

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CAMPUS SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**Bruno Henrique Saranholi**

**Genética populacional de felinos e as ameaças para *Puma concolor*: estruturação populacional recente e atropelamentos**

São Carlos – SP

2018

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
**CAMPUS SÃO CARLOS**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA**  
**MOLECULAR**

**TESE DE DOUTORADO**

**Genética populacional de felinos e as ameaças para *Puma concolor*: estruturação populacional recente e atropelamentos**

**Bruno Henrique Saranholi**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, para obtenção do título de doutor em Ciências, Área de concentração em Genética e Evolução.

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

São Carlos - SP

2018

**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 do candidato Bruno Henrique Saranholi, realizada em 25/06/2018:

---

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
UFSCar

---

Prof. Dr. Fernando de Faria Franco  
UFSCar

---

Prof. Dr. Vlamir Jose Rocha  
UFSCar

---

Profa. Dra. Katia Maria Paschoaletto Micchi de Barros Ferraz  
USP

---

Profa. Dra. Marina Corrêa Côrtes  
UNESP

***Dedicatória***

*A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a elaboração deste trabalho, em especial aos meus pais que sempre me apoiaram e à Carla que esteve presente em cada etapa. Obrigado!*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador Prof. Dr. Pedro M. Galetti Jr. pela oportunidade em desenvolver este trabalho e por me permitir estar vinculado a outros projetos, ampliando a minha experiência e o meu desenvolvimento para a carreira acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da UFSCar por permitir e viabilizar o desenvolvimento do projeto e a minha formação.

Ao LabBMC por todas as conversas para resolvermos juntos os desafios dos trabalhos. Em especial aos amigos Ueslei Lopes nas conversas e ajuda de campo, ao amigo Lucas Caldano nas longas caminhadas para as coletas, à Karen G. Rodríguez-Castro pelas conversas constantes para resolvermos os desafios dos microsatélites, ao companheiro de coleta Pedro Gallo, à amiga Karla Chávez-Congrains por todas as ajudas, ao amigo Raphael de Oliveira pelas amostras e por sempre estar disposto a contribuir. Obrigado a todos do Lab!!!

Aos companheiros de projeto da equipe PCMC (Fred, Fernanda, Mozart, Caio, Isis e Rich). Obrigado pela parceria e pela oportunidade e experiência em poder participar das atividades de captura. Foi incrível!

À Sandra Cavalcanti e a Pró-carnívoros pela colaboração e amostras.

A todos que contribuíram com amostras: À Prof. Dra. Karin Werther e Aline B. de Souza da Unesp Jaboticabal, ao Prof. Dr. Carlos Teixeira e toda a equipe do CEMPAS-Unesp Bauru, a Luiz Pires e Maria Emília (Mila) do Zoológico Municipal de Bauru, a Rodrigo Teixeira e toda a equipe do Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros de Sorocaba, à Claudia Hashimoto através do Criadouro Fortaleza de Felinos Selvagens, à Cristina H. Adania da Associação Mata Ciliar e do Centro Brasileiro para Conservação dos Felinos Neotropicais.

Às unidades de conservação e a suas equipes que sempre apoiaram: a Estação Ecológica dos Caetetus e seu gestor Nelson Gallo e ao Fábio que sempre deu apoio nas

coletas, a todas da equipe da Floresta Nacional de Capão Bonito, ao Parque Estadual Carlos Botelho, à Fazenda Rio Claro-DURATEX. Ao Instituto Florestal, COTEC e SISBIO pelas autorizações para as coletas.

Ao Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros-CENAP pelas amostras cedidas e também por viabilizar o desenvolvimento do projeto, em especial ao pesquisador Dr. Ronaldo Morato.

Aos amigos Paulo Ruffino e Mariano Bergel na colaboração com amostras e parcerias constantes.

Ao Prof. Dr. Carlos Alberts pela confiança em podermos contribuir em um importante estudo, culminante em uma publicação importante para os felinos.

À Renata Miotto pela colaboração com dados, discussões, ideias e por estar sempre disposta a conversar e contribuir.

Aos Professores membros da banca por terem aceitado o convite em avaliar e contribuir com o trabalho. Obrigado!

À minha família, em especial aos meus pais por sempre estarem me apoiando e confiando na minha trajetória, obrigado! À minha esposa Carla por me acompanhar em todas as etapas deste processo, me motivando, acalmando e comemorando juntos cada conquista.

Às ONGs *IdeaWild* e *Neotropical Grassland Conservancy* pelo apoio em equipamentos e ajudas de custo com atividades de campo.

À FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo), pela bolsa concedida (Processo nº 2013/24453-4) e pelo apoio financeiro nas atividades de campo e de aperfeiçoamento profissional.

***Obrigado a todos!!!***

“So, don’t believe anyone who says that since nature is based on a struggle for life, we need to live like this as well. Many animals survive not by eliminating each other or keeping everything for themselves, but by cooperating and sharing.”

Frans de Waal

## RESUMO

As espécies em todo o mundo estão cada vez mais expostas à novas ameaças devido às atividades antrópicas. A principal ameaça atualmente corresponde à modificação da paisagem, resultando em alterações nos padrões demográficos e genéticos das populações das espécies. A perda e fragmentação do habitat pode levar à redução do tamanho populacional e, dessa forma, alterar as relações entre as espécies que compõe uma comunidade. A mudança na paisagem também pode impor barreiras ao deslocamento dos indivíduos, limitando o fluxo gênico entre as populações. Além disso, a necessidade de buscar novas áreas para estabelecer territórios, devido a diminuição de seus habitats naturais, expõe as espécies a novas ameaças, entre elas, o atropelamento, considerada hoje uma grande ameaça para as espécies. Nesse cenário, alguns grupos são ainda mais sensíveis, por exemplo os carnívoros, que já ocorrem naturalmente em baixas densidades e necessitam de grandes áreas de vida. Nesse sentido, este trabalho teve como principais objetivos avaliar os aspectos demográficos (tamanho populacional mínimo, abundância e densidade) da comunidade de felinos em quatro áreas no estado de São Paulo (Estação Ecológica dos Caetetus, Fazenda Rio Claro da Duratex, Floresta Nacional de Capão Bonito e Parque Estadual Carlos Botelho) através da coleta de amostras não invasivas (fezes) em conjunto com técnicas moleculares. Além disso, tendo a espécie *P. concolor* como modelo, verificamos a distribuição da sua diversidade genética e ocorrência de estruturação populacional em uma paisagem fragmentada no estado de São Paulo e Minas Gerais. Também avaliamos o impacto da perda de indivíduos por atropelamentos em uma população local de *P. concolor* utilizando os dados genéticos para uma análise de viabilidade populacional. Os resultados mostram uma influência das características das áreas para a ocorrência das espécies de felinos diretamente relacionadas às suas características e necessidades. Os resultados também indicam que a perda e fragmentação do habitat já podem estar influenciando na dispersão de indivíduos de *Puma concolor*, resultando na estruturação de suas populações. Espécie essa que também sofre o impacto dos atropelamentos na perda de indivíduos, e em longo prazo, pode também trazer impactos na diversidade genética nas suas populações. Dessa forma, este trabalho demonstra, sob diferentes aspectos, os impactos demográficos e genéticos sofridos pelas espécies de felinos em um ambiente cada vez mais alterado.

**Palavras-chaves:** Carnívoros; Dispersão; Genética da conservação; Viabilidade populacional; Microsatélites.



## ABSTRACT

Species around the world are increasingly exposed to new threats due to human activities. The main threat is the landscape modification by human activities, resulting in demographic and genetic pattern changes of species populations. Habitat loss and fragmentation may promote the reduction of population size and thus can result in changes in species community. In addition, the modification of landscape can act as a barrier to the individuals movement, limiting gene flow and the population viability. In addition, the needs of searching for new areas to the establishment of territories, may expose individuals to new threats, such as road killing, which is currently considered an important threat to species. In this scenario, some groups are even more sensitive, for example carnivores, which already occur naturally in low densities and require large home ranges. In this sense, this work had as main objectives to evaluate the demographic aspects (minimum population size, abundance and density) of the feline community in four study areas in São Paulo state (Estação Ecológica dos Caetetus, Fazenda Rio Claro da Duratex, Floresta Nacional de Capão Bonito e Parque Estadual Carlos Botelho) using non-invasive sampling and molecular technics. In addition, considering *P. concolor* as a model, we verified the distribution of its genetic diversity and the occurrence of population structuring in a fragmented landscape within São Paulo and Minas Gerais states. We also evaluated the impact of the loss of individuals due to road killing for the population viability of *Puma concolor*. The results show an influence of the characteristics of the areas for the occurrence of feline species directly related to their characteristics and requirements. In addition, the results indicate that the loss and fragmentation of the habitat already may represent an important factor for the dispersion of individuals of *P. concolor*, resulting in the structuring of their populations. This species also suffers the impact of road killing on the loss of individuals which, in long term, also may represent a loss of genetic diversity in their populations. In this way, this work demonstrates, under different aspects, the demographic and genetic impacts on feline species in an increasingly modified environment.

**Keywords:** Carnivorous; Dispersion; Conservation Genetics; Population viability; Microsatellites.

## LISTA DE FIGURAS

### Fundamentação teórica

**Figura 1.** Espécies de felinos estudadas: (A) *Puma concolor*; (B) *Leopardus pardalis*; (C) *Leopardus guttulus*; (D) *Puma yagouaroundi*. Fotos: (A) Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado; (B) Gestich C.C. & Saranholi B.H.; (C) Projeto gatos do mato; (D) kevinschafer.com. .... 34

**Figura 2.** Distribuição das espécies de felinos. (A) *Puma concolor*; (B) *Leopardus pardalis*; (C) *Leopardus guttulus*; (D) *Puma yagouaroundi*. Fonte: Adaptado de IUCN 2018. .... 35

### Capítulo I

**Figura I.1.** Mapa da localização das quatro áreas de estudo. .... 43

**Figura I.2.** Amostra fecal deposita por felino (A) e armazenamentos das amostras fecais em tubos de polipropileno com etanol (B). .... 44

**Figura I.3.** Valores de  $P_{id}$  e  $P_{idsibs}$  para o conjunto de microssatélites empregados para cada espécie. .... 57

**Figura I.4.** Representação das áreas efetivamente amostradas representadas pelos *buffers* para cada espécie em cada área de estudo. EEC: Estação Ecológica dos Caetetus; FRC Fazenda Rio Claro Duratex; FNCB: Floresta Nacional Capão Bonito; PECB: Parque Estadual Carlos Botelho. .... 61

### Capítulo II

**Figura II.1.** Áreas de estudo representando as áreas de coleta para as amostras fecais, os atropelamentos e a captura de indivíduos. (A) Destaque para as três áreas de coleta de amostras de fezes: Estação Ecológica dos Caetetus (vermelho); Fazenda Rio Claro da Duratex (roxo); Floresta Nacional de Capão Bonito (amarelo). .... 68

**Figura II.2.** Coletas das amostras em campo. (A), (B), (C): busca por vestígios e amostras não-invasivas. (D): Participação nas campanhas de captura com a equipe do PCMC para coleta de amostras. (E): Indivíduo de onça-parda atropelado. .... 70

**Figura II.3.** Análise de correlação entre a distância genética e a distância geográfica (Teste de Mantel), indicando baixa correlação entre os valores ( $r^2=0,053$ ,  $p>0,05$ ). .... 76

**Figura II.4.** Análise bayesiana conduzida no *software* Structure. Os gráficos indicam a presença de  $K=2$  (A) de acordo com o método de Evanno e colaboradores (2005) (C) e  $K=3$  (B) de acordo com o método de Pritchard et al. (2000) (D)..... 77

**Figura II.5.** A análise de componentes fatoriais (FCA - *Factorial Component Analysis*), indicando a presença de três *clusters*: **grupo-1, branco**: indivíduos do triangulo-mineiro; **grupo-2, amarelo**: indivíduos atropelados localizados ao norte do estado de São Paulo; **grupo-3, azul**: indivíduos da coleta não invasiva juntamente com os indivíduos atropelados ao sul do estado de São Paulo. .... 77

**Figura II.6.** Análise de componentes principais discriminantes-DAPC, indicando a presença de três *clusters*: **grupo-1**: indivíduos do triangulo-mineiro; **grupo-2**: indivíduos da coleta não invasiva juntamente com os indivíduos atropelados ao sul do estado de São Paulo e os três indivíduos capturados com o projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê; **grupo-3**: indivíduos atropelados localizados ao norte do estado de São Paulo. **(B)** Valores de BIC (*Bayesian Information Criterion*) para cada número de *clusters*, indicando que o número mais provável de *clusters* é 3. .... 78

**Figura II.7.** *Clusters* identificados pela análise bayesiana com modelo espacial. O número de  $K$  mais provável indicado pela análise é  $K=3$ , como indicado pelo número mais provável de  $K$  ao longo das cadeias **(A)**, assim como pela distribuição dos indivíduos alocados em três diferentes *clusters* **(B)**. O *cluster 1* é formado pelos indivíduos da coleta não invasiva juntamente com os indivíduos atropelados ao sul do estado de São Paulo e os indivíduos capturados pelo projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê; o *cluster 2* é formado pelos indivíduos atropelados localizados ao norte do estado de

São Paulo e o *cluster* 3 é formado pelos indivíduos capturados no do triângulo-mineiro (C). Os pontos pretos representam a localidades dos indivíduos. Valores mais alto de probabilidade de pertencer ao *cluster* são representados pelas cores amarela e branca. 79

**Figura II.8.** Definição dos três *clusters* detectados após as análises de estruturação populacional. .... 82

### *Capítulo III*

**Figura III.1.** Área de estudo e pontos de atropelamento. .... 91

**Figura III.2.** Indivíduo fêmea jovem encontrada atropelada na rodovia Washington Luiz próximo a São Carlos-SP. .... 91

**Figura III.3.** Gráficos das probabilidades de permanência da população em diferentes cenários. A: tamanho populacional inicial 150 e sem sexo com dispersão preferencial; B: tamanho populacional inicial 70 e sem sexo com dispersão preferencial; C: tamanho populacional inicial 150 e com machos com dispersão preferencial; D: tamanho populacional inicial 70 e com machos com dispersão preferencial. ....100

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo I

<b>Tabela I.1.</b> Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites isolados para <i>Puma concolor</i> .....	46
<b>Tabela I.2.</b> Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites utilizados para <i>L. pardalis</i> , <i>L. guttulus</i> e <i>P. yagouaroundi</i> ). ....	47
<b>Tabela I.3.</b> Valores das áreas de vida e dos raios utilizados para o cálculo da área efetivamente amostrada. ....	50
<b>Tabela I.4.</b> Resultado da identificação molecular das amostras coletadas por área .....	51
<b>Tabela I.5.</b> Individualização das amostras de fezes de cada espécie em cada área de estudo.....	58
<b>Tabela I.6.</b> Estimativas de abundância de cada espécie para cada área de estudo .....	60
<b>Tabela I.7.</b> Áreas efetivamente amostradas para cada espécie nas áreas de estudo. ....	61
<b>Tabela I.8.</b> Densidade das espécies nas áreas de estudo. ....	62

### Capítulo II

<b>Tabela II.1.</b> Origem dos indivíduos analisados de <i>P. concolor</i> . ....	75
<b>Tabela II.2.</b> Valores de $F_{st}$ par-a-par para os três <i>clusters</i> detectados. ....	80
<b>Tabela II.3.</b> Valores de $D_{est}$ par-a-par para os três <i>clusters</i> detectados. ....	80
<b>Tabela II.4.</b> Valores de diversidade genética para cada <i>cluster</i> . ....	86

### Capítulo III

<b>Tabela III.1.</b> Parâmetros para a análise de viabilidade populacional (PVA). ....	95
<b>Tabela III.2.</b> Valores dos parâmetros de diversidade genética para cada sexo. ....	97

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

**μM** - micromolar

**Ae** - Alelos efetivos

**ATP6** - ATP sintetase F0 subunidade 6

**BIC** - *Bayesian Information Criterion*

**BSA** - *Bovine Serum Albumin*

**pmol** - picomol

**CEUA** - Comissão de Ética no Uso de Animais

**COTEC** - Comissão Técnico-Científica

**Cytb** - *cytochrome b*

**DAPC** - *Discriminant analysis of principal components*

**DNAmt** – DNA mitocondrial

**EEC** – Estação Ecológica dos Caetetus

**FCA** - *Factorial component analysis*

**FNCB** – Floresta Nacional de Capão Bonito

**FRC** – Fazenda Rio Claro

**GPS** - *Global positioning system*

**ha** - hectares

**He** - Heterozigosidade esperada

**Ho** - Heterozigosidade observada

**ICMBIO** - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

**MCMC** - *Markov chain Monte Carlo*

**mg** - miligramas

**mL** - mililitros

**mM** - milimolar

**MMA** – Ministério do meio ambiente

**N** - Número de Indivíduos

**Na** - Número de alelos

**NCBI** - *National Center of Biotechnology Information*

**Ne** – tamanho populacional efetivo

**ng** - nanogramas

**Nm** – número de migrantes por geração

**Pa** - Alelos privados

**pb** – pares de base

**PCI** - Conteúdo de informação polimórfica

**PCR** - *Polymerase chain reaction*

**PECB** – Parque estadual Carlos Botelho

**PIC** - Conteúdo de informação polimórfica

**P<sub>id</sub>** - *probability of identity*

**P<sub>idsibs</sub>** - *probability of identity of siblings*

**PVA** - *probability viability analysis*

**Ra** - Riqueza alélica

**SISBIO** - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade

**SAA** – *Spatial Autocorrelation analysis*

**TIRM** - *two innate rates model*

## SUMÁRIO

1. Apresentação .....	19
2. Fundamentação teórica.....	21
2.1. A perda e fragmentação do habitat .....	21
2.2. As consequências da perda e fragmentação do habitat para as populações de carnívoros .....	23
2.3. Genética da conservação e o uso dos marcadores moleculares.....	25
2.4. A amostragem não invasiva e as técnicas moleculares: uma abordagem eficiente para espécies elusivas .....	27
2.5. As espécies foco deste trabalho.....	29
2.5.1. A onça-parda ( <i>Puma concolor</i> (Linnaeus, 1771)).....	30
2.5.2. A jaguatirica ( <i>Leopardus pardalis</i> (Linnaeus, 1758)).....	32
2.5.3. O gato-do-mato-pequeno ( <i>Leopardus guttulus</i> (Hensel, 1872)) .....	33
2.5.4. O gato-mourisco ( <i>Puma yagouaroundi</i> (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803)).....	34
3. Hipóteses e Objetivos .....	37
3.1. Hipóteses .....	37
3.2. Objetivo Geral .....	38
3.3. Objetivos específicos.....	39
4. <i>Capítulo I: Estimativas demográficas e composição da comunidade de felinos em remanescentes do estado de São Paulo por meio da amostragem não invasiva</i> .....	41
4.1. Introdução.....	41
4.2. Material e Métodos.....	43
4.2.1. Área de estudo .....	43
4.2.2. Obtenção das amostras, armazenamento e extração do DNA.....	45
4.2.3. Identificação molecular da espécie das amostras de fezes .....	46
4.2.4. Individualização molecular das amostras.....	48
4.2.5. Sexagem molecular .....	50
4.2.6. Análises demográficas.....	51
4.3. Resultados e Discussão .....	52
4.3.1. Identificação molecular das amostras.....	52



4.3.2. Ocorrência das espécies.....	56
4.3.3. Poder de individualização dos microssatélites e detecção dos indivíduos amostrados.....	57
4.3.4. Abundância, Densidade e avaliação entre as relações demográficas entre as espécies.....	61
4.4. Conclusões.....	64
5. <i>Capítulo II: Estruturação populacional e diversidade genética de <i>Puma concolor</i> em uma paisagem fragmentada</i> .....	67
5.1. Introdução.....	67
5.2. Material e Métodos.....	69
5.2.1. Área de estudo.....	69
5.2.2. Coleta, armazenamento das amostras e extração do DNA.....	71
5.2.3. Identificação molecular da espécie das amostras de fezes.....	74
5.2.4. Individualização molecular das amostras de fezes e obtenção dos genótipos para todas as amostras.....	74
5.2.5. Sexagem molecular.....	75
5.2.6. Análises genéticas.....	76
<i>Estruturação populacional</i> .....	76
<i>Diversidade Genética</i> .....	78
5.3. Resultados e Discussão.....	78
5.3.1. Amostras individualizadas e indivíduos analisados.....	78
5.3.2. Estruturação Populacional.....	79
5.3.3. Diversidade Genética.....	88
5.4. Conclusões.....	91
6. <i>Capítulo III: O Atropelamento como ameaça para a espécie <i>Puma concolor</i>: viés no atropelamento entre os sexos e o impacto para a genética e viabilidade de uma população</i> .....	92
6.1. Introdução.....	93
6.2. Material e Métodos.....	94
6.2.1. Área de estudo e Obtenção das amostras.....	94
6.2.2. Armazenamento e extração do DNA.....	96
6.2.3. Sexagem molecular e viés do sexo mais atropelado.....	96

6.2.4. Contribuição genética diferencial para cada sexo .....	97
6.2.5. Tamanho populacional efetivo e análise de viabilidade populacional .....	98
6.3. Resultados e Discussão .....	99
6.3.1. Viés sexual nos atropelamentos .....	99
6.3.2. Valores de diversidade genética para cada sexo .....	100
6.3.3. Tamanho populacional efetivo e Viabilidade populacional .....	102
6.4. Conclusões.....	103
7. Considerações finais.....	104
8. Referências .....	106

## 1. Apresentação

Esta tese está dividida em diferentes capítulos para melhor apresentação dos resultados. Inicialmente, apresento uma fundamentação teórica para compreensão de todos os aspectos abordados no trabalho, seguida de três capítulos em formato de artigos científicos a serem submetidos. Posteriormente, faço considerações finais levando-se em conta principalmente aspectos para a conservação das espécies. Por fim, apresento nossas conclusões com os principais resultados e contribuições obtidas ao longo do trabalho.

No primeiro capítulo, verificamos aspectos demográficos (ocorrência e estimativas de abundância e densidade) das espécies de felinos que compõem a comunidade das populações estudadas: *Puma concolor*, *Leopardus pardalis*, *Leopardus guttulus* e *Puma yagouaroundi*. Nesse estudo utilizamos amostras fecais e técnicas moleculares para identificação molecular das amostras e detecção dos indivíduos amostrados. Além da descrição dos aspectos demográficos, também discutimos as possíveis relações de competição envolvidas entre as espécies que compõem essa comunidade e como isso afeta a demografia das espécies de menor porte.

O segundo capítulo faz uso de todo o conjunto de amostras obtido para a espécie *P. concolor*, incluindo amostras fecais, atropelamentos e indivíduos capturados, para avaliar a distribuição da sua diversidade genética e verificar a ocorrência de estruturação genética. Em um estudo prévio durante o desenvolvimento do projeto de doutorado, constatamos a ocorrência de estruturação populacional para *P. concolor* em fina escala para uma região altamente antropizada no interior do estado de São Paulo (SARANHOLI et al. 2017). Desse modo, no segundo capítulo desta tese, nosso objetivo foi avaliar esses mesmos parâmetros em uma escala geográfica mais ampla. A espécie *P. concolor* foi utilizada como modelo, pois além de ter sido a espécie melhor representada do ponto de vista amostral, também é considerada a espécie mais generalista entre as estudadas devido a capacidade de usar habitats mais modificados. Portanto, os resultados para a onça-parda sobre as consequências da modificação do habitat podem ser utilizados como parâmetros para as demais espécies que são consideradas mais sensíveis, auxiliando em medidas práticas de conservação.

No terceiro capítulo abordamos uma das principais ameaças atuais para as espécies de carnívoros de médio e grande porte, o atropelamento de fauna. Dessa forma, esse capítulo aborda não somente uma avaliação do número de indivíduos de onça-parda atropelados, espécie altamente impactada por essa ameaça em nossas áreas de estudo, mas também o impacto genético em uma população local devido à perda e retirada de indivíduos. Tal perda pode afetar a viabilidade dessa população em longo prazo.

Paralelamente ao desenvolvimento desta tese, nos envolvemos com outras questões relacionadas ao estudo de carnívoros empregando as análises genéticas e ferramentas moleculares. No trabalho de Alberts e colaboradores (2017), mostramos a aplicabilidade e eficiência das ferramentas moleculares na identificação de amostras fecais para as espécies de felinos brasileiros. Em Rodríguez-Castro (2018) desenvolvemos um novo conjunto de *primers mini-barcodings* para aumentar a eficiência da identificação de amostras fecais para espécies de felinos e canídeos, permitindo também um maior aproveitamento das amostras fecais para estudos genéticos e ecológicos. No trabalho de Saranholi e colaboradores (2017) detectamos pela primeira vez na América do Sul estruturação populacional para a onça-parda. Em Souza e colaboradores (2017) “redescobrimos” três indivíduos de onça-pintada (*Panthera onca*) em uma área do Parque Estadual da Serra do Mar (Núcleo anta Virgínia) onde a espécie era considerada localmente extinta, mostrando a importância da abordagem não invasiva com técnicas moleculares para estudos de espécies elusivas. Todos esses trabalhos contribuíram para a nossa experiência e formação.

Dessa forma, as diferentes abordagens realizadas ao longo deste trabalho permitiram compreender melhor aspectos ecológicos, demográficos e genéticos, além de propor e mostrar a aplicabilidade das técnicas moleculares para o estudo das espécies de carnívoros. Os principais resultados auxiliam a entender como essas espécies respondem a um ambiente cada vez mais impactado e, ao mesmo tempo, podem influenciar ações de conservação.

## 2. Fundamentação teórica

### 2.1. A perda e fragmentação do habitat

A perda e fragmentação do habitat em decorrência das atividades humanas têm sido reconhecidas como as principais responsáveis pelo declínio e isolamento de populações em espécies do mundo todo (HADDAD et al., 2015; SCHIPPER et al., 2008). Este processo de fragmentação da paisagem pode criar barreiras ao fluxo gênico (GERLACH; MUSOLF, 2000), reduzindo a diversidade genética e, assim, diminuir a viabilidade em longo prazo das populações (FRANKHAM, 2010). Dessa forma, muitas espécies já apresentam perda da diversidade genética ou estruturação de suas populações decorrente desse processo (ERNEST et al., 2014; HAAG et al., 2010; MCMANUS et al., 2015; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017; SINGH et al., 2017; SRBEK-ARAUJO et al., 2018). Até mesmo espécies consideradas de hábitos mais generalistas quanto ao uso do habitat, por exemplo aquelas que toleram ambientes alterados, já sofrem essas consequências, resultando na redução do fluxo gênico e estruturação de suas populações em paisagens dominadas pela interferência humana (DUTTA et al., 2013; ERNEST et al., 2014; MCMANUS et al., 2015; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017).

No Brasil, os biomas Mata Atlântica e o Cerrado vêm sofrendo com os impactos das ações antrópicas e apresentam um histórico de fragmentação bem antigo. São considerados dois dos principais *hotspots* mundiais para a conservação justamente devido ao grau de ameaça em que se encontram e à grande biodiversidade que abrigam, incluindo muitas espécies endêmicas (MYERS et al., 2000).

Atualmente, a Mata Atlântica apresenta apenas cerca de 16% dos 150 milhões de ha de sua cobertura original (RIBEIRO et al., 2009). O maior contínuo ainda existente desse bioma encontra-se na Serra do Mar, estendendo-se do Estado do Paraná até o sul do Estado do Rio de Janeiro, representando 7% de todo o seu remanescente. No entanto, a maior parte dos remanescentes está distribuída em pequenos fragmentos (menores que 50 ha), representando 80% da sua cobertura atual (RIBEIRO et al., 2009). No estado de São

Paulo, região da Mata Atlântica onde este trabalho foi conduzido, esse bioma vem sofrendo com as atividades antrópicas há muito tempo. Em 1962, os seus remanescentes já representavam apenas cerca de 29% da sua cobertura original para o estado e, atualmente, recobre apenas cerca de 14% da sua cobertura original no estado (METZGER; RODRIGUES, 2008). Apesar do grande impacto que vem sofrendo, a Mata Atlântica ainda abriga uma grande diversidade de espécies, incluindo cerca de 620 espécies de aves, 200 de répteis, 280 de anfíbios e 261 espécies de mamíferos, sendo que para os mamíferos, 28% dessas espécies são consideradas endêmicas (MYERS et al., 2000). Devido a essa grande diversidade de mamíferos, a Mata Atlântica abriga hoje cerca de 69% das espécies consideradas em algum grau de ameaça de acordo com a lista nacional da fauna ameaçada de extinção (CHIARELLO et al., 2008).

Da mesma forma que a Mata Atlântica, o Cerrado também sofre diretamente com as atividades antrópicas. O início de sua grande ocupação e impacto antrópico deu-se no começo do século XVIII com atividades como a mineração e a pecuária (BRASIL, 2000), seguida da ocupação pela expansão da fronteira agrícola e início da construção de Brasília na década de 1950 (DE OLIVEIRA; FERREIRA; GARVEY, 2018). Na década de 1970, o Cerrado também passou por uma intensificação de perda de hábitat devido à implementação do Programa “Pró-Álcool” (SIMÕES DE CASTRO et al., 2010), que incentivou o plantio de cana-de-açúcar. Dessa forma, calcula-se que mais da metade da sua cobertura original tenha sido removida nos últimos 35 anos (KLINK; MACHADO, 2005). Machado e colaboradores (2004) consideram que cerca de 55% da área do cerrado já foi convertida em outras coberturas devido ações antrópicas. Entre as principais mudanças, estão grandes plantações de soja, pastagem (KLINK; MACHADO, 2005; KLINK; MOREIRA, 2002) e, mais recentemente, o cultivo da cana-de-açúcar (SIMÕES DE CASTRO et al., 2010). O Cerrado também abriga uma grande diversidade de espécies e um grande endemismo (KLINK; MACHADO, 2005; MYERS et al., 2000). No entanto, essa fauna encontra-se cada vez mais ameaçada devido à perda de habitat e ausência de

áreas para a conservação desse importante bioma, uma vez que apenas 2% de sua área atual está inserida em unidades de conservação (KLINK; MACHADO, 2005).

## **2.2. As consequências da perda e fragmentação do habitat para as populações de carnívoros**

Algumas espécies podem ser ainda mais suscetíveis a esse cenário de perda e fragmentação do habitat devido às suas características e necessidades. Entre essas espécies, os carnívoros podem ser considerados particularmente mais sensíveis devido à baixa densidade em que naturalmente ocorrem, necessidade de grandes áreas de vida e até mesmo devido ao aumento do contato com o ser humano, resultando em conflitos com essas espécies (CARDILLO et al., 2005; CROOKS, 2002; NOSS et al., 1996; RIPPLE et al., 2014a).

A perda e fragmentação do habitat obriga os indivíduos a dispersarem em busca de novas áreas para estabelecer o seu território, uma vez que às áreas disponíveis podem não ser suficientes, expondo as populações à novas ameaças, como o atropelamento dos animais ao transitarem por essa paisagem cada vez mais antropizada (CEIA-HASSE et al., 2017; MIOTTO et al., 2012). Tal comportamento torna o atropelamento uma das principais ameaças para esse grupo atualmente (CEIA-HASSE et al., 2017). Dessa forma, suas populações encontram-se cada vez mais restritas à pequenas áreas e reduzidas a poucos indivíduos (RIPPLE et al., 2014). Além disso, a alteração da paisagem associada às barreiras criadas por atividades humanas, como rodovias, grandes monoculturas e a urbanização, podem afetar negativamente as espécies ao reduzir o deslocamento dos indivíduos e conseqüentemente afetar o fluxo gênico, inclusive para carnívoros com grande capacidade de dispersão e maior tolerância à paisagens com atividade humana (DUTTA et al., 2013; LOXTERMAN, 2011; MCMANUS et al., 2015; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017). Assim, o impacto das ações antrópicas sobre os carnívoros pode representar um risco de extinção local dessas espécies (CROOKS et al., 2011; DUTTA et al., 2013; RIPPLE et al., 2014).

Alterações em aspectos demográficos e genéticos nas populações de carnívoros também podem afetar populações de outras espécies, devido esse grupo desempenhar um importante papel no ecossistema no controle dessas populações (SERGIO et al., 2008; TERBORGH et al., 2001). Os carnívoros controlam o tamanho populacional de suas presas através da predação, diminuindo principalmente a densidade de herbívoros, que afetariam a comunidade de plantas e, conseqüentemente, toda a dinâmica do ecossistema em que está presente (RIPPLE; BESCHTA, 2012).

O desequilíbrio nas populações de grandes carnívoros também pode afetar as populações de carnívoros de menor porte, provocando alterações no seu tamanho populacional (PRUGH et al., 2009; RIPPLE et al., 2013), ou ainda, levar a uma restrição de sua área de vida, mantendo-os em habitats subótimos (MITCHELL; BANKS, 2005; TANNERFELDT; ELMHAGEN; ANGERBJÖRN, 2002). Essa interação ocorre por possível competição direta por recursos; por se evitarem a partir de contato visual ou olfativo (o que pode acarretar em mudança de uso do habitat); ou inclusive por predação direta das espécies menores pelas maiores (CARO; STONER, 2003). Uma dessas primeiras observações foram feitas por Crooks e Soulé (1999) que observaram que a redução das populações de coiotes (*Canis latrans*, predador de topo) ocasionava o aumento de predadores menores (gatos domésticos, gambás e guaxinins) (CROOKS; SOULÉ, 1999).

Os predadores de topo são espécies que ocupam o nível trófico superior em uma comunidade, geralmente possuem grande tamanho corpóreo e são grandes caçadores, enquanto os mesopredadores possuem tamanho menor e ocupam o nível trófico inferior (RITCHIE; JOHNSON, 2009). O aumento da densidade de mesopredadores pela ausência ou diminuição da densidade de predadores de topo é conhecido como efeito de “liberação de mesopredador” (CROOKS; SOULÉ, 1999). No caso das espécies de felinos brasileiros, Oliveira et al. (2010) relatam que o aumento da densidade de jaguatiricas (*Leopardus pardalis*), considerada um mesopredador, afeta negativamente a presença de felinos menores como o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*), gato maracajá (*Leopardus*



*wiedii*), gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) e o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*); essa interação foi chamada de “efeito pardalis” (OLIVEIRA et al., 2010). Esse seria um exemplo de como a alteração da paisagem poderia favorecer uma espécie, no caso *L. pardalis*, e provocar alterações dentro da comunidade das espécies.

### **2.3. Genética da conservação e o uso dos marcadores moleculares**

A genética da conservação tem como principal objetivo a conservação da biodiversidade no nível dos genes, uma das três categorias (genes, espécies e ecossistemas) consideradas na conservação da biodiversidade (MCNEELY et al., 1990). Fazendo uso das teorias da genética, busca compreender as principais consequências da redução das populações naturais frente às alterações ambientais que, dessa forma, passam a ser mais suscetíveis a efeitos estocásticos (FRANKHAM, 2009; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002).

O uso de técnicas moleculares e análises genéticas permitem esclarecer e investigar aspectos importantes sobre a biologia das espécies como a resolução de incertezas taxonômicas, os efeitos deletérios da endogamia, estudos da diversidade genética para que possa ser avaliado como as populações poderão responder diante de mudanças ambientais, estudos de estruturação populacional, fluxo gênico, entre outros. Essas informações serão úteis no direcionamento de medidas práticas de manejo para a conservação e, assim, a genética da conservação pode auxiliar na proposição de medidas para reduzir o risco de extinção das espécies (FRANKHAM, 2009; FRANKHAM; BRISCOE; BALLOU, 2002). Entre exemplos bem-sucedidos de medidas práticas para a conservação, podemos citar o caso da Pantera da Flórida. Nesse caso, a população de onças-pardas do Flórida (Estados Unidos) foi reduzida a poucos indivíduos devido à perda de habitat e aumento das atividades antrópicas (ROELKE; MARTENSON; O'BRIEN, 1993) e, graças ao monitoramento genético dessa e outras populações, foi possível translocar novos indivíduos, garantindo o aumento dessa população e também restaurando a sua diversidade genética (JOHNSON et al., 2010).

Cada marcador molecular empregado nas análises genéticas apresenta características próprias, assim, cada um deles é mais adequado à resolução de questões específicas (PEREZ-SWEENEY; RODRIGUES; MELNICK, 2003). Na Genética da Conservação, eles podem ser aplicados simplesmente para verificar a presença da espécie em determinada área através da confirmação molecular de uma amostra ou vestígio, por exemplo fezes ou pelos, deixados no local (FARRELL; ROMAN; SUNQUIST, 2000; SOUZA et al., 2017; TABERLET; BOUVET, 1992), avaliação do número de indivíduos presentes no local através da individualização molecular de amostras (MIOTTO et al., 2014; SOLBERG et al., 2006), diversidade genética (MIOTTO et al., 2011), estruturação populacional (DUTTA et al., 2013a; MCMANUS et al., 2015; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017; SRBEK-ARAÚJO et al., 2018) entre outros dados.

Entre os marcadores moleculares, as regiões ou genes no DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) apresentam como principais características ausência de recombinações, alta taxa de evolução e alto polimorfismo em algumas regiões, permitindo que seja utilizado na identificação de espécies, até mesmo a partir de pequenas sequências (CHAVES et al., 2012; FARRELL; ROMAN; SUNQUIST, 2000; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2018), tornando-o efetivo quando se trabalha com amostras que apresentam baixa quantidade e integridade de DNA, como no caso das amostras não invasivas.

Já entre os marcadores nucleares, os microssatélites são amplamente utilizados em estudos populacionais, investigando a diversidade genética, estruturação populacional, análises de parentesco, entre outros objetivos (BROQUET; MÉNARD; PETIT, 2006; RODGERS; JANEČKA, 2013; SELKOE; TOONEN, 2006). Os microssatélites são pequenas sequências de um a seis pares de bases repetidos lado a lado (ZANE; BARGELLONI; PATARNELLO, 2002). Essas unidades podem ser dímeros, trímeros, tétrades ou uma combinação deles (compostos). Possuem ampla distribuição no genoma, tamanho pequeno e alto grau de polimorfismo (SCHLÖTTERER; TAUTZ, 1992; SPRINGER et al., 2001). Apresentam herança codominante, ou seja, é possível identificar os dois alelos de um *locus* separadamente (SUNNUCKS, 2000), são considerados

seletivamente neutros, ou seja, não codificam nenhum produto na maioria dos seus *loci*, o que possibilita que sejam utilizados para comparar a diversidade genética entre populações (SELKOE; TOONEN, 2006). Os seus produtos de amplificação são geralmente pequenos, o que possibilita que sejam empregados em amostras não invasivas (BEJA-PEREIRA et al., 2009), onde geralmente encontramos um DNA degradado. Além disso, a partir da utilização de um painel *multilocus* (BEJA-PEREIRA et al., 2009; BROQUET; MÉNARD; PETIT, 2006), permite a individualização de amostras, característica essa que também permite o seu emprego em amostras não invasivas, cuja origem do indivíduo nem sempre é possível de se obter em campo.

Assim, além das análises genéticas permitirem acessar diversos tipos de informações sobre as espécies, ao permitirem a obtenção dos dados sem a captura do animal a partir da amostragem não invasiva também minimizam os impactos nas populações de estudo (BEJA-PEREIRA et al., 2009; BROQUET; MÉNARD; PETIT, 2006; RODGERS; JANEČKA, 2013). Essa abordagem torna-se ainda mais valiosa para espécies como os carnívoros, espécies que devido seus hábitos elusivos, representam um grupo de difícil obtenção de amostras biológicas.

#### **2.4. A amostragem não invasiva e as técnicas moleculares: uma abordagem eficiente para espécies elusivas**

A utilização de amostras não invasivas, ou seja, aquelas que não necessitam da captura do animal, em conjunto com técnicas moleculares para obtenção de dados genéticos sobre as espécies é uma abordagem relativamente recente. Os primeiros estudos conduzidos com animais selvagens datam do ano de 1992 (HÖSS et al., 1992; TABERLET; BOUVET, 1992). Entre as principais amostras utilizadas para essa abordagem podemos citar amostras de fezes, pelos, trocas de pele, entre outras (BEJA-PEREIRA et al., 2009). A partir da combinação de amostras não invasivas que contenham vestígios de DNA da espécie foco do estudo e as técnicas moleculares, diversas informações podem ser obtidas, por exemplo, ocorrência e confirmação da espécie,

estimativas populacionais, sexagem molecular e obtenção de dados genéticos como diversidade genética, relações de parentesco, estruturação populacional e muitas outras (MCMANUS et al., 2015; MIOTTO et al., 2011, 2014; PILGRIM et al., 2005; RUELL et al., 2009; RUELL; CROOKS, 2007; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017; SOUZA et al., 2017; TABERLET; BOUVET, 1992).

Uma das maiores contribuições que essa abordagem propiciou foi a obtenção de dados para espécies consideradas de difícil captura, seja pelo risco que esse procedimento poderia representar, ou ainda pela dificuldade de obtenção dos dados pelos comportamentos elusivos da espécie. Assim, a utilização da amostragem não invasiva, principalmente fezes, tem sido amplamente utilizada para se obter dados ecológicos e genéticos em espécies de carnívoros (MCMANUS et al., 2015; MIOTTO et al., 2011, 2014; PILGRIM et al., 2005; RODGERS; JANEČKA, 2013; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017; SOUZA et al., 2017; SRBEK-ARAUJO et al., 2018; TABERLET; BOUVET, 1992), já que esse grupo apresenta como características hábitos elusivos, baixas densidades e grandes áreas de vida (CROOKS, 2002; NOSS et al., 1996; RIPPLE et al., 2014a), fatores esses que dificultam a sua visualização direta ou captura. Além disso, os carnívoros são animais territorialistas e costumam marcar seu território através da deposição de fezes, geralmente em lugares proeminentes, como trilhas, pedras e troncos (CHAME, 2003), facilitando a obtenção de amostras fecais para esse grupo.

Apesar das vantagens que a amostragem não invasiva representa para a obtenção de dados, principalmente para algumas espécies, alguns cuidados devem ser tomados. Um deles, é que devido à exposição do DNA ao ambiente, esse pode se encontrar degradado. Dessa forma, é necessária a utilização de marcadores que sejam informativos a partir de pequenas sequências. Nesse sentido, o DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado, tendo como principal objetivo a identificação molecular das espécies das amostras. Assim, vários trabalhos têm sido desenvolvidos no sentido de gerarem *mini-barcondings*, ou seja, pequenas sequências capazes de identificar as espécies a partir desse tipo de amostra (CHAVES et al., 2012; DE BARBA et al., 2014; FARRELL; ROMAN;

SUNQUIST, 2000; HAAG et al., 2009; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2018). Essas ferramentas permitiram um grande avanço nos trabalhos que têm como um dos objetivos a identificação molecular das espécies a partir de amostras não invasivas (ALBERTS et al., 2017; HAAG et al., 2010; MIOTTO et al., 2007; RUELL et al., 2009; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017; SOUZA et al., 2017; SRBEK-ARAUJO et al., 2018).

Já para a obtenção de dados populacionais, diversidade genética, relações de parentesco entre outras informações genéticas, os microssatélites também são amplamente utilizados na abordagem não invasiva (BEJA-PEREIRA et al., 2009; BROQUET; MÉNARD; PETIT, 2006; RODGERS; JANEČKA, 2013). Uma das características que favorece o seu uso em tal abordagem é devido à amplificação de produtos de PCRs relativamente pequenos. Apesar dessa grande aplicabilidade dos microssatélites, é importante destacar que, devido à qualidade do DNA obtido a partir de amostras não invasivas, é altamente recomendável a realização de réplicas das genotipagens, evitando que a não amplificação de um dos alelos (*allelic-dropout*) resulte em subestimativas. Assim, os genótipos devem ser utilizados nas análises somente após a sua confirmação em réplicas independentes (BEJA-PEREIRA et al., 2009; TABERLET et al., 1996). Graças a essas características e com os devidos cuidados, os microssatélites têm sido utilizados com muito sucesso em trabalhos com amostras não invasivas (DUTTA et al., 2013; HAAG et al., 2010; MCMANUS et al., 2015; MIOTTO et al., 2007; PALOMARES et al., 2002, 2017; RUELL et al., 2009; SINGH et al., 2017; SOUZA et al., 2017; SRBEK-ARAUJO et al., 2018).

## **2.5. As espécies foco deste trabalho**

A família felidae é a família dentro da ordem carnívora que representam as espécies com as melhores adaptações para o comportamento carnívoro, possuindo caninos longos e fortes e os demais dentes reduzidos devido ao hábito predominantemente carnívoro, além de papilas nas línguas que ajudam a raspar a carne dos ossos e também

para a limpeza do corpo (NOWAK; WALKER, 1999). As espécies desse grupo possuem variações em seus tamanhos corpóreos, suas áreas de distribuição, áreas de vida e densidades populacionais. No entanto, todas apresentam como principais ameaças a perda e fragmentação do habitat e a retaliação por caça. Dentre as espécies estudadas neste trabalho, a espécie *P. concolor* é que apresenta mais estudos genéticos e ecológicos, no entanto, a grande maioria deles foi conduzida na América do Norte. A espécie *L. pardalis*, também apresenta estudos genéticos e ecológicos, mas em menor número que *P. concolor*. Já as demais espécies, *L. guttulus* e *Puma yagouaroundi*, são muito deficientes de dados, representando um obstáculo para a sua conservação. A seguir, são apresentadas as principais características e estudos conduzidos para cada espécie.

#### **2.5.1. A onça-parda (*Puma concolor* (Linnaeus, 1771))**

A onça-parda (*P. concolor*) (Figura 1A) é o segundo maior felino das Américas, sendo considerado um dos nossos grandes predadores topo-de-cadeia. A espécie distribuiu-se por todo o continente americano (Figura 2A), distribuindo-se por diferentes habitats e biomas. Ao longo da sua distribuição, são reconhecidas geneticamente seis subespécies (*P. concolor cougar*, *P. concolor costaricensis*, *P. concolor concolor*, *P. concolor capricornensis*, *P. concolor puma* e *P. concolor cabrae*) (CULVER et al., 2000), sendo que no Brasil ocorrem as subespécies *P. concolor capricornensis* e *P. concolor puma*. A espécie é conhecida por sua alta capacidade de deslocamento por longas distâncias mesmo em áreas descontínuas, dessa forma, é considerada a espécie mais generalista quanto ao uso de hábitat (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; LOGAN; SWEANOR, 2001). Esse comportamento de dispersão e seus hábitos mais generalistas podem permitir a existência de fluxo gênico mesmo entre populações inseridas em uma paisagem fragmentada (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; CASTILHO et al., 2012). No entanto, a intensa modificação do habitat tem feito com que a espécie já esteja enfrentando as consequências decorrentes de perda e fragmentação do habitat, resultando em estruturação genética de suas populações (LOXTERMAN 2011;

ERNEST et al. 2014; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017). Mais recentemente, o atropelamento de fauna também tem sido registrado como uma importante ameaça para a espécie. Miotto e colaboradores (2012) ao monitorarem geneticamente uma população de *P. concolor* na região sudeste do Brasil notaram o impacto dos atropelamentos na perda de indivíduos da população local. No entanto, devido a sua ampla distribuição, a espécie é considerada “Pouco preocupante” pela IUCN (NIELSEN et al., 2015). Porém, pela lista Brasileira da fauna ameaçada de extinção, a mesma é considerada “Vulnerável” (ICMBIO, 2016). Entre as principais ameaças para a espécie, estão a perda e fragmentação do seu habitat, a caça por retaliação devido à predação de animais domésticos e a perda de indivíduos em rodovias, já que a espécie apresenta grande capacidade de dispersão e necessidade de grandes áreas de vida, estando, portanto, sujeita a atravessar empreendimentos lineares, resultado muitas vezes em seu atropelamento (DE AZEVEDO et al., 2013).

A onça-parda tem sido mais amplamente estudada na América do Norte (DE ANGELO; PAVIOLO; DI BITETTI, 2011; ERNEST et al., 2014; LOXTERMAN, 2011; MORRISON; BOYCE, 2009; SWEANOR et al., 2008). Na América do sul, ainda são poucos os trabalhos buscando entender as consequências genéticas da perda e fragmentação do habitat (CASTILHO et al., 2010, 2012; MIOTTO et al., 2011; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017). Com exceção do trabalho de Saranholi e colaboradores (2017), os demais trabalhos feitos até o momento não haviam registrado sinais de estruturação genética entre as populações estudadas no Brasil (MIOTTO et al 2011; CASTILHO et al. 2012), provavelmente por terem conduzindo os trabalhos em áreas onde não existem barreiras tão evidentes ao deslocamento dos indivíduos. Porém, as atividades humanas têm alterado muito a paisagem nos últimos anos, podendo influenciar os padrões de dispersão da espécie e, assim, tornando cada vez mais necessário o estudo e monitoramento das consequências genéticas nas populações frente às mudanças da paisagem.

### 2.5.2. A jaguatirica (*Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758))

A espécie *Leopardus pardalis* (Figura 2B), popularmente conhecida como jaguatirica é um felino de porte médio, sendo considerada por alguns autores como o mesopredador dentro da nossa comunidade de espécie de felinos (OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2010). A sua distribuição vai do sul da América do Sul até a região extremo sul dos Estado Unidos (Figura 2B), incluindo uma grande diversidade de biomas. A garantia de permanência das espécies em determinada região parece estar diretamente relacionada a presença de remanescentes naturais (OLIVEIRA et al., 2010). No entanto, a espécie pode ser encontrada em ambientes bem conservados, assim como em áreas com maior atividade antrópica, como áreas agrícolas e com pastagens, sugerindo possuir uma grande plasticidade (OLIVEIRA et al., 2010). Devido a essa plasticidade, a jaguatirica foi considerada a espécie mais abundante em grande parte das áreas estudadas no Brasil, com densidade bem variável. Além disso, por ser maior que as espécies de felinos de pequeno porte, as jaguatiricas podem afetar negativamente essas espécies através da competição, ao mesmo tempo que é pouco afetada pelas espécies de felino de maior porte, como a onça-parda (OLIVEIRA, 2011).

No Brasil, apenas um estudo genético foi conduzido com a espécie, indicando ausência de estruturação populacional na região estudada (FIGUEIREDO et al., 2015). Já Wulsch e colaboradores (2016) ao estudarem populações de jaguatiricas na América Central detectaram sinais moderados de estruturação populacional e diversidade genética e acreditam que a intensificação da perda e fragmentação do habitat podem agravar essa situação para a espécie. Em estudos conduzidos nos Estados Unidos, a espécie já apresenta isolamento genético e perda de diversidade genética em decorrência da fragmentação do habitat (JANECKA et al., 2014; JANEČKA et al., 2011). No Brasil, a principal ameaça para a espécie é a perda e fragmentação do habitat (OLIVEIRA; DE ALMEIDA; DE CAMPOS, 2013). No entanto, segundo a IUCN a espécie é considerada como “Pouco preocupante” (PAVIOLO et al., 2015) e foi retirada da última lista nacional da fauna ameaçada (ICMBIO, 2016). Porém, a necessidade de fragmentos naturais que permitam a



sua permanência, somada a outras ameaças como caça por retaliação e atropelamentos (OLIVEIRA; DE ALMEIDA; DE CAMPOS, 2013) podem resultar em seu declínio populacional.

### **2.5.3. O gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus* (Hensel, 1872))**

A espécie gato-do-mato-pequeno de ocorrência da nossa área de estudo até pouco tempo era reconhecida como *Leopardus tigrinus*, no entanto, Trigo e colaboradores (2013) demonstraram, através de estudos moleculares, que as populações localizadas na região sul e sudeste do Brasil, Paraguai e Argentina (Figura 2C) representam outra espécie, nomeada como *L. guttulus* (Figura 1C), tendo uma distribuição menor que a espécie *L. tigrinus*. A espécie possui pequeno porte, geralmente menor que 6 kg, e apresenta comportamento menos generalista, mostrando grande dependência de fragmentos naturais e podendo buscar recursos, por exemplo roedores, geralmente apenas nas bordas de plantações (OLIVEIRA et al., 2010).

Trigo e colaboradores (2008, 2013, 2014) detectaram a hibridação da espécie *L. guttulus* com *L. geoffroyi* na zona de contato entre as duas espécies na região sul do Brasil. A hibridação poderia ser resultado da falta de habitat para as espécies, resultado em sobreposição de suas áreas e promovendo a hibridação (TRIGO et al., 2008).

Atualmente, a espécie é considerada como “Vulnerável” pela IUCN (OLIVEIRA et al., 2016) e pela lista nacional (ICMBIO, 2016). Entre as principais ameaças estão a perda e fragmentação do seu habitat, a caça para o comércio ilegal de peles e a caça por retaliação (OLIVEIRA et al., 2016, 2013), sendo estimada uma grande redução nas suas populações nas próximas gerações (OLIVEIRA et al., 2013). Devido a sua menor plasticidade para explorar habitats mais modificados, a espécie pode sofrer ainda mais que os outros felinos com as alterações da paisagem, já que, por ocorrerem naturalmente em baixas densidades, como todos os pequenos felinos brasileiros, e por não terem grande capacidade de adaptação a ambientes alterados, a espécie pode ser

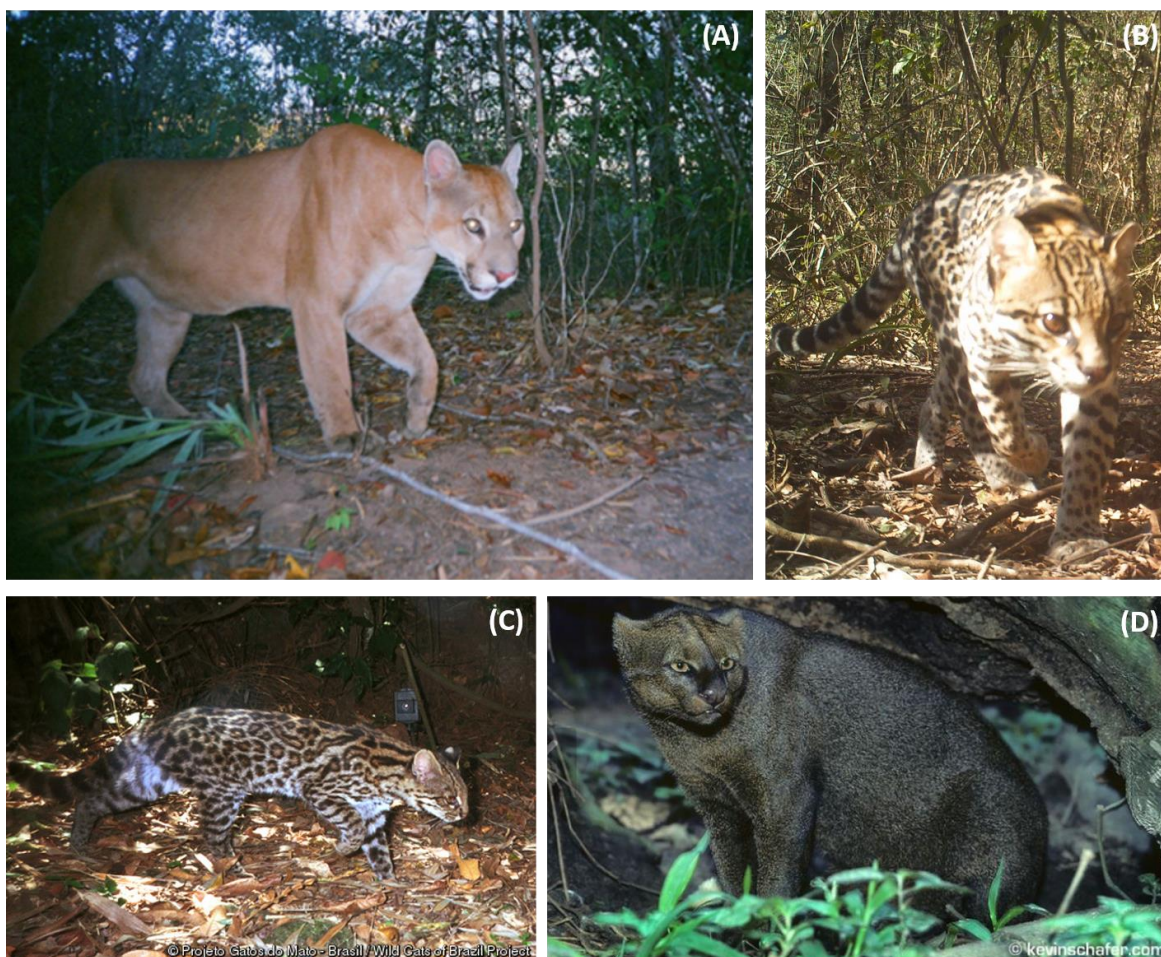
diretamente afetada pela alteração da paisagem, além da competição com outras espécies que melhor respondem às mudanças no ambiente, como a jaguatirica, afetando negativamente as suas populações (“Efeito pardalis”, OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA, 2011).

#### **2.5.4. O gato-mourisco (*Puma yagouaroundi* (É. Geoffroy Saint-Hilaire, 1803))**

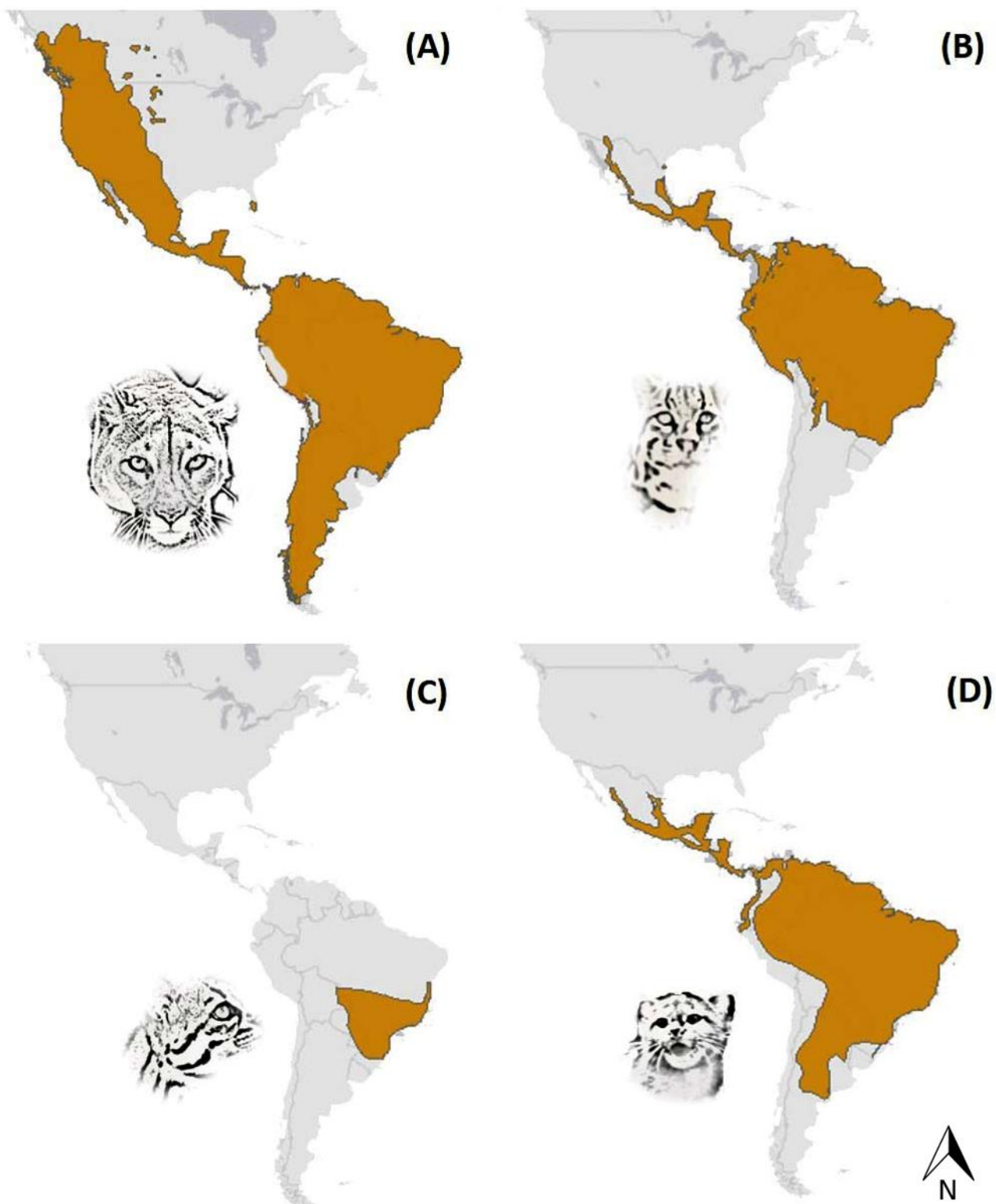
O gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) (Figura 1D) também está entre os felinos de pequeno porte. Ocorre em diversos biomas, tendo distribuição do extremo sul dos Estados Unidos até a Argentina, ocorrendo em todo o Brasil (Figura 2D). Assim como as demais espécies de felinos de pequeno porte, as densidades de suas populações também são baixas e as densidades mais altas são registradas em locais onde as densidades de *L. pardalis* são menores, indicando uma forte relação de evitamento e competição entre as espécies (OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2010). Acreditava-se que a espécie seria uma das mais abundantes entre as espécies de felinos, no entanto isso não se reflete nas estimativas realizadas (OLIVEIRA, 2011; OLIVEIRA et al., 2010). Uma possível explicação seria que, diferentemente dos demais felinos, seus hábitos são mais diurnos (MANZANI; MONTEIRO FILHO, 1989; OLIVEIRA, 1998), propiciando um maior número de avistamentos da espécie, fazendo acreditar que seria mais abundante (OLIVEIRA, 1998). A espécie utiliza áreas abertas e também pode explorar áreas de entornos de plantações em busca de recursos, no entanto, costuma estar associada próxima a remanescentes naturais (OLIVEIRA et al., 2010). Estudos genéticos utilizando marcadores nucleares avaliando a diversidade genética ou estruturação populacional em populações naturais ainda não foram conduzidos para a espécie.

A espécie é considerada “Pouco preocupante” pela IUCN (NIELSEN et al., 2015), porém, é classificada como “Vulnerável” pela lista Brasileira da fauna ameaçada de extinção (ICMBIO, 2016). As principais ameaças para a espécie são a perda e

fragmentação do seu habitat e a caça, seja ela cultural ou por retaliação devido à predação de animais domésticos (ALMEIDA et al., 2013).



**Figura 1.** Espécies de felinos estudadas: (A) *Puma concolor*; (B) *Leopardus pardalis*; (C) *Leopardus guttulus*; (D) *Puma yagouaroundi*. Fotos: (A) Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado; (B) Gestich C.C. & Saranholi B.H.; (C) Projeto gatos do mato; (D) kevinschafer.com.



**Figura 2.** Distribuição das espécies de felinos. (A) *Puma concolor*; (B) *Leopardus pardalis*; (C) *Leopardus guttulus*; (D) *Puma yagouaroundi*. Fonte: IUCN 2018.

### 3. Hipóteses e Objetivos

#### 3.1. Hipóteses

Considerando o que foi exposto na fundamentação teórica, a mudança da paisagem pode alterar padrões genéticos e ecológicos nas populações. Em um cenário de constante mudança e aumento das atividades antrópicas, espécies de comportamentos mais plásticos e generalistas, ou seja, aquelas que fazem uso de uma grande variedade de itens alimentares na sua dieta e que possuem grande capacidade de deslocamento mesmo em ambientes mais alterados, poderiam ter maior vantagem sobre outras. Além disso, do ponto de vista genético, tais modificações podem afetar padrões de dispersão e deslocamento dos indivíduos, interferindo no fluxo gênico entre as populações. A necessidade de buscar novas áreas para estabelecer territórios também passa a ser mais uma ameaça em um cenário de intensa atividade antrópica, expondo os indivíduos a novas ameaças, como os atropelamentos. Dessa forma, temos como hipóteses para este trabalho:

#### *Capítulo I:*

-Considerando a alteração da paisagem e os diferentes comportamentos entre as espécies, acreditamos que as áreas estudadas (Estação Ecológica dos Caetetus, Fazenda Rio Claro da Duratex, Floresta Nacional de Capão Bonito e Parque Estadual Carlos Botelho) apresentarão diferentes espécies que compõe a comunidade de felinos de acordo com o grau de antropização e presença de remanescentes naturais, sendo que as espécies de hábitos mais generalistas (*Puma concolor* e *Leopardus pardalis*) serão mais comuns e abundantes nas áreas; enquanto as espécies que dieta mais restrita e menor capacidade de deslocamento em áreas alteradas (*Leopardus guttulus* e *Puma yagouaroundi*) serão menos abundantes.

### ***Capítulo II:***

-Apesar da espécie *P. concolor* apresentar comportamento considerado generalista quanto ao uso de habitats modificado, alguns estudos já detectaram estruturação genética entre as populações da espécie. Assim, devido a intensificação das mudanças na paisagem, esperamos encontrar estruturação populacional ao longo da área estudada para a espécie.

-Devido à intensificação das mudanças na paisagem serem recentes, acreditamos ainda não encontrar perda de diversidade genética para a espécie *P. concolor*.

### ***Capítulo III:***

-Devido à perda de habitat, as espécies necessitam buscar novas áreas para estabelecer seu território. Os indivíduos machos de *P. concolor* evitam sobreposição de território, obrigando-os a buscarem novas áreas para estabelecer seus territórios. Assim, acreditamos encontrar um viés entre os sexos dos indivíduos atropelados de onça-parda, sendo os machos mais afetados pelos atropelamentos.

-Como os machos da espécie *P. concolor* costumam dispersar por maiores distâncias que as fêmeas, esperamos que a contribuição genética dos machos para a população local será diferente em relação à das fêmeas, e que haja um viés entre os sexos dos indivíduos atropelados, sendo os machos mais frequentes.

## **3.2. Objetivo Geral**

O Objetivo geral do estudo foi avaliar os aspectos demográficos (ocorrência, tamanho populacional mínimo, abundância e densidade) da comunidade de felinos nas áreas estudadas. Além disso, tendo a espécie *P. concolor* como modelo, verificamos a distribuição da sua diversidade genética e ocorrência de estruturação populacional em uma paisagem fragmentada. Também avaliamos o impacto da perda de indivíduos por atropelamentos em uma população local de *P. concolor*.

### 3.3. Objetivos específicos

#### *Capítulo I:*

- Verificar as espécies que ocorrem nas áreas estudadas;
- Obter o tamanho populacional mínimo de cada espécie em cada área de estudo;
- Estimar a abundância e densidade para cada espécie nas áreas de estudo;

#### *Capítulo II:*

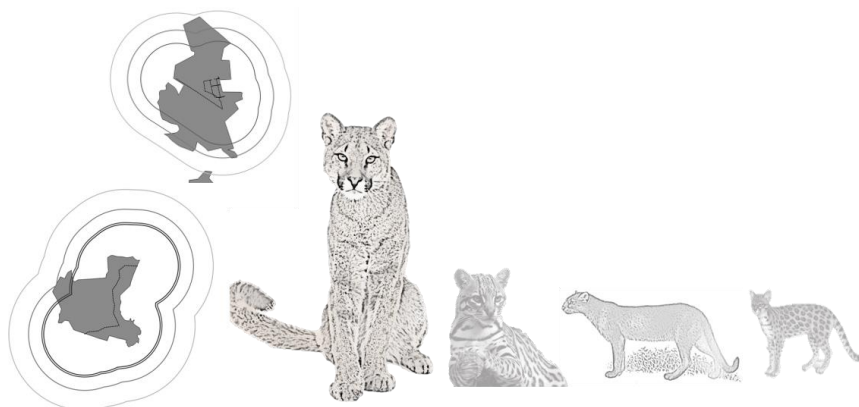
- Avaliar a diversidade genética da espécie *P. concolor* ao longo das áreas estudadas;
- Verificar a ocorrência de estruturação populacional para a espécie.

#### *Capítulo III:*

- Verificar se existe um viés entre os sexos dos indivíduos de *P. concolor* mortos por atropelamento;
- Verificar se cada sexo contribui de forma diferencial para a genética da população local;
- Inferir sobre a redução da viabilidade da população devido à perda de indivíduos por atropelamento.

## *Capítulo I*

### **Estimativas demográficas e composição da comunidade de felinos em remanescentes do estado de São Paulo por meio da amostragem não invasiva**





#### **4. Capítulo I: Estimativas demográficas e composição da comunidade de felinos em remanescentes do estado de São Paulo por meio da amostragem não invasiva**

##### **4.1. Introdução**

A perda e fragmentação do habitat como resultados das ações antrópicas têm sido reconhecidas como as principais ameaças às espécies, causando o declínio das mesmas em todo o mundo (HADDAD et al., 2015; SCHIPPER et al., 2008). Algumas espécies podem ser mais sensíveis a essas mudanças da paisagem devido às suas características biológicas. Os carnívoros estão entre as espécies mais diretamente afetadas, pois ocorrem em baixa densidade naturalmente e necessitam de grandes áreas de vida (CARDILLO et al., 2005; CROOKS, 2002; NOSS et al., 1996; RIPPLE et al., 2014). O atual cenário de redução de áreas naturais tem feito com que suas populações se encontrem cada vez mais restritas a pequenos fragmentos e reduzidas a tamanhos cada vez menores (RIPPLE et al., 2014). Entretanto, os efeitos sobre as espécies variam com seus hábitos e comportamento e a combinação da alteração da paisagem com o comportamento plástico de algumas espécies pode levar a alterações nos padrões demográficos da comunidade de determinada área. Espécies mais generalistas podem obter vantagens em ambientes mais alterados em relação a outras espécies. Esse padrão pode ser observado para algumas espécies de mesocarnívoros, ou seja, espécies que possuem tamanho corpóreo menor que os predadores de topo e ocupam o nível trófico inferior (RITCHIE e JOHNSON, 2009). O aumento da densidade de mesopredadores pela ausência ou diminuição da densidade de predadores de topo é conhecido como “liberação de mesopredador” (SOULÉ et al., 1988; CROOKS e SOULÉ, 1999).

Entre as espécies de felinos brasileiras, a jaguatirica corresponderia ao mesopredador dessa comunidade, assim, teria maior vantagem em ambientes alterados, se prevalecendo na competição com as espécies de felinos de menor porte devido à competição por recursos e evitamento entre os indivíduos (OLIVEIRA et al., 2010; OLIVEIRA-SANTOS et al., 2012), afetando negativamente as populações de pequenos

felinos. Além disso, a segregação temporal no padrão de atividade das jaguatiricas parece ser um mecanismo que permite a sua coexistência com predadores maiores como a onça-parda (MASSARA et al., 2018). As jaguatiricas (*Leopardus pardalis*) também são reconhecidas como generalistas quanto a seus hábitos; no entanto, a sua permanência em determinada região parece estar diretamente relacionada a presença de remanescentes naturais (OLIVEIRA et al., 2010; MASSARA et al., 2018). Assim, as jaguatiricas podem ser encontradas em ambientes bem conservados, mas também em áreas de entornos de plantações e pastagens em busca de recursos (OLIVEIRA et al., 2010), diversificando seus itens alimentares (BIANCHI; MENDES; JÚNIOR, 2010). Essa característica faz com que ela se adapte melhor em ambiente modificados, tornando-se uma competidora melhor sucedida. Já espécies de felinos menores como o gato-do-mato-pequeno (*Leopardus guttulus*) e o gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*) são consideradas espécies mais sensíveis que as demais, mostrando grande dependências de fragmentos florestais (OLIVEIRA et al., 2010), podendo ser, portanto, mais afetadas pela perda de habitat. Entre os felinos brasileiros, a onça-parda (*Puma concolor*) é considerada uma espécie de hábitos mais generalistas, tendo grande capacidade de dispersão até mesmo entre áreas fragmentadas (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; LOGAN; SWEANOR, 2001) e podendo fazer uso de recursos alimentares em áreas agrícolas (MAGIOLI et al., 2014).

A perda e fragmentação do habitat também são grandes ameaças para os biomas brasileiros. A Mata Atlântica e o Cerrado estão entre os biomas mais impactados com a modificação das paisagens pelas ações antrópicas. São considerados *hotspots* para a conservação devido às ameaças que sofrem e também à grande biodiversidade e endemismo que abrigam (MYERS, 1988). Para a Mata Atlântica, atualmente restam apenas 16% da sua cobertura original (RIBEIRO et al., 2009), sendo representada por pequenos remanescentes (menores que 50 ha), o que corresponde a 80% da sua cobertura atual (RIBEIRO et al., 2009). O Cerrado também sofre diretamente com as atividades

antrópicas, calcula-se que 55% da sua cobertura já tenha sido removida e convertida em grandes áreas de plantações e pastagens (MACHADO et al., 2004).

Neste contexto, nosso principal objetivo foi avaliar a composição e os parâmetros demográficos da comunidade de felinos em áreas com diferentes graus de modificação da cobertura de vegetação. Considerando a alteração da paisagem e os diferentes comportamentos entre as espécies, esperamos que dentre as áreas estudadas aquelas com paisagem mais modificada e coberta na maior parte por vegetação não nativa apresentem menor diversidade de espécie de felinos. Além disso, as espécies de hábitos mais generalistas (*Puma concolor* e *Leopardus pardalis*) serão mais comuns e abundantes nas áreas. Dessa forma, temos como objetivos específicos verificar as espécies que ocorrem nas áreas estudadas, avaliar o tamanho populacional mínimo de cada espécie nas áreas e estimar abundância e densidade para cada espécie nas áreas de estudo.

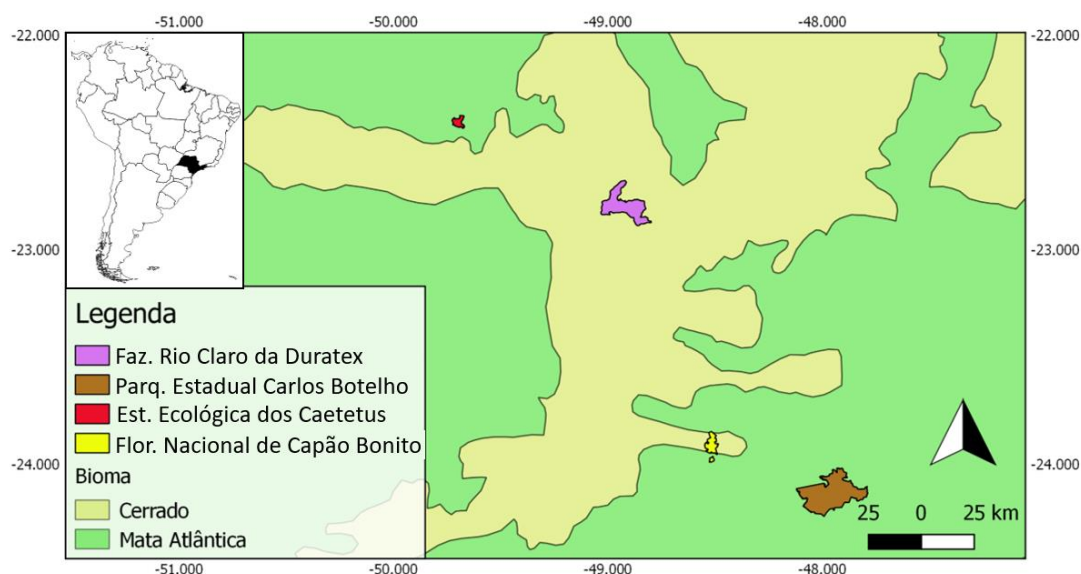
## **4.2. Material e Métodos**

### **4.2.1. Área de estudo**

As coletas foram conduzidas em quatro áreas no estado de São Paulo (Figura I.1). A primeira área é o Parque Estadual Carlos Botelho (PECB) (37.000 ha), composta por floresta ombrófila (densa e aberta) (INSTITUTO FLORESTAL, 2008) localizado em São Miguel Arcanjo (São Paulo) e próxima ao maior contínuo da Mata Atlântica localizada na serra do mar (Parque Estadual da Serra do Mar). No PECB pode ser encontrada uma grande diversidade de espécies da nossa fauna, incluindo cerca de sessenta espécies de mamíferos, entre elas, a onça-pintada (*Panthera onca*) (INSTITUTO FLORESTAL, 2008), sendo a única área com ocorrência dessa espécie de felino entre as nossas áreas de estudo. Outra espécie em nível de ameaça encontrada é o muriqui-do-sul (*Brachyteles arachnoides*) (INSTITUTO FLORESTAL 2008) A segunda área é a Estação Ecológica dos Caetetus (EEC) com 2.100 há, localizada entre os municípios de Gália e Alvinlândia (São Paulo). Sua vegetação é típica do bioma Mata Atlântica (floresta estacional semidecidual), sendo um dos poucos e mais representativos remanescentes desse bioma no

interior do estado de São Paulo e o único remanescente maior que 1000ha em um raio de 200 km (TABANEZ et al., 2005). A fauna da EEC compreende 196 espécies de aves e diversas espécies de mamíferos: catetos (*Tayassu tajacu*), queixada (*Tayassu pecari*), anta (*Tapirus terrestres*), cutia (*Dasyprocta azarae*), tapiti (*Sylvilagus brasiliensis*) paca (*Agouti paca*) e o mico-leão-preto (*Leontopithecus chrysopygus*) (TABANEZ et al., 2005) A terceira área é a Floresta Nacional de Capão Bonito (FNCB) com 4.770 ha localizada na cidade de Capão Bonito (São Paulo). Está inserida nos domínios dos Bioma Mata Atlântica e Cerrado, tendo as tipologias floresta ombrófila mista e Cerrado *strictu sensu*. No entanto, a sua cobertura é predominantemente composta por plantações de espécies exóticas (*Pinus* sp. e Araucárias) e pequenos remanescentes de vegetação natural (ICMBIO, 2017). Na FNCB pode ser encontrado veado catingueiro (*Mazama gouazoubira*), veado mateiro (*Mazama americana*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), bugio (*Alouatta clamitans*), entre outras espécies de mamíferos (ICMBIO, 2017). A última área é a Fazenda Rio Claro da Duratex (FRC) com 23.000 ha localizada na cidade de Lençóis Paulista (São Paulo). Sua vegetação é composta por fragmentos de floresta estacional semidecidual, cerradão e plantações exóticas (*Eucalyptus* sp.). Na área já foram levantadas 39 espécies de mamíferos, como os tatus (*Dasypus* sp. e *Euphractus sexcinctus*) tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*), tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*), lontra (*Lontra longicaudis*) entre outras (MENCONÇA, 2009)

Com exceção do PECB, que está inserido dentro de um grande contínuo da Mata Atlântica, as demais áreas estão inseridas entre áreas de ocorrência dos biomas Mata Atlântica e Cerrado em uma região com intensa atividade antrópica do estado de São Paulo, formada em sua grande maioria por pequenos fragmentos (menores que 50 ha), representando 80% da sua cobertura atual (RIBEIRO et al., 2009) .



**Figura I.1:** Mapa da localização das quatro áreas de estudo.

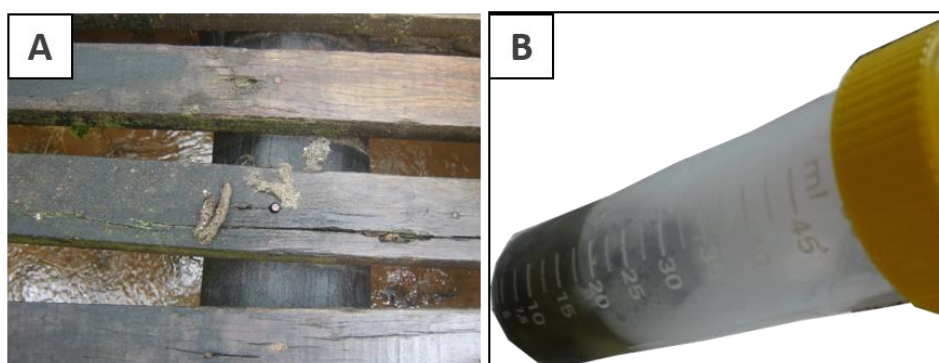
#### 4.2.2. Obtenção das amostras, armazenamento e extração do DNA

Os carnívoros demarcam seu território com a deposição de fezes, principalmente em lugares proeminentes, como trilhas, pedras, pontes e troncos (CHAME, 2003), facilitando a obtenção desse tipo de amostras. Assim, essa abordagem foi empregada como metodologia para a obtenção do material genético das espécies (Figura I.2). As coletas foram conduzidas através da busca ativa das amostras por trilhas e estradas de terra existentes nas áreas de estudo, já que os felinos têm como hábito o uso delas para o seu deslocamento e marcação de território (CHAME, 2003). As coletas das amostras foram concentradas dentro de períodos curtos (dois meses) realizadas duas vezes (uma estação seca e uma estação chuvosa) ao ano para cada área durante o primeiro ano do estudo (2014 a 2015). Dessa forma, os períodos de coleta caracterizaram uma “população fechada”, ou seja, períodos curtos de tempo que minimizem os efeitos da entrada (nascimento ou imigração) ou perda (morte ou emigração) de indivíduos na população, permitindo o uso desse modelo nas estimativas de densidade e abundância. Em cada área, o esforço de amostragem foi de 15 a 17 km percorridos em cada mês dos períodos amostrais.

As amostras de fezes frescas e potencialmente pertencentes à felinos com base em sua morfologia foram coletadas e armazenadas em tubos de polipropileno contendo

etanol absoluto e mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração. Todos os pontos de coleta foram registrados com equipamento de GPS (*Global Positioning System*). Para a obtenção do DNA das amostras utilizamos o *kit* de extração “*QIAamp DNA Stool Mini Kit*” (Qiagen), que é específico para amostras fezes por retirar os inibidores de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) presentes nelas e que tem demonstrado bons resultados em estudos anteriores (ALBERTS et al., 2017; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2018; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017)

Todas as coletas realizadas foram autorizadas pela instituições responsáveis (Licenças SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – MMA/ICMBIO: **42524-2**, **42524-3**, **42524-4**; Licença COTEC - Comissão Técnico-Científica – SMA/ Instituto Florestal: **416/2014 D052/2014 BA**), além da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR), segundo o n° **UFSCAR CEUA 4823120615**.



**Figura 1.2:** Amostra fecal deposita por felino (A) e armazenamentos das amostras fecais em tubos de polipropileno com etanol (B).

#### 4.2.3. Identificação molecular da espécie das amostras de fezes

A identificação molecular da espécie de todas as amostras de fezes foi feita através da amplificação de pequenas sequências de duas regiões do DNA mitocondrial. Foram utilizados os *primers* CytbF (5′TATTCTTTATCTGCCTATAACATRCACG-3′) e CytbR (5′-AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTC-3′) para a região do citocromo b (*Cytb*) descritos por Farrel e colaboradores (2000). Para a amplificação da região *ATP sintetase F0 subunidade (ATP6)* foram utilizados os *primers* ATP6-DF3 (5′–

AACGAAAATCTATTCGCCTCT-3') e ATP6-DR2 (5-TGGATGGACAGTATTTGTTTTGAT-3') descritos por Chaves e colaboradores (2012). Todas as amplificações foram realizadas em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) seguindo os protocolos propostos pelos autores de cada *primers* (CHAVES et al., 2012; FARRELL; ROMAN; SUNQUIST, 2000). Para todas as reações foram incluídos controles positivos com amostras de tecido das espécies de felinos foco deste estudo para verificar se a não amplificação seria devido a qualidade do DNA das amostras de fezes ou devido a erros nos protocolos. Também foram utilizados controles negativos nas PCRs para verificação possíveis contaminações. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1%. As amplificações bem-sucedidas foram purificadas por método enzimático (ExoSAP-IT, Affymetrix) para evitar perdas de produtos de PCR. Em seguida, foram enviadas para sequenciamento em sequenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

A qualidade das sequências obtidas foi analisada no *software* Geneious v.7 (KEARSE et al., 2012) e somente sequências com alta qualidade foram mantidas para a identificação molecular das espécies. Para a identificação das espécies, as sequências obtidas foram alinhadas com sequências de referências das espécies obtidas no *GenBank* (BENSON et al., 2014), além de sequências obtidas a partir de amostras de tecido usadas como controle. Após o alinhamento no *software* Geneious v.7 (KEARSE et al., 2012), foram calculadas as distâncias genéticas entre todas as sequências utilizando o Modelo de dois Parâmetros de Kimura (1980) e realizamos a análise de Neighbor-Joining (SAITOU; NEI, 1987) com 1000 replicações de *bootstrap* para se verificar a significância estatística. Os resultados obtidos através desse método de identificação também foram verificados com os resultados das comparações das nossas sequências com as sequências depositadas no *GenBank* (BENSON et al., 2014) utilizando a ferramenta BLAST *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) ([https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE\\_TYPE=BlastSearch](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch)).

#### 4.2.4. Individualização molecular das amostras

Para a obtenção dos genótipos e individualização molecular das amostras coletadas foram utilizados dois painéis *multilocus* de microssatélites, uma para a espécie *P. concolor* e outro para as demais espécies (*L. pardalis*, *L. guttulus* e *P. yagouaroundi*), cada um com nove pares de *primers*. Para a espécie *P. concolor*, foram utilizados *primers* específicos (KURUSHIMA et al., 2006) e também *primers* heterólogos desenvolvidos inicialmente para gatos domésticos (MENOTTI-RAYMOND et al., 1999) (Tabela I.1). Para as demais espécies (*L. pardalis*, *L. guttulus* e *P. yagouaroundi*) foram utilizados *primers* heterólogos (*Felis catus*) (MENOTTI-RAYMOND et al., 1999) (Tabela I.2).

**Tabela I.1.** Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* de microssatélites isolados para *Puma concolor*.

<i>Primer</i>	<i>Sequências</i>	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
PcoA208	TGGCAGCTTTAGTGGAAGAC	CCCTATTAAATACCGCCTCACT
PcoA216	CTTGGCTCCTTGAATGTGATC	GCTGTGTGACTGTAAGCAGGTTA
PcoA339	AGTGGCAAACCTTTCTGGGT	gttcttGCCTCCCTCTGAAGTGCATAT
PcoB003	CCTCAGGTTCCCTTGTCTGTAAA	gttcttCAGTCCTAACAGGGACGTGTAC
PcoB010	TACGGAAAGGTACTGGCAACT	gttcttCCTGGTAATAGAGGCAGGTGT
PcoB210	CTTGGGATGTCTCATGTGGTT	CATCTTGGTGTTGATCCTCTAGTC
PcoC108	CTTGATGATGTTGAGGCAGATC	ACATGGTAGGTGCTGGGTAAT
*Fca077	GGCACCTATAACTACCAGTGTGA	ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG
*Fca126	GCCCCTGATACCCTGAATG	CTATCCTTGCTGGCTGAAGG

\**Primers* heterólogos.

**Tabela I.2.** Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* de microssatélites utilizados para *L. pardalis*, *L. guttulus* e *P. yagouaroundi*.

<i>Primer</i>	<i>Sequências</i>	
	<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
Fca008	ACTGTAAATTTCTGAGCTGGCC	TGACAGACTGTTCTGGGTATGG
Fca042	CCCACGTGGACTAATCAAAT	CACTGCACAAATTAAGAGGC
Fca045	TGAAGAAAAGAATCAGGCTGTG	GTATGAGCATCTCTGTGTTCTGTG
Fca053	TGCTTACACTCATGCACAGATG	GAGCCTTGACATTGCTCTCC
Fca077	GGCACCTATAACTACCAGTGTGA	ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG
Fca096	CACGCCAAACTCTATGCTGA	CAATGTGCCGTCGAAGAAAC
Fca124	CCATTCCCTCCCTGTCTGTA	GCCTCAAGCCTCATTGCTAC
Fca146	TATTTAGAAAGCTTGAGAGGC	GACAGTAAAACCTCCCTATGG
Fca391	GCCTTCTAACTTCCTTGACAGA	TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA

Todos os *primers* utilizados para *L. pardalis*, *L. guttulus* e *P. yagouaroundi* são heterólogos desenvolvidos inicialmente para gatos domésticos (MENOTTI-RAYMOND et al., 1999).



Devido a qualidade do DNA das amostras fecais, alguns cuidados devem ser tomados ao se trabalhar com esse tipo de amostras, evitando a não detecção de alelos devido à *allelic-dropout* (TABERLET et al., 1996). Para evitar essa subestimativa do número dos alelos e genótipos, foram mantidos nas análises apenas os genótipos heterozigotos que puderam ser confirmados duas vezes e os genótipo homozigotos que puderam ser confirmados três vezes em PCRs independentes até um total de 5 PCRs. Somente amostras com pelo menos 70% dos *loci* amplificados foram mantidas (BEJA-PEREIRA et al., 2009; MIOTTO et al., 2011; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017).

Para reduzir os custos de genotipagem, foi seguida a metodologia proposta por Schuelke (2000). Nessa metodologia, em todos os *primers forward* foi acrescentada uma cauda universal de 18 pares de bases (cauda M13) a qual se liga a um *primer* contendo a fluorescência para a genotipagem. O protocolo de PCR para volume final de 10  $\mu$ L seguiu as seguintes concentrações: 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 0,2  $\mu$ M de dNTPs, 3 a 4mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen); 0,2 pmol do *primer forward* e do *primer* marcado com fluorescência; 0,8 pmol do *primer reverse*; 1 unidade de *Taq* Polymerase Platinum (Invitrogen); 0,25 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 3 a 5  $\mu$ L de DNA molde e água ultrapura até completar o volume final. As amplificações foram conduzidas termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 55 a 58°C (variação na temperatura para garantir a amplificação do DNA dependendo da qualidade da amostra) por 45 segundos, 74°C por 1 minuto; seguidos de 8 ciclos para incorporação da fluorescência à cauda M13 com 94°C durante 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C a 45°C; e uma extensão final de 15 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e enviados para genotipagem em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas dos genótipos foram analisados no *software* Geneious v7 (KEARSE et al., 2012).

Após a obtenção dos genótipos, foi realizada a identificação dos indivíduos através das comparações entre os genótipos de todas as amostras no *software* Gimlet (VALIÈRE, 2002), o qual agrupa amostras com os mesmos genótipos. Utilizamos como critério agrupar apenas amostras que poderiam ter apenas um alelo diferente em um *locus*. Alguns trabalhos utilizam critérios mais “relaxados” (DUTTA et al., 2013), permitindo até dois *locus* diferentes, no entanto, como isso poderia resultar em superestimativas, fomos mais rígidos nesse critério.

A capacidade de identificar os indivíduos entre todas as amostras coletadas depende diretamente do poder de individualização dos *loci* utilizados. Assim, para a capacidade de individualização, submetemos nossos *loci* selecionados a um teste. Para isso, utilizamos amostras controles para todas as espécies a partir de indivíduos atropelados ou de colaborações de zoológicos (Parque Zoológico Municipal de Bauru, Parque Zoológico Municipal Quinzinho de Barros e Parque Ecológico de São Carlos Dr. Antônio Teixeira Vianna), mantenedores (Criadouro Fortaleza e Associação Mata Ciliar) e hospitais veterinários (Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens-CEMPAS/Unesp Botucatu e Hospital Veterinário Unesp Jaboticabal). Tendo conhecimento da origem dos indivíduos, calculamos os valores de  $P_{id}$  (Probabilidade de Identidade), que é a chance de indivíduos compartilharem o mesmo genótipo dentro da população estudada e  $P_{idsibs}$  que também é probabilidade de indivíduos compartilharem o mesmo genótipo dentro da população estudada considerando a ocorrência de indivíduos aparentados (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001), o que é mais próximo da realidade biológica das nossas áreas fragmentadas. Os cálculos dos valores de  $P_{id}$  e  $P_{idsibs}$  foram feitos no GenAlex v6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) de forma a se obter os valores desses índices para um *locus* até a somatória do número total de *locus* empregados.

#### **4.2.5. Sexagem molecular**

Após a identificação dos indivíduos, realizamos a sexagem molecular utilizando o par de *primers* descritos por Pilgrim e colaboradores (2005) que amplificam

uma região do gene da Amelogenina presente nos cromossomos sexuais. No caso das fêmeas, são amplificados dois fragmentos de 214 pb correspondentes aos dois cromossomos X. Já nos machos, ocorre a amplificação de um fragmento de 214 pb (cromossomo X) e outro de 194 pb, resultante de uma deleção de 20 pb no cromossomo Y. Após as PCRs, seus produtos serão visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% por 120 minutos (100 volts). Foram utilizados controles positivos e negativos para todas as PCRs e três réplicas para evitar a detecção de falsas fêmeas devido a não amplificação de uma região.

#### **4.2.6. Análises demográficas**

##### ***Tamanho populacional mínimo e estimativa de abundância***

A primeira estimativa demográfica para cada área foi o tamanho populacional mínimo obtido a partir da individualização das amostras. A partir da individualização, montamos o histórico de captura e recaptura para as estimativas de abundância pelo modelo TIRM (*Two innate rates model*) (MILLER; JOYCE; WAITS, 2005) que considera que os indivíduos possuem diferentes probabilidades de captura-recaptura, sendo mais adequado para felinos uma vez que machos e fêmeas podem ter probabilidades diferentes de recaptura devido às diferenças de seus comportamentos territorialistas. O cálculo da abundância utilizando o modelo TIRM foi feito no *software* Capwire (MILLER; JOYCE; WAITS, 2005) o qual é considerado mais adequado quando se utiliza amostras não invasivas, já que em uma mesma ocasião de coleta pode-se amostrar o mesmo indivíduo mais de uma vez.

##### ***Densidade***

A densidade foi calculada dividindo-se os valores de abundância encontrados pela área efetivamente amostrada. O cálculo da área efetivamente amostrada é importante, pois sabemos que as espécies não utilizam somente os fragmentos de hábitat, mas também

as áreas do entorno. Dessa forma, se utilizarmos somente as áreas dos fragmentos estudados para a obtenção das densidades, poderíamos ter superestimativas das densidades. Logo, para obter a área efetivamente amostrada, nos baseamos em valores das áreas de vida das espécies obtidos em estudos prévios (Tabela I.3). A partir do raio dessas áreas de vida, estabelecemos um *buffer* inserindo o valor do raio perpendicularmente ao longo das trilhas percorridas, criando um *buffer* que representa a área efetivamente amostrada. Essa abordagem tem sido utilizada em outros trabalhos com amostragem não invasiva para obtenção dos dados demográficos (RUELL et al., 2009; SOLBERG et al., 2006) para comparações demográficas entre diferentes áreas.

**Tabela I.3.** Valores das áreas de vida e dos raios utilizados para o cálculo da área efetivamente amostrada.

Espécie	Área de vida	Raio	Referência
<i>Puma concolor</i>	75,5 Km <sup>2</sup>	4,90 km	Estudo conduzido em área antropizada no Paraná (MAZZOLLI, 2010)
<i>Leopardus pardalis</i>	43 Km <sup>2</sup>	3,70 Km	Estudo conduzido no Brasil na Mata Atlântica (CRAWSHAW, 1995)
<i>Leopardus guttulus</i>	25 Km <sup>2</sup>	2,82 Km	Estudo em diferentes regiões do Brasil (OLIVEIRA et al., 2010)
<i>Puma yagouaroundi</i>	23 Km <sup>2</sup>	2,70 Km	Estudo conduzido em área antropizada (OLIVEIRA et al., 2010)

### 4.3. Resultados e Discussão

#### 4.3.1. Identificação molecular das amostras

Em todas as áreas de estudo, foi coletado um total de 142 amostras de fezes potencialmente pertencente a felinos de acordo com as suas características morfológicas. Após a extração do DNA de todas as amostras, foi possível realizar a identificação molecular de 127 amostras com os dois marcadores selecionados, portanto, um sucesso de 89% de identificação da espécie. Essa taxa de sucesso é semelhante ou maior a outros estudos (MIOTTO et al., 2014; SRBEK-ARAÚJO et al., 2018), indicando a importância de

coletas sistêmicas para a obtenção de amostras frescas. Todas as amostras com sucesso de amplificação foram identificadas como sendo de espécies de felinos (Tabela I.4).

**Tabela I.4.** Resultado da identificação molecular das amostras coletadas por área.

<b>Código da Amostra</b>	<b>Área de Coleta</b>	<b>Identificação Molecular</b>
FNCB01	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB02	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB03	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB04	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB05	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB06	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB07	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB08	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB09	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB10	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB11	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB12	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB13	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB14	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB15	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB16	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB17	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB18	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB19	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB20	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB21	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB22	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB23	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB24	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB25	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB26	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB27	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Leopardus pardalis</i>
FNCB28	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma yagouaroundi</i>
FNCB29	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma yagouaroundi</i>
FNCB30	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Leopardus pardalis</i>
FNCB31	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FNCB32	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Leopardus pardalis</i>
FNCB33	Floresta Nac. Capão Bonito	<i>Puma concolor</i>
FRC01	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Leopardus pardalis</i>
FRC02	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Leopardus pardalis</i>
FRC03	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma yagouaroundi</i>
FRC04	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>

FRC05	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC06	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC07	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC08	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC09	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC10	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC11	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC12	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC13	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC14	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC15	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC16	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC17	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC18	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC19	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC20	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC21	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC22	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Leopardus pardalis</i>
FRC23	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Leopardus pardalis</i>
FRC24	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Leopardus pardalis</i>
FRC25	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC26	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC27	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
FRC28	Faz. Rio Claro-Duratex	<i>Puma concolor</i>
PECB01	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB02	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB03	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB04	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB05	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB06	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB07	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB08	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB09	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB10	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB11	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB12	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB13	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma yagouaroundi</i>
PECB14	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma yagouaroundi</i>
PECB15	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma yagouaroundi</i>
PECB16	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma yagouaroundi</i>
PECB17	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma concolor</i>
PECB18	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma concolor</i>
PECB19	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma concolor</i>
PECB20	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma concolor</i>
PECB21	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>

PECB22	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB23	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB24	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB25	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB26	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB27	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB28	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma yagouarondi</i>
PECB29	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma concolor</i>
PECB30	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma concolor</i>
PECB31	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus pardalis</i>
PECB32	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB33	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB34	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma yagouarondi</i>
PECB35	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Leopardus guttulus</i>
PECB36	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma yagouarondi</i>
PECB37	Parque Estadual Carlos Botelho	<i>Puma concolor</i>
EEC01	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC02	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC03	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC04	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC05	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC06	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC07	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC08	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus pardalis</i>
EEC09	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus guttulus</i>
EEC10	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus guttulus</i>
EEC11	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Leopardus guttulus</i>
EEC12	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma yagouarondi</i>
EEC13	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma yagouarondi</i>
EEC14	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma yagouarondi</i>
EEC15	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC16	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC17	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC18	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC19	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC20	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC21	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC22	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC23	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC24	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC25	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC26	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC27	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC28	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>
EEC29	Estação Ec. dos Caetetus	<i>Puma concolor</i>

---

### 4.3.2. Ocorrência das espécies

Os resultados da identificação molecular demonstram que quase todas as espécies estudadas foram detectadas em quase todas as áreas de estudo. No entanto, notamos a ausência de *L. guttulus* nas áreas da FNCB e da FRC e também um menor número de amostras coletadas de *Puma yagouaroundi* nas mesmas áreas. De acordo com o tamanho de ambas as áreas, seria esperado uma amostragem maior para essas espécies, já que elas poderiam abrigar um número maior de indivíduos quando comparadas com uma área menor como a EEC. No entanto, a composição dessas unidades com menos áreas de vegetação nativa podem ser um fator importante, limitando a ocorrência dessas espécies, já que ambas as espécies são consideradas mais sensíveis e com maior exigência de coberturas naturais (OLIVEIRA et al., 2010).

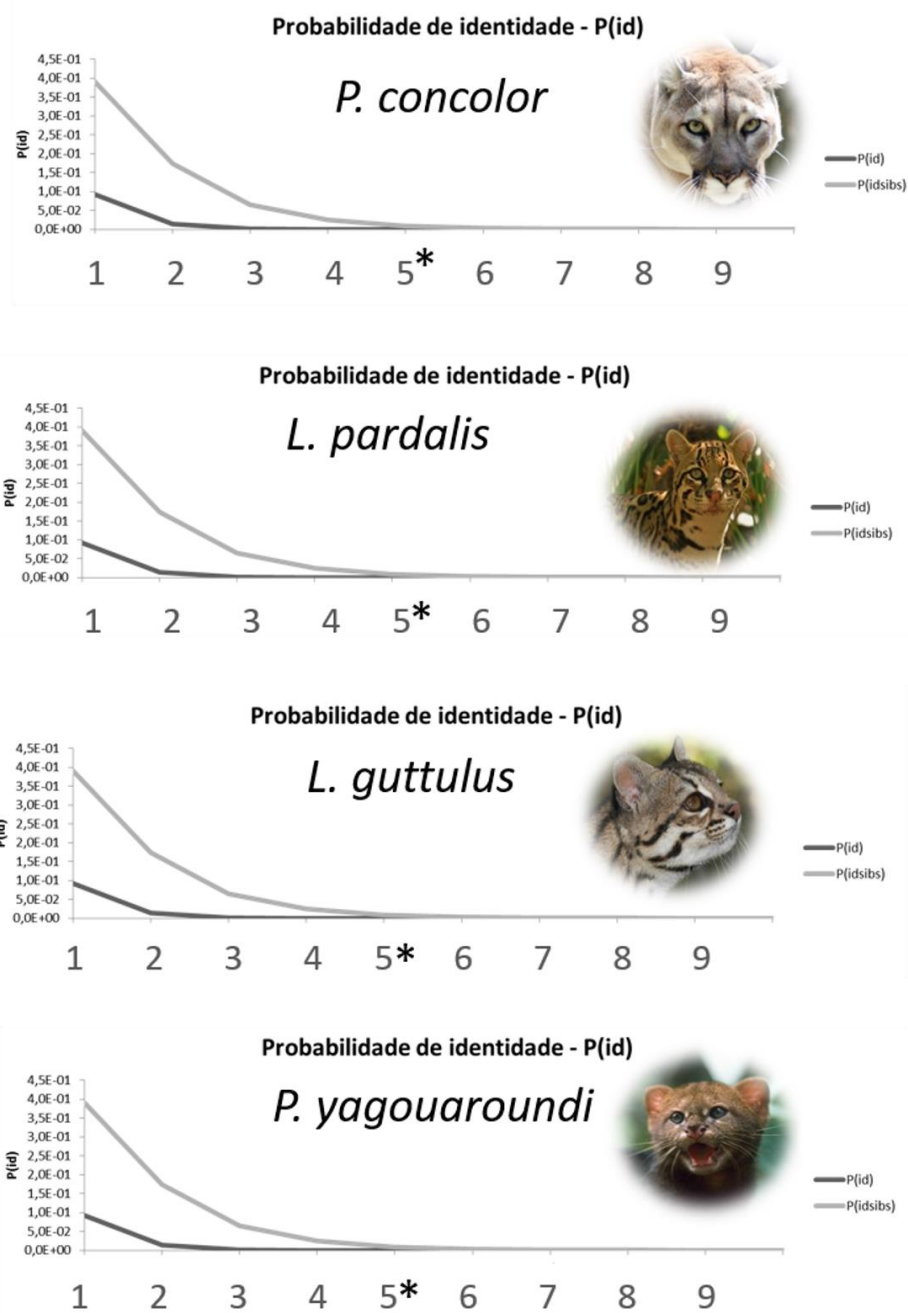
Para a jaguatirica, mesmo a espécie sendo considerada generalista (OLIVEIRA et al., 2010), a mesma teve um menor número de amostras coletadas nas áreas mais alteradas: 5 amostras na FRC e 3 amostras na FNCB). Apesar da espécie poder buscar seus recursos na matriz (OLIVEIRA et al., 2010), trabalhos mais recentes têm demonstrado uma forte necessidade da presença de áreas naturais para poder garantir a sua viabilidade (DI BITETTI et al., 2008; L. MASSARA et al., 2018).

A espécie *Puma concolor* foi a com maior número de amostras coletadas, correspondendo a 57% do total das amostras identificadas e um total de 22 indivíduos amostrados, o que seria explicado pelo seu comportamento mais generalista e também pela sua alta capacidade de deslocamento e dispersão, permitindo-a percorrer grandes áreas (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; HORNOCKER; NEGRI, 2010; LOGAN; SWEANOR, 2001), mesmo aquelas com algum grau de antropização como áreas de plantações para buscar recursos (MAGIOLI et al., 2014).



### 4.3.3. Poder de individualização dos microssatélites e detecção dos indivíduos amostrados

A análise conduzida para avaliar o poder de individualização dos dois painéis de microssatélites utilizando amostras controles demonstram que eles são suficientemente informativos para identificar os indivíduos entre amostras com origem incerta. Os valores de  $P_{id}$  indicam que apenas três *loci* já seriam informativos para obter essa informação (considerando  $P_{id} < 0,01$ ). No entanto, utilizando os valores  $P_{idsibs}$ , que consideram a possibilidade de ocorrerem indivíduos aparentados em uma população, sendo assim um critério mais rigoroso, os valores indicam que 5 *loci* são capazes de realizar a individualização (considerando  $P_{idsibs} < 0,01$ ) (Figura I.3). Esses resultados mostram a eficiência da abordagem não invasiva em conjunto com técnicas moleculares para a detecção de indivíduos a partir desse tipo de amostras. Rodgers e colaboradores (2015), utilizaram 4 *loci* de microssatélite para identificar indivíduos de jaguatiricas em seu estudo empregando amostras fecais e obteve  $P_{idsibs}$  igual a 0,038. Já Wultsch e colaboradores (2016), mostraram que para valores de  $P_{idsibs}$  menores que 0,01 seriam necessários seis *loci* de microssatélites a partir de seu painel empregado para individualizar amostras de *P. concolor* e *L. pardalis*. Nenhum trabalho ainda havia avaliado o poder de individualização de um painel de microssatélites para as espécies *L. guttulus* e *P. yagouaroundi*. Assim, nossos painéis de microssatélites sugeridos mostram-se informativos para tal objetivo, sendo também uma contribuição para estudo que tenham como enfoque apenas a identificação dos indivíduos, reduzindo custo, uma vez que não seria necessária a amplificação de um número maior de *loci*.



**Figura I. 3.** Valores de  $P_{id}$  e  $P_{idsibs}$  para o conjunto de microssatélites empregados para cada espécie.  
\*Valores de  $P_{idsibs}$  menores que 0,01.

Dessa forma, foi possível chegar ao número de indivíduos de cada espécie para cada área de estudo, correspondendo ao tamanho populacional mínimo (Tabela I.5).

**Tabela I.5.** Individualização das amostras de fezes de cada espécie em cada área de estudo. Os valores entre parênteses indicam o número total de indivíduos de cada espécie amostrado em cada área.

Espécie	Amostras	Indivíduo	Número de Capturas
<b>FLORESTA NAC. CAPÃO BONITO</b>			
<i>P. concolor</i> (7)	FNCB01, FNCB04, FNCB09, FNCB12, FNCB14, FNCB16	PcFNCB1♂	6
	FNCB02, FNCB06, FNCB07	PcFNCB2♀	3
	FNCB10	PcFNCB3♀	1
	FNCB19, FNCB21, FNCB24, FNCB26	PcFNCB4♀	4
	FNCB03, FNCB23, FNCB25	PcFNCB5♂	3
	FNCB05, FNCB11, FNCB15, FNCB20, FNCB31, FNCB33	PcFNCB6♂	6
	FNCB08, FNCB17, FNCB18, FNCB22	PcFNCB7♀	4
<i>L. pardalis</i> (3)	FNCB 27	LpFNCB1♂	1
	FNCB 30	LpFNCB2♀	1
	FNCB 32	LpFNCB3♀	1
<i>P. yagouaroundi</i> (1)	FNCB29, FNCB28	PyFNCB1♀	2
<b>ESTAÇÃO EC. DOS CAETETUS</b>			
<i>P. concolor</i> (5)	EEC15, EEC18, EEC20	PcEEC1♂	3
	EEC16, EEC17, EEC23	PcEEC2♀	3
	EEC22, EEC28	PcEEC3♀	2
	EEC19, EEC21,	PcEEC4♀	2
	EEC24, EEC25, EEC27	PcEEC5♂	3
<i>L. pardalis</i> (5)	EEC03	LpEEC2♀	1
	EEC01, EEC06, EEC08	LpEEC3♂	3
	EEC02, EEC04, EEC05	LpEEC4♂	3
	EEC07	LpEEC5X	1
<i>L. guttulus</i> (3)	EEC09	LgEEC1♀	1
	EEC10	LgEEC2♀	1
	EEC12	LgEEC3♀	1
<i>P. yagouaroundi</i> (1)	EEC12, EEC13, EEC14	PyEEC2♀	3
<b>FAZ. RIO CLARO DURATEX</b>			
<i>P. concolor</i> (6)	FRC04, FRC05, FRC08, FRC13, FRC15	PcFRC1♂	5
	FRC06, FRC07	PcFRC2♀	2
	FRC09, FRC10, FRC16, FRC19	PcFRC3♀	4
	FRC11	PcFRC4♂	1
	FRC12, FRC26, FRC27, FRC28	PcFRC5♂	4
	FRC14, FRC17, FRC18, FRC20, FRC21, FRC25	PcFRC6♀	6
<i>L. pardalis</i> (2)	FRC01, FRC02, FRC22	LpFRC1♀	3
	FRC23, FRC24	LpFRC2♀	2
<i>P. yagouaroundi</i> (1)	FRC03	PyFRC1♀	1

PARQUE ESTADUAL CARLOS BOTELHO			
<i>P. concolor</i> (4)	PECB17, PECB19,	PcPECB1♀	2
	PECB18, PECB20, PECB29	PcPECB2♂	3
	PECB30	PcPECB3♀	1
	PECB37	PcPECB4♀	1
<i>L. pardalis</i> (5)	PECB01	LpPECB1♀	1
	PECB02, PECB04, PECB08	LpPECB2♂	3
	PECB03	LpPECB3♂	1
	PECB05, PECB06, PECB07	LpPECB4♀	3
	PECB23, PECB26, PECB27, PECB31	LpPECB5♀	4
<i>L. guttulus</i> (6)	PECB09	LgPECB1♀	1
	PECB10	LgPECB2♂	1
	PECB11, PECB22, PECB24	LgPECB3♂	3
	PECB12, PECB21	LgPECB4♀	2
	PECB25	LgPECB5♀	1
	PECB32, PECB33, PECB35	LgPECB6♀	3
<i>P. yagouaroundi</i> (5)	PECB13	PyPECB1♀	1
	PECB14, PECB15	PyPECB2♂	2
	PECB16	PyPECB3♀	1
	PECB28, PECB36	PyPECB4♀	2
	PECB34,	PyPECB5♀	1

As amostras FNCP10, EEC26 e EEC29 não puderam ter todos os *loci* de microssatélites amplificados para a individualização molecular. "X" não foi possível determinar o sexo do indivíduo.

Como notado a partir da identificação molecular das espécies das amostras, a detecção molecular dos indivíduos seguiu o mesmo padrão quanto às características das áreas e das espécies, sendo um menor número de indivíduos de *P. yagouaroundi* e ausências de *L. guttulus* para FNCP e FRC e maior abundância para as demais espécies (Tabela I.4).

Com exceção do PCEB, os baixos valores de recaptura para *P. yagouaroundi* e *L. guttulus* nas demais áreas não permitiram estimar seus valores de abundância para essas áreas, dessa forma, para a obtenção da densidade, utilizamos os tamanhos populacionais mínimo detectados. O mesmo foi adotado para jaguatirica na FRC.

#### 4.3.4. Abundância, Densidade e avaliação entre as relações demográficas entre as espécies

Os valores de abundância obtidos pelas estimativas do modelo do *software Capwire* foram muito semelhantes aos números de indivíduos obtidos através da individualização genética das amostras (Tabela I.6), mostrando o potencial desse tipo de amostragem para estimativas demográficas (MIOTTO et al., 2014; RUELL et al., 2009).

**Tabela I.6.** Estimativas de abundância de cada espécie para cada área de estudo.

Espécie	Individualização Molecular	Estimativa Abundância (Capwire)
<b>FLORESTA NAC. CAPÃO BONITO</b>		
<i>Puma concolor</i>	7	8 (6-9; CI 95%)
<i>Leopardus pardalis</i>	3	5 (4-6; CI 95%)
<i>Puma yagouaroundi</i>	1	-
<b>ESTAÇÃO EC. DOS CAETETUS</b>		
<i>Puma concolor</i>	5	5 (4-6; CI 95%)
<i>Leopardus pardalis</i>	5	5 (4-6; CI 95%)
<i>Leopardus guttulus</i>	3	-
<i>Puma yagouaroundi</i>	1	-
<b>FAZ. RIO CLARO DURATEX</b>		
<i>Puma concolor</i>	6	5 (4-6; CI 95%)
<i>Leopardus pardalis</i>	2	-
<i>Puma yagouaroundi</i>	1	-
<b>PARQUE ESTADUAL CARLOS BOTELHO</b>		
<i>Puma concolor</i>	4	5 (4-6; CI 95%)
<i>Leopardus pardalis</i>	5	7 (7-8; CI 95%)
<i>Leopardus guttulus</i>	6	8 (6-9; CI 95%)
<i>Puma yagouaroundi</i>	5	5 (4-6; CI 95%)

Assim, as estimativas de abundância refletem o mesmo padrão encontrado para a ocorrência das espécies no que se refere à qualidade ambiental das áreas e presença de remanescentes florestais. Nas áreas mais alteradas (FRC e FNCB), as espécies mais

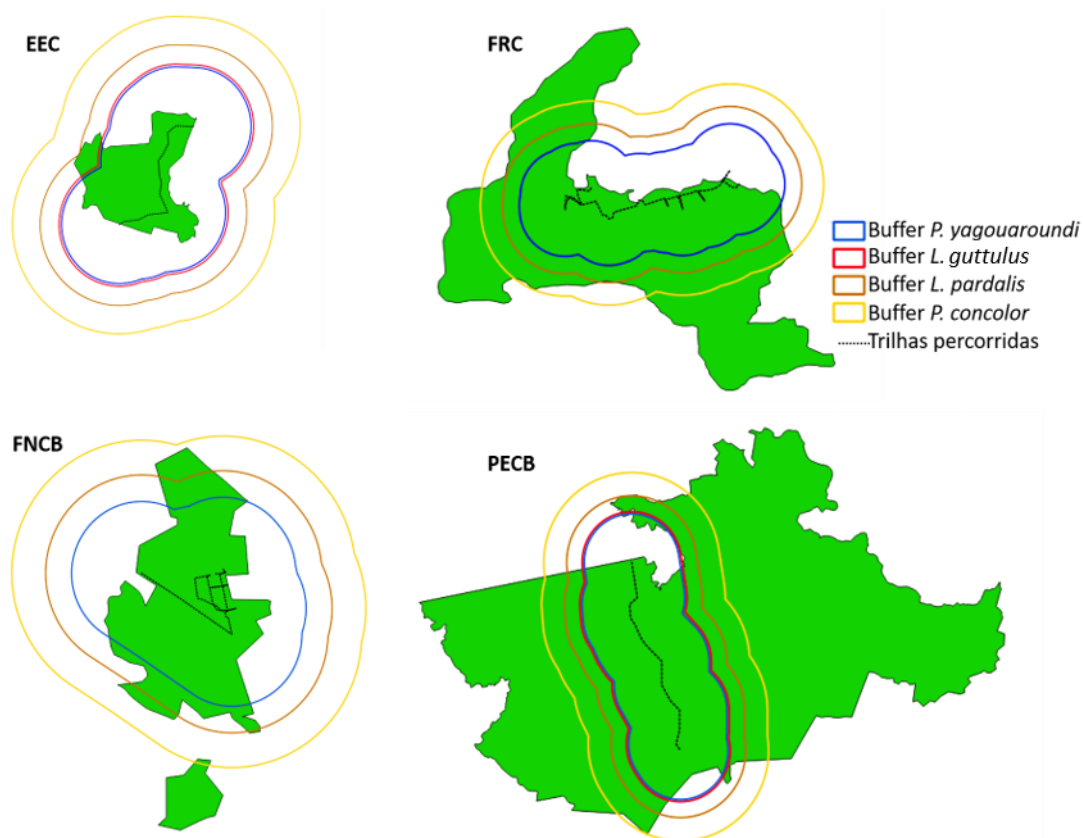
abundantes foram *Puma concolor* e *Leopardus pardalis*. Apenas um indivíduo de *Puma yagouaroundi* foi detectado nessas duas áreas e nenhum indivíduo de *L. guttulus*.

Os tamanhos das áreas efetivamente amostradas estão descritos na Tabela I.7 e representadas para cada espécie na Figura I.3.

**Tabela I.7.** Áreas efetivamente amostradas para cada espécie nas áreas de estudo.

Espécie	Área Efetivamente Amostradas			
	EEC	FRC	FNCB	PECB
<i>P. concolor</i>	180 Km <sup>2</sup>	250 Km <sup>2</sup>	163 Km <sup>2</sup>	238 Km <sup>2</sup>
<i>L. pardalis</i>	116 Km <sup>2</sup>	170 Km <sup>2</sup>	103 Km <sup>2</sup>	158 Km <sup>2</sup>
<i>L. guttulus</i>	80 Km <sup>2</sup>	-	-	111 Km <sup>2</sup>
<i>P. yagouaroundi</i>	75 Km <sup>2</sup>	115 Km <sup>2</sup>	65 Km <sup>2</sup>	105 Km <sup>2</sup>

EEC: Estação Ecológica dos Caetetus; FRC Fazenda Rio Claro Duratex; FNCB: Floresta Nacional Capão Bonito; PECB: Parque Estadual Carlos Botelho.



**Figura I.4.** Representação das áreas efetivamente amostradas representadas pelos *buffers* para cada espécie em cada área de estudo. EEC: Estação Ecológica dos Caetetus; FRC Fazenda Rio Claro Duratex; FNCB: Floresta Nacional Capão Bonito; PECB: Parque Estadual Carlos Botelho.

A partir das áreas efetivamente amostradas e os valores de abundância, obtemos as densidades de cada espécie nas áreas de estudo (Tabela I.8).

**Tabela I.8.** Densidade das espécies nas áreas de estudo.

Espécie	Densidades			
	EEC	FRC	FNCB	PECB
<i>P. concolor</i>	2,77 /100Km <sup>2</sup>	2/100Km <sup>2</sup>	4,90/100Km <sup>2</sup>	2,1/100Km <sup>2</sup>
<i>L. pardalis</i>	4,3/100Km <sup>2</sup>	1,17/100Km <sup>2</sup>	4,85/100Km <sup>2</sup>	4,4/100Km <sup>2</sup>
<i>L. guttulus</i>	3,75/100Km <sup>2</sup>	-	-	7,20/100Km <sup>2</sup>
<i>P. yagouaroundi</i>	1,33/100Km <sup>2</sup>	0,86/100Km <sup>2</sup>	1,53/100Km <sup>2</sup>	4,76/100Km <sup>2</sup>

EEC: Estação Ecológica dos Caetetus; FRC Fazenda Rio Claro Duratex; FNCB: Floresta Nacional Capão Bonito; PECB: Parque Estadual Carlos Botelho.

Pode-se observar uma grande variação nesses valores para cada espécie, assim como também é observado na literatura (MAZZOLLI, 2010; NEGRÕES et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2010; TROLLE; KÉRY, 2003). Para as espécies mais sensíveis (*L. guttulus* e *P. yagouaroundi*), as maiores densidades estão no PECB, a área estudada que apresenta a melhor qualidade de habitat e também inserida ao maior contínuo de Mata atlântica remanescente (Parque Estadual da Serra do Mar), o que provavelmente lhe permite abrigar maiores populações, mesmo tendo a ocorrência de espécies competidoras. A segunda área com maior densidade desses dois felinos é a EEC, a qual é composta basicamente por um fragmento de Mata atlântica. A EEC é um dos poucos remanescentes de Mata atlântica no interior do estado de São Paulo, dessa forma, a presença desses felinos em maior densidade quando comparado com as áreas mais alteradas, reforça a importâncias dessas unidades de conservação principalmente para as espécies mais sensíveis.

A área com maior densidade e número de indivíduos de onças-pardas foi a FNCB, apesar da área não possuir grandes remanescentes naturais. A biologia mais generalista da onça-parda lhe permite obter recursos nessa área, além da área poder servir de ponto de passagem para mais indivíduos de onça-parda que transitam na região. Além disso, é a área mais próxima do contínuo da Serra do Mar, dessa forma, também pode estar recebendo os indivíduos que dispersam próximos dessa região. Enquanto que a área com menor densidade para *P. concolor* foi o PECB, onde poderia ser esperada uma maior

densidade devido a qualidade do habitat dessa área. Porém, um fator que poderia explicar essa menor densidade seria a presença da onça-pintada no PECB. As duas espécies podem conviver em uma mesma área (SCOGNAMILLO et al. 2003; HARMSEN et al. 2009.), no entanto, evitam a sobreposição espacial e temporal (HARMSEN et al. 2009) e isso pode reduzir a dectabilidade de *P. concolor* onde *P. onca* está presente.

Não observamos uma relação direta entre as densidades de *L. pardalis* e as densidades de *P. yagouaroundi* e *L. pardalis*. Por exemplo, a EEC e o PECB possuem praticamente a mesma densidade de jaguatiricas, no entanto, as densidades de *L. guttulus* e *P. yagouaroundi* no PECB é muito mais alta quando comparada com a EEC, o que provavelmente se deve à maior qualidade do ambiente no PECB. No entanto, a jaguatirica se mostrou mais abundante que os pequenos felinos nas áreas estudadas com maior grau de alteração devido ao seu comportamento mais generalista. Dessa forma, a presença mais abundante das jaguatiricas nas áreas alteradas pode ser mais um fator que não favorece a ocorrência dos felinos menores nessas áreas, pois além de serem mais sensíveis à mudança da paisagem, também sofreram a competição com as jaguatiricas, resultando em mais um efeito negativo na demografia dos pequenos felinos como é sugerido por Oliveira e colaboradores (OLIVEIRA et al., 2010).

#### **4.4. Conclusões**

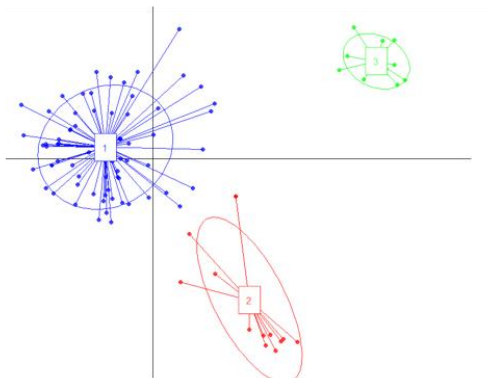
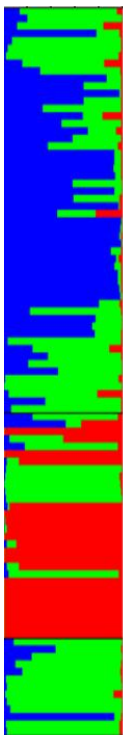
Nota-se uma diferença na presença principalmente das espécies consideradas mais sensíveis, sendo que nas áreas consideradas mais alteradas, as mesmas ocorrem em baixa abundância e densidade. Não encontramos uma relação clara entre a densidade do mesopredador (*L. pardalis*) e as espécies de felinos menores. Acreditamos que a qualidade do ambiente seria o primeiro fator a afetar a densidade dessas espécies. No entanto, a maior abundância do mesopredador (*L. pardalis*) pode sim ser um fator que contribui negativamente para a presença dos pequenos felinos em áreas mais alteradas.



A baixa densidade das espécies de pequenos felinos nos fragmentos no interior do estado pode ser considerada preocupante, uma vez que sendo mais sensíveis à mudança da paisagem, as mesmas podem tornar-se cada vez mais raras no atual cenário de perda de habitat. Por isso, a presença de áreas mais conservadas é essencial para a manutenção dessas populações, principalmente para as espécies mais sensíveis. Também ressaltamos que a amostragem não invasiva se mostra uma eficiente alternativa para estudo demográfico de espécies elusivas e de baixa densidade como os carnívoros, permitindo os levantamentos e monitoramento das populações em longo prazo.

## Capítulo II

### Estruturação populacional e diversidade genética de *Puma concolor* em uma paisagem fragmentada



## **5. Capítulo II: Estruturação populacional e diversidade genética de *Puma concolor* em uma paisagem fragmentada**

### **5.1. Introdução**

O atual cenário de intensa degradação e redução da cobertura florestal pode impor barreiras a dispersão dos animais devido à redução da conectividade entre os remanescentes de vegetação ou devido o surgimento de uma nova barreira (ANDREN, 1994; EWERS; DIDHAM, 2006; KRUESS; TSCHARNTKE, 1994; TSCHARNTKE et al., 2012) como uma rodovia, centro urbano, monocultura etc. Essa limitação do deslocamento dos indivíduos pode levar à redução do fluxo gênico entre as populações (GERLACH; MUSOLF, 2000) e, conseqüentemente, elevar o grau de endogamia e reduzir a diversidade genética das populações remanescentes (HELLER; OKELLO; SIEGISMUND, 2010). Em longo prazo, a redução das populações as torna mais suscetíveis a eventos estocásticos, reduzindo a variabilidade genética e diminuindo a sua viabilidade (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2010), podendo resultar na extirpação local da espécie (FRANKHAM, 2005, 2010). Devido à perda e fragmentação de seus habitats, muitas espécies já apresentam perda da diversidade genética e estruturação de suas populações decorrente desse processo (DUTTA et al., 2013; HAAG et al., 2010; JANEČKA et al., 2011; MCMANUS et al., 2015; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017; SRBEK-ARAÚJO et al., 2018). Até mesmo espécies consideradas de hábitos mais generalistas, como algumas espécies de grandes carnívoros, já têm sofrido essas conseqüências, resultando na estruturação genética de suas populações (DUTTA et al., 2013; ERNEST et al., 2014; MCMANUS et al., 2015). Dessa forma, permitir que os indivíduos se desloquem nas paisagens cada vez mais fragmentadas é um desafio para conservação da biodiversidade em longo prazo.

Os grandes carnívoros podem ser particularmente mais sensíveis à perda e fragmentação do habitat devido à baixa densidade em que ocorrem e necessidade de grandes áreas de vida (CROOKS, 2002; CROOKS et al., 2011). Dessa forma, suas

populações encontram-se cada vez mais restritas a pequenas áreas e reduzida a poucos indivíduos (RIPPLE et al., 2014). Mais recentemente, diversos trabalhos têm demonstrado que determinadas atividades antrópicas, mesmo elas sendo relativamente recentes, podem ocasionar estruturação populacional em fina escala devido à limitação do deslocamento dos indivíduos na paisagem local (DUTTA et al., 2013; MCMANUS et al., 2015; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017; SINGH et al., 2017).

Dentre as espécies de grandes carnívoros, a onça-parda (*Puma concolor*) também tem enfrentado as consequências (aumento dos atropelamentos, maior contato com humanos resultando em conflitos, doenças devido à proximidade com animais domésticos etc.) decorrentes de perda e fragmentação do habitat, (Loxterman 2011; Ernest et al. 2014). A espécie distribui-se por todo o continente Americano onde são registradas diferentes linhagens genéticas correspondendo a seis subespécies (CULVER et al., 2000). É considerada de hábitos generalistas e com alta capacidade de deslocamento (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; LOGAN; SWEANOR, 2001). No entanto, na América do Norte, onde a espécie tem sido mais amplamente estudada, alguns trabalhos já registraram estruturação em suas populações que se devem principalmente às mudanças da paisagem, incluindo a perda de habitat, surgimento de grandes centros urbanos ou redução da dispersão devido à grande malha viária (Loxterman 2011; Ernest et al. 2014). Tais limitações ao fluxo já levaram à perda de diversidade genética na população local, fazendo com que a mesma já exiba os efeitos deletérios da endogamia (ERNEST et al., 2014). Um exemplo direto da endogamia, as torções nas extremidades de suas caudas, foi reportado para a espécie em locais onde a mesma passou por redução populacional drástica, devido à perda de seu habitat e intensa pressão de caça (CULVER et al., 2008; ROELKE; MARTENSON; O'BRIEN, 1993).

No Brasil, poucos trabalhos buscaram avaliar a ocorrência de estruturação populacional para a espécie (CASTILHO et al., 2012; MIOTTO et al., 2011; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017). Com exceção do trabalho mais recente de Saranholi e colaboradores (2017) que investigou a ocorrência de

estruturação populacional em fina escala para a espécie por uma barreira antrópica associada às mudanças da paisagem, os demais trabalhos não detectaram estruturação para a espécie. Historicamente, é reconhecida apenas uma linhagem e ausência de estruturação populacional a partir de marcadores mitocondriais para a nossa região de estudo (CULVER et al. 2000; MATTE et al. 2013). No entanto, as atividades antrópicas têm alterado muito a paisagem nos últimos anos, em particular para a região sudeste do Brasil, a região mais desenvolvidas do país, onde seus dois biomas, Mata Atlântica e Cerrado, já foram reduzidos a 16% e a menos da metade de suas coberturas originais, respectivamente (KLINK; MACHADO, 2005; LYRA-JORGE et al., 2009). Portanto, faz-se necessário mais estudos tentando compreender as consequências dessa drástica alteração em escala mais ampla, avaliando a ocorrência de estruturação populacional e possível redução da diversidade genética para a espécie.

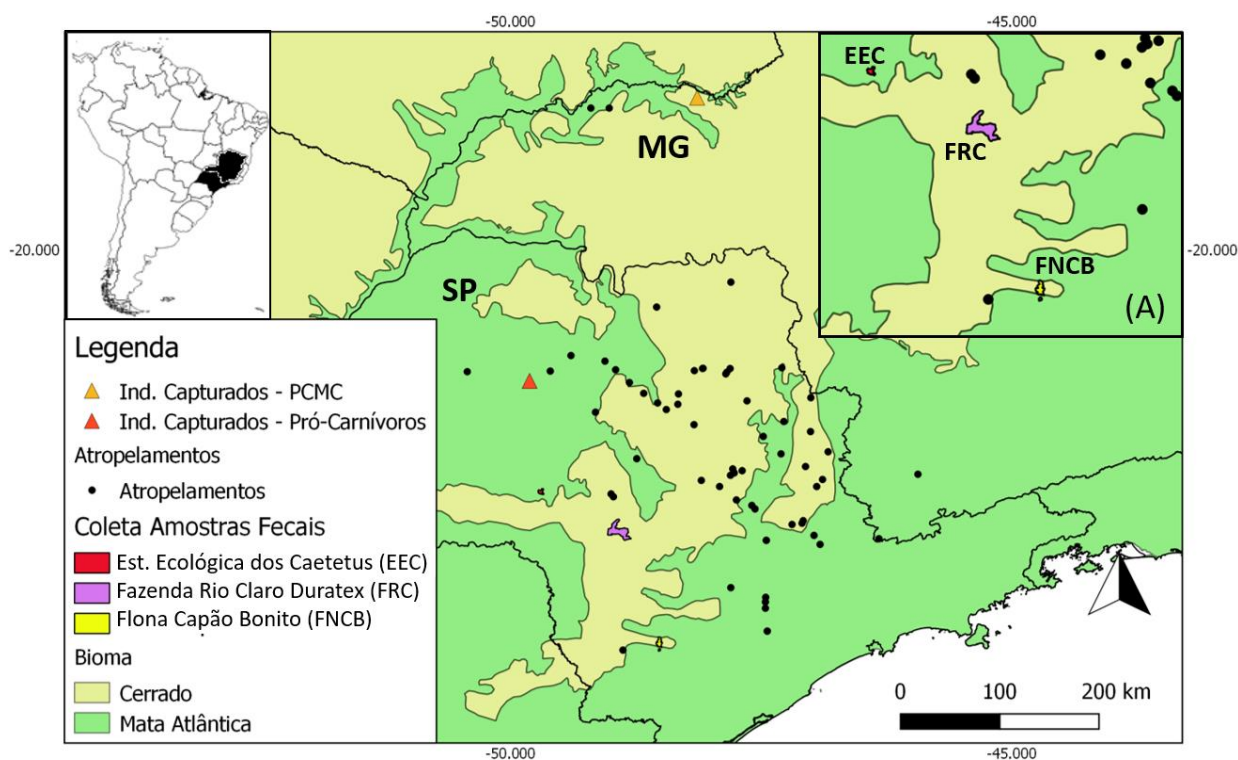
Nesse sentido, este trabalho buscou verificar a ocorrência de estruturação populacional para a espécie *P. concolor* em uma região de intensa perda de habitat. Nossa hipótese é de que, apesar da espécie ser considerada generalista, será observado estruturação na região estudada, uma vez que alguns trabalhos já demonstraram isso para a espécie em áreas com intensa modificação.

## **5.2. Material e Métodos**

### **5.2.1. Área de estudo**

O estudo foi conduzido na região sudeste do Brasil, compreendendo os estados de São Paulo e Minas Gerais (Figura II.1). Para as amostras do estado de São Paulo, foram utilizados dados a partir da obtenção de amostras fecais coletadas em unidade de conservação, amostras obtidas de indivíduos de *P. concolor* atropelados e indivíduos capturados no projeto parceiro Pró-carnívoros/AES-Tietê (Projeto “A onça-parda na bacia do rio Tietê”). As amostras de fezes foram coletadas em três áreas de conservação do estado: a Estação Ecológica dos Caetetus (EEC) com 2.100 ha e localizada entre os

municípios de Gália e Alvinlândia (São Paulo); a segunda área é a Floresta Nacional de Capão Bonito (FNCB) com 4.770 ha localizada na cidade de Capão Bonito (São Paulo) e na Fazenda Rio Claro da Duratex (FRC) com 23.000 ha localizada na cidade de Lençóis Paulista (São Paulo). As amostras de indivíduos atropelados foram coletadas principalmente em rodovias da região central do estado (Figura II.1), onde temos registrado um grande número de atropelamentos. As amostras da colaboração com o projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê foram coletadas a partir da captura de indivíduos na região de Promissão-SP (Figura II.1). Já as amostras de Minas Gerais foram obtidas através da parceria com a equipe do PCMC (Programa de Conservação dos Mamíferos do Cerrado) que realizam um estudo amplo com a espécie na região do Triângulo Mineiro (Figura II.1) e, para isso, realizam capturas dos animais para responder diversas questões, entre elas, aspectos genéticos da população.



**Figura II.1.** Áreas de estudo representando as áreas de coleta para as amostras fecais, os atropelamentos e a captura de indivíduos. (A) Destaque para as três áreas de coleta de amostras de fezes: Estação Ecológica dos Caetetus (vermelho); Fazenda Rio Claro da Duratex (roxo); Floresta Nacional de Capão Bonito (amarelo).

### 5.2.2. Coleta, armazenamento das amostras e extração do DNA

As coletas das amostras de fezes foram conduzidas através da busca ativa das amostras por trilhas e estradas de terra existentes nas áreas de estudo, já que os felinos têm como hábito o uso delas para o seu deslocamento e marcação de território (CHAME, 2003) (Figura II.2). As coletas foram concentradas dentro de períodos curtos (dois meses) realizadas duas vezes (uma estação seca e uma estação chuvosa) ao ano para cada área durante o primeiro ano do estudo (2014 a 2015). Em cada área, o esforço de amostragem foi de 15 a 17 km percorridos em cada mês dos períodos amostrais.

As amostras de fezes frescas e potencialmente pertencentes à felinos com base em sua morfologia foram coletadas e armazenadas em tubos de polipropileno contendo etanol absoluto e mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração. As amostras coletadas foram armazenadas em tubos de polipropileno contendo etanol absoluto e mantidas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração. Todos os pontos de coleta foram registrados com equipamento de GPS (*Global Positioning System*). Para a obtenção do DNA das amostras fecais, utilizamos o *kit* de extração “*QIAamp DNA Stool Mini Kit*” (Qiagen), que é específico para amostras fezes por retirar os inibidores de PCR (*Polymerase Chain Reaction*) presentes nelas e que tem demonstrado bons resultados em estudos anteriores (ALBERTS et al., 2017; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2018; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017)

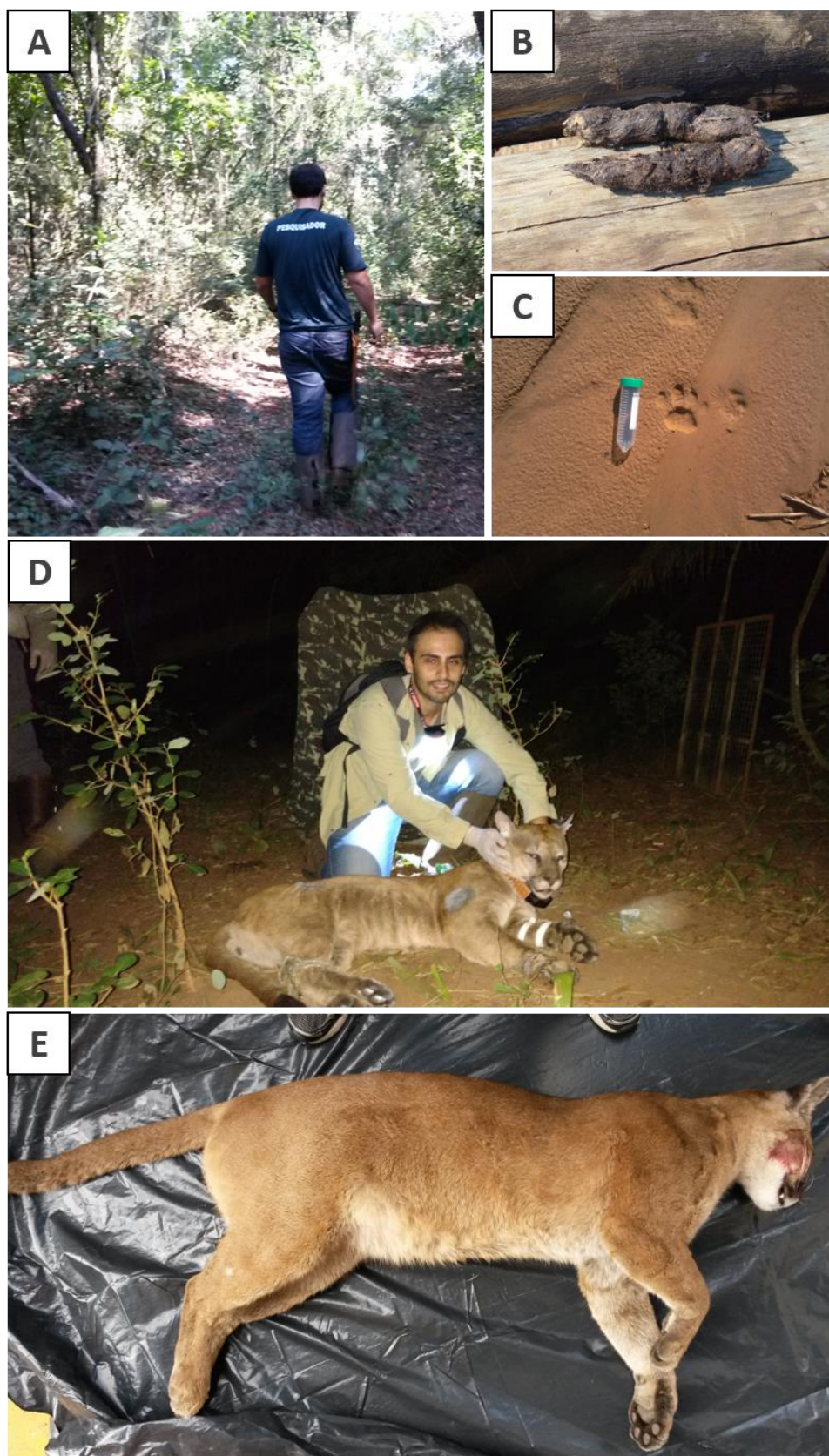
As amostras de tecido de indivíduos atropelados foram coletadas diretamente por nós nos pontos de atropelamento após recebermos os comunicados de algumas concessionárias de rodovias ou parceiros (Figura II.2) no período entre 2012 a 2017. Outras amostras foram cedidas por colaboradores (Hospitais veterinários ou Zoológicos) que recebiam esses animais para tratamento e, então nos sediam uma amostra dos indivíduos juntamente com as informações do local do atropelamento. Amostras de tecido (músculo) foram armazenadas em micrutubo de 2,0 mL contendo etanol 70% e amostras de sangue foram armazenadas em tubos Vacutainer<sup>®</sup> contendo como anticoagulante EDTA. As amostras de tecido e sangue foram mantidas em freezer  $-20^{\circ}\text{C}$  até a extração do

DNA que foi realizada através do protocolo de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

Em relação aos indivíduos capturados em parceria com a equipe do PCMC (Figura II.2) e com o projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê, foram retidas amostras de sangue desses animais que foram mantidas em tubo Vacutainer<sup>®</sup> contendo EDTA e armazenadas em freezer -20°C até a obtenção do DNA com o protocolo de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989). Para as amostras de tecido e sangue, o DNA obtido foi quantificado em biofotômetro (Eppendorf Biophotometer) para a padronização de alíquotas a 50ng/μl para uso nas PCRs.

Todas as coletas realizadas foram autorizadas pela instituições responsáveis (Licenças SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – MMA/ICMBIO: **42524-2, 42524-3, 42524-4**; Licença COTEC - Comissão Técnico-Científica – SMA/ Instituto Florestal: **416/2014 D052/2014 BA**), além da aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR), segundo o n° **UFSCAR CEUA 4823120615**.





**Figura II.2.** Coletas das amostras em campo. (A), (B), (C): busca por vestígios e amostras não-invasivas. (D): Participação nas campanhas de captura com a equipe do PCMC para coleta de amostras. (E): Indivíduo de onça-parda atropelado.

### 5.2.3. Identificação molecular da espécie das amostras de fezes

Para as amostras de fezes, realizamos a identificação molecular para verificarmos se pertenciam a espécie *P. concolor*. Para isso, utilizamos os marcadores (Cytb e ATP6, FARREL et al., 2000; CHAVES et al. 2012) e a metodologia já descrita no *Capítulo I* deste trabalho. Já para as amostras de tecido dos indivíduos atropelados ou dos indivíduos capturados, não foi necessária realizar a identificação molecular, uma vez que tivemos a oportunidade de conferir a espécie do animal.

### 5.2.4. Individualização molecular das amostras de fezes e obtenção dos genótipos para todas as amostras

Para a obtenção dos genótipos para a individualização das amostras de fezes, seguimos a mesma metodologia descrita no *Capítulo I*, utilizando um painel *multilocus* de microssatélites (A208, A216, A339A, B003, B010, B210, FCA126A, C108A e FCA077A) (KURUSHIMA et al., 2006; MENOTTI-RAYMOND et al., 1999) e identificando indivíduos a partir do agrupamento das amostras a partir dos mesmos genótipos utilizando o *software* Gimlet (VALIÈRE, 2002). Também calculamos os valores de  $P_{id}$  e  $P_{idsibs}$  para verificarmos o poder de individualização dos *loci* (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001) no *software* GenAlexv6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Devido a qualidade do DNA das amostras fecais, foram realizadas réplicas como descrito no *Capítulo I* para mensurar *allelic-dropout* (TABERLET et al., 1996). Após a individualização das amostras de fezes, realizamos a amplificação para as amostras de tecido para a obtenção dos genótipos.

Para reduzir os custos de genotipagem, foi seguida a metodologia proposta por Schuelke (2000). Nessa metodologia, em todos os *primers forward* foi acrescentada uma cauda universal de 18 pares de bases (cauda M13) a qual se liga a um *primer* contendo a fluorescência para a genotipagem. O protocolo de PCR para volume final de 10  $\mu$ L seguiu as seguintes concentrações: 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM);

0,2  $\mu$ M de dNTPs, 3 a 4 mM de  $MgCl_2$  (50 mM, Invitrogen) para amostras fecais e 3 mM de  $MgCl_2$  (50 mM, Invitrogen) para amostras de tecido ou sangue; 0,2 pmol do *primer forward* e do *primer* marcado com fluorescência; 0,8 pmol do *primer reverse*; 1 unidade de *Taq Polymerase Platinum* (Invitrogen); 0,25 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 3 a 5  $\mu$ L de DNA molde para amostras fecais e 50ng de DNA das amostras de tecido ou sangue e água ultrapura até completar o volume final. As amplificações foram conduzidas em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 55 a 58°C (variação na temperatura para garantir a amplificação do DNA dependendo da qualidade da amostra) por 45 segundos, 74°C por 1 minuto; seguidos de 8 ciclos para incorporação da fluorescência à cauda M13 com 94°C durante 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C a 45°C; e uma extensão final de 15 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e enviados para genotipagem em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas dos genótipos foram analisados no *software* Geneious v7 (KEARSE et al., 2012).

### 5.2.5. Sexagem molecular

Após a identificação dos indivíduos, realizamos a sexagem molecular utilizando o par de *primers* descritos por Pilgrim e colaboradores (2005) que amplificam uma região do gene da Amelogenina presente nos cromossomos sexuais. No caso das fêmeas, são amplificados dois fragmentos de 214 pb correspondentes aos dois cromossomos X. Já nos machos, ocorre a amplificação de um fragmento de 214 pb (cromossomo X) e outro de 194 pb, resultante de uma deleção de 20 pb no cromossomo Y. Após as PCRs, seus produtos foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% por 120 minutos (100 volts). Foram utilizados controles positivos e negativos para todas as PCRs e três réplicas para evitar a detecção de falsas fêmeas devido a não amplificação de uma região.

## 5.2.6. Análises genéticas

### *Estruturação populacional*

Primeiramente, verificamos uma possível estruturação genética devido a distância geográfica entre os indivíduos, para isso, os valores de distância genética e distância geográfica entre os indivíduos foram comparados par-a-par para verificamos uma possível correlação através do teste de Mantel realizado no *software* GenAlex v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Para verificar a presença de estruturação genética, conduzimos a análise de agrupamento no *software* Structure 2.2 (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), assumindo o modelo de “*Admixture Model*” e ‘*Correlated allelic frequencies*’. A análise foi feita sem informação *a priori* da origem dos indivíduos. Testamos as probabilidades dos indivíduos pertencerem de 1 a 10 populações diferentes ( $1 < K < 10$ ) utilizando como parâmetros 100 réplicas independentes para cada K, *burn-in* 100000 de passos e 200000 interações para a “*Markov Chain Monte Carlo*”. O K mais provável foi definido através do cálculo do valor de  $\Delta K$  como descrito por Evanno e colaboradores (2005) utilizando o *software* Structure Harvester (EARL; VONHOLDT, 2012) e também pelo método proposto por Pritchard e colaboradores (2000), no qual o melhor K é aquele que maximiza o valor de LnP (Probabilidade logarítmica) e que ao mesmo tempo possua a menor variância. Segundo alguns trabalhos (JOMBART, 2008; JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010), o *software* Structure pode falhar em algumas situações para detectar o real número de *cluster* devido as suas premissas dos modelos populacionais, por isso, o uso de diferentes abordagens é altamente recomendável. Assim, também foram feitas análises de agrupamento Bayesianas utilizando um modelo espacial incluindo os dados de origem geográfica dos indivíduos, a qual pode ser capaz de identificar estruturações mesmo que ainda crípticas (MCMANUS et al., 2015). A análise foi conduzida no pacote Geneland (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005) no *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e usamos como parâmetros o modelo espacial com frequência de alelos não correlacionados, mesmo sendo menos sensível para detectar estruturações sutis.

Testamos os valores de K variando de 1 a 10 com 10 rodadas independentes utilizando função *loop* (“nrun”).

Como análises complementares, testamos a existência de estruturação populacional pela análise multivariada de FCA (*Factorial Component Analysis*) no *software* Genetix (BELKHIR et al., 2004) que considera que os dados genéticos utilizados são multivariados devido ao conjunto de *loci* utilizados. Também conduzimos a análise de Componentes principais discriminantes (DAPC - *Discriminant analysis of principal components*) a qual não assume a necessidade de modelos populacionais e visa maximizar a diferenciação entre os grupos com base na variação genética (JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010). A análise foi conduzida no pacote Adegenet (JOMBART, 2008) implementada no *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) e o K mais provável foi definido pelo menor valor de BIC (*Bayesian Information Criterion*) usando a função *find.clusters*. Em seguida, selecionamos o número de funções discriminantes (*dapc(mydata, grp\$grp, n.pca= )*) e selecionamos o melhor número de componentes pela função *optim.a.score*.

Após a detecção de possíveis *clusters*, foram calculados os valores do índice de fixação de Wright ( $F_{ST}$ ) (WRIGHT, 1949) no FSTAT 2.9.3.2 (GOUDET, 2001) e o valor do  $D_{est}$  proposto por Jost (2008) através do pacote DEMetics (JUETERBOCK et al., 2012) implementado no *software* R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2011) para verificar se eles corroboram com uma possível estruturação. O uso do  $D_{est}$  se deve ao seu menor viés para marcadores altamente polimórficos como os microssatélites (JOST, 2008). Os cálculos de  $F_{ST}$  e  $D_{est}$  foram feitos para todas as combinações par-a-par entre todos os *clusters* identificados. Também verificamos a presença de alelos exclusivos em cada *cluster* no *software* GenAIEx 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012).

Por fim, verificamos o número de migrantes por geração ( $N_m$ ) utilizando o método de alelos privados (SLATKIN, 1985) no *software* Genepop 4.6 (ROUSSET, 2008). Também foram verificados migrantes de primeira geração no *software* GeneClass (PIRY et al., 2004) utilizando o método baseado nas frequências (PAETKAU et al., 1995).

### ***Diversidade Genética***

Após verificar o número de possíveis *clusters* genéticos, verificamos a presença de alelos nulos e *allelic-dropout* no *software* Micro-Checker v.2.2.3 (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Em seguida, verificamos desequilíbrio de Hardy–Weinberg (HWE) e desequilíbrio de ligação (LD) utilizando o *Software* Genepop v.4.0.10 (ROUSSET, 2008). Os valores de p foram corrigidos utilizando a correção de Bonferroni (RICE, 1989). No *software* CERVUS (KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007) verificamos o quão informativo foram os *loci* utilizados pelo cálculo do conteúdo de informação polimórfica (PIC) (BOTSTEIN et al., 1980). Calculamos os valores de heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), número de alelos (A), alelos privados ( $P_a$ ) e alelos efetivos ( $N_e$ ), que consideram os alelos mais frequentes no *software* GenAlEx v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Déficits ou excesso de heterozigotos foram avaliados pelo cálculo do coeficiente de endogamia ( $F_{is}$ ) no *software* FSTAT v.2.9.3.2 (GOUDET, 2001). Também calculamos os valores de riqueza alélica (RA), que consiste no número de alelos corrigido pelo tamanho amostral através da rarefação (KALINOWSKI, 2005).

## **5.3. Resultados e Discussão**

### **5.3.1. Amostras individualizadas e indivíduos analisados**

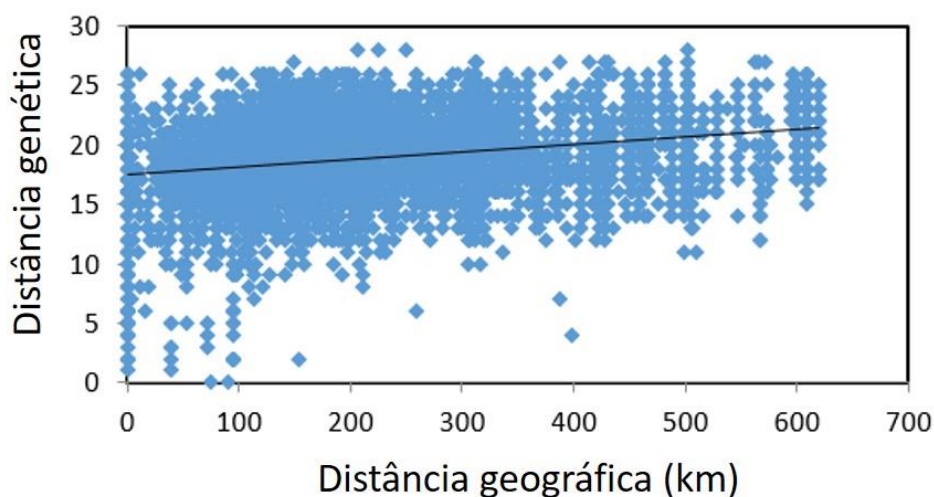
Após individualização molecular das amostras fecais, chegamos em um total de 97 indivíduos de *P. concolor*, sendo 18 obtidos a partir da individualização das amostras fecais nas unidades de conservação (EEC, FRC e FNCB) (*Capítulo I*), 13 indivíduos capturados na região do triângulo mineiro, três indivíduos capturados no projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê e 63 obtidos a partir dos atropelamentos (Tabela II.1, Figura II.1).

**Tabela II.1.** Origem dos indivíduos analisados de *P. concolor*.

Origem dos Indivíduos analisados	Número de Indivíduos
<i>Atropelamentos</i>	63
<i>Amostras fecais</i>	
EEC	5
FNCB	7
FRC	6
<i>Capturas</i>	
Triângulo-Mineiro (PCMC)	13
Promissão (Pró-carnívoros/AES-Tietê)	3
	97

### 5.3.2. Estruturação Populacional

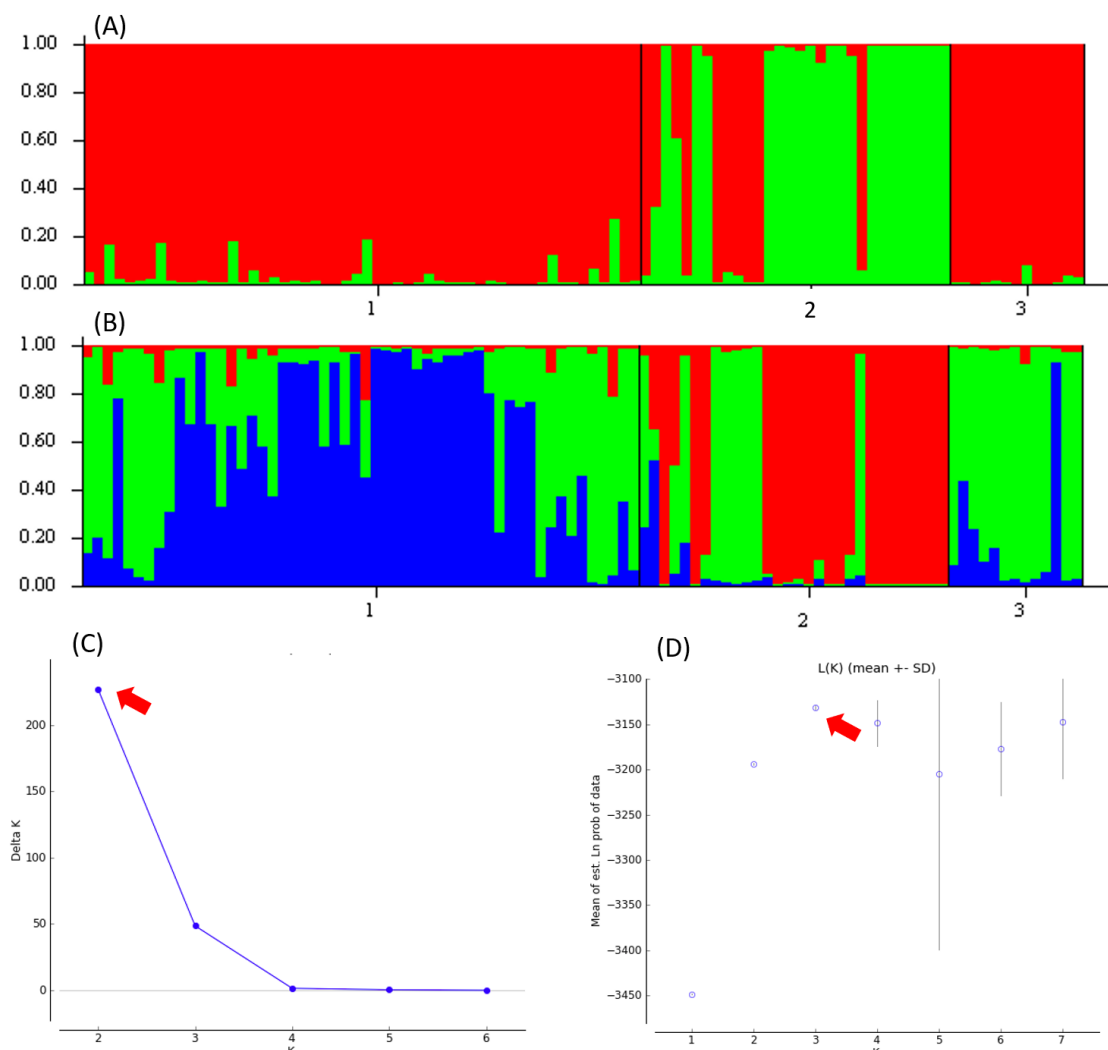
A análise de correlação entre a distância genética e geográfica entre os indivíduos par-a-par indicou uma baixa correlação entre as variáveis ( $r^2=0,053$ ,  $p>0,05$  Figura II.3), dessa forma, ficaria descartada uma estruturação populacional devido a isolamento por distância, o que também não faria sentido biológico na escala geográfica do estudo, uma vez que a onça-parda apresenta uma grande capacidade de dispersão (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; LOGAN; SWEANOR, 2001).



**Figura II.3.** Análise de correlação entre a distância genética e a distância geográfica (Teste de Mantel), indicando baixa correlação entre os valores ( $r^2=0,053$ ,  $p>0,05$ ).

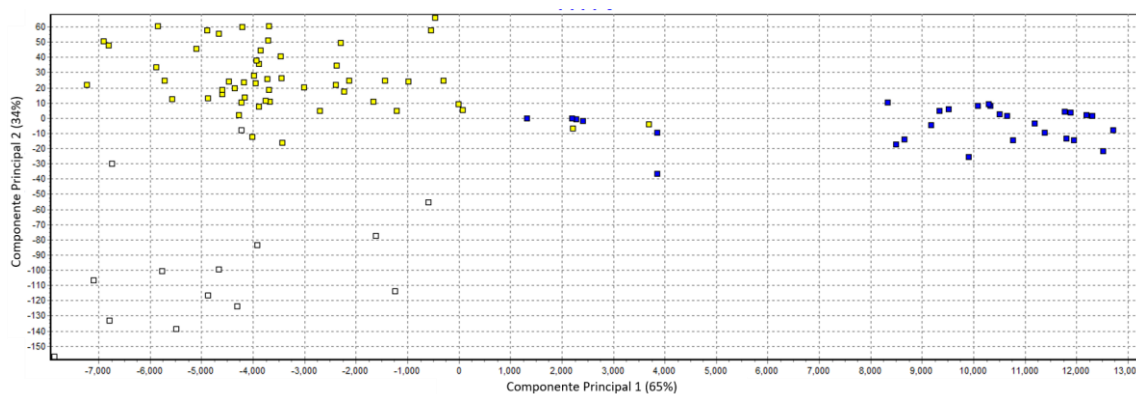
A análise bayesiana de agrupamento resultou em valores de  $K=2$  e  $K=3$ , de acordo com o critério de seleção adotado para identificar o  $K$  mais provável. De acordo com o método de  $\Delta K$  proposto por Evanno e colaboradores (2005) o número de *cluster* mais provável seria  $K=2$  (Figura II.4 A,C), no qual um grupo seria formado pelos indivíduos atropelados na região norte do estado de São Paulo juntamente com indivíduos capturados no triângulo mineiro e o segundo grupo formado pelos indivíduos atropelados na região sul do estado de São Paulo, abaixo do Rio Tietê, juntamente com os indivíduos coletados nas três unidades de conservação e os três indivíduos da colaboração com Pró-carnívoros/AES-Tietê. No entanto, de acordo com o método de Pritchard et al. (2000), no qual o melhor de  $K$  é aquele que maximiza o valor de  $\ln P(K)$  e que ao mesmo tempo possua a menor variância, o  $K$  mais provável seria  $K=3$  (Figura II.4 B, D).





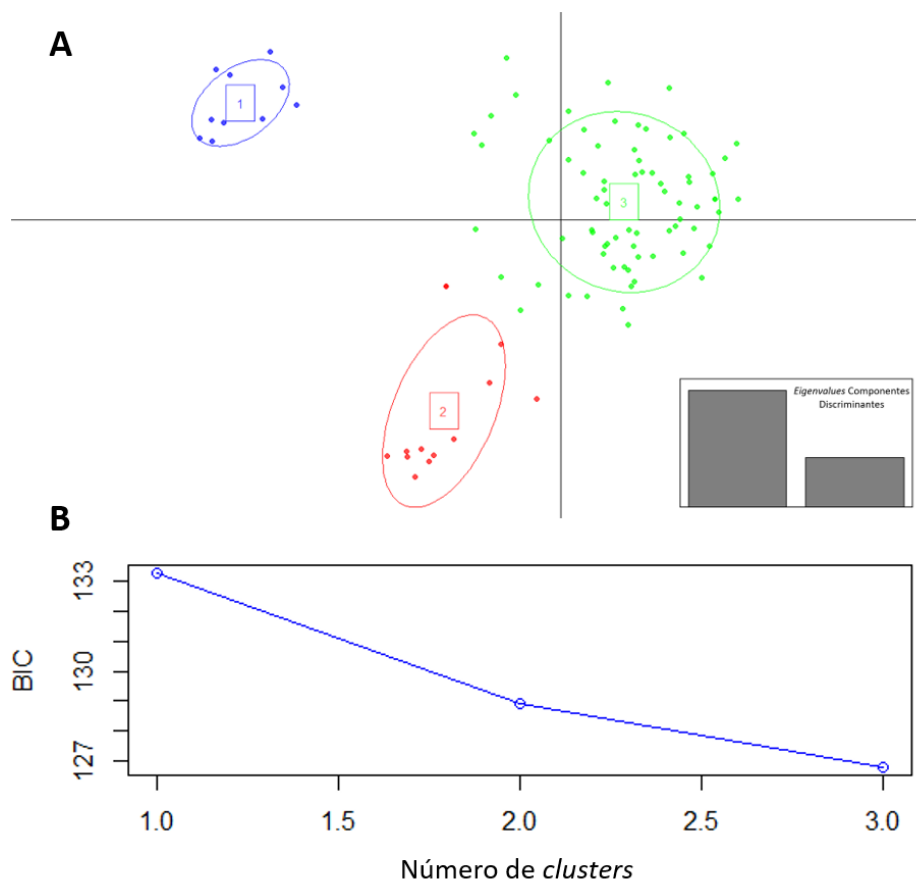
**Figura II.4.** Análise bayesiana conduzida no *software* Structure. Os gráficos indicam a presença de  $K=2$  (A) de acordo com o método de Evanno e colaboradores (2005) (C) e  $K=3$  (B) de acordo com o método de Pritchard et al. (2000) (D).

É possível identificar a presença de três nuvens na análise de FCA, indicando a presença de três *clusters* (Figura II.5). Os eixos do gráfico demonstram que dois componentes explicam 99% da variação dos dados (65% componente 1 e 34% componente 2), mostrando que os *loci* foram altamente informativos para representar a variação entre os indivíduos. Cada nuvem, é representada pelos indivíduos do triângulo-mineiro (grupo branco), indivíduos atropelados localizados ao norte do estado de São Paulo (grupo amarelo) e os indivíduos da coleta através das amostras não invasivas juntamente com os indivíduos atropelados ao sul do estado de São Paulo e os três indivíduos capturados com o projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê (grupo azul) (Figura II.5).



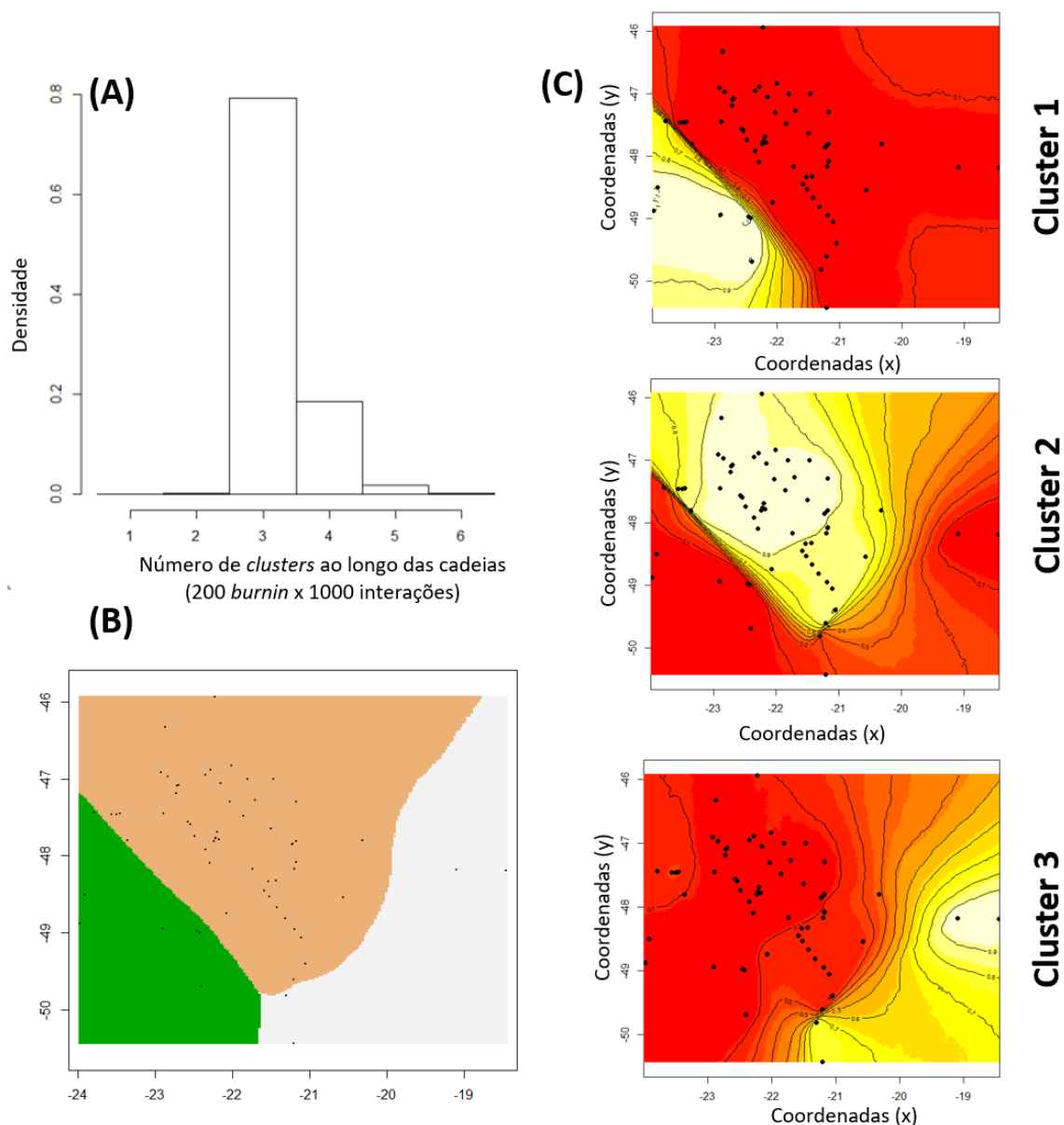
**Figura II.5.** A análise de componentes fatoriais (FCA - *Factorial Component Analysis*), indicando a presença de três *clusters*: **grupo-1, branco:** indivíduos do triangulo-mineiro; **grupo-2, amarelo:** indivíduos atropelados localizados ao norte do estado de São Paulo; **grupo-3, azul:** indivíduos da coleta não invasiva juntamente com os indivíduos atropelados ao sul do estado de São Paulo.

A terceira análise de componentes principais discriminantes demonstram o mesmo padrão encontrado anteriormente, sugerindo a existência de três *clusters* (Figura II.6) que são representados pelos mesmos grupos discutidos acima.



**Figura II.6.** (A) Análise de componentes principais discriminantes-DAPC, indicando a presença de três *clusters*: **grupo-1:** indivíduos do triangulo-mineiro; **grupo-2:** indivíduos da coleta não invasiva juntamente com os indivíduos atropelados ao sul do estado de São Paulo e os três indivíduos capturados com o projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê; **grupo-3:** indivíduos atropelados localizados ao norte do estado de São Paulo. (B) Valores de BIC (*Bayesian Information Criterion*) para cada número de *clusters*, indicando que o número mais provável de *clusters* é 3.

Por fim, a análise bayesiana com modelo espacial conduzida no pacote Geneland (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005) demonstra novamente a presença de três *clusters* (Figura II.7), mostrando a formação dos mesmos grupos anteriormente.



**Figura II.7.** *Clusters* identificados pela análise bayesiana com modelo espacial. O número de  $K$  mais provável indicado pela análise é  $K=3$ , como indicado pelo número mais provável de  $K$  ao longo das cadeias (A), assim como pela distribuição dos indivíduos alocados em três diferentes *clusters* (B). O *cluster 1* (verde) é formado pelos indivíduos da coleta não invasiva juntamente com os indivíduos atropelados ao sul do estado de São Paulo e os indivíduos capturados pelo projeto Pró-carnívoros/AES-Tietê; o *cluster 2* (rosa) é formado pelos indivíduos atropelados localizados ao norte do estado de São Paulo e o *cluster 3* (cinza) é formado pelos indivíduos capturados no do triângulo-mineiro (C). Os pontos pretos representam a localidades dos indivíduos. Valores mais alto de probabilidade de pertencer ao *cluster* são representados pelas cores amarela e branca.

Com exceção da análise conduzida no *software* Structure que indicou a presença de dois ou três *clusters* de acordo com o critério de seleção adotado, todas as demais análises apontam a formação de três grupos, indicação a ocorrência de estruturação.

Assim, os valores dos índices de fixação  $F_{st}$  (WRIGHT, 1949) e  $D_{est}$  (JOST, 2008) foram usados para fazer a comparações par-a-par dos três grupos encontrados nos resultados anteriores, uma vez que todos os valores entre a comparações foram significativos (Tabela II.2, Tabela II.3). Os valores encontrados para  $F_{st}$  e  $D_{est}$  foram semelhantes ou até mesmo maiores aos resultados de outros trabalhos que também detectaram estruturação populacional para espécies de felinos (ERNEST et al., 2014; JANECKA et al., 2017; JANEČKA et al., 2008; MCRAE et al., 2005).

**Tabela II.2.** Valores de  $F_{st}$  par-a-par para os três *clusters* detectados.

$F_{st}$		
	Pop2	Pop3
Pop1	0,10413*	0,03587*
Pop2	-	0,12321*

\*Valores significativos ( $p < 0,05$ )

**Tabela II.3.** Valores de  $D_{est}$  par-a-par para os três *clusters* detectados.

$D_{est}$		
	Pop2	Pop3
Pop1	0,39**	0,17**
Pop2	-	0,47**

\*Valores significativos ( $p < 0,01$ )

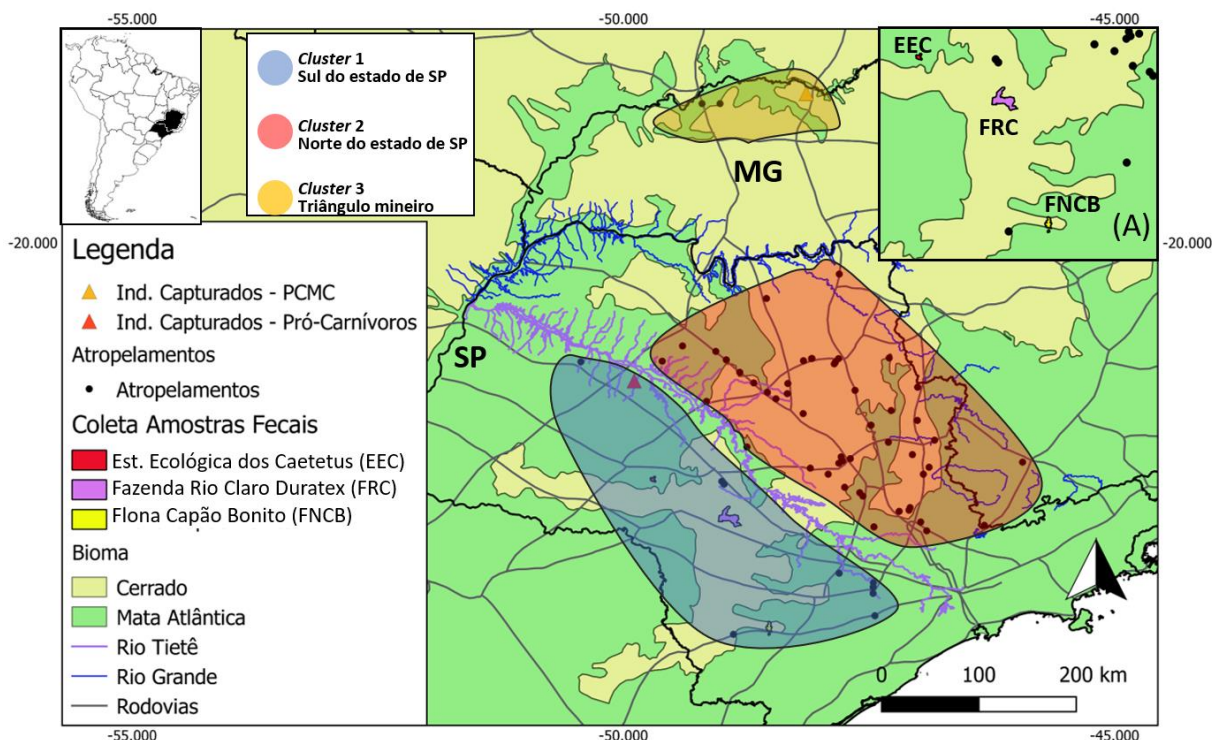
Após a identificação dos *clusters*, verificamos a presença de alelos privados em todos os *clusters*, sendo que o *cluster* 2 é o que apresenta um maior número de alelos privados (Tabela II.4). Assim como em outros trabalhos que detectaram estruturação populacional em espécies de carnívoros (DUTTA et al., 2013; MCMANUS et al., 2015; SRBEK-ARAUJO et al., 2018), a presença de alelos privados pode ser mais um indicativo da redução do fluxo gênico entre as populações.

Dessa forma, todas as análises conduzidas indicam a existência de estruturação populacional, formando três clusters representados na **Figura II.8** para melhor visualização dos mesmos. Nos trabalhos anteriores conduzidos no Brasil que tiveram como objetivo avaliar estruturação populacional para *P. concolor* (CASTILHO et al., 2012; MIOTTO et al., 2011), os autores não detectaram estruturação populacional genética. No trabalho de Castilho e colaboradores (2012) desenvolvido predominantemente na região sul do estado de Santa Catarina, os autores sugerem que a matriz estudada ainda seria permeável para a espécie. Já Miotto e colaboradores (2011) realizou o estudo em uma escala geográfica bem mais restrita entre três unidades de conservação no interior do estado de São Paulo, o que explicaria a ausência de estruturação devido a capacidade de dispersão da espécie, além da falta de uma barreira evidente entre as áreas estudadas. No estudo mais recente de Saranholi e colaboradores (2017), a estruturação populacional foi detectada pela primeira vez para a espécie na América do Sul possivelmente devido a presença de barreiras antrópicas (a perda e fragmentação do habitat, rodovias e alargamento do rio Tietê devido a construção de lagos artificiais). Neste trabalho conduzido em escala mais ampla, a estruturação detectada por Saranholi e colaboradores (2017) continua sendo detectada e corresponde à estruturação entre o norte e sul do estado de São Paulo (Figura II.7, *clusters* 1 e 2).

A partir dos resultados obtidos aqui, essa estruturação se torna ainda mais evidente, reforçando a hipótese de Saranholi e colaboradores (2017) de que as mudanças na paisagem associada à grandes atividades antrópicas como rodovias e o represamento do rio Tietê (promovendo a formação de um grande lago), já podem estar atuando como barreiras para a dispersão dos indivíduos e resultando em estruturação populacional. A análise bayesiana com modelo espacial, que é mais sensível em detectar até mesmo estruturas mais sutis, consegue mostrar bem os limites entre os *clusters* 1 e 2, o qual corresponde justamente a presença de uma série de lagos artificiais surgidos pelo represamento do Tietê (Figura II.7), como sugerido por Saranholi e colaboradores (2017). É importante destacar que tal estruturação não se deve a um processo histórico, já que

trabalhos anteriores mostram que a região estudada corresponde a uma única linhagem genética com haplótipos compartilhados entre ambos os lados do rio (CULVER et al., 2000; MATTE et al., 2013). Assim, apesar da espécie ter hábitos generalistas e grande capacidade de dispersão (ANDERSON; LINDZEY; MCDONALD, 2004; LOGAN; SWEANOR, 2001), atividades antrópicas podem atuar como barreiras (ERNEST et al., 2014). Além disso, como propomos, grandes corpos de água já foram descritos como potenciais barreiras para a espécie (DICKSON et al., 2013; WALLER; WHEELER, 2012; WEBER; RABINOWITZ, 2009) e a atividade antrópica promovendo o aumento dessas barreiras pode representar uma limitação de dispersão ainda maior para a espécie, principalmente se somada a outras modificações na paisagem. Alguns trabalhos têm demonstrando que mesmo elementos recentes inseridos no habitat já podem ser detectados pelas análises genéticas como barreiras para o deslocamento de indivíduos, resultando em estruturação populacional (MCMANUS et al. 2015, YU et al. 2017).

Quanto a presença do terceiro *cluster* formado pelos indivíduos do triângulo mineiro, também acreditamos que a intensa perda de habitat da Mata-atlântica e do Cerrado (KLINK; MACHADO, 2005; RIBEIRO et al., 2009) que recobrem essa área podem estar limitando a dispersão da espécie, juntamente como o surgimento de grandes cidades, rodovias e represamento do Rio Grande (Tabela II.8). Assim, fica evidente de que mesmo uma espécie de comportamento plástico como a onça-parda pode sofrer as consequências da alteração do seu habitat, resultando em limitação da sua movimentação e do fluxo entre as suas populações.



**Figura II.8.** Definição dos três *clusters* detectados após as análises de estruturação populacional.

Apesar da estruturação detectada, ainda foram registrados migrantes entre os *clusters*. A taxa média de migrantes por geração foi  $N_m=3,14$ . A existência de migrantes mesmo após a detecção dos grupos genéticos continua fazendo sentido, já que não seria esperado a ausência total de migrantes para uma espécie com grande dispersão como a onça-parda, além disso, essa taxa também reflete um fluxo gênico histórico entre as áreas. O valor de  $N_m$  aqui encontrado é menor quando comparado a outros trabalhos que também detectaram estruturação populacional em outras espécies de carnívoros que também possuem hábitos generalistas (DUTTA et al., 2013a; MCMANUS et al., 2015). Historicamente, tem sido considerado que apenas um migrante por geração seria suficiente para garantir subdivisão populacional (VUCETICH; WAITE, 2000). No entanto, outros trabalhos destacam que pode ser necessário taxas maiores com 10 ou mais indivíduos para evitar a subdivisão populacional em populações naturais em longo prazo (MILLS; ALLENDORF, 1996; WANG, 2004), principalmente para espécie com baixos tamanhos populacionais, como grandes predadores, e que estão cada vez mais sujeitos a diferentes ameaças, reduzindo as chances de reprodução.

A análise de detecção de migrantes de primeira geração reforça a baixa taxa de migração, sendo que foram detectados apenas seis indivíduos migrantes entre os três *clusters*, o que representa apenas 6% dos indivíduos analisados. Entre esses indivíduos, dois do *cluster 2* têm maiores probabilidades de pertencer ao *cluster 1*; três do *cluster 1* têm maiores chances de pertencer ao *cluster 2*; e um indivíduo do *cluster 3* tem maior probabilidade de pertencer ao *cluster 2*. Nota-se, portanto, que não foram detectados migrantes entre os dois grupos geograficamente mais distantes (*clusters 1 e 3*), indicando uma limitação de fluxo maior entre esses dois grupos genéticos. É interessante destacar que dentre os seis indivíduos detectados como migrantes cinco deles são machos e entre eles quatro foram amostrados através do atropelamento (indivíduos jovens), assim como a única fêmea, o que sugere serem indivíduos em fase de dispersão para estabelecimento de território.

### 5.3.3. Diversidade Genética

Após a detecção dos *clusters*, verificamos os parâmetros de diversidade genética para cada grupo. Não foram detectados alelos nulos e nem desequilíbrio de Hardy Weinberg após a correção de Bonferroni ( $p=0,0055$ ) (Tabela II.4). Também não foi detectado desequilíbrio de ligação entre os *loci*. Os valores de PIC médio para os três *clusters* detectados mostram que o conjunto de *loci* utilizado foi altamente informativo, uma vez que valores médios de PIC maiores que 0,5 são considerados altamente informativos de acordo com Botstein e colaboradores (1980) (Tabela II.4).

Os valores médios de  $H_o$  e  $H_e$  observados para cada grupo foram muito semelhantes, variando de 0,72 a 0,76 para  $H_o$  e de 0,74 a 0,82 para  $H_e$ . Tais valores encontrados são próximos aos valores dos trabalhos realizados para a espécie na América do Sul (CASTILHO et al., 2012; MIOTTO et al., 2011; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017). O número de alelos médio variou de 8,4 a 11,8, sendo relativamente um pouco maiores que os trabalhos realizados anteriormente (CASTILHO et al., 2012; MIOTTO et al., 2011; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI,



2017), no entanto, o número de alelos é dependente do tamanho amostral, portanto não são um parâmetro adequado para estudos com esforços amostrais diferentes. Dessa forma, a riqueza alélica é mais adequada para comparações, já que permite comparar resultados obtidos a partir de esforços amostrais diferentes através da rarefação. Assim, quando observamos a riqueza alélica entre os grupos detectados, notamos um valor maior para o *cluster* dois, o que se deve provavelmente à maior distribuição geográfica dos indivíduos coletados. Quando os valores obtidos são comparados com os valores de riqueza alélica do estudo de Castilho e colaboradores (2012) nota-se uma redução na riqueza alélica, já que os nossos valores de riqueza alélica variam de 2,68 (*cluster* 1) a 3,16 (*cluster* 3), enquanto que no trabalho de Castilho e colaboradores (2012) o valor foi de 5,62, podendo indicar uma redução de diversidade genética, já que para os demais parâmetros de diversidade, como a  $H_o$ , a detecção de perda de diversidade genética pode levar mais gerações.

Além do esforço amostral para cada área, as diferenças observadas entre os nossos valores de riqueza alélica e número de alelos pode ser explicada pelo número de alelos efetivos que encontramos, sendo esses bem menores que o número de alelos. Ou seja, muitos dos alelos encontrados em cada *cluster* são pouco frequentes e, dessa forma o número de alelos efetivos ( $A_e$ ) é menor que o número de alelos ( $N_a$ ). Também se nota a presença de alelos privados em cada *cluster*, sendo esses menos frequentes, portanto, eles contribuem para aumentar o número de alelos ( $N_a$ ).

Apesar da estruturação encontrada, a comparação dos valores de  $H_e$ ,  $H_o$ ,  $N_a$  entre os trabalhos realizados com a espécie no Brasil (CASTILHO et al., 2012; MIOTTO et al., 2011) mostram que esses valores de diversidade são semelhantes, indicando que neste estudo não foi detectado perda de diversidade genética levando-se em conta esses parâmetros, o que provavelmente se deve às mudanças recentes na paisagem. Quanto aos valores de endogamia, todos os valores de  $F_{is}$  foram positivos, indicando déficit de heterozigotos e tendência a endogamia, no entanto, após a correção de Bonferroni e com o novo valor de  $p$  ( $p=0,00189$ ), nenhum dos valores foi significativo para os déficits de heterozigoto (Tabela II.4).

Tabela II.4. Valores de diversidade genética para cada *cluster*.

		<i>Loci</i>										
		208A	216A	339A	003A	010A	210A	126A	108A	077A	Média	Total
Cluster 1 (Azul) (Sul estado SP)	N	26	29	29	20	30	30	9	30	28	-	-
	Na	7	8	8	11	10	11	2	10	11	8,667	78
	Ra	2,933	2,819	2,832	2,739	3,341	2,553	1	2,786	3,143	2,683	-
	Ae	4,537	4,014	3,986	3,252	7,43	2,85	1,976	3,734	5,681	4,166	-
	Pa	0	1	0	2	0	1	0	4	3	-	11
	PCI	0,846	0,873	0,845	0,85	0,883	0,897	0,794	0,732	0,758	0,83	-
	HW E	0,006	0,006	0,006	0,006	0,006	0,043	0,04	0,04	0,037	-	-
	Ho	0,78	0,751	0,749	0,693	0,866	0,652	0,494	0,732	0,824	0,727	-
	He	0,795	0,764	0,762	0,71	0,88	0,663	0,523	0,745	0,839	0,742	-
	$F_{is}$	0,229	0,281	-0,087	0,301	0,131	-0,056	0,59	-0,167	-0,109	-	0,109
	$P(F_{is})$	0,032	0,004	0,265	0,009	0,056	0,396	0,126	0,044	0,137	-	0,004
Cluster 2 (Vermelho) (Norte Estado SP)	N	52	51	51	50	53	54	45	45	49	-	-
	Na	9	15	10	14	17	15	8	8	10	11,778	106
	Ra	3,186	3,308	3,186	3,221	3,37	3,43	2,953	2,724	2,845	3,136	-
	Ae	6,174	7,389	6,127	6,305	7,991	8,972	4,644	3,626	4,012	6,138	-
	Pa	1	8	2	3	6	4	1	1	1	-	27
	PCI	0,744	0,71	0,714	0,674	0,851	0,624	0,5	0,697	0,801	0,691	-
	HW E	0,35	0,035	0,126	0,007	0,054	0,004	0,368	0,06	0,088	-	-
	Ho	0,865	0,882	0,882	0,52	0,868	0,87	0,711	0,644	0,612	0,762	-
	He	0,838	0,865	0,837	0,841	0,875	0,889	0,785	0,724	0,751	0,823	-
	$F_{is}$	-0,023	-0,011	-0,045	0,391*	0,017	0,03	0,105	0,121	0,194	-	0,084
	$P(F_{is})$	0,439	0,522	0,307	0,002	0,433	0,319	0,139	0,087	0,007	-	0,002
Cluster 3 (Amarelo) (Minas Gerais)	N	12	13	13	12	12	12	12	12	10	-	-
	Na	7	7	12	10	6	10	9	5	10	8,444	-
	Ra	2,503	3,237	3,484	3,305	3,11	3,522	3,317	2,658	3,379	3,168	-
	Ae	2,618	5,828	7,86	6	4,96	8,229	6,128	3,273	6,25	5,683	-
	Pa	1	0	3	1	0		2	0	2	-	9
	PCI	0,589	0,805	0,86	0,815	0,77	0,866	0,819	0,641	0,824	0,777	-
	HW E	0,332	0,92	0,426	0,31	0,038	0,015	0,201	0,341	0,079	-	-
	Ho	0,583	0,846	0,769	0,75	0,583	0,667	0,833	0,667	0,8	0,722	-
	He	0,618	0,828	0,873	0,833	0,799	0,878	0,837	0,694	0,84	0,8	-
	$F_{is}$	0,099	0,019	0,158	0,143	0,309	0,282	0,048	0,083	0,1	-	0,141
	$P(F_{is})$	0,409 3	0,5648	0,1148	0,2019	0,0259	0,013	0,4463	0,4593	0,2981	-	0,002

N: Número de Indivíduos. Na: Número de alelos. Ra: Riqueza alélica. Ae: Alelos efetivos. Pa: Alelos privados. PCI: Conteúdo de informação polimórfica. HWE: valores de p para desvio de Hardy-Weinberg (valor de p para EHW após correção sequencial de Bonferroni =0,0055). Ho: Heterozigiosidade Observada. He: Heterozigiosidade esperada.  $F_{is}$ : Coeficiente de endogamia.  $P(F_{is})$ : valor de p para o coeficiente de endogamia (valor de p ajustado para  $F_{is} = 0,00189$ ). T: total do  $F_{is}$ .

#### 5.4. Conclusões

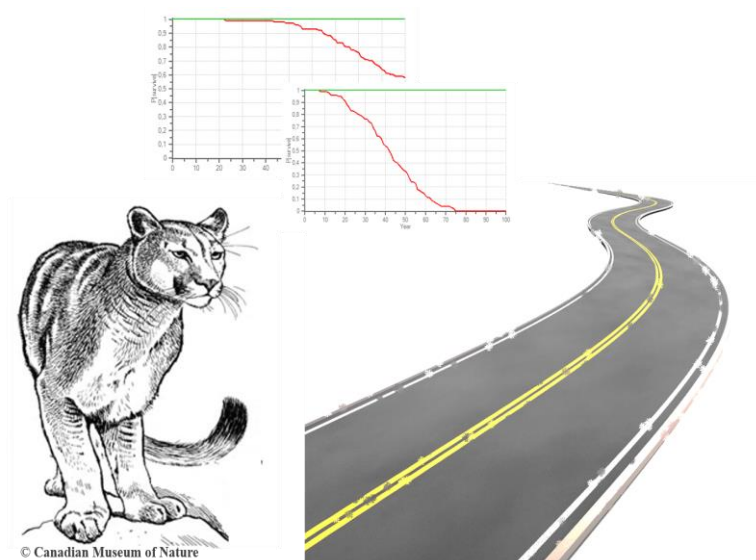
Apesar da literatura considerar a espécie *P. concolor* como uma espécie generalista, alguns trabalhos já detectaram o efeito das mudanças da paisagem no deslocamento dos indivíduos dessa espécie, resultando em estruturação populacional. No Brasil, essa questão ainda não era muito bem avaliada para a espécie. Dessa forma, este trabalho contribui com uma informação importante não somente para *P. concolor*, mas também levanta preocupações para outras espécies, já que espécies menos generalistas podem estar sendo afetadas de maneira ainda mais severa. Vale ressaltar que ainda é extremamente necessário avaliar como cada elemento da paisagem atua como potencial barreira para essas espécies através de uma abordagem de genética da paisagem e dados ecológicos.

Entre todas as áreas estudadas, foram detectados três grupos genéticos diferentes. A estruturação devido ao isolamento por distância foi descartada, uma vez que não houve uma forte correlação entre distância genética e distância geográfica. Além disso, a escala geográfica do estudo não representaria uma grande distância para uma espécie com grande capacidade de dispersão como a onça-parda. Assim, os *clusters* encontrados se devem às alterações nas paisagens promovidas pelas atividades antrópicas, como já foi constatado para a espécie na América do Norte. Apesar da estruturação populacional, não foram detectados sinais de perda de diversidade genética para as populações estudadas, provavelmente devido ao cenário recente da alteração da paisagem. No entanto, em longo prazo, a redução do fluxo gênico entre as áreas pode representar uma ameaça para a sua diversidade genética, assim como para a viabilidade de suas populações.

Compreender melhor como a espécie utiliza e se desloca em meio a esse ambiente alterado ainda é uma pergunta extremamente importante para compreender como cada estrutura da paisagem atua na limitação do deslocamento da espécie. Porém, os resultados obtidos já dão um sinal de que medidas de conservação devem ser tomadas a fim de garantir a movimentação dos indivíduos, garantindo a saúde dos aspectos demográficos e genéticos de suas populações.

## Capítulo III

### O Atropelamento como ameaça para a espécie *Puma concolor*: viés no atropelamento entre os sexos e o impacto para a genética e viabilidade de uma população



## **6. Capítulo III: O Atropelamento como ameaça para a espécie *Puma concolor*: viés no atropelamento entre os sexos e o impacto para a genética e viabilidade de uma população**

### **6.1. Introdução**

Atualmente as espécies têm enfrentado uma série de ameaças decorrentes das ações antrópicas (HADDAD et al., 2015; RIPPLE et al., 2014). A perda e fragmentação do habitat pode ser considerada a principal delas para a maioria das espécies terrestres (HADDAD et al., 2015; RIPPLE et al., 2014), principalmente pela limitação da dispersão dos indivíduos, com consequências genéticas para as populacionais (HADDAD et al., 2015; RIPPLE et al., 2014; DIRZO et al., 2014). Além das consequências diretas, tais modificações também expõem os animais às novas ameaças, uma vez que os indivíduos das populações remanescentes precisam buscar novas áreas para estabelecer o seu território e, assim, ficando sujeitos a novas ameaças, por exemplo, os atropelamentos. Para espécies que necessitam de grandes áreas de vida e possuem hábitos territorialistas como os carnívoros, essa situação já é considerada alarmante e preocupante (CEIA-HASSE et al., 2017). Os carnívoros costumam deslocar-se por longas distâncias para estabelecerem seus territórios, portanto ficam mais sujeitos aos atropelamentos. Dessa forma, as rodovias representam uma ameaça ao promoverem a redução populacional (CEIA-HASSE et al., 2017), além de atuarem como barreira, impedindo a dispersão dos indivíduos e o fluxo gênico entre as populações, reduzindo a viabilidade das mesmas (VAN DER REE, 2004).

O Brasil apresenta uma extensa malha viária e assim, o atropelamento de fauna também tem sido uma das grandes ameaças para muitas espécies (GRILO et al., 2018 *in press*). Dentre as espécies de carnívoros com alta taxa de atropelamentos encontra-se a onça-parda (*Puma concolor*), um predador de topo-de-cadeia que possui a necessidade de grandes áreas de vida para estabelecer o seu território (HORNOCKER; NEGRI, 2010; LOGAN; SWEANOR, 2001). Na região sudeste do Brasil, uma das mais desenvolvidas do país, a espécie tem sido cada vez mais afetada pelos atropelamentos. Miotto e

colaboradores (2012) ao monitorarem uma população de onças-pardas no estado de São Paulo registraram a perda de 11 indivíduos por atropelamentos em sua população previamente estudada. Além disso, se considerarmos que grande parte dos indivíduos mortos podem estar realizando dispersão, isso teria consequências na genética da população local, uma vez que a dispersão é importante para garantir o fluxo gênico entre populações (RILEY et al., 2006)

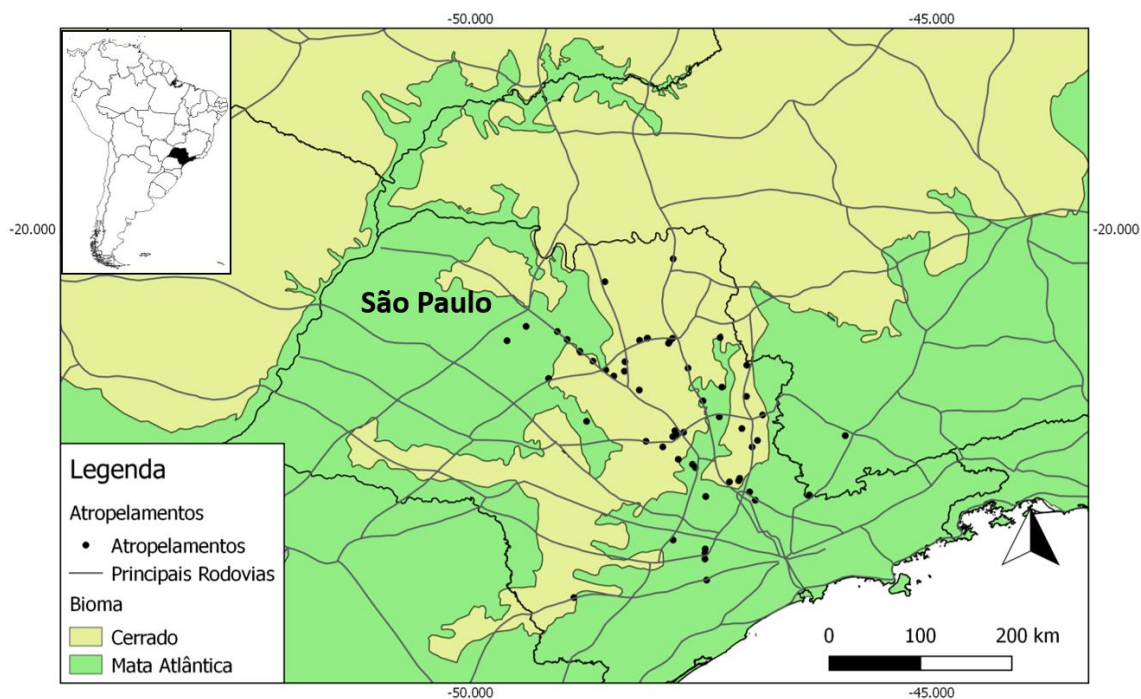
Apesar da espécie ser considerada de hábitos generalistas, podendo se adaptar a diversos ambientes (HORNOCKER; NEGRI, 2010; LOGAN; SWEANOR, 2001), a grande taxa de perda de indivíduos em uma população local pode representar uma ameaça em longo prazo. Dessa forma, este trabalho teve como objetivos verificar se existe um viés entre os sexos dos indivíduos de *P. concolor* mortos por atropelamento; verificar se cada sexo contribui de forma diferencial para a genética da população local e inferir sobre a redução da viabilidade da população devido à perda de indivíduos por atropelamento. Como os indivíduos machos de *P. concolor* evitam sobreposição de território (HORNOCKER; NEGRI, 2010; LOGAN; SWEANOR, 2001), temos como hipótese encontrar um viés entre os sexos dos indivíduos atropelados de onça-parda, sendo os machos mais afetados pelos atropelamentos. Além disso, como os machos da espécie *P. concolor* costumam dispersar por maiores distâncias que as fêmeas, esperamos que a contribuição genética dos machos para a população local será diferente em relação à das fêmeas.

## **6.2. Material e Métodos**

### **6.2.1. Área de estudo e Obtenção das amostras**

As coletas das amostras dos indivíduos atropelados foram conduzidas no sudeste do Brasil, na região central do estado de São Paulo (Figura III.1), caracterizada por seu grande desenvolvimento econômico, atividade antrópica e com a maior malha viária do país. As amostras de tecido dos indivíduos atropelados (Figura III.2) foram coletadas no período de 2012 a 2017 e foram obtidas diretamente por nós nos pontos de atropelamento

após recebermos os comunicados de algumas concessionárias de rodovias ou parceiros. Outras amostras foram cedidas por colaboradores (Hospitais veterinários ou Zoológicos) que recebiam esses animais para tratamento e, então nos sediam uma amostra dos indivíduos juntamente com as informações do local do atropelamento.



**Figura III.1.** Área de estudo e pontos de atropelamento.



**Figura III.2.** Indivíduo fêmea jovem encontrada atropelada na rodovia Washington Luiz próximo a São Carlos-SP

### 6.2.2. Armazenamento e extração do DNA

As amostras de tecido (músculo) foram armazenadas em micrutubo de 2,0 mL contendo etanol 70% e as amostras de sangue foram armazenadas em tubos Vacutainer® contendo como anticoagulante EDTA. As amostras de tecido e sangue foram mantidas em freezer a -20°C até a extração do DNA que foi realizada através do protocolo de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989).

### 6.2.3. Sexagem molecular e viés do sexo mais atropelado

Após a extração do DNA, realizamos a sexagem molecular de todas as amostras uma vez que nem sempre tínhamos certeza do sexo das amostras dos indivíduos coletados. Para isso, utilizamos o par de *primers* descritos por Pilgrim e colaboradores (2005) que amplificam uma região do gene da Amelogenina presente nos cromossomos sexuais. No caso das fêmeas, são amplificados dois fragmentos de 214 pb correspondentes aos dois cromossomos X. Já nos machos, ocorre a amplificação de um fragmento de 214 pb (cromossomo X) e outro de 194 pb, resultante de uma deleção de 20 pb no cromossomo Y. Após as PCRs, seus produtos serão visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% por 120 minutos (100 volts). Foram utilizados controles positivos e negativos para todas as PCRs e três réplicas para evitar a detecção de falsas fêmeas devido a não amplificação de uma região. O protocolo para amplificação do DNA nas PCRs seguiu as recomendações de Pilgrim e colaboradores (2005) e foi realizado em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems).

Após a confirmação molecular do sexo dos indivíduos, realizamos um teste Qui-quadrado para verificar se o viés entre machos e fêmeas seria significativo. Utilizamos como proporções esperadas de atropelamentos as mesmas quantidades de machos e fêmeas, ou seja, 50% para cada sexo uma vez que se espera a mesma proporção de ambos os sexos nos nascimentos da espécie (HORNOCKER; NEGRI, 2010; LOGAN; SWEANOR, 2001).



#### 6.2.4. Contribuição genética diferencial para cada sexo

Para verificar a se cada sexo poderia contribuir de forma diferente na genética da população local realizamos a amplificação de nove *loci* de microssatélites para todas as amostras (A208, A216, A339A, B003, B010, B210, FCA126A, C108A e FCA077A) (KURUSHIMA et al., 2006; MENOTTI-RAYMOND et al., 1999) (*Capítulo I*).

Para reduzir os custos de genotipagem, foi seguida a metodologia proposta por Schuelke (2000). Nessa metodologia, em todos os *primers forward* foi acrescentada uma cauda universal de 18 pares de bases (cauda M13) a qual se liga a um *primer* contendo a fluorescência para a genotipagem. O protocolo de PCR para volume final de 10  $\mu$ L seguiu as seguintes concentrações: 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 0,2  $\mu$ M de dNTPs, 3 mM de MgCl<sub>2</sub> (50 mM, Invitrogen); 0,2 pmol do *primer forward* e do *primer* marcado com fluorescência; 0,8 pmol do *primer reverse*; 1 unidade de *Taq Polymerase Platinum* (Invitrogen); 0,25 mg/mL de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 50ng de DNA e água ultrapura até completar o volume final. As amplificações foram conduzidas em termociclador *Veriti 96 Well Thermal Cycler* (Applied Biosystems) com o seguinte ciclo: desnaturação inicial a 94°C durante 5 minutos; 30 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 55 a 58°C (variação na temperatura para garantir a amplificação do DNA dependendo da qualidade da amostra) por 45 segundos, 74°C por 1 minuto; seguidos de 8 ciclos para incorporação da fluorescência à cauda M13 com 94°C durante 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C a 45°C; e uma extensão final de 15 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose 1% e enviados para genotipagem em sequenciador automático ABI 3130 (Applied Biosystems). Os eletroferogramas dos genótipos foram analisados no *software* Geneious v7 (KEARSE et al., 2012).

Após a obtenção dos genótipos, calculamos alguns parâmetros de diversidade genética a fim de verificarmos se eles seriam diferentes para cada sexo. Utilizamos como parâmetros de diversidade genética: heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), número de alelos ( $N_a$ ), alelos efetivos ( $N_e$ ) e alelos privados ( $P_a$ ) calculados no *software* GenAIEx v.6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012). Também

calculamos os valores de riqueza alélica (RA), que consiste no número de alelos corrigido pelo tamanho amostral através da rarefação (KALINOWSKI, 2005).

### **6.2.5. Tamanho populacional efetivo e análise de viabilidade populacional**

A partir dos genótipos obtidos, calculamos o tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ). O  $N_e$  representa, diferentemente do tamanho de censo ( $N$ ), o número de indivíduos que contribuem geneticamente na população, ou seja, é o número de indivíduos que deixam descendentes na próxima geração. O cálculo foi feito no *software* NeEstimator v.2 (DO et al., 2014) utilizando o método de desequilíbrio de ligação e sistema de acasalamento poligâmico.

Em seguida, foram verificadas as probabilidades de permanência da população ao longo do tempo através da análise de viabilidade populacional (PVA - *probability viability analysis*) no *software* VORTEX (LACY, 2000). A PVA constrói a história de uma população a partir de um número inicial de indivíduos considerando os aspectos biológicos da espécie (tempos de sobrevivência, idade reprodutiva, taxas de mortalidade para cada sexo entre outros) e podendo prever as consequências da perda de indivíduos devido a diferentes causas (LACY, 2000). Utilizamos como parâmetros de tamanho populacional inicial teórico 150 indivíduos (*default* do *software*) e também o valor de  $N_e$  obtido a partir dos dados genéticos. Os demais parâmetros para a espécie foram obtidos a partir da literatura (DE AZEVEDO et al., 2013; HORNOCKER; NEGRI, 2010; LOGAN; SWEANOR, 2001) (Tabela III.1). Foram avaliados três cenários: 1) utilizando parâmetros somente com os dados biológicos da espécie (*baseline*); 2) com perda dos indivíduos por atropelamento (8,8 indivíduos por ano, sendo na proporção de 5,8 machos para 2,9 fêmeas) utilizando as taxas médias anuais de indivíduos atropelados no nosso período de amostragem; 3) considerando os dados de atropelamento e também os machos como o sexo responsável pela dispersão.

**Tabela III.1.** Parâmetros para a análise de viabilidade populacional (PVA).

Parâmetros	Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3
	Dados-Base ( <i>Baseline</i> )	Atropelamento	Atropelamento + dispersão preferencial (Machos)
Número de populações	1	1	1
Tamanho da população inicial	150/70(Ne)	150/70(Ne)	150/70(Ne)
Capacidade suporte	150/70	150/70	150/70
Depressão por endogamia	6 letais equivalente	6 letais equivalente	6 letais equivalente
Sistema de acasalamento	Poligâmico	Poligâmico	Poligâmico
Idade primeira reprodução M/F	3/3	3/3	3/3
Idade máxima reprodução	12	12	12
Porcent. fêmeas reproduzindo	50%	50%	50%
Média do tamanho da prole	2	2	2
Máximo tamanho prole	4	4	4
Proporção macho/fêmea na prole	50:50	50:50	50:50
Porcent. machos reproduzindo	90	90	90
Porcent. mortalidade 0-1 anos M/F	40(5)/40(5)	40(5)/40(5)	40(5)/40(5)
Porcent. mortalidade 1-2 anos M/F	20(4)/20(4)	20(4)/20(4)	20(4)/20(4)
Porcent. mortalidade 2-3 anos M/F	10(2)/25(5)	10(2)/25(5)	10(2)/25(5)
Porcent. mortalidade 3-8 anos M/F	10(2)/12(3)	10(2)/12(3)	10(2)/12(3)
Porcent. mortalidade 9 anos ou mais M/F	5% a cada ano	5% a cada ano	5% a cada ano
Catástrofe	Não	Não	Não
Redução ( <i>Harvest</i> )	Não	Sim (5,8M:2,9F por ano)	Sim (5,8M:2,9F por ano)
Dispersão preferencial	Não	Não	Sim (Machos)

M: Machos; F: Fêmeas; Ne: tamanho populacional efetivo

### 6.3. Resultados e Discussão

#### 6.3.1. Viés sexual nos atropelamentos

Durante o período amostrado, foram analisados 44 indivíduos oriundos de atropelamentos, sendo 29 machos e 15 fêmeas, indicando um maior viés para os atropelamentos em machos (66% machos, sendo uma proporção total de aproximadamente dois machos para cada fêmea). Assim, o teste de  $\chi^2$  indica que a diferença é significativa ( $\chi^2=7,77$ ,  $p<0,01$ ), uma vez que se espera as mesmas proporções de nascimento para cada sexo. No entanto, o que se observa nas populações naturais são

diferentes taxas de sobrevivência, sendo os machos com menor taxa devido à competição com outros do mesmo sexo. Além disso, os machos evitam sobreposição de áreas de vida com outros machos (LOGAN; SWEANOR, 2001). Portanto, em populações naturais o esperado é uma menor proporção de machos em relação às fêmeas em determinada área. De modo mais conservador, a proporção geralmente encontrada é de um macho para cada duas fêmeas (1macho:2fêmeas) (LOGAN; SWEANOR, 2001). Logo, se considerarmos essas características nas populações naturais de onça-parda, o viés no atropelamento encontrado por nós fica ainda mais evidente ( $\chi^2=25$ ,  $p<0,001$ ), já que seria esperado um número ainda menor de machos atropelados considerando as proporções de cada sexo nas populações naturais.

A explicação para o viés encontrado seria justamente devido ao comportamento mais territorialista dos machos e por evitarem sobreposição de áreas de vida, obrigando-as a realizarem grandes dispersões (HORNOCKER; NEGRI, 2010; LOGAN; SWEANOR, 2001) para estabelecer o seu território e assim, ficando mais susceptível aos atropelamentos.

### **6.3.2. Valores de diversidade genética para cada sexo**

Os valores de diversidade genética de número de alelos, heterozigosidade esperada e observada e riqueza alélica (corrigida para o tamanho amostral) foram muito semelhantes entre os machos e as fêmeas. No entanto, dois parâmetros importantes foram diferentes: o número de alelos efetivos e o número de alelos privados. Esses dois estimadores foram maiores para os machos, sendo a diferença no número de alelos privados ainda mais evidente (Tabela III.2). Tais diferenças mostram que a perda dos machos na população também representa a perda de alelos diferentes (alelos privados) que teriam importante contribuição na diversidade. A presença de mais alelos privados nos machos se deve ao seu comportamento de dispersão por maiores distâncias que as fêmeas (LOGAN; SWEANOR, 2001). Como visto no *Capítulo II*, dentre os seis

indivíduos detectados como migrantes de primeira geração, cinco deles eram machos, mostrando que eles podem contribuir mais com o fluxo gênico entre populações.

**Tabela III.2** Valores de diversidade genética para cada sexo

	<b>Locus</b>	<b>N</b>	<b>Na</b>	<b>Ae</b>	<b>Ra</b>	<b>Pa</b>	<b>Ho</b>	<b>He</b>
<b>Machos</b>	<b>208A</b>	25	9	6,098	7,168	2	0,880	0,836
	<b>216A</b>	28	12	7,000	7,175	5	0,786	0,857
	<b>339A</b>	26	9	6,794	6,986	3	1,000	0,853
	<b>003A</b>	28	13	5,426	7,036	5	0,750	0,816
	<b>010A</b>	29	12	7,787	7,960	3	0,793	0,872
	<b>210A</b>	27	10	7,477	7,800	2	0,852	0,866
	<b>108A</b>	24	7	4,174	5,500	0	0,542	0,760
	<b>126A</b>	20	7	4,348	5,615	2	0,750	0,770
	<b>077A</b>	23	9	3,177	5,888	3	0,696	0,685
	<b>Média</b>	-	10	5,809	6,792	-	0,783	0,813
	<b>Total</b>	-	-	52,28	-	25	-	-
<b>Fêmeas</b>	<b>208A</b>	15	7	4,839	6,175	0	0,800	0,793
	<b>216A</b>	15	10	7,143	7,534	3	0,933	0,860
	<b>339A</b>	15	7	5,233	6,444	1	0,867	0,809
	<b>003A</b>	13	10	5,633	7,793	2	0,462	0,822
	<b>010A</b>	14	11	8,000	9,571	2	0,714	0,875
	<b>210A</b>	12	10	7,784	8,632	2	0,917	0,872
	<b>108A</b>	13	7	4,072	6,310	0	0,769	0,754
	<b>126A</b>	10	6	3,390	5,000	1	0,800	0,705
	<b>077A</b>	13	7	2,209	5,831	1	0,538	0,547
	<b>Média</b>	-	8	5,367	7,032	-	0,756	0,782
	<b>Total</b>	-	-	48,303	-	12	-	-

N: Número de Indivíduos. Na: Número de alelos. Ae: Número efetivo de alelos; Ra: Riqueza alélica. Pa: Alelos privados. Ho: Heterozigosidade Observada. He: Heterozigosidade esperada.

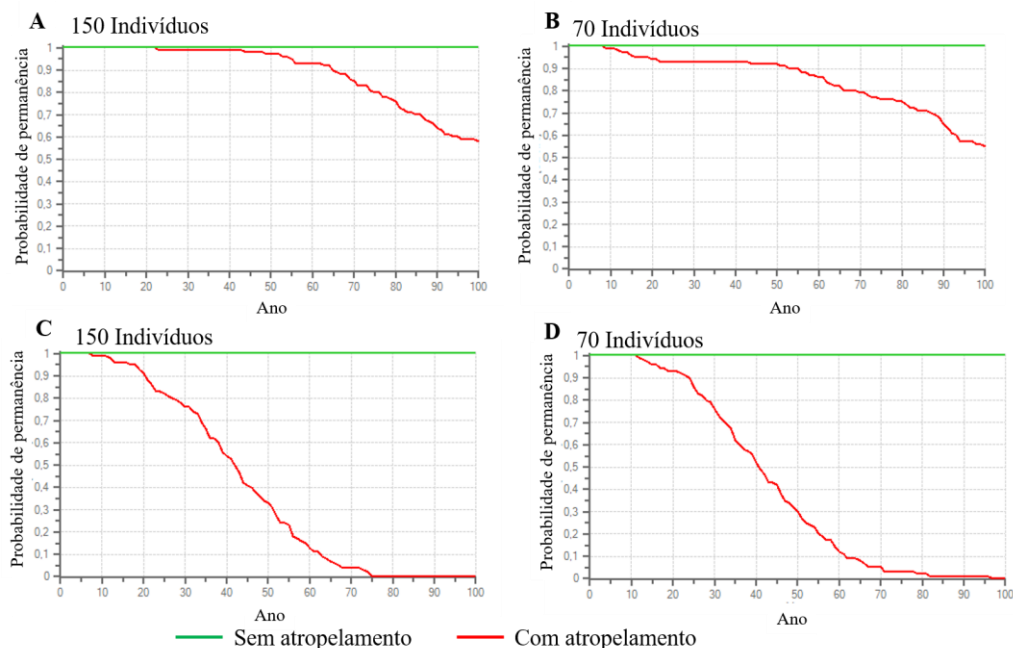
Biek e colaboradores (2006) também detectaram uma contribuição diferencial dos machos na diversidade genética da população estudada. Dessa forma, os machos têm uma contribuição na manutenção da diversidade genética e na redução do aumento da endogamia (BIEK et al., 2006), devido ao seu comportamento de dispersarem por maiores distâncias (LOGAN; SWEANOR, 2001), sendo, portanto, importantes para garantir a viabilidade da população em longo prazo.

### 6.3.3. Tamanho populacional efetivo e Viabilidade populacional

O tamanho populacional efetivo obtido a partir dos dados genéticos foi  $N_e=70$  (IC95% = 47,9 – 122,9), sendo, portanto, menor que o tamanho populacional inicial sugerido pelo *default* do *software* (150). A alteração do parâmetro do tamanho populacional inicial pode refletir diretamente na probabilidade de permanência da população ao longo do tempo (DESBIEZ et al., 2012), uma vez que populações iniciais maiores podem ter maiores chances de persistência ao longo do tempo. Dessa forma, a obtenção do  $N_e$  a partir dos dados genéticos pode representar uma importante contribuição para a análise de viabilidade populacional.

A análise de viabilidade populacional mostra o impacto da perda de indivíduos por atropelamento em longo prazo. A retirada de indivíduos da população resulta na diminuição da probabilidade de permanência da mesma. Como a viabilidade é diretamente relacionada ao tamanho populacional inicial da população, nota-se que a sua permanência começa a reduzir mais rapidamente ao consideramos o tamanho populacional efetivo calculado a partir dos dados genéticos ( $N_e=70$ ) (Figura III.3 A, B), o qual é menor que outros valores sugeridos (150). Além disso, se considerarmos que os machos são o sexo com maior taxa de dispersão na espécie, como foi observado a partir dos dados do *Capítulo II* e também demonstrado pela análise de SAA, a probabilidade de permanência começa a reduzir mais antecipadamente para ambos os tamanhos populacionais iniciais e, diferentemente da situação inicial em que ambos os sexos dispersam na mesma proporção, após cerca de 60 anos a probabilidade fica em torno de apenas 0,1 (Figura III.3 C, D).

Dessa forma, fica claro que mesmo para uma espécie considerada generalista, podendo ser bem-sucedida em diferentes ambientes, a perda de indivíduos devido as ações antrópicas, como os atropelamentos, podem afetar a viabilidade da mesma em longo prazo.



**Figura III.3.** Gráficos das probabilidades de permanência da população em diferentes cenários. **A:** tamanho populacional inicial 150 e sem sexo com dispersão preferencial; **B:** tamanho populacional inicial 70 e sem sexo com dispersão preferencial; **C:** tamanho populacional inicial 150 e com machos com dispersão preferencial; **D:** tamanho populacional inicial 70 e com machos com dispersão preferencial.

#### 6.4. Conclusões

O impacto dos atropelamentos nas onças-pardas já pode ser considerado uma importante ameaça para a espécie devido aos registros cada vez mais constantes. A perda de indivíduos representa uma redução nos tamanhos populacionais, mas também podem ter consequências genéticas, principalmente devido à limitação do fluxo gênico. Devido à contribuição genética diferencial dos machos, o que se deve ao seu maior potencial de dispersão já relatado na literatura, a maior taxa de atropelamentos de indivíduos desse sexo representa também uma perda na diversidade genética da população local, uma vez que, devido ao seu comportamento menos filopátrico que as fêmeas e por realizarem maiores dispersões, esses contribuem como novos alelos na população local e também evitam o aumento da endogamia. Vale lembrar, que a espécie está sujeita a outras ameaças que promovem a redução populacional, como a caça e o abate por retaliação, dessa forma, mitigar os atropelamentos é uma medida essencial não somente para reduzir a perda de indivíduos, mas também para garantir a dispersão e o fluxo gênico entre as áreas, garantindo a viabilidade das populações.

## 7. Considerações finais

O atual cenário de mudança da paisagem promove diferentes impactos nas populações naturais. Dentre as principais mudanças, a perda e fragmentação do habitat representa a principal ameaça para as espécies, interferindo nos seus aspectos demográficos, ecológicos e genéticos. Porém, muitas espécies ainda são deficientes de informações básicas como dados demográficos (ocorrência, abundância e densidade), sem os quais não é possível conhecermos as reais consequências e como elas respondem às mudanças do seu habitat devido às atividades antrópicas. Da mesma forma, a obtenção de dados genéticos como diversidade genética, fluxo gênico e estruturação populacional são importantes para monitorar as populações. Essas informações são essenciais para auxiliar em medidas práticas de manejo e conservação.

As espécies podem responder de formas diferentes a esse cenário, portanto, o desequilíbrio nas populações pode ter impactos mais profundos na dinâmica das comunidades e no ecossistema em longo prazo. Tais mudanças na paisagem também expõem as espécies a novas ameaças, por exemplo, aumento com conflitos com os humanos, aquisição de doenças devido à proximidade com animais domésticos, aumento dos atropelamentos, entre outras ameaças. Assim, as ameaças às populações naturais vão se somando à medida que seu habitat é removido ou alterado.

A redução das populações juntamente com sua perda de diversidade genética as torna mais susceptíveis a eventos estocásticos, reduzindo a sua viabilidade em longo prazo. Dessa forma, a mudança drástica da paisagem tem afetado a dispersão de até mesmo espécies mais generalistas, como alguns grandes carnívoros, resultando em estruturação populacional como foi detectado neste trabalho. Logo, os resultados desse trabalho fornecem mais evidências de que mesmo pequenos fragmentos protegidos podem ser importantes para manter as espécies, no entanto, a viabilidade dessas populações depende da conexão com outras áreas para permitir os deslocamentos dos indivíduos. Além das mudanças demográficas e ecológicas, como as populações têm se tornado cada vez mais



reduzidas e isoladas, elas estão mais sujeitas à estruturação populacional e redução do fluxo gênico.

A baixa detecção e ocorrência dos pequenos felinos em relação às outras espécies em áreas mais antropizadas é um sinal direto de que a alteração da paisagem pode ser particularmente mais negativa para elas. Além disso, os pequenos felinos são muito mais deficientes em dados ecológicos e genéticos, o que reforça a necessidade de mais estudos com essas espécies para podermos avaliar melhor a verdadeira situação de suas populações. Como vimos, a detecção de estruturação população para a onça-parda já é um reflexo da alteração da paisagem, o que torna extremamente necessária a avaliação desses parâmetros também para os pequenos felinos, uma vez que são ainda mais sensíveis à mudança da paisagem, mais exigentes quanto à qualidade do habitat e possuem menor potencial de deslocamento e dispersão, portanto, obter informações genéticas sobre as populações do pequenos felinos é fundamental para conhecermos a profundidade dos impactos nessas espécies. A análise de viabilidade populacional para a onça-parda mostra que os tamanhos populacionais são essenciais para garantir a viabilidade das mesmas, uma vez que populações menores apresentarem a redução de sua viabilidade mais rapidamente. Por isso, a obtenção de dados demográficos também é essencial para estimarmos e acompanharmos os riscos de extinções locais das espécies, principalmente para espécies com tamanhos populacionais pequenos como as espécies de felinos.

Assim, garantir a saúde demográfica, ou seja, permitir que as populações não fiquem reduzidas a poucos indivíduos e também garantir a saúde genética através da manutenção da diversidade genética e fluxo gênico são fatores essenciais para a viabilidade das populações. Nesse sentido, o aumento de áreas protegidas e a conexão entre elas é a medida primordial para permitir a sobrevivência dos indivíduos e garantir a viabilidade de suas populações.

## 8. Referências

ALBERTS, C. C.; SARANHOLI, B. H.; Frei, F.; Galetti Jr., P. M. Comparing hair-morphology and molecular methods to identify fecal samples from Neotropical felids. v. 12, n. 9, p. e0184073, 7 set. 2017.

ALMEIDA, L. B. et al. Avaliação do estado de conservação do gato-mourisco *Puma yagouaroundi* (E. Geoffroy Saint-Hilaire, 1083) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 99–106, 2013.

ANDERSON, C. R.; LINDZEY, F. G.; MCDONALD, D. B. Genetic structure of cougar populations across the wyoming basin: metapopulation or megapopulation. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 6, p. 1207–1214, dez. 2004.

ANDREN, H. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review. **Oikos**, p. 355–366, 1994.

BAUER, H.; VAN DER MERWE, S. Inventory of free-ranging lions *Panthera leo* in Africa. **Oryx**, v. 38, n. 01, p. 26–31, 12 fev. 2004.

BEJA-PEREIRA, A. et al. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 5, p. 1279–1301, 2009.

BELKHIR, K. et al. GENETIX 4.05, Windows TM software for population genetics. **Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR**, v. 5000, 2004.

BENSON, D. A. et al. GenBank. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. D1, p. D32–D37, jan. 2014.

BIANCHI, R. DE C.; MENDES, S. L.; JÚNIOR, P. D. M. Food habits of the ocelot, *Leopardus pardalis*, in two areas in southeast Brazil. **Studies on Neotropical Fauna and Environment**, v. 45, n. 3, p. 111–119, 2010.

BIEK, R.; AKAMINE, N.; SCHWARTZ, M. K.; RUTH, T. K.; MURPHY, K. M.; POSS, M. Genetic consequences of sex-biased dispersal in a solitary carnivore: Yellowstone cougars. **Biology letters**, v. 2, n. 2, p. 312–5, 22 jun. 2006.

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

314, 1980.

BRASIL, W. W. F. Expansão Agrícola e Perda da biodiversidade no Cerrado: origens históricas eo papel do comércio internacional. **Brasília: Color**, 2000.

BROQUET, T.; MÉNARD, N.; PETIT, E. Noninvasive population genetics: a review of sample source, diet, fragment length and microsatellite motif effects on amplification success and genotyping error rates. **Conservation Genetics**, v. 8, n. 1, p. 249–260, 3 jun. 2006.

CARDILLO, M. et al. Multiple causes of high extinction risk in large mammal species. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5738, p. 1239–41, 19 ago. 2005.

CARO, T. M.; STONER, C. J. The potential for interspecific competition among African carnivores. **Biological Conservation**, v. 110, n. 1, p. 67–75, 2003.

CASTILHO, C. S.; MARINS-SÁ, L. G.; BENEDET, R. C.; FREITAS, T. O. Landscape genetics of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. **Mammalian Biology - Zeitschrift fur Säugetierkunde**, v. 76, n. 4, p. 476–483, 16 set. 2010.

CASTILHO, C. S.; MARINS-SÁ, L. G.; BENEDET, R. C.; FREITAS, T. O. Genetic structure and conservation of Mountain Lions in the south-Brazilian atlantic rain forest. **Genetics and molecular biology**, v. 35, n. 1, p. 65–73, 2012.

CEIA-HASSE, A. et al. Global exposure of carnivores to roads. **Global Ecology and Biogeography**, v. 26, n. 5, p. 592–600, 2017.

CHAME, M. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98 Suppl 1, p. 71–94, jan. 2003.

CHAVES, P. B.; GRAEFF, V. G.; LION, M. B.; OLIVEIRA, L. R.; EIZIRIK, E. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 18–35, jan. 2012.

CHIARELLO, A. G. et al. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**, v. 2, p. 680–880, 2008.

CRAWSHAW, P. . **Comparative ecology of ocelot (*Felis pardalis*) and jaguar (*Panthera onca*) in a protected subtropical forest in Brazil and Argentina**. University

of Florida, Gainesville, , 1995.

CROOKS, K. R. Relative Sensitivities of Mammalian Carnivores to Habitat Fragmentation. **Conservation Biology**, v. 16, n. 2, p. 488–502, abr. 2002.

CROOKS, K. R.; BURDETT, C. L.; THEOBALD, D. M.; RONDININI, C.; BOITANI, L. Global patterns of fragmentation and connectivity of mammalian carnivore habitat. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 366, n. 1578, p. 2642–2651, 2011.

CROOKS, K. R.; SOULÉ, M. E. Mesopredator release and avifaunal extinctions in a fragmented system. **Nature**, v. 400, n. 6744, p. 563, 1999.

CULVER, M.; JOHNSON, W. E.; PECON-SLATTERY, J.; O'BRIEN, S. J. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). **Journal of Heredity**, v. 91, n. 3, p. 186–197, 1 maio 2000.

CULVER, M.; HEDRICK, P. W.; MURPHY, K.; O'BRIEN, S.; HORNOCKER, M. G. Estimation of the bottleneck size in Florida panthers. **Animal Conservation**, v. 11, n. 2, p. 104–110, 2008.

DE ANGELO, C.; PAVIOLO, A.; DI BITETTI, M. Differential impact of landscape transformation on pumas (*Puma concolor*) and jaguars (*Panthera onca*) in the Upper Paraná Atlantic Forest. **Diversity and Distributions**, v. 17, n. 3, p. 422–436, 22 maio 2011.

DE AZEVEDO, F. C. et al. Avaliação do risco de extinção da onça-parda *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 107–121, 2013.

DE BARBA, M.; ADAMS, J. R.; GOLDBERG, C. S.; STANSBURY, C. R.; ARIAS, D.; CISNEROS, R.; WAITS, L. P. Molecular species identification for multiple carnivores. **Conservation genetics resources**, v. 6, n. 4, p. 821–824, 20 dez. 2014.

DE OLIVEIRA, A. R.; FERREIRA, L. C. G.; GARVEY, B. A OCUPAÇÃO DO CERRADO GOIANO PELO AGRONEGÓCIO CANAVIEIRO/The Cerrado biome occupation through the sugarcane agribusiness. **REVISTA NERA**, n. 43, p. 79–100, 2018.

DESBIEZ, A. L. J. et al. Population Viability Analysis of jaguar populations in Brazil. **Cat News**, v. 7, p. 35–37, 2012.

DI BITETTI, M. S.; PAVIOLO, A.; DE ANGELO, C. D.; DI BLANCO, Y. E. Local and continental correlates of the abundance of a neotropical cat, the ocelot (*Leopardus pardalis*). **Journal of Tropical Ecology**, v. 24, n. 2, p. 189–200, 2008.

DICKSON, B. G.; ROEMER, G. W.; MCRAE, B. H.; RUNDALL, J. M. Models of Regional Habitat Quality and Connectivity for Pumas (*Puma concolor*) in the Southwestern United States. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e81898, 18 dez. 2013.

DIRZO, R.; YOUNG, H. S.; GALETTI, M.; CEBALLOS, G.; ISAAC, N. J.; COLLEN, B. Defaunation in the Anthropocene. **science**, v. 345, n. 6195, p. 401–406, 2014.

DO, C.; WAPLES, R. S.; PEEL, D.; MACBETH, G. M.; TILLET, B. J.; OVENDEN, J. R. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. **Molecular Ecology Resources**, v. 14, n. 1, p. 209–214, 2014.

DUTTA, T.; SHARMA, S.; MALDONADO, J. E.; WOOD, T. C.; PANWAR, H. S.; SEIDENSTICKER. Fine-scale population genetic structure in a wide-ranging carnivore, the leopard (*Panthera pardus fusca*) in central India. **Diversity and Distributions**, v. 19, n. 7, p. 760–771, 2013a.

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

ERNEST, H. B.; VICKERS, T. W.; MORRISON, S. A.; BUCHALSKI, M. R.; BOYCE, W. M. Fractured genetic connectivity threatens a southern California puma (*Puma concolor*) population. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. e107985, 8 out. 2014.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, jul. 2005a.

EWERS, R. M.; DIDHAM, R. K. Confounding factors in the detection of species responses to habitat fragmentation. **Biological reviews**, v. 81, n. 1, p. 117–142, 2006.

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

1583–90, out. 2000

FIGUEIREDO, M. G.; CERVINI, M.; RODRIGUES, F. P.; EIZIRIK, E.; AZEVEDO, F. C.; CULLEN, L.; CRAWSHAW Jr., P. G.; GALETTI, P. M et al. Lack of Population Genetic Structuring in Ocelots (*Leopardus pardalis*) in a Fragmented Landscape. **Diversity**, v. 7, n. 3, p. 295–306, 2015.

FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, n. 2, p. 131–140, nov. 2005.

FRANKHAM, R. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 661–663, 1 nov. 2009.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**, v. 143, n. 9, p. 1919–1927, set. 2010.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D. (JONATHAN D. .; BRISCOE, D. A. (DAVID A. **Introduction to conservation genetics**. [s.l.] Cambridge University Press, 2010.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to conservation genetics**. [s.l.] Cambridge university press, 2002.

GERLACH, G.; MUSOLF, K. Fragmentation of landscape as a cause for genetic subdivision in bank voles. **Conservation biology**, v. 14, n. 4, p. 1066–1074, 2000.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversity and fixation indices (version 2.9. 3). <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>, 2001.

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

HAAG, T.; SANTOS, A. S.; DE ANGELO, C.; SRBEK-ARAUJO, A. C.; SANA, D. A.; MORATO, R. G.; SALZANO, F. M.; EIZIRIK, E. Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies. **Diversity**, p. 505–512, 2009.

HAAG, T.; SANTOS, A. S.; SANA, D. A.; MORATO, R. G.; CULLEN JR, L.; CRAWSHAW JR, P. G.; DE ANGELO, C.; DI BITETTI, M. S.; 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**, v. 19, n. 22, p. 4906–21, nov. 2010.

HADDAD, N. M. et al. Habitat fragmentation and its lasting impact on Earth's ecosystems. **Science Advances**, v. 1, n. 2, p. e1500052, 2015.

HARMSSEN, B. J.; FOSTER, R. J.; SILVER, S. C.; OSTRO, L. E.; DONCASTER, C. P. Spatial and temporal interactions of sympatric jaguars (*Panthera onca*) and pumas (*Puma concolor*) in a neotropical forest. **Journal of mammalogy**, 90(3), 612-620. 2009.

HELLER, R.; OKELLO, J. B. A.; SIEGISMUND, H. Can small wildlife conservancies maintain genetically stable populations of large mammals? Evidence for increased genetic drift in geographically restricted populations of *Cape buffalo* in East Africa. **Molecular ecology**, v. 19, n. 7, p. 1324–34, abr. 2010.

HORNOCKER, M. G.; NEGRI, S. **Cougar: ecology and conservation**. [s.l.] University of Chicago Press, 2010.

HÖSS, M; KOHN, M.; PÄÄBO, S.; KNAUER, F.; SCHRÖDER, W. Excrement analysis by PCR. **Nature**, v. 359, n. 6392, p. 199, 1992.

ICMBIO. **Sumário Executivo-Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Ministério do Meio Ambiente Brasília, , 2016.

ICMBIO. **Plano de manejo Floresta Nacional de Capão Bonito**. 2017

INSTITUTO FLORESTAL. **Parque Estadual Carlos Botelho: plano de manejo**. Instituto Florestal, São Paulo, Brazil. 2008

JANEČKA, J. E.; E.; TEWES, M. E.; LAACK, L.; CASO, A.; GRASSMAN, L. I.; HONEYCUTT, R. L. Loss of Genetic Diversity among Ocelots in the United States during the 20th Century Linked to Human Induced Population Reductions. **PLoS ONE**, v. 9, n. 2, p. e89384, 26 fev. 2014.

JANEČKA, J. E.; et al. Range-wide snow leopard phylogeography supports three subspecies. **Journal of Heredity**, v. 108, n. 6, p. 597–607, 2017.

JANEČKA, J. E.; JACKSON, R.; YUQUANG, Z.; DIQIANG, L.; MUNKHTSOG, B.; BUCKLEY-BEASON, V.; MURPHY, W. J. Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: a pilot study. **Animal Conservation**, v. 11,

n. 5, p. 401–411, out. 2008.

JANEČKA, J. E.; TEWES, M. E.; LAACK, L. L.; CASO, A.; GRASSMAN JR, L. I.; HAINES, A. M.; SHINDLE, B. W.; MURPHY, W. J.; HONEYCUTT, R. L. Reduced genetic diversity and isolation of remnant ocelot populations occupying a severely fragmented landscape in southern Texas. **Animal Conservation**, v. 14, n. 6, p. 608–619, dez. 2011a.

JOHNSON, W. E. et al. Genetic restoration of the Florida panther. **Science**, v. 329, n. 5999, p. 1641–1645, 2010.

JOMBART, T. adegenet: a R package for the multivariate analysis of genetic markers. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 24, n. 11, p. 1403–5, 1 jun. 2008.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.

JOST, L.  $G_{ST}$  and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 4015–4026, set. 2008.

JUETERBOCK, A.; KRAEMER, P.; GERLACH, G.; DEPPERMAN, J.; JUETERBOCK, M. A. Package ‘DEMEtics’. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 3845–3852, 2012.

KALINOWSKI, S. T. hp-rare 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 187–189, mar. 2005.

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

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 15 jun. 2012.

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



KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation biology**, v. 19, n. 3, p. 707–713, 2005.

KLINK, C. A.; MOREIRA, A. G. Past and current human occupation, and land use. **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**, p. 69–88, 2002.

KRUESS, A.; TSCHARNTKE, T. Habitat fragmentation, species loss, and biological control. **Science (New York, N.Y.)**, v. 264, n. 5165, p. 1581–4, 10 jun. 1994.

KURUSHIMA, J. D.; COLLINS, J. A.; WELL, J. A.; ERNEST, H. B. Development of 21 microsatellite loci for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 4, p. 1260–1262, 24 ago. 2006.

LACY, R. C. Structure of the VORTEX simulation model for population viability analysis. **ecological Bulletins**, p. 191–203, 2000.

LOGAN, K. A.; SWEANOR, L. L. **Desert puma: evolutionary ecology and conservation of an enduring carnivore**. [s.l.] Island Press, 2001.

LOXTERMAN, J. L. Fine scale population genetic structure of pumas in the Intermountain West. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 4, p. 1049–1059, 17 ago. 2011.

LYRA-JORGE, M. C.; RIBEIRO, M. C.; CIOCHETI, G.; TAMBOSI, L. R.; PIVELLO, V. R. Influence of multi-scale landscape structure on the occurrence of carnivorous mammals in a human-modified savanna, Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, v. 56, n. 3, p. 359–368, 9 out. 2009.

MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Conservation International do Brasil, Brasília**, 2004.

MAGIOLI, M.; MOREIRA, M. Z.; FERRAZ, K. M. B.; MIOTTO, R. A.; DE CAMARGO, P. B.; RODRIGUES, M. G.; CANHOTO, M. C.; SETZ, E. F. Stable isotope evidence of *Puma concolor* (Felidae) feeding patterns in agricultural landscapes in southeastern Brazil. **Biotropica**, v. 46, n. 4, p. 451–460, 2014.

MANZANI, P. R.; MONTEIRO FILHO, E. L. A. Notes on the food habits of the jaguarundi, *Felis yagouaroundi* (Mammalia: Carnivora). **Mammalia**, v. 53, n. 4, p. 659–660, 1989.

MASSARA, R. L.; PASCHOAL, A. M. D. O.; L. BAILEY, L.; F. DOHERTY JR, P.; HIRSCH, A.; CHIARELLO, A. G.. Factors influencing ocelot occupancy in Brazilian Atlantic Forest reserves. **Biotropica**, v. 50, n. 1, p. 125–134, 2018.

MASSARA, R. L.; DE OLIVEIRA PASCHOAL, A. M.; BAILEY, L. L.; DOHERTY JR, P. F.; DE FRIAS BARRETO, M.; CHIARELLO, A. G.. Effect of humans and pumas on the temporal activity of ocelots in protected areas of Atlantic Forest. **Mammalian Biology**, v. 92, p. 86–93, 2018.

MATTE, E. M.; CASTILHO, C. S.; MIOTTO, R. A.; SANA, D. A.; JOHNSON, W. E.; O'BRIEN, S. J.; DE FREITAS, T. R. O.; EIZIRIK, E. Molecular evidence for a recent demographic expansion in the puma (*Puma concolor*) (Mammalia, Felidae). **Genetics and Molecular Biology**, v. 36, n. 4, p. 586–597, 2013.

MAZZOLLI, M. Mosaics of Exotic Forest Plantations and Native Forests as Habitat of Pumas. **Environmental Management**, v. 46, n. 2, p. 237–253, 28 ago. 2010.

MCMANUS, J. S. DALTON, D. L.; KOTZÉ, A.; SMUTS, B.; DICKMAN, A.; MARSHAL, J. P.; KEITH, M. Gene flow and population structure of a solitary top carnivore in a human-dominated landscape. **Ecology and evolution**, v. 5, n. 2, p. 335–344, jan. 2015.

MCNEELY, J. A. et al. **Conserving the world's biological diversity**. [s.l.] International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 1990.

MCRAE, B. H.; BEIER, P.; DEWALD, L. E.; HUYNH, L. Y.; KEIM, P. Habitat barriers limit gene flow and illuminate historical events in a wide-ranging carnivore, the American puma. **Molecular ecology**, v. 14, n. 7, p. 1965–77, jun. 2005.

MENDONÇA, L. S. Os médios e grandes mamíferos de mosaicos em áreas de reflorestamentos no Centro-Oeste paulista. 2009. TESE. UNICAMP

MENOTTI-RAYMOND, M.; DAVID, V. A.; LYONS, L. A.; SCHÄFFER, A. A.; TOMLIN, J. F.; HUTTON, M. K.; O'BRIEN, S. J. A Genetic Linkage Map of Microsatellites in the Domestic Cat (*Felis catus*). **Genomics**, v. 57, n. 1, p. 9–23, abr. 1999.

METZGER, J. P.; RODRIGUES, R. R. Diretrizes para conservação e restauração da biodiversidade no estado de São Paulo: mapas-síntese. **Diretrizes para a conservação e**

restauração da biodiversidade no estado de São Paulo. Instituto de Botânica, São Paulo, p. 132–139, 2008.

MILLER, C. R.; JOYCE, P.; WAITS, L. P. A new method for estimating the size of small populations from genetic mark-recapture data. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 7, p. 1991–2005, 3 maio 2005.

MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation Biology**, v. 10, n. 6, p. 1509–1518, 1996.

MIOTTO, R. A.; CERVINI, M.; FIGUEIREDO, M. G.; BEGOTTI, R. A.; GALETTI, P. M. Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 6, p. 1447–1455, 1 dez. 2011.

MIOTTO, R. A.; CERVINI, M.; BEGOTTI, R. A.; GALETTI, P. M. Monitoring a Puma (*Puma concolor*) Population in a Fragmented Landscape in Southeast Brazil. **Biotropica**, v. 44, n. 1, p. 98–104, jan. 2012.

MIOTTO, R. A.; CERVINI, M.; KAJIN, M.; BEGOTTI, R. A.; GALETTI, P. M. Estimating puma *Puma concolor* population size in a human-disturbed landscape in Brazil, using DNA mark-recapture data. **Oryx**, v. 48, n. 2, p. 250–257, 24 abr. 2014.

MIOTTO, R. A.; CIOCHETI, G.; RODRIGUES, F. P.; GALETTI JR, P. M. Identification of pumas (*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)) through faeces: a comparison between morphological and molecular methods. **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 67, n. 4 Suppl, p. 963–5, dez. 2007.

MITCHELL, B. D.; BANKS, P. B. Do wild dogs exclude foxes? Evidence for competition from dietary and spatial overlaps. **Austral Ecology**, v. 30, n. 5, p. 581–591, 2005.

MORRISON, S. A.; BOYCE, W. M. Conserving connectivity: some lessons from mountain lions in southern California. **Conservation biology : the journal of the Society for Conservation Biology**, v. 23, n. 2, p. 275–85, abr. 2009.

MYERS, N. Threatened biotas: “hot spots” in tropical forests. **The Environmentalist**, v. 8, n. 3, p. 187–208, jan. 1988.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; DA FONSECA, G.

A.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–8, 24 fev. 2000.

NEGRÕES, N.; P., CRUZ, J.; EIRA, C.; REVILLA, E.; FONSECA, C.; SOLLMANN, R.; TORRES, N. M.; FURTADO, M. M.; JÁCOMO, A. T. A.; SILVEIRA, L. Use of Camera-Trapping to Estimate Puma Density and Influencing Factors in Central Brazil. **The Journal of Wildlife Management**, v. 74, n. 6, p. 1195–1203, ago. 2010.

NIELSEN, C. et al. *Puma concolor*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, p. 2014–2015, 2015.

NOSS, R. F.; QUIGLEY, H. B.; HORNOCKER, M. G.; MERRILL, T.; PAQUET, P. C. Conservation Biology and Carnivore Conservation in the Rocky Mountains. **Wildlife Research**, v. 10, n. 4, p. 949–963, 1996.

NOWAK, R. M.; WALKER, E. P. **Walker's Mammals of the World**. [s.l.] JHU Press, 1999. v. 1

OLIVEIRA-SANTOS, L. G. R.; GRAIPEL, M. E.; TORTATO, M. A.; ZUCCO, C. A.; CÁCERES, N. C.; GOULART, F. V.. Abundance changes and activity flexibility of the oncilla, *Leopardus tigrinus* (Carnivora: Felidae), appear to reflect avoidance of conflict. **Zoologia (Curitiba)**, v. 29, n. 2, p. 115–120, 2012.

OLIVEIRA, T. G. DE. Ecologia e conservação de pequenos felinos no Brasil e suas implicações para o manejo. **Universidade Federal de Minas Gerais**, 2011.

OLIVEIRA, T. et al. *Leopardus guttulus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e. T54010476A54010576**, 2016.

OLIVEIRA, T. G. *Herpailurus yagouaroundi*. **Mammalian species**, n. 578, p. 1–6, 1998.

OLIVEIRA, T. G.; TORTATO, M. A.; SILVEIRA, L.; KASPER, C. B.; MAZIM, F. D.; LUCHERINI, M.; JÁCOMO, A. T.; SOARES, J. B. G.; SUNQUIST, M. Ocelot ecology and its effect on the small-felid guild in the lowland neotropics. **Biology and conservation of wild felids**, p. 559–580, 2010.

OLIVEIRA, T. G. et al. Avaliação do risco de extinção do gato-do-mato *Leopardus tigrinus* no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 56–65, 2013.

OLIVEIRA, T. G.; DE ALMEIDA, L. B.; DE CAMPOS, C. B. Avaliação do risco de extinção da jaguatirica *Leopardus pardalis* (Linnaeus, 1758) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, n. 1, p. 66–75, 2013.

PAETKAU, D.; CALVERT, W.; STIRLING, I.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular ecology**, v. 4, n. 3, p. 347–354, 1995.

PALOMARES, F.; GODOY, J. A.; PÍRIZ, A.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. **Molecular ecology**, v. 11, n. 10, p. 2171–82, out. 2002.

PALOMARES, F. et al. A non-invasive faecal survey for the study of spatial ecology and kinship of solitary felids in the Viruá National Park, Amazon Basin. **Mammal Research**, v. 62, n. 3, p. 241–249, 11 jul. 2017.

PAVIOLO, A.; ADRADOS, B.; ZANIN, M.; SILVEIRA, L.; KELLER, C. *Leopardus pardalis*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2015.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research--an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 1 out. 2012.

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

PILGRIM, K. L.; MCKELVEY, K. S.; RIDDLE, A. E.; SCHWARTZ, M. K. Felid sex identification based on noninvasive genetic samples. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 1, p. 60–61, mar. 2005.

PIRY, S.; ALAPETITE, A.; CORNUET, J. M.; PAETKAU, D.; BAUDOUIN, L.; ESTOUP, A. GENECLASS2: a software for genetic assignment and first-generation migrant detection. **The Journal of heredity**, v. 95, n. 6, p. 536–9, 2004.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–59, jun. 2000.

PRUGH, L. R.; STONER, C. J.; EPPS, C. W.; BEAN, W. T.; RIPPLE, W. J.; LALIBERTE, A. S.; BRASHARES, J. S.. The rise of the mesopredator. **Bioscience**, v. 59, n. 9, p. 779–791, 2009.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. [2.12.2], 2011.

RABINOWITZ, A. **Cougar: ecology and conservation**. [s.l.] University of Chicago Press, 2009.

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

RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223, jan. 1989.

RILEY, S. P. D.; POLLINGER, J. P.; SAUVAJOT, R. M.; YORK, E. C.; BROMLEY, C.; FULLER, T. K.; WAYNE, R. K. A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 7, p. 1733–1741, 24 mar. 2006.

RIPPLE, W. J.; WIRSING, A. J.; WILMERS, C. C.; LETNIC, M. Widespread mesopredator effects after wolf extirpation. **Biological Conservation**, v. 160, p. 70–79, 2013.

RIPPLE, W. J. et al. Status and ecological effects of the world's largest carnivores. **Science**, v. 343, n. 6167, p. 1241484, 2014a.

RIPPLE, W. J.; BESCHTA, R. L. Large predators limit herbivore densities in northern forest ecosystems. **European Journal of Wildlife Research**, v. 58, n. 4, p. 733–742, 4 ago. 2012.

RITCHIE, E. G.; JOHNSON, C. N. Predator interactions, mesopredator release and biodiversity conservation. **Ecology letters**, v. 12, n. 9, p. 982–998, 2009.

RODGERS, T. W.; GIACALONE, J.; HESKE, E. J.; PAWLIKOWSKI, N. C.; SCHOOLEY, R. L. Communal latrines act as potentially important communication centers in ocelots *Leopardus pardalis*. **Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde**, v.

80, n. 5, p. 380–384, 2015.

RODGERS, T. W.; JANEČKA, J. E. Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation. **European Journal of Wildlife Research**, v. 59, n. 1, p. 1–16, 25 fev. 2013.

RODRÍGUEZ-CASTRO, K. G.; SARANHOLI, B. H.; BATAGLIA, L.; BLANCK, D. V.; GALETTI, P. M. Molecular species identification of scat samples of South American felids and canids. **Conservation Genetics Resources**, p. 1–6, 14 maio 2018.

ROELKE, M. E.; MARTENSON, J. S.; O'BRIEN, S. J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. **Current Biology**, v. 3, n. 6, p. 340–350, jun. 1993.

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

RUELL, E. W.; RILEY, S. P.; DOUGLAS, M. R.; POLLINGER, J. P.; CROOKS, K. R. Estimating Bobcat Population Sizes and Densities in a Fragmented Urban Landscape Using Noninvasive Capture – Recapture Sampling. **Journal of Mammalogy**, v. 90, n. 1, p. 129–135, 2009a.

RUELL, E. W.; CROOKS, K. R. Evaluation of Noninvasive Genetic Sampling Methods for Felid and Canid Populations. **Journal of Wildlife Management**, v. 71, n. 5, p. 1690–1694, jul. 2007.

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

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual+ cold Spring Harbor**New York: Cold spring harbor laboratory press, , 1989.

SARANHOLI, B.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; GALETTI, P. Evidence of Recent Fine-Scale Population Structuring in South American Puma concolor. **Diversity**, v. 9, n. 4, p. 44, 12 out. 2017.

SCHIPPER, J. et al. The status of the world's land and marine mammals: diversity, threat, and knowledge. **Science**, v. 322, n. 5899, p. 225–230, 2008.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 2, p. 211–215, 1992.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233–234, 1 fev. 2000.

SCOGNAMILLO, D.; MAXIT, I. E.; SUNQUIST, M.; POLISAR, J. Coexistence of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) in a mosaic landscape in the Venezuelan llanos. **Journal of Zoology**, 259(3), 269-279. 2003

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

SERGIO, F.; CARO, T.; BROWN, D.; CLUCAS, B.; HUNTER, J.; KETCHUM, J.; MCHUGH, K.; HIRALDO, F. Top predators as conservation tools: ecological rationale, assumptions, and efficacy. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, v. 39, n. 1, p. 1–19, dez. 2008.

SIMÕES DE CASTRO, S. et al. A expansão da cana-de-açúcar no cerrado e no estado de Goiás: elementos para uma análise espacial do processo. **Boletim Goiano de Geografia**, v. 30, n. 1, 2010.

SINGH, S. K.; ASPI, J.; KVIST, L.; SHARMA, R.; PANDEY, P.; MISHRA, S., SINGH, R.; AGRAWAL, M.; GOYAL, S. P. Fine-scale population genetic structure of the Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*) in a human-dominated western Terai Arc Landscape, India. **PloS one**, v. 12, n. 4, p. e0174371, 26 abr. 2017.

SOLBERG, K. H.; BELLEMAIN, E.; DRAGESET, O. M.; TABERLET, P.; SWENSON, J. E. An evaluation of field and non-invasive genetic methods to estimate brown bear (*Ursus arctos*) population size. **Biological Conservation**, v. 128, n. 2, p. 158–168, 2006.

SOUZA, A. S. M. C.; SARANHOLI, B. H.; CRAWSHAW JR, P. G.; PAVIOLO, A. J.; RAMPIM, L. E.; SARTORELLO, L.; GALETTI JR, P. M. Re-discovering jaguar in remaining coastal atlantic forest in southeastern Brazil by non-invasive DNA analysis. **Biota Neotropica**, v. 17, n. 2, 2017.

SPRINGER, M. S.; DEBRY, R. W.; DOUADY, C.; AMRINE, H. M.; MADSEN, O.; DE JONG; W. W.; STANHOPE, M. J. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in



deep-level mammalian phylogeny reconstruction. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 132–143, 2001.

SRBEK-ARAUJO, A. C.; HAAG, T.; CHIARELLO, A. G.; SALZANO, F. M.; EIZIRIK, E.. Worrying isolation: noninvasive genetic analyses shed light on the critical status of a remnant jaguar population. **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 2, p. 397–407, 3 abr. 2018.

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

SWEANOR, L. L.; LOGAN, K. A.; BAUER, J. W.; MILLSAP, B.; BOYCE, W. M. Puma and Human Spatial and Temporal Use of a Popular California State Park. **Journal of Wildlife Management**, v. 72, n. 5, p. 1076–1084, jul. 2008.

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**, v. 24, n. 16, p. 3189–3194, 15 ago. 1996.

TABERLET, P.; BOUVET, J. Bear conservation genetics. **Nature**, v. 358, p. 197, 16 jul. 1992.

TANNERFELDT, M.; ELMHAGEN, B.; ANGERBJÖRN, A. Exclusion by interference competition? The relationship between red and arctic foxes. **Oecologia**, v. 132, n. 2, p. 213–220, 2002.

TERBORGH, J.; LOPEZ, L.; NUÑEZ, P.; RAO, M.; SHAHABUDDIN, G.; ORIHUELA, G.; MAILEN, R.; ASCANIO, R.; ADLER, G. H.; LAMBERT, T. D.; BALBAS, L. Ecological meltdown in predator-free forest fragments. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1923–1926, 2001.

TRIGO, T.; FREITAS, T. R. O.; KUNZLER, G.; CARDOSO, L.; SILVA, J. C. R.; JOHNSON, W. E.; O'BRIEN, S. J.; BONATTO, S. L.; EIZIRIK, E. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. **Molecular ecology**, v. 17, n. 19, p. 4317–4333, 2008.

TRIGO, T.; SCHNEIDER, A.; LEHUGEUR, L.; SILVEIRA, L.; FREITAS, T. O.;

EIZIRIK. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of Neotropical wild cat. **Current Biology**, v. 23, n. 24, p. 2528–2533, 2013.

TRIGO, T. C.; TIRELLI, F. P.; DE FREITAS, T. R.; EIZIRIK, E. Comparative assessment of genetic and morphological variation at an extensive hybrid zone between two wild cats in southern Brazil. **PloS one**, v. 9, n. 9, p. e108469, 2014.

TROLLE, M.; NOSS, A. J.; DE LIMA, E. S.; DALPONTE, J. C. Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 4, p. 1197–1204, 27 abr. 2007.

TROLLE, M.; KÉRY, M. Estimation of ocelot density in the pantanal using capture–recapture analysis of camera-trapping data. **Journal of Mammalogy**, v. 84, n. 2, p. 607–614, maio 2003.

TSCHARNTKE, T. et al. Landscape moderation of biodiversity patterns and processes-eight hypotheses. **Biological Reviews**, v. 87, n. 3, p. 661–685, 2012.

VALIÈRE, N. a computer program for analysing genetic GIMLET: **Molecular Ecology Notes**, 2002.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W. F.; WILLS, D. P.; SHIPLEY, P. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, set. 2004.

VUCETICH, J. A.; WAITE, T. A. Is one migrant per generation sufficient for the genetic management of fluctuating populations? **Animal Conservation**, v. 3, n. 3, p. 261–266, 2000.

WAITS, L. P.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular ecology**, v. 10, n. 1, p. 249–56, jan. 2001.

WALLER, L. A.; WHEELER, D. C. Spatial analysis linking landscape features and genetic population structure in cougars (*Puma concolor*) in the northern Rocky Mountains. **Statistics and Its Interface**, v. 5, n. 2, p. 183–193, 2012.

WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 332–343, 2004.

WEBER, W.; RABINOWITZ, A. A Global Perspective on Large Carnivore Conservation. **Conservation Biology**, v. 10, n. 4, p. 1046–1054, ago. 1996.

WRIGHT, S. THE GENETICAL STRUCTURE OF POPULATIONS. **Annals of Eugenics**, v. 15, n. 1, p. 323–354, jan. 1949.

WULTSCH, C.; WAITS, L. P.; KELLY, M. J. A Comparative Analysis of Genetic Diversity and Structure in Jaguars (*Panthera onca*), Pumas (*Puma concolor*), and Ocelots (*Leopardus pardalis*) in Fragmented Landscapes of a Critical Mesoamerican Linkage Zone. **PLOS ONE**, v. 11, n. 3, p. e0151043, 14 mar. 2016.

YU, H.; SONG, S.; LIU, J.; LI, S.; ZHANG, L.; WANG, D.; LUO, S. J. Effects of the Qinghai-Tibet Railway on the Landscape Genetics of the Endangered Przewalski's Gazelle (*Procapra przewalskii*). **Scientific reports**, 7(1), 17983. 2017.

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