

**A UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**Estudo dos aspectos demográficos da onça-parda (*Puma concolor*) na  
Estação Ecológica de Itirapina no estado de São Paulo  
por meio da análise de amostras não invasivas**

Karla Verónica Chávez Rodríguez

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

São Carlos – SP  
Fevereiro de 2013

**A UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS**  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Estudo dos aspectos demográficos da onça-parda (*Puma concolor*) na  
Estação Ecológica de Itirapina no estado de São Paulo  
por meio da análise de amostras não invasivas**

**Karla Verónica Chávez Rodríguez**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Ciências com área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais.

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

São Carlos – SP

Fevereiro de 2013

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

C512ea Chávez Rodríguez, Karla Verónica.  
Estudo dos aspectos demográficos da onça-parda (*Puma concolor*) na Estação Ecológica de Itirapina no estado de São Paulo por meio da análise de amostras não invasivas / Karla Verónica Chávez Rodríguez. -- São Carlos : UFSCar, 2013.  
89 f.

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

1. Conservação biológica. 2. *Puma concolor*. 3. Marcador molecular. 4. DNA fecal. I. Título.

CDD: 574.5 (20<sup>a</sup>)



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

## Relatório de Defesa de Dissertação Candidata: Karla Verónica Chávez Rodríguez

Aos 25/02/2013, às 14:00, realizou-se na Universidade Federal de São Carlos, nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, a defesa de dissertação de mestrado sob o título: Estudo dos aspectos demográficos da onça-parda (Puma concolor) na Estação Ecológica de Itirapina no estado de São Paulo por meio da análise de amostras não invasivas, apresentada pela candidata Karla Verónica Chávez Rodríguez. Ao final dos trabalhos, a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento, tendo os membros chegado ao seguinte resultado:

### Participantes da Banca

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior  
Prof. Dr. Reinaldo Otavio Alvarenga Alves de Brito  
Prof. Dr. Ronaldo Gonçalves Morato

Função	Instituição
Presidente	UFSCar
Titular	UFSCar
Titular	CENAP

Conceito
<u>APROVADO</u>
<u>APROVADO</u>
<u>APROVADO</u>

Resultado Final: APROVADO

### Parecer da Comissão Julgadora\*:

APROVADO COM DESTAQUE

Encerrada a sessão reservada, o presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar, eu, João Augusto da Silva aAffonso, representante do Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais, lavrei o presente relatório, assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Prof. Dr. Reinaldo Otavio Alvarenga Alves de Brito

Prof. Dr. Ronaldo Gonçalves Morato

Representante do PPG: João Augusto da Silva aAffonso

Não houve alteração no título da dissertação ( ) Houve. O novo título passa a ser:

\*Obs: Se o candidato for reprovado por algum dos membros, o preenchimento do parecer é obrigatório.

Para gozar dos direitos do título de Mestre em Ecologia e Recursos Naturais, a candidata ainda precisa ter sua dissertação homologada pelo Conselho de Pós-Graduação da UFSCar.

Dedico este trabalho aos  
meus pais, Romelia e Demetrio,  
pela compreensão nestes anos de afastamento  
ao meu irmão, José, pelo contínuo apoio  
e ao Carlos pela ajuda, carinho e incentivo.

“O cientista não estuda a natureza porque ela é útil; ele a estuda porque se deleita nela, e se deleita nela porque ela é bela. Se a natureza não fosse bela, não valeria a pena ser conhecida, e se não valesse a pena ser conhecida, a vida não valeria a pena ser vivida.”

Henry Poincaré

## Agradecimentos

Ao meu orientador, o professor Dr. Pedro Manoel Galetti Jr, pela oportunidade concedida, disponibilidade, colaboração e conhecimentos transmitidos.

Aos membros da banca examinadora, o Dr. Reinaldo Alves de Brito e o Dr. Ronaldo Gonçalves Morato pelos grandes aportes no trabalho.

Aos meus pais, Romelia e Demetrio, e o meu irmão, José, pela compreensão nestes dois anos longe de casa e o apoio desde o início desta viagem.

Ao Carlos, meu noivo, pelo apoio, carinho e incentivo, pelas contínuas discussões ao chegar a casa e porque “*Nada em biologia faz sentido a não ser sob a luz da evolução*”.

Aos meus colegas do laboratório pela amizade e espírito de companheirismo, por tornarem o dia a dia mais divertido. Ao Jorge, por essa longa amizade que nos une, pelo apoio e por incentivar o início do mestrado. Ao Bruno, a Andiará e o Ueslei pela continuação no laboratório e nas inúmeras saídas a campo. A Alline, Fernanda, Camila, Adriana e Eliana, pelos momentos divertidos dentro e fora do laboratório. A Renata Miotto, pela colaboração e dicas fornecidas ao início do mestrado. Ao Gallo por ter sido de grande ajuda em cada uma das saídas a campo.

A minhas amigas Cynthia e Regina, por toda a ajuda prestada e pelo carinho.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa concedida e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela ajuda financeira que fez possível o desenvolvimento deste trabalho. Aos funcionários da Estação Ecológica de Itirapina pela ajuda no trabalho em campo.

Ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais e ao Departamento de Genética evolutiva.

## Resumo

A contínua fragmentação e perda de habitats ocasionados pela ação humana têm levado ao declínio de populações de onça-parda (*Puma concolor*). Delimitar as populações, e estabelecer as taxas de migração entre elas é essencial para entender a dinâmica populacional e, conseqüentemente, planejar medidas conservacionistas. No estudo foram utilizadas técnicas moleculares com amostras não invasivas para avaliar uma população de *P. concolor* em um fragmento de cerrado de 32km<sup>2</sup> no estado de São Paulo, o qual apresentou um tamanho populacional de 6 indivíduos e uma densidade que variava entre 4,6 e 1,8/100km<sup>2</sup>. Adicionalmente, esta população foi analisada em conjunto com outros indivíduos de *P. concolor* coletados na região nordeste do estado. O método de cluster Bayesiano foi utilizado para o estabelecimento de populações genéticas, e o método Bayesiano de genótipos multiloci para estimar as taxas de migração a fim de determinar uma possível dinâmica fonte-sumidouro. Finalmente, foram identificadas duas subpopulações, que tinham com barreira a rodovia SP-310. A partir dos resultados constatou-se que a subpopulação localizada ao leste da rodovia se comportava como população fonte e a subpopulação ao oeste como sumidouro. Futuras pesquisas acerca populacionais de *P. concolor* deverão visar a determinação da estrutura populacional e desse modo favorecer o estabelecimento de planos de ação eficientes para a conservação da espécie.

## Abstract

Landscape fragmentation and habitats loss caused by human activities have led to a decline cougar populations (*Puma concolor*). Delimiting populations and establish rates of migration between them is essential to understanding its dynamics and therefore planning conservation measures. The present study propose to use molecular techniques with noninvasive samples to evaluate the status of a population of *P. concolor* inhabiting in a patch of 32km<sup>2</sup> of São Paulo State. The population size was of 6 individuals and its density ranged between 4.6 and 1.8/100km<sup>2</sup>. In addition, this population was analyzed together with other individuals of *P. concolor* collected in the northeast region of the state. Bayesian clustering methods were used to identify genetic populations, and Bayesian multilocus genotyping method to estimate migration rates, in order to determinate possible source-sink dynamics. Finally, two subpopulations separated by the highway SP-310 were identified. The results showed that the subpopulation located on the east of the highway behaved as source population and the another one found on west as a sink. Future researches of *P. concolor* populations must aim to determinate the populations structures and thereby facilitate the establishment of effective action plans for the conservation of the species.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Abrangência do bioma cerrado no estado de São Paulo .....	6
<b>Figura 2.</b> Localização da Estação Ecológica e Experimental de Itirapina no estado de São Paulo .....	7
<b>Figura 3.</b> Área de distribuição da onça-parda, indicando o estado das populações .....	10
<b>Figura 4.</b> Imagem da Estação Ecológica de Itirapina .....	16
<b>Figura 5.</b> Mapa do percurso feito durante a coleta de amostras fecais na Estação Ecológica de Itirapina .....	17
<b>Figura 6.</b> Imagens de fezes e pegada de <i>P. concolor</i> obtidas na Estação Ecológica de Itirapina .....	18
<b>Figura 7.</b> Gel de eletroforese do citocromo b das amostras de fezes e tecido .....	31
<b>Figura 8.</b> Árvore de Neighbor-joining do citocromo b .....	33
<b>Figura 9.</b> Número de indivíduos por espécie coletados na Estação Ecológica de Itirapina .....	34
<b>Figura 10.</b> Rede de haplótipos calculada a partir das sequências de citocrome b .....	34
<b>Figura 11.</b> Gel de eletroforese de um fragmento do gene da amelogenina das amostras de fezes individualizadas .....	38
<b>Figura 12.</b> Gráfico da análise fatorial de correspondência mostrando três possíveis grupos dentro da população de <i>P. concolor</i> na estação Ecológica de Itirapina .....	40
<b>Figura 13.</b> Possíveis heredogramas das amostras aparentadas de <i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina .....	41
<b>Figura 14.</b> Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo fêmea de <i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina .....	42
<b>Figura 15.</b> Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo macho de	

<i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina .....	43
<b>Figura 16.</b> Tamanho efetivo da área amostrada .....	44
<b>Figura 17.</b> Localização dos pontos de coleta das fezes de <i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina .....	46
<b>Figura 18.</b> Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo <i>P. concolor</i> na região nordeste do estado de São Paulo .....	61
<b>Figura 19.</b> Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo <i>P. concolor</i> separados pela rodovia SP 310 .....	62
<b>Figura 20.</b> Delta k (Dk) e Deviance information criterion (DIC) calculados pelos programas Structure Harvester e TESS, respectivamente .....	65
<b>Figura 21.</b> Gráfico de barras obtido pelo STRUCTURE com k=2 .....	66
<b>Figura 22.</b> Gráfico de barras obtido pelo TESS com k=2 .....	66

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Loci microssatélites analisados .....	22
<b>Tabela 2.</b> Taxa de sucesso de amplificação para cada um dos 7 loci de microssatélite analisados .....	35
<b>Tabela 3.</b> Índice de identidade calculado para o panel de 7 microssatélites .....	35
<b>Tabela 4.</b> Caracterização dos loci microssatélite. Indica-se o número de alelos por loci, o conteúdo de informação polimórfica e a riqueza alélica .....	36
<b>Tabela 5.</b> Caracterização dos loci microssatélite. Indica-se o número de alelos por loci, o allelic dropout e presença de falsos alelos .....	36
<b>Tabela 6.</b> Frequências de alelos nulos estimadas por diferentes métodos para os locos de microssatélites .....	37
<b>Tabela 7.</b> Coeficiente de endogamia calculado para cada um dos loci estudados .....	37
<b>Tabela 8.</b> Heterozigocidade observada e esperada para cada um dos loci microssatélites estudados .....	38
<b>Tabela 9.</b> Identificação dos indivíduos de <i>P. concolor</i> coletados na Estação Ecológica de Itirapina .....	39
<b>Tabela 10.</b> Relações de parentesco entre os indivíduos de <i>P. concolor</i> amostrados na Estação Ecológica de Itirapina .....	41
<b>Tabela 11.</b> Tamanho populacional e densidades estimadas para <i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina .....	45
<b>Tabela 12.</b> Taxa de migração obtida para duas subpopulações de <i>P. concolor</i> na região nordeste do estado de São Paulo .....	67
<b>Tabela 13.</b> Heterozigocidade observada e esperada para cada um dos loci	

microssatélites estudados .....	67
<b>Tabela 14.</b> Análises de variância molecular .....	68

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	1
<b>1. Capítulo I. Estudo dos aspectos demográficos da onça-parda (<i>Puma concolor</i>) na Estação Ecológica de Itirapina</b> .....	3
1. 1. INTRODUÇÃO .....	4
1.1.1 Perda e fragmentação de habitats .....	4
1.1.1.1.Bioma Cerrado .....	5
1.1.1.2.Estação Ecológica de Itirapina .....	6
1.1.2. Consequências da perda e fragmentação de habitats para populações de grandes carnívoros .....	8
1.1.3. A espécie <i>Puma concolor</i> (Linnaeus 1771) .....	8
1.1.4. Amostras não invasivas .....	11
1.1.5. Marcadores Moleculares .....	12
1.2. OBJETIVOS .....	14
1.2.1. Objetivo geral .....	14
1.2.2. Objetivos específicos .....	14
1.3. MATERIAL E MÉTODOS .....	16
1.3.1. Área de estudo .....	16
1.3.2. Obtenção das amostras .....	16
1.3.3. Análises Moleculares .....	18
1.3.3.1. Extração de DNA .....	18
1.3.3.1.1. Amostras fecais .....	18
1.3.3.1.2. Amostra de tecido muscular .....	20
1.3.3.2. Diagnóstico da espécie .....	21

1.3.3.3.	Individualização das amostras .....	22
1.3.3.4.	Determinação do sexo .....	23
1.3.4.	Análises dos dados moleculares .....	23
1.3.4.1.	Diagnóstico da espécie .....	23
1.3.4.2.	Individualização das amostras .....	24
1.3.4.3.	Determinação de possíveis erros na genotipagem .....	26
1.3.4.4.	Caracterização dos alelos microssatélites .....	27
1.3.4.5.	Identificação de relações de parentesco .....	28
1.3.5.	Localização das amostras individualizadas de <i>P. concolor</i> .....	28
1.3.6.	Análises Demográfica .....	29
1.3.6.1.	Tamanho efetivo da área amostrada .....	29
1.3.6.2.	Tamanho populacional e Densidade de <i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina .....	29
1.3.6.3.	Tamanho efetivo populacional .....	30
1.3.7.	Seletividade de habitat de <i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina .....	30
1.4.	RESULTADOS .....	31
1.4.1.	Obtenção das amostras .....	31
1.4.2.	Diagnóstico da espécie .....	31
1.4.3.	Individualização das amostras e caracterização dos microssatélites .....	35
1.4.4.	Determinação do sexo dos indivíduos .....	38
1.4.5.	Identificação de relações de parentesco .....	40
1.4.6.	Localização das amostras individualizadas de <i>P. concolor</i> .....	42
1.4.7.	Tamanho efetivo da área amostrada .....	44
1.4.8.	Tamanho e Densidade Populacional .....	44
1.4.9.	Tamanho Efetivo populacional .....	45

1.4.10. Seletividade de habitat de <i>P. concolor</i> na Estação Ecológica de Itirapina	45
1.5.1 DISCUSSÃO	47
<b>2. Capítulo II. Estudo da dinâmica populacional dos indivíduos <i>P. concolor</i></b>	
<b>da Estação Ecológica de Itirapina</b>	<b>53</b>
2. 1. INTRODUÇÃO	54
2.1.1. Metapopulações	54
2.1.1.1. Dinâmica Fonte – Sumidouro	55
2.1.2. Efeito da alteração da paisagem na estrutura metapopulacional	55
2.1.3. Perda e Fragmentação de habitat no Estado de São Paulo	56
2.1.4. Estrutura metapopulacional de <i>P. concolor</i>	57
2.2. OBJETIVOS	59
2.2.1. Objetivo geral	59
2.2.2. Objetivos específicos	60
2. 2. MATERIAIS E MÉTODOS	61
2.2.1. Obtenção das amostras	61
2.2.2. Estruturação populacional	62
2.2.3. Dinâmica populacional	63
2.2.4. Estatísticas descritivas dos clusters	64
2.3. RESULTADOS	65
2.3.1. Estruturação populacional	65
2.3.2. Dinâmica populacional	66
2.3.3. Estatísticas descritivas dos clusters	67
2.4. DISCUSÃO	69
<b>3. Conclusões</b>	<b>71</b>
<b>4. Referencias</b>	<b>72</b>

## INTRODUÇÃO GERAL

A onça-parda (*Puma concolor*) é uma espécie de grande importância ecológica por influenciar fortemente o fluxo de energia no ecossistema, agindo como força seletiva sobre as suas presas, modulando a dinâmica predador-presa, influenciando indiretamente nas comunidades de plantas, intervindo nas interações entre herbívoros e competindo com outros carnívoros (LOGAN; SWEANOR, 2001). Caracteriza-se por ser altamente adaptável e permeável, apresentando uma grande área de distribuição, desde o norte da Colúmbia Britânica (Canadá) até a Patagônia, e desde o Oceano Pacífico até o Atlântico (YOUNG, 1946, SUNQUIST *et al.*, 2002).

Ainda que *P. concolor* possa habitar em quase qualquer ambiente que ofereça presas e refúgio, populações autossustentáveis requerem grandes extensões de áreas naturais interconectadas (BEIER, 1993; CROOKS, 2002). Essa necessidade por grandes ambientes compete diretamente com a necessidade do homem de colonizar novas áreas dado o contínuo aumento do seu tamanho populacional. Assim, *P. concolor* tem sido forçada a se desenvolver em paisagens altamente fragmentadas nas quais correm risco de contrair doenças transmitidas por animais domésticos, são vítimas da caça e são mortas por atropelamento, provocando o declínio das populações (WEBER; RABINOWITZ; 1996, BEIER, 1996).

A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2012) considera a como uma espécie pouco preocupante quanto ao decréscimo de suas populações. Entretanto, no Brasil (BRASIL, 2008), assim como no estado de São Paulo (SÃO PAULO, 2009) é

classificada como vulnerável. Medidas conservacionistas devem ser tomadas a fim de evitar a extinção da espécie, promovendo a manutenção de populações viáveis de *P. concolor*, das suas presas e habitats de boa qualidade (HORNOCKER; NEGRI, 2010).

Para se estabelecer planos de ação eficientes, além de se precisar do conhecimento da biologia e comportamento da espécie, se torna imperativo conhecer que populações estão criticamente ameaçadas e para quais destas os esforços de conservação deveriam ser concentrados (HANSKI; GAGGIOTTI, 2004). Determinar as populações críticas implica um grande conhecimento das características de cada uma delas, assim de como elas interagem mutuamente. A grande maioria das informações que se tem sobre dinâmica populacional de *P. concolor* correspondem a estudos feitos na América do Norte, os quais nem sempre podem ser aplicados fora da área de estudo. Observa-se uma grande escassez de informações acerca da dinâmica populacional, assim como do efeito da fragmentação e perda de habitat nas populações de onças-pardas na América do Sul.

# Capítulo I

## **Demografia da onça-parda (*Puma concolor*) na Estação Ecológica de Itirapina no estado de São Paulo**

## 1. 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1.1 Perda e fragmentação de habitats.

Diversos processos, como erupções vulcânicas, ciclones, etc. podem alterar a composição de uma paisagem, mas são as alterações humanas que estão causando na atualidade uma grande perda e fragmentação de habitats (LINDENMAYER; FISCHER, 2006). O incremento destas alterações ocasionadas pela ação do homem traz como consequência uma diminuição de habitats e um incremento na degradação deles, originando paisagens heterogêneas compostas por áreas isoladas de diferentes qualidades, as quais estão embutidas em diferentes matrizes, como áreas agrícolas e centros urbanos (NOSS; CSUTI, 1997; MCINTYRE; HOBBS, 1999).

Com o contínuo aumento das alterações humanas e a perda de habitats, aumentaram as pesquisas que visavam demonstrar que a diminuição na qualidade e quantidade de habitats reduz o tamanho populacional de algumas espécies que habitam essas áreas, elevando a probabilidade de extinção de espécies (BURKEY, 1989; CARDILLO *et al.*, 2004; PARKS; HARCOURT, 2002). Wiegand e colaboradores (2005) determinaram por meio de simulações no computador o efeito da fragmentação e da perda de habitat na dinâmica populacional do urso marrom (*Ursos arctos*). Tais resultados mostraram que a redução das áreas de vida explicava o 68% do tamanho populacional dessa espécie e fragmentação explicava o 13%.

Sendo os efeitos da perda e da fragmentação de habitats tão significativos, aumenta-se a preocupação pelas espécies oriundas de áreas tidas como *hotspots*, áreas que possuem uma grande concentração de espécies endêmicas, as quais têm sofrido uma significativa diminuição. No ano 2000 restavam apenas 12,2% da área original dos 25 *hotspots* existentes

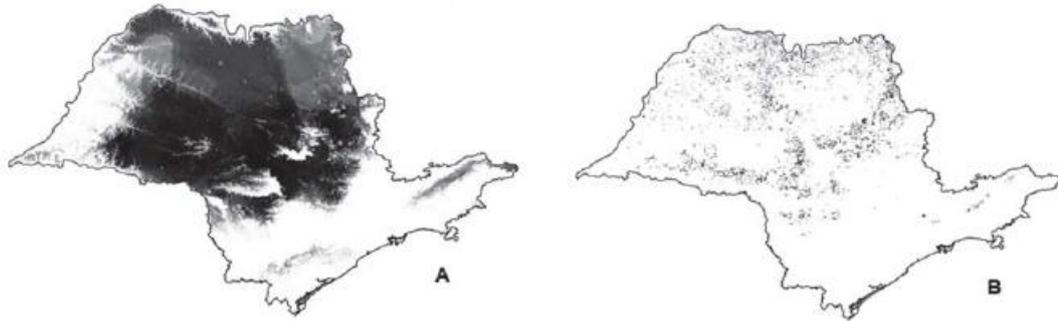
no mundo. O Brasil, por sua vez, apresenta em seu território dois *hotspots*, o Cerrado e a Floresta Atlântica, cujas áreas foram reduzidas em 80% e 92,5%, respectivamente (MYERS *et al.*, 2000).

#### **1.1.1.1. Bioma Cerrado**

O cerrado é o segundo maior bioma brasileiro ocupando 21% do território (BORLAUG, 2002). Caracteriza-se por apresentar duas estações bem marcadas, inverno seco (abril - setembro) e verão chuvoso (outubro - março), a temperatura varia entre 22° e 27°C e a precipitação anual média é de 1500 mm (KLINK; MACHADO, 2005). Os solos são geralmente profundos e de baixa fertilidade (MANTOVANI; PEREIRA, 1998). Este bioma tem sido altamente perturbado pelo homem (CAVALCANTI; JOLY, 2002). Os solos têm sido utilizados para o uso na atividade agrícola (KLINK; MOREIRA, 2002). Da área original de 1,783,200 km<sup>2</sup>, na atualidade apenas restam 20% (MYERS *et al.*, 2000). Assim mesmo, o desmatamento e as queimadas causam perda de solos por erosão, poluição hídrica e atmosférica, afetando à biodiversidade (MANTOVANI; PEREIRA, 1998).

A conservação dos remanescentes do cerrado e das espécies que habitam nele é de primordial importância, uma vez que este bioma é considerado um dos 25 *hotspots* mundiais (MYERS *et al.*, 2000). Constitui a savana tropical com maior riqueza de espécies no mundo, possuindo aproximadamente 7000 espécies de plantas e 199 espécies de mamíferos, sendo 44% e 9.5% delas endêmicas, respectivamente (KLINK; MACHADO, 2005).

No estado de São Paulo a situação é crítica (Figura 1), nos últimos 50 anos os remanescentes de cerrado diminuíram drasticamente, chegando a cobrir apenas 1% do território paulista (DURIGAN *et al.*, 2004). Atualmente são poucos os remanescentes protegidos, sendo um deles a Estação Ecológica de Itirapina.



**Figura 1.** Abrangência do bioma cerrado no estado de São Paulo. (A) Possível abrangência original do bioma cerrado no estado de São Paulo. (B) Remanescentes do bioma cerrado no estado de São Paulo (KRONKA *et al.*, 2008).

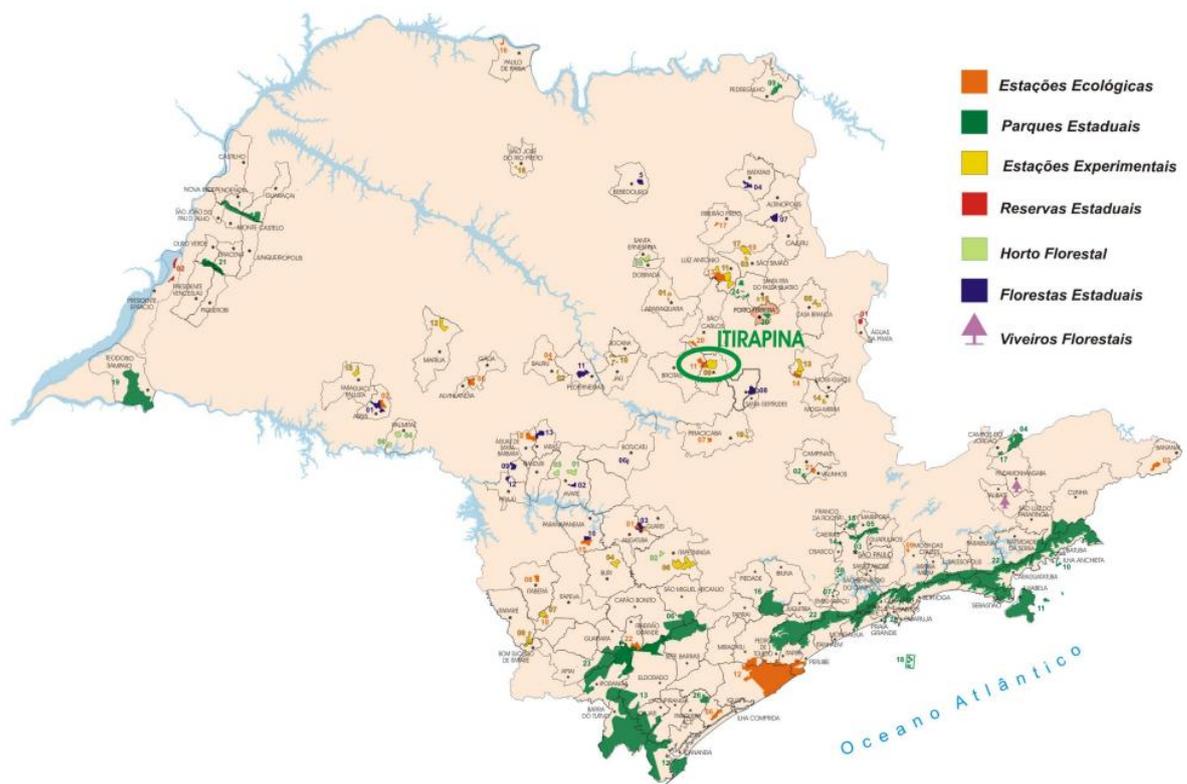
#### 1.1.1.2. Estação Ecológica de Itirapina

A Estação Ecológica de Itirapina se localiza entre os municípios de Brotas e Itirapina, no estado de São Paulo (Figura 2). A origem da estação se remonta ao ano de 1957, quando através de um decreto estadual uma área 1000 ha foi destinada a trabalhos de serviço florestal. Posteriormente, entre os anos 1957 e 1966 ocorreram uma série de expropriações, com as quais a área da Estação Experimental de Itirapina chegou a abranger 5500 ha. No ano 1984, 2300 ha de remanescente de cerrado pertencente da Estação Experimental passariam a constituir a Estação Ecológica de Itirapina, cuja finalidade seria a preservação da natureza e a realização de pesquisas científicas. Esta área representa o 2,12% da área total protegida sob esta categoria no estado de São Paulo (PROBIO/SMA-SP, 1997; DELGADO, 2004; ZANCHETTA, 2006).

A área da Estação Ecológica de Itirapina está localizada sobre a Bacia Sedimentar do Paraná, é drenada pela bacia hidrográfica do rio Jacaré-Guaçu e exibe um clima mesotérmico, com duas estações bem marcadas, inverno seco e verão chuvoso. Essa unidade de conservação apresenta quase que em sua totalidade fisionomias savânicas e campestres, as

quais têm sido reduzidas em virtude do desenvolvimento urbano, transformando-as principalmente em áreas de pastagens e campos de cultivo (SILVA, 2005; ZANCHETTA, 2006).

Estudos na área revelam a sua importância ecológica, a qual apresenta um alto número de espécies ameaçadas e endêmicas. Entre as espécies de animais que podem ser encontrados na estação ecológica, e cujas populações estão sendo afetadas pela diminuição do seu habitat, podemos mencionar a codorna buraqueira (*Nothura minor*), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), o tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e a onça-parda (*Puma concolor*) (MOTTA *et al.*, 2008; HÜLLE, 2006).



**Figura 2.** Localização da Estação Ecológica e Experimental de Itirapina no estado de São Paulo (ZANCHETTA, 2006).

### **1.1.2. Consequências da perda e fragmentação de habitats para populações de grandes carnívoros**

As populações de carnívoros são essenciais para a manutenção de um ecossistema saudável (CROOKS; SOULÉ, 1999; HORNOCKER; NEGRI, 2010). Porém, a conservação de populações de grandes carnívoros tem sido difícil devido às grandes áreas de vida que precisam (HORNOCKER; NEGRI, 2010). Assim, em paisagens altamente fragmentadas as populações apresentam uma taxa de mortalidade elevada e um sucesso reprodutivo diminuído, podendo ser extintas se não houver uma população fonte que produza colonizadores (NOSS *et al.*, 1996).

Crooks (2002) demonstrou que, quanto menor o tamanho de um fragmento e mais isolado ele se encontra, menor será a probabilidade de ocorrência de carnívoros na área, porém aumentam as chances de ocorrência de animais domésticos provenientes das áreas urbanas próximas. Das espécies estudadas por Crooks, a onça-parda foi quem precisou de áreas de fragmentos maiores e com menores níveis de isolamento, devido aos seus hábitos solitários e territorialistas e à grande área de vida em que se desenvolve.

### **1.1.3. A espécie *Puma concolor* (Linnaeus 1771)**

A (*Puma concolor*), assim como muitas espécies de felinos, é um animal solitário e de atividade noturna que costuma evitar o contato com o homem (LOGAN; SWEANOR, 2001). Apresenta um comportamento territorialista, marcando o seu território com o depósito de fezes em locais proeminentes, tais como trilhas e rochas (CHAME, 2003).

Possui um corpo longo com um comprimento que varia entre 106 e 209 cm (cabeça e corpo) e uma longa cauda que pode chegar a 97 cm. O peso médio dos adultos é de 55,3 kg nos machos e 33,1 kg nas fêmeas. Os filhotes nascem com um peso médio de 508,3 gramas, apresentando manchas escuras no corpo e anéis pretos nas caudas, as quais são úteis para se

esconder eficazmente. Por volta dos nove meses as manchas começam a desaparecer, tornando-se, geralmente, inexistentes aos 24 meses, idade na qual começa a maturidade sexual (LOGAN; SWEANOR, 2001).

As onças-pardas são promíscuas e poligâmicas, isto se deve principalmente ao fato de que a área de vida de um macho se sobrepõe à área de vida de mais de uma fêmea. Observa-se na natureza uma taxa sexual de machos e fêmeas adultas que varia majoritariamente entre 01:02 e 01:03 (QUIGLEY; HORNOCKER, 2010). A maioria das fêmeas apresenta um comportamento filopátrico, o qual parece ser benéfico por melhorar sua aptidão ao permitir-lhe aproveitar o conhecimento aprendido dos recursos na área (LOGAN; SWEANOR, 2001). A diferença das fêmeas quase todos os machos se dispersam da sua área natal, evitando com isto o acasalamento entre parentes (LOGAN; SWEANOR, 2010).

A espécie é altamente adaptável e permeável, apresenta uma grande área de distribuição, desde o norte da Colúmbia Britânica (Canadá) até a Patagônia e desde o Oceano Pacífico até o Atlântico (Figura 3) (YOUNG, 1946, SUNQUIST; SUNQUIST, 2002). Porém, apesar de ser um dos felinos mais distribuídos da América, a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN, 2012) considera a onça-parda como uma espécie de baixo risco com populações que tendem a decrescer, tendência que tem sido reportada em diversas populações nos Estados Unidos (HORNOCKER; NEGRI, 2010).

As populações de onça-parda encontram-se em declínio, como resultado da perda e fragmentação dos seus habitats, caça, doenças transmitidas por animais domésticos e comércio ilegal de partes do seu corpo (WEBER; RABINOWITZ, 1996; BEIER, 1996). Devido ao baixo número de indivíduos e isolamento, a espécie exibe uma estrutura de metapopulação (BEIER, 1996), ou seja, uma população dividida em subpopulações separadas por espaços ou barreiras que se conectam por escassos movimentos de migração (OPDAM, 1991). Não obstante, o fluxo entre as diferentes subpopulações nem sempre acontece,

podendo levar algumas metapopulações à extinção (HANSKI, 1998), devido aos efeitos da deriva genética, aumentando o risco de perda de variação genética (O'BRIEN, 1994; ANDERSEN; FOG; DAMGAARD, 2004; FRANKHAM *et al.*, 2010).

No Brasil a situação não é diferente, o crescimento das populações humanas está forçando os demais animais, entre eles os grandes carnívoros, a se desenvolver em espaços cada vez mais reduzidos (PALMEIRA *et al.*, 2008). Sendo que no país (BRASIL 2008), assim como em São Paulo (SÃO PAULO 2009), a onça-parda é classificada como vulnerável.

O manejo desta espécie precisa de estudos demográficos e genéticos. Porém, os hábitos noturnos e elusivos desfavorecem o encontro e captura de indivíduos (LOGAN; SWEANOR, 2001). É nestes casos que o uso de análises de amostras não invasivas oferece uma fascinante alternativa.



**Figura 3.** Área de distribuição da onça-parda, indicando o estado das populações (Editado por HORNOCKER; NEGRI, 2010).

#### **1.1.4. Amostras não invasivas**

Estudos baseados em análises de amostras não invasivas oferecem uma grande quantidade de dados, como a presença de espécies, comportamento, alimentação e determinação do território, os quais podem ser aplicados em projetos de conservação (CHAME, 2003) e, sobretudo porque, ao contrário das amostras de sangue ou tecido, que envolve a captura e manipulação dos indivíduos, a amostragem não invasiva não causa estresse nem danos aos animais, algo desejável especialmente no caso de animais vulneráveis ou em perigo de extinção (HEYMANN *et al.*, 2004).

A amostra não invasiva é toda aquela que não depende da captura dos animais para a sua obtenção, como pelos soltos, fezes, ossos ou regurgito (TABERLET; LUIKART, 1999; MORIN *et al.*, 2001; CREEL *et al.*, 2003). Dentre os materiais não invasivos as fezes têm sido majoritariamente utilizadas para estudos genéticos em carnívoros (BHAGAVATULA *et al.*, 2006, MIOTTO *et al.*, 2010).

A aplicação de técnicas moleculares em amostras fecais é difícil devido à degradação sofrida pela exposição ao ambiente, a qual diminui a qualidade e quantidade do ADN (TABERLET; LUIKART, 1999; FARREL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E., 2000). Este ADN é obtido das células epiteliais descartadas durante a passagem pelo intestino (KOHN; WAYNE, 1997), sendo adicionalmente afetado pelo estado fisiológico do indivíduo, a dieta e o sistema digestivo da espécie (FERNANDO *et al.*, 2003).

Embora o ADN não seja de boa qualidade, com o uso de marcadores moleculares de pequeno tamanho as amostras fecais podem ser usadas para a análise de tamanho populacional, diversidade genética, parentesco e relações populacionais (BHAGAVATULA *et al.*, 2006; MIOTTO *et al.*, 2010; MIOTTO *et al.*, 2012).

### 1.1.5. Marcadores Moleculares

Um marcador molecular é qualquer característica herdável presente nos organismo, que pode ser empregado para avaliar diferenças genéticas (BERED, F.; NETO, J. F.; FELIX DE CARVALHO, F. I., 1997; RUANE; SONINNO, 2007), os quais podem ser bioquímicos (baseados em enzimas) ou de DNA (BERED, F.; NETO, J. F.; FELIX DE CARVALHO, F. I., 1997, JONES, 2009).

O uso dos marcadores de DNA para pesquisa tem sido significativamente utilizado ao longo dos anos. Isto devido às vantagens que provê, tais como: (i) fornecer muitos sítios potenciais para serem usados como marcadores, ao ser possível identificar simples mudanças nas sequências de DNA; (ii) são independentes do estado de desenvolvimento; (iii) podem ser encontrados tanto em sequências codificantes como não codificantes; e (iv) a maioria deles apresenta seleção neutra (JONES, 2009). Entre os marcadores de DNA mais utilizados encontramos os mitocondriais e nucleares, os quais apesar de estar expostos às mesmas forças evolutivas, a diferença na sua taxa de mutação e o modo de herança, ajudam a resolver diferentes perguntas biológicas.

As principais vantagens do uso do DNA mitocondrial (DNAmít) como marcador molecular são ausência de recombinação, rápida taxa de evolução e o grande número de cópias por célula (AVISE, 2009). Assim mesmo, o alto polimorfismo de algumas de suas regiões permite a diferenciação entre espécies intimamente relacionadas (FRANKHAM *et al.*, 2010). Essas características têm favorecido o seu uso quase exclusivo nas pesquisas com amostras não invasivas (FORAN, D. R.; CROOKS, K. R.; MINTA, S. C., 1997; MURPHY *et al.*, 2003; REED *et al.*, 2004; MIOTTO *et al.*, 2007; HAAG, *et al.*, 2009). A moderada variação do gene citocromo b, do DNAmít, faz dele o mais indicado para a identificação de espécies (JOHNS; AVISE, 1999; KOHN; WAYNE, 1997). Farrel e colaboradores (2000)

conseguiram identificar espécies de carnívoros utilizando apenas uma sequência de 146 pares de bases do citocromo b.

De entre os marcadores de DNA nuclear, os loci microssatélites têm sido usados para determinar a variação genética, a estrutura populacional, o fluxo gênico e as relações de parentesco nas populações (VIDYA; SUKUMAR, 2005). Os microssatélites são pequenas sequências de DNA, comumente constituídas por 1–5 pares de bases repetidos em tandem tipicamente entre 5 e 40 vezes (FRANKHAM, 2010; SELKOE; TOONEN, 2006). Os loci microssatélites apresentam alta taxa de mutação, sendo frequentemente da ordem de  $10^{-3}$  a  $10^{-4}$  eventos por loco por gameta por geração (ZANE *et al.*, 2002). Isso proporciona um alto polimorfismo torna-os suficientemente informativos para serem aplicados em estudos forenses e de paternidade (SELKOE; TOONEN, 2006).

## 1.2. OBJETIVOS

---

A Estação Ecológica de Itirapina é um dos poucos remanescentes de cerrado no estado de São Paulo, motivo pelo qual desempenha um papel muito importante na manutenção da biodiversidade que nela habita. Devido ao alto grau de antropização das áreas circundantes, esta pode ser considerada como refúgio natural de diferentes espécies animais, dentre as quais se encontra a onça-parda (*Puma concolor*).

Este trabalho tem se focado em fazer uma descrição da população de *P. concolor* presente na Estação Ecológica de Itirapina, visando estabelecer se esta população é viável. Ao mesmo tempo, se espera fazer inferências sobre o tipo de dinâmica populacional e probabilidade de que esteja inserida dentro de uma metapopulação.

### 1.2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho é realizar estudos demográficos da onça-parda (*Puma concolor*) na Estação Ecológica de Itirapina, estado de São Paulo.

### 1.2.2. Objetivos específicos

- Individualizar as amostras de *P. concolor*.
- Identificar o sexo dos indivíduos.
- Estimar as relações de parentesco.
- Caracterizar a variação genética da população.
- Determinar o tamanho populacional.
- Estimar a densidade populacional.
- Determinar o tamanho efetivo populacional.

- Obter uma aproximação da distribuição da espécie na área de estudo.
- Determinar a movimentação dos indivíduos por meio das recapturas do mesmo indivíduo em distintas localidades.
- Estimar a seletividade de habitat de *P. concolor* na Estação Ecológica de Itirapina.

### 1.3. MATERIAL E MÉTODOS

---

#### 1.3.1. Área de estudo

A Estação Ecológica de Itirapina está localizada nos municípios de Itirapina e Brotas, nordeste do estado de São Paulo, delimitada pelas coordenadas: 22°10' - 22°15'S e 47°45' - 48°W (Figura 4). Possui uma área aproximada de 32,13km<sup>2</sup>, com médias anuais de temperatura e precipitação de 20,8°C e 1523mm, respectivamente (TANNUS, J. L. S.; ASSIS, M. A.; MORELLATO, L. P., 2006).

Caracteriza-se por ser uma área bastante heterogênea com fisionomias de campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado *sensu strictu*, campo úmido e plantios de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp.

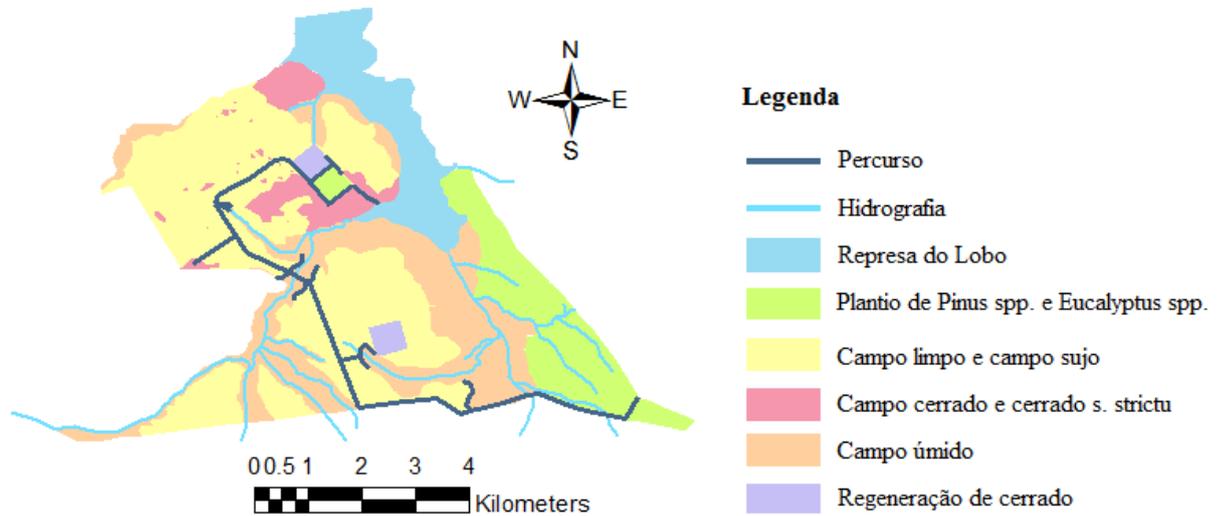


**Figura 4.** Imagem da Estação Ecológica de Itirapina.

#### 1.3.2. Obtenção das amostras

As amostras de fezes foram coletadas de modo oportunista percorrendo trilhas previamente abertas na unidade de conservação entre os meses de julho 2011 e agosto 2012,

devido ao fato de que os carnívoros frequentemente defecam ao longo das estradas e trilhas (MACDONALD, 1980) (Figura 5).



**Figura 5.** Mapa do percurso feito durante a coleta de amostras fecais na Estação Ecológica de Itirapina

As amostras foram coletadas com base na morfologia (CHAME, 2003), mas nas áreas mais arenosas e limpas as pegadas serviram como indício de que provavelmente as fezes eram pertencentes à onça-parda (Figuras 6). O comprimento do percurso na Estação Ecológica de Itirapina foi 17,44 km. Cada local de amostragem foi georreferenciado utilizando um Sistema de Posicionamento Global (GPS).

De cada amostra de fezes, foram retiradas aproximadamente uma camada externa de 1 cm de espessura dos primeiros 4 cm de cada um dos extremos. Estas foram armazenadas em tubos falcon com álcool ao 96%. Nos 13 meses de coleta foram obtidas 42 amostras potenciais de *P. concolor*. Adicionalmente uma amostra de músculo proveniente de um indivíduo macho atropelado em maio de 2011, foi fornecida pela Dra. Renata Miotto. No laboratório, todas as amostras foram conservadas no freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**Figura 6.** Imagens de fezes (A) e pegada (B) de *P. concolor* obtidas na Estação Ecológica de Itirapina.

### **1.3.3. Análises Moleculares**

#### **1.3.3.1.Extração de DNA**

A extração do DNA genômico foi realizada utilizando dois métodos diferentes, os quais dependiam do tipo de amostra da qual ia ser extraído o DNA.

##### **1.3.3.1.1. Amostras fecais**

A extração de ADN genômico foi realizada usando o kit de extração “PSP SPIN Stool DNA Plus” (Invitek), o qual foi desenvolvido para extrair ADN de amostras que apresentam concentrações elevadas de componentes inibidores PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), como é no caso das amostras fecais. O protocolo de extração foi fornecido pelo fabricante e consta dos seguintes passos:

- Uma pequena parte da amostra sólida a trabalhar foi vortexada com álcool para obter um líquido homogêneo. Este procedimento foi repetido até se obter o volume necessário (500µL).

- 400µL da amostra foram depositados no 2,0mL Safe-Lock-Tube, adicionados 1,2mL de Lysis Buffer P e vortexeados durante um minuto. Posteriormente a amostra foi incubada por 15 minutos a 95°C agitando constantemente e centrifugada a 13200 rpm (rotações por minuto) por seis minutos.
- O sobrenadante foi transferido para o InviAdsorb-Tube e vortexado por 15 segundos. A suspensão foi incubada por um minuto à temperatura ambiente e centrifugada a 13200 rpm por seis minutos.
- O sobrenadante foi transferido a um novo tubo de 1,5mL e centrifugado a 13200 rpm por seis minutos.
- 400 µL do sobrenadante foram pipetados em um novo tubo de 1,5mL e se adicionaram 25µL de proteinase K. A solução foi vortexada rapidamente e incubada por 15 minutos a 70°C agitando constantemente.
- 400µL de Binding Buffer P foram adicionados ao tubo de 1,5mL. A nova solução foi vortexada rapidamente e transferida para o Spin Filter, previamente colocado no 2,0mL Receiver Tube, e incubada por um minuto a temperatura ambiente e centrifugada a 12000 rpm por 90 segundos. O filtrado foi descartado.
- 500µL do Wash Buffer I foram colocados no Spin Filter e centrifugados a 12000 rpm por 90 segundos. O filtrado foi descartado.
- 800µL do Wash Buffer II foram adicionados para o Spin Filter e centrifugados a 12000 rpm por 90 segundos. O filtrado foi descartado.
- Para remover o etanol o Spin Filter foi centrifugado a 13200 rpm por três minutos.
- O Spin Filter foi colocado em um novo 1,5mL Receiver Tube e se adicionaram 100µL pré-aquecidos (70°C) do Elution Buffer D. Durante 8 minutos se incubou a temperatura ambiente. Posteriormente foi centrifugado a 8000 rpm por dois minutos para eluir o DNA. O Spin Filter foi descartado.

- O DNA foi armazenado a -20°C.

#### **1.3.3.1.2. Amostra de tecido muscular**

A extração de DNA genômico da amostra de músculo foi realizada mediante o uso do protocolo proposto por Sambrook *et al.* (1989) com algumas modificações, e consta dos seguintes passos:

- Colocar uma pequena amostra de tecido em um tubo de 1,5mL e adicionar 500µL de solução de digestão contendo 12,5µL de SDS (20%), 5 µL RNase (0,1 mg/mL), 100µL de EDTA (0,1M), 2,5µL Tris-HCl (0,01M), 40µL de NaCl e 330µL de água MilliQ. Incubar por 1h a 37°C.
- Adicionar 30 µL de proteinase K (0,1 mg/mL). Incubar por 3 hs a 55°C.
- Adicionar o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico. Mexer o tubo suavemente durante 10 min.
- Centrifugar a 14500 rpm por 15 min. Recuperar o sobrenadante.
- Centrifugar a 14500 rpm por 10 min. Recuperar o sobrenadante.
- Adicionar NaCl (5M) de modo que a concentração final da solução seja de 1M;
- Adicionar delicadamente 500 µL de álcool 100% gelado.
- Centrifugar a 10000 rpm por 10 min. Descartar o sobrenadante.
- Adicionar 500 µL de álcool 70% gelado;
- Centrifugar a 10000 rpm por 10 min. Descartar o sobrenadante.
- Secar o material a 37°C por 24h.
- Ressuspender o DNA em 200 µL de água MilliQ.
- O DNA foi armazenado a -20°C.

### 1.3.3.2. Diagnóstico da espécie

Para confirmar se as amostras de fezes correspondiam à espécie *P. concolor*, uma região específica de 146 pb correspondente ao citocromo b do DNAm foi amplificada utilizando os primers 5'-AAACTGAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA-3' e 5'-TATTCTTTATCTGCCTATACATRCACG-3' (FARREL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E., 2000).

Cada PCR foi realizada em um termociclador Veriti utilizando um volume final de 12,5µl de DNA. Cada reação continha 5µl de tampão 1x (20 mM Tris HCl pH 8,4 e 50 mM de KCl); 0,2mM de cada dNTP; 3mM de MgCl<sub>2</sub>; 0,48 mg/ml de BSA; 0,56 mM de cada iniciador e 1u de Taq polimerase (Invitrogen TM). As condições do ciclo de reação foram: desnaturação inicial a 95°C (5 min) seguido de 40 ciclos a 94°C (45 seg), 52°C (45 seg), 72°C (1 min) e uma extensão final a 72°C (20 min). Dois microlitros do produto da PCR juntamente com 1ul de GelRed e 1ul de azul de bromofenol foram submetidos a eletroforeses em gel de agarose ao 1% para a checagem do sucesso de amplificação.

Após a amplificação os produtos de PCR foram purificados por reação enzimática, utilizando a Exo-SAP-IT (USB, Affymetrix, EUA) de acordo com o protocolo indicado pelo fabricante. Aos 10,5µl restantes do produto da PCR, foram adicionados 8µl da combinação de enzimas. A mistura foi incubada a 37°C por 15 minutos e a 80°C por 35 minutos. Após a purificação os produtos de PCR foram sequenciados pela MacroGen Inc. (Coreia) no sequenciador automático ABI 3730xl DNA Analyzer.

### 1.3.3.3. Individualização das amostras

Sete locos microssatélites específicos para onça-parda foram utilizados para individualizar cada amostra previamente identificada como *P. concolor*: PcoA208, PcoC108, PcoB003, PcoB010, PcoB210, PcoA339 e PcoA216 (KURUSHIMA *et al.*, 2006). Eles foram amplificados utilizando *primers* marcados com o fluoróforo FAM (Tabela 1).

**Tabela1.** Loci microssatélites analisados. Mostram-se os tamanhos esperados de cada locus e os *primers* utilizados (KURUSHIMA *et al.*, 2006).

Locus	Tamanho do fragmento (pb)	Sequências dos primers	
		Forward	Reverse
<b>PcoA106</b>	237 – 257	GTTGGAAGGTCACAAAAGTCCT	gttcttCACAAAGGCTGGTCTACAGTGT
<b>PcoA208</b>	180 – 200	TGGCAGCTTTAGTGGAAAGAC	CCCTATTAATAACCGCCTCACT
<b>PcoA216</b>	240 – 260	CTTGGCTCCTTGAATGTGATC	GCTGTGTGACTGTAAGCAGGTTA
<b>PcoA339</b>	259 – 277	AGTGGCAAACCTTTCTGGGT	gttcttGCCTCCCTCTGAAGTGCATAT
<b>PcoB003</b>	263 – 289	CCTCAGGTTTCCTGTCTGTAAA	gttcttCAGTCCTAACAGGGACGTGTAC
<b>PcoB010</b>	201 – 229	TACGGAAAGGTAAGTGGCAACT	gttcttCCTGGTAATAGAGGCAGGTGT
<b>PcoB210</b>	157 – 185	CTTGGGATGTCTCATGTGGTT	CATCTTGGTGTGATCCTCTAGTC
<b>PcoC108</b>	117 – 141	CCCCTGCTTTGAAAAAAGTCTC	CCTGTTCTCCAACCTACAGATAGC

Cada PCR foi realizada em um termociclador Veriti utilizando um volume final de 15µl. Cada reação continha 7,5 mL de GoTaq Mix Master (Promega) - 1x de tampão, 0,2mM de cada dNTP, 1,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 u de Taq polimerase - 0,45uM de cada iniciador, 200ug/mL de BSA, 2mM MgCl<sub>2</sub> e 5uL de ADN. As condições do ciclo de reação foram: desnaturação inicial a 95°C (5 min) seguido de 40 ciclos a 95°C (45 seg), 48°C (45 seg), 72°C (1 min) e uma extensão final a 72°C (20 min), os produtos de PCR foram analisados no sequenciador automático ET-550R MegaBACE Size Standard (Amersham Biosciences). A amostra de músculo também foi genotipada utilizando as mesmas condições. Para aumentar a confiabilidade do estudo foram realizadas ao menos cinco genotipagens de cada amostra (NAVIDI *et al.* 1992; BELLEMAIN *et al.*, 2005).

#### 1.3.3.4. Determinação do sexo

A amplificação de um segmento do gene amelogenina presente nos cromossomas sexuais de *P. concolor* permitiu a identificação do sexo das amostras. O gene da amelogenina possui a característica de ter uma deleção no cromossomo Y, motivo pelo qual o tamanho da sequência proveniente do cromossomo é 20 pb maior ao proveniente do cromossomo X.

Os *primers* utilizados para esta análise foram descritos por Pilgrim e colaboradores (2005), 5'-CGAGGTAATTTTTCTGTTTACT-3' e 5'-GAAACTGAGTCAGAGAGGC-3'. Cada PCR foi realizada em um termociclador Veriti utilizando um volume final de 15 uL, contendo 7,5 mL de GoTaq Mix Master (Promega), 0,9 uM de cada iniciador, 200 ug/mL de BSA e 4,5ul de DNA. As condições do ciclo de reação foram: desnaturação inicial a 94°C (5 min) seguido de 40 ciclos a 94°C (1 min), 43°C (1 min), 72°C (1 min) e uma extensão final a 72°C (10 min). Cada amostra foi corrida por duas horas em gel de agarose a 2%.

#### 1.3.4. Análises dos dados moleculares

##### 1.3.4.1. Diagnóstico da espécie

Todos os cromatogramas obtidos do mento foram verificadas visualmente, um a um para avaliar a qualidade do sequenciamento, e editadas usando o programa Chromas Lite v2.01 (Technelysium Pty Ltd 2007).

Uma comparação com outras sequências disponíveis na base de dados GenBank foi feita mediante a ferramenta MegaBlast (ZHANG *et al.*, 2000; MORGULIS *et al.*, 2008). Essa ferramenta usa o algoritmo *greedy* para pesquisa de sequências de nucleotídeos, e difere do *blastn* ao estar otimizado para o alinhamento de sequências que diferem ligeiramente entre elas. Devido a essa característica a procura de sequências semelhante resulta ser mais específica e idônea para o foco do trabalho. Tendo em consideração a especificidade da

procura, de todas sequências comparadas com a base de dados, só seriam selecionadas para próximas análises aquelas que obtivessem 100% de *query coverage* e pelo menos 95% de *maximum identity*, com as sequências de felinos.

As sequências selecionadas, obtidas de fezes, foram alinhadas juntamente com a sequência de *P. concolor* obtida do indivíduo atropelado na periferia da Estação Ecológica de Itirapina e com 5 sequencias obtidas da base de dados GenBank, as quais correspondias às espécies *P. concolor* (JN999997.1 e AF266475.1), *Puma yagouaroundi* (AY886751.1), *Leopardus pardalis* (AF266473.1), e *Panthera onca* (GU175435.1 e HM107682) utilizando o programa Clustal X2 (LARKIN *et al.*, 2007).

Uma árvore de *Neighbor-joining* (NJ), utilizando o modelo de substituição Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980), foi construída a partir do alinhamento com o auxílio do programa MEGA v.5.05 (TAMURA *et al.*, 2011). As sequências de *P. onca* serviram como extragrupo. Adicionalmente uma análise de parcimônia estatística foi feita com as sequências das amostras obtidas das fezes e do tecido, em conjunto com as sequências de *P. concolor*, *P. yagouaroundi*, *L. pardalis* e *P. onca* do GenBank, usando o programa TCS 1.21 (CLEMENT; POSADA; CRANDALL, 2000) para determinar o número de haplótipos únicos e posteriormente gerar a rede.

#### **1.3.4.2. Individualização das amostras**

Com auxílio do programa MegaBACE Genetic Profiler v2.2 (GE Healthcare) foram analisados os cromatogramas para determinar os tamanhos dos alelos presentes nas amostras. Toda pontuação automática foi verificada manualmente.

A individualização das amostras foi feita usando o programa GIMLET v1.3.3 (VALIÈRE, 2002) mediante a opção de reagrupamento de genótipos, no qual cada genótipo é

considerado um genótipo potencial de referência. Em seguida uma matriz de comparação de pares de genótipos é construída indicando a porcentagem de semelhança entre as amostras.

A probabilidade de identidade (PID), a qual calcula a chance de que dois indivíduos aleatoriamente de uma população tenham o mesmo genótipo multilocos (PAETKAU; STRÖBECK, 1994; WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001) foi também calculada usando o programa GIMLET v1.3.3 (VALIÈRE, 2002), o qual faz uso das equações:

$$PI_{theoric} = \sum_i p_i^4 + \sum_i \sum_{j \neq i} 2p_i p_j$$

$$PI_{unbiased} = \frac{n^3(2a_2^2 - a_4) - (2n^2(a_3 + 2a_2) + n(9a_2 + 2) - 6)}{(n-1)(n-2)(n-3)}$$

$$PI_{sibs} = \frac{1}{4} + \frac{1}{2} \sum_i p_i^2 + \frac{1}{2} \left( \sum_i p_i^2 \right)^2 - \frac{1}{4} \sum_i p_i^4$$

Onde  $p_i$  and  $p_j$  são as frequências dos alelos  $i$ -éssimo e  $j$ -éssimo, e  $a_n = \sum_i p_i^n$

A primeira equação é calculada para uma população de indivíduos com acasalamento aleatório e foi proposta por Paetkau e Ströbeck (1994). A segunda equação é mais adequada para um pequeno conjunto de indivíduos e foi indicada por Kendall e Stewart (1977). A terceira equação é para uma população composta apenas por indivíduos aparentados e foi sugerida por Evett e Weir (1998) e Taberlet e Luikart (1999). Essa última é considerada a mais adequada para pesquisas forenses, sendo necessário que o valor de  $PI_{sibs}$  encaixe entre os limites 0,01 – 0,0001 para concluir que o *set* de microssatélites era o estatisticamente adequado para poder diferenciar indivíduos (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001).

### 1.3.4.3. Determinação de possíveis erros na genotipagem

O programa GIMLET v1.3.3 (VALIÈRE, 2002), ajudou a calcular os valores de *Allelic Dropout* e Falso Alelo, os quais constituem duas fontes de erro comum na genotipagem, mas que não podem ser facilmente monitoradas (GERLOFF *et al.*, 1995; NAVIDI *et al.*, 1992; TABERLET *et al.*, 1996). O *allelic dropout* consiste na não amplificação de um alelo de um indivíduo heterozigoto durante a PCR, e o Falso Alelo na geração de um alelo de novo devido a um erro da Taq polimerase (BROQUET; PETIT, 2004). A abordagem de réplicas multitubos (NAVIDI *et al.*, 1992) que foi utilizada neste trabalho e que consiste na replicação dos PCR por locus para confirmar o genótipo de uma amostra, é útil para diminuir essas taxas de erro.

A ausência ou presença de alelos nulos foi verificada pelo programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004). Consideram-se alelos nulos aqueles que não têm sido amplificados devido à ocorrência de mutações nas sequências do genoma adjacentes às sequências dos *primers*, resultando em falsos homozigotos (SHAW; PIERCE; BOYLE, 1999). O programa calcula a frequência de alelos nulos baseando-se na metodologia proposta por Van Oosterhout e colaboradores (2004) e a compara com as frequências obtidas com as metodologias de Chakraborty (CHAKRABORTY *et al.*, 1992) e Brookfield (BROOKFIELD, 1996). Estas metodologias se diferenciam em que enquanto Chakraborty e Brookfield consideram que o déficit de heterozigotos é causado unicamente pela presença de alelos nulos, Van Oosterhout considera que esta deficiência pode ser causada por *allelic dropout* e não panmixia da população, além da presença de alelos nulos.

#### 1.3.4.4. Caracterização dos alelos microssatélites

O conteúdo de informação polimórfica (PIC - *Polymorphism Information Content*) foi obtido por meio do programa CERVUS 3.0 (MARSHALL *et al.*, 1998; KALINOWSKI; TAPER; MARSHALL, 2007), o qual é calculado baseado na seguinte equação (BOTSTEIN *et al.*, 1980):

$$1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Onde  $p_i$  and  $p_j$  são as frequências dos alelos  $i$ -éssimo e  $j$ -éssimo, e  $n$  corresponde ao número de indivíduos.

Os locos foram classificados em altamente informativos (PIC > 0,5), razoavelmente informativos (0,25 < PIC < 0,5) e pouco informativos (PIC < 0,25), isto de acordo com a classificação feita por Botstein e colaboradores (1980).

Para detectar um possível desvio dos locus, do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), o qual faz uso de uma versão modificada do algoritmo *Markov-chain random walk* descrito por Guo e Thompson (1992). O desequilíbrio de fase gamética também foi calculado com o programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER, LISCHER, 2010), sendo que cada par de loci é testado usando o teste de taxa de verossimilhança, cuja distribuição empírica é obtida por um procedimento de permutação (SLATKIN; EXCOFFIER, 1996).

O programa FSTAT foi utilizado para calcular a riqueza alélica e o coeficiente de endogamia (GOUDET, 2001). Este coeficiente varia entre -1 e +1, e indica que existe um déficit ou um excesso de heterozigotos, se os valores forem positivos e negativos, respectivamente, e se for negativo existe um excesso de heterozigotos.

#### **1.3.4.5. Identificação de relações de parentesco**

Uma análise de correspondência multidimensional fatorial foi feita com o programa GENETIX 4.02 (BELKHIR, 2001) para identificar grupos de indivíduos com genótipos similares. Esta metodologia fornece um método objetivo para determinar grupos de indivíduos provenientes de possíveis populações diferentes não fazendo suposição de membros do grupo *a priori*.

Posteriormente, o programa ML-related (KALINOWSKI *et al.*, 2006) foi usado para determinar as relações de parentesco entre os indivíduos, o qual calcula a estimativa de máxima verossimilhança para supostas relações de parentesco. Esse programa consegue discriminar entre quatro relações: parental - prole, irmãos completos, meios-irmãos e não relacionados.

#### **1.3.5. Localização das amostras individualizadas de *P. concolor***

Cada um dos pontos coleta, correspondentes a cada um dos indivíduos de *P. concolor*, foi georeferenciado com GPS e plotado em uma imagem da Estação Ecológica de Itirapina obtida pelo satélite Landsat5 em dezembro de 2010, usando o programa ArcGis (ESRI, 2007).

#### **1.3.6. Análises Demográfica**

##### **1.3.6.1. Tamanho efetivo da área amostrada**

O tamanho efetivo de área amostrada foi estimado a partir de informações geográficas, tomando cada ponto do transecto percorrido como ponto central de uma área circular, a qual foi desenhada assumindo como o raio, a metade da meia da máxima distância de movimento ( $\frac{1}{2}$  MMDM) e a MMDM completa (SOISALO, CAVALACANTI, 2006; DILLON, KELLY,

2008). A distância máxima percorrida pelos indivíduos foi calculada para aqueles que foram coletados mais de uma vez.

### **1.3.6.2. Tamanho populacional e densidade de *P. concolor* na Estação Ecológica de Itirapina**

O tamanho populacional foi estimado com o modelo TIRM no programa Capwire (MILLER *et al.*, 2005). Este programa foi especialmente desenvolvido para estimar o tamanho populacional em pesquisas genéticas com amostragens não invasivas. Sua utilização é importante devido ao fato de que, ao contrário das amostragens de captura e recaptura tradicionais, amostras não invasivas do mesmo indivíduo podem ser capturadas dentro da mesma coleta. Para esta análise foi feita uma coleta intensiva durante 7 dias para assim obter o tamanho populacional em base a uma população fechada.

A densidade populacional foi estimada dividindo o tamanho populacional entre os tamanhos efetivos da área amostrada, obtendo uma densidade com base à  $\frac{1}{2}$  MMDM e a MMDM.

### **1.3.6.3. Tamanho efetivo populacional**

Define-se o tamanho efetivo populacional como a medida da força da deriva genética ao influenciar uma característica genética de interesse na população (TEMPLETON, 2011). O tamanho efetivo populacional ( $N_e$ ) foi calculado pelo programa LDNe (WAPLES; DO, 2008), o qual exclui os alelos raros da análise para facilitar a avaliação de dados para os marcadores altamente polimórficos, como microssatélites.

O  $N_e$  é estimado baseado no desequilíbrio de ligação que surge devido à deriva genética em uma população finita e isolada (WAPLES; DO, 2008). No entanto, o

desequilíbrio de ligação pode também surgir como resultado de migração, sobreposição de gerações e de miscigenação da população (SERVICE *et al.* 2006).

### 1.3.7. Seletividade de habitat de *P. concolor* na Estação Ecológica de Itirapina

A área de estudo foi dividida em três grandes áreas de acordo com a sua vegetação: (i) cerrado, no qual estão inclusos campo limpo, campo sujo, campo cerrado, cerrado *sensu strictu* e regeneração de cerrado; (ii) campo úmido; e (iii) plantio de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. A seletividade de habitat foi estimada usando o índice de Jacob (D) (Jacobs, 1974), o qual foi adaptado para amostras de fezes por Khorozyan e colaboradores (2010) e é calculado com a seguinte equação:

$$D = \frac{R - P}{R + P - 2RP}$$

Onde R é a taxa do número de amostras em uma dada paisagem por o numero total de amostras coletadas e P é a taxa da área de uma paisagem específica por a área total estudada.

Os valores de D podem variar entre -1 e +1 e indicam que, para aqueles mais próximos de -1, a área é ignorada, e os mais próximos de +1, a espécie está restrita aquele local. O valor zero indica que a área é indiferente para a espécie.

## 1.4. RESULTADOS

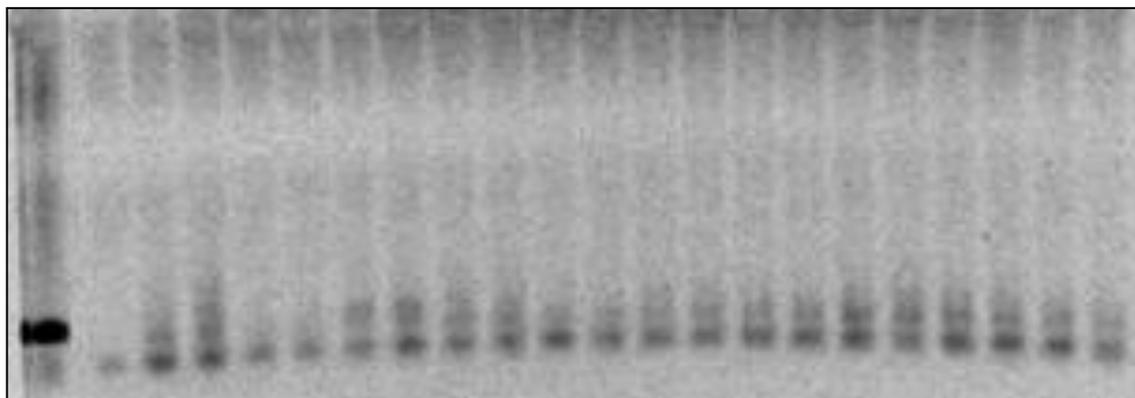
---

### 1.4.1. Obtenção das amostras

Um total de 42 possíveis amostras de fezes de onça-parda foi coletado durante as 30 saídas a campo, sendo 27 coletadas em época seca e 15 em época chuvosa. O menor número de amostras obtidas na época chuvosa está relacionada com a dificuldade em acessar as trilhas devido ao crescimento da vegetação e/ou à ação das águas, que muitas vezes enterravam ou deslocavam as fezes.

### 1.4.2. Diagnóstico da espécie

Apesar de se ter obtido DNA de todas as amostras, sete delas provavelmente não encontravam-se em boa qualidade, estava em baixa quantidade ou não pertenciam ao grupo de carnívoros, pelo qual não foi possível a amplificação e sequenciamento do citocromo b. A maioria das vezes o produto de amplificação das sequências foi de baixa quantidade, mas apesar disso, grande parte delas foram sequenciadas com sucesso (Figura 7).

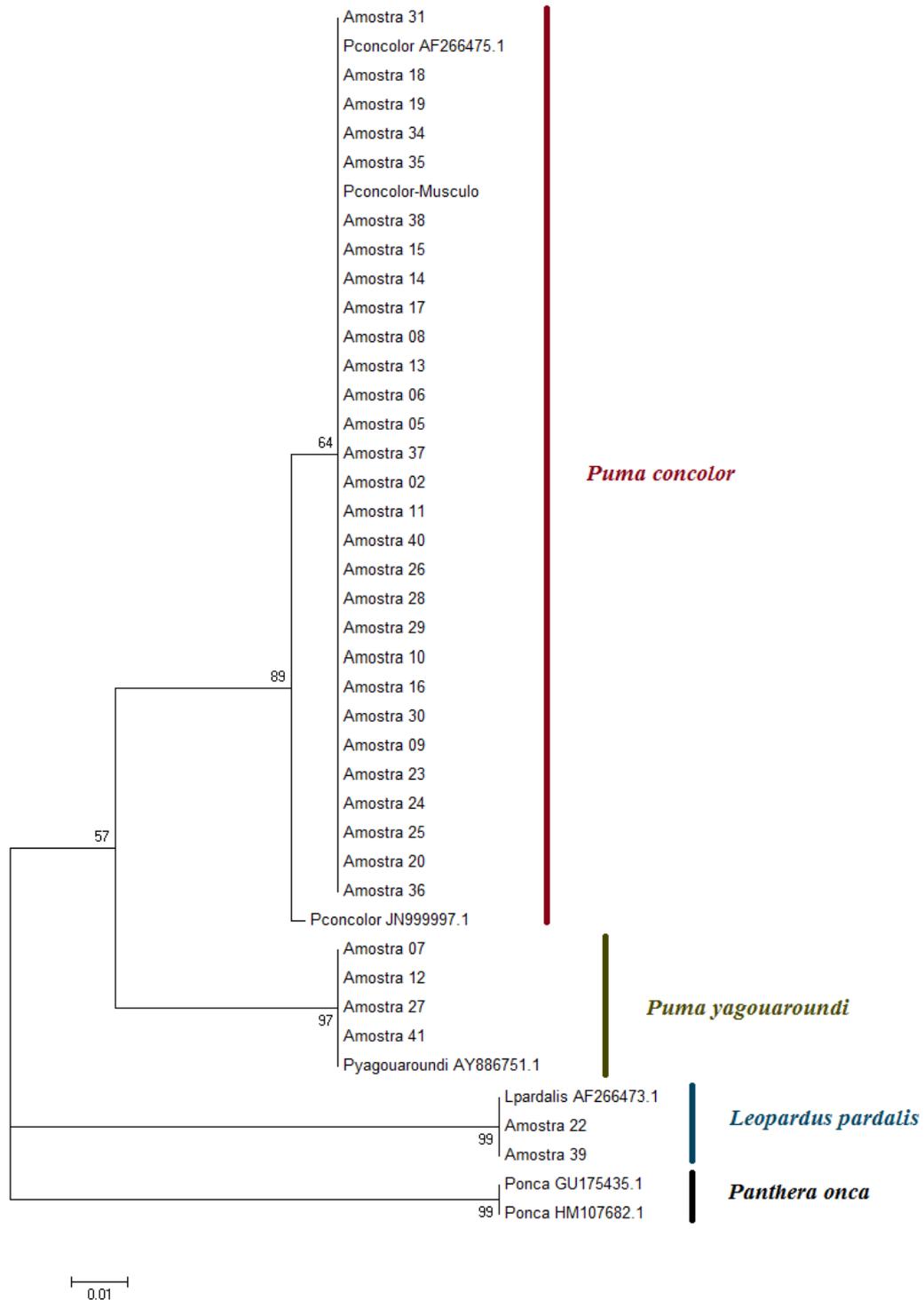


**Figura 7.** Gel de eletroforese do citocromo b das amostras de fezes, o primeiro poço contém a amostra de tecido de *P. concolor*, o segundo o controle negativo e os seguintes, as amostras de fezes.

Após a edição das sequências e a comparação com a base de dados do GenBank, 35 amostras foram identificadas como proveniente de felinos. Destas, 25 foram coletas em época seca e as demais na chuvosa. Ao se comparar os dados totais, é possível constatar uma taxa de êxito de amplificação de 96% e 73% para os períodos de seca e chuva, respectivamente.

Para a identificação das espécies foi inferida uma árvore de *Neighbour-joining*, usando um segmento de 96pb do citocromo b, o qual permitiu o reconhecimento de três diferentes espécies de felinos (Fig. 8). Das 35 amostras cuja espécie foi identificada, 5,71% (n=2) pertencia a *L. pardalis*, 11,43% (n=4) a *P. yagouaroundi* e 82,86% (n=29) a *P. concolor* (Figura 9).

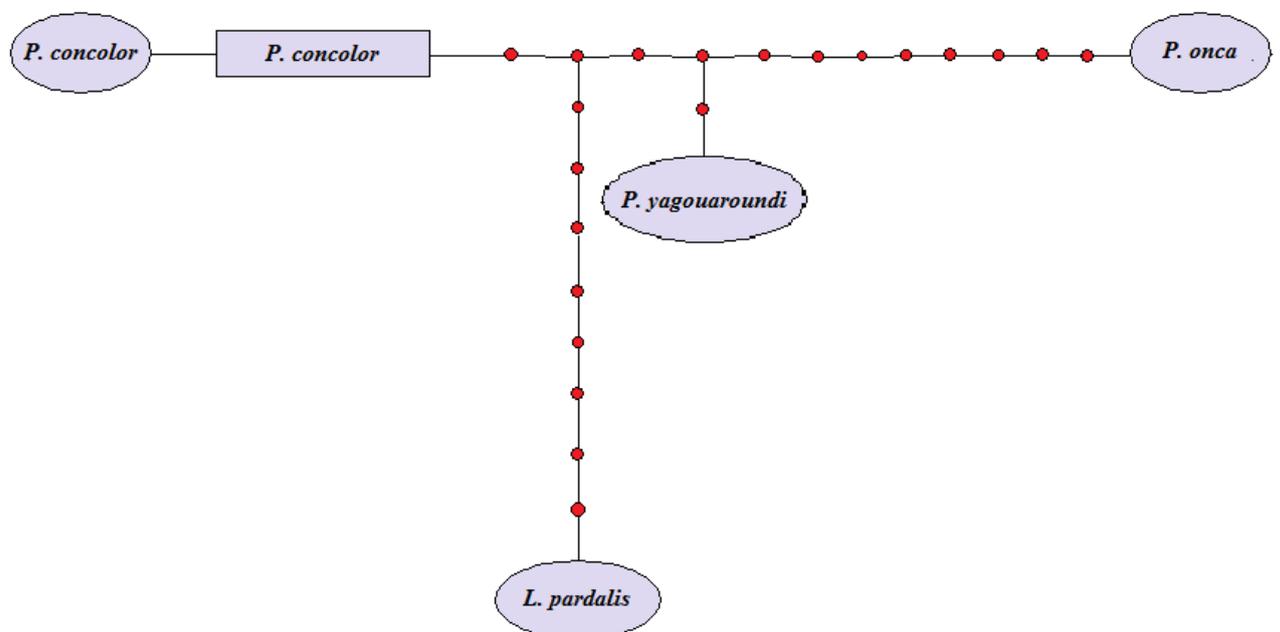
A partir da rede de haplótipos foi possível separar as 4 espécies de felinos, sendo que , para cada uma delas foi encontrado um único haplótipo, exceto para *P. concolor*, que apresentou 2 haplótipos distintos (Figura 10).



**Figura 8.** Árvore de *Neighbor-joining* do citocromo b usando o modelo de substituição nucleotídica Kimura-2 Parâmetros (K2P) para a identificação das espécies. Foram utilizadas sequências de citocromo b de espécies de felinos presentes na área e *P. onca* como grupo externo. Mostram-se os números de acesso das sequências obtidas do Genbank.



**Figura 9.** Número de indivíduos por espécie coletados na Estação Ecológica de Itirapina entre os meses de julho de 2011 a agosto de 2012



**Figura 10.** Rede de haplótipos calculada a partir das seqüências de citocrome b. Limite de parcimônia de 90%.

### 1.4.3. Individualização das amostras e caracterização dos microssatélites

Com as 29 amostras identificadas como *P. concolor*, se realizou a análise de microssatélites. Os 7 loci microssatélites tiveram alta taxa de sucesso de amplificação (Tabela 2). Segundo o perfil genotípico de cada uma das 29 amostras de *P. concolor*, conseguiu-se identificar 10 indivíduos.

**Tabela 2.** Taxa de sucesso de amplificação para cada um dos 7 loci de microssatélite analisados. Esta taxa foi calculada para um total de 29 amostras.

<b>Locus</b>	<b>Taxa de sucesso de amplificação (%)</b>
PcoA208	86,20
PcoC108	86,20
PcoB003	100,00
PcoB010	100,00
PcoA216	89,66
PcoB210	89,66
PcoA339	100,00

A probabilidade de identidade (PID<sub>sib</sub>) foi de 0,001121, mostrando com isso que o panel de 7 microssatélites foi o adequado para a realização da individualização das amostras (Tabela 3).

**Tabela 3.** Índice de identidade calculado para o panel de 7 microssatélites.

<b>Locus</b>	<b>PID(biased)</b>	<b>PID(unbiased)</b>	<b>PID(sib)</b>
PcoA208	0.04718	0.009943	0.3444
PcoC108	0.005959	0.0006163	0.1475
PcoB003	0.0009099	0.00003725	0.06807
PcoB010	0.00003227	0.0000002081	0.02241
PcoA216	0.000001029	0.00000000081	0.007262
PcoB210	0.0000000899	0.000000000024	0.002846
PcoA339	0.00000000087	0.0000000000122	0.001121

PID (biased) = Índice de identidade teórico.

PID (unbiased) = Índice de identidade para populações pequenas.

PID (sib) = Índice de identidade para populações aparentadas.

De acordo com os valores de PIC, todos os locos foram altamente informativos ( $PIC > 0,5$ ), sendo o PIC médio para o panel de loci utilizado igual a 0.7427. Os loci apresentaram entre 5 e 9 alelos e a riqueza alélica variou entre 4,905 e 8,805 (Tabela 4).

**Tabela 4.** Caracterização dos loci microssatélite. Indica-se o número de alelos por loci, o conteúdo de informação polimórfica e a riqueza alélica.

<b>Locus</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>PIC</b>	<b>Riqueza alélica</b>
PcoA208	7	0.784	6.814
PcoC108	5	0.626	4.905
PcoB003	6	0.622	5.814
PcoB010	9	0.844	8.719
PcoA216	9	0.853	8.805
PcoB210	7	0.750	7.000
PcoA339	6	0.721	5.814

O *allelic dropout* por alelo testado variou entre (0,0-0,4) e o número de alelos falsos calculados para cada loci foi de 0 (Tabela 5).

**Tabela 5.** Caracterização dos loci microssatélite. Indica-se o número de alelos por loci, o *allelic dropout* e presença de falsos alelos.

<b>Locus</b>	<b>Allelic dropout</b>	<b>Falsos alelos</b>
PcoA208	0.1	0
PcoC108	0.1	0
PcoB003	0.4	0
PcoB010	0.0	0
PcoA216	0.0	0
PcoB210	0.3	0
PcoA339	0.2	0

A análise para determinar a presença de alelos nulos indicou que todos os loci apresentam ausência deles (Tabela 6).

**Tabela 6.** Frequências de alelos nulos estimadas por diferentes métodos para os locos de microssatélites.

<b>Locus</b>	<b>Alelo Nulo</b>	<b>Oosterhout</b>	<b>Chakraborty</b>	<b>Brookfield 1</b>	<b>Brookfield 2</b>
PcoA208	Ausente	0.0976	0.12	0.0959	0.0959
PcoC108	Ausente	-0.0651	-0.0414	-0.0347	0
PcoB003	Ausente	0.0469	0.0897	0.065	0.065
PcoB010	Ausente	0.0194	0.0246	0.0222	0.0222
PcoA216	Ausente	-0.0267	-0.0233	-0.0221	0
PcoB210	Ausente	0.0588	0.0541	0.0449	0.2146
PcoA339	Ausente	0.0863	0.0888	0.0704	0.0704

O coeficiente de endogamia (Fis) indicou um déficit de heterozigotos para os loci PcoA208, PcoB003, PcoB010, PcoB210 e PcoA339, e um excesso de heterozigotos para o locus PcoC108.

**Tabela 7.** Coeficiente de endogamia calculado para cada um dos loci estudados.

<b>Locus</b>	<b>Fis</b>
PcoA208	0.259
PcoC108	-0.039
PcoB003	0.211
PcoB010	0.095
PcoA216	0.000
PcoB210	0.154
PcoA339	0.209

Foi observado que todos os loci apresentam-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 8). Mesmo assim, foi encontrado desequilíbrio de fase gamética para o par de loci PcoA208 e PcoA339 e o par de loci PcoC108 e PcoB003.

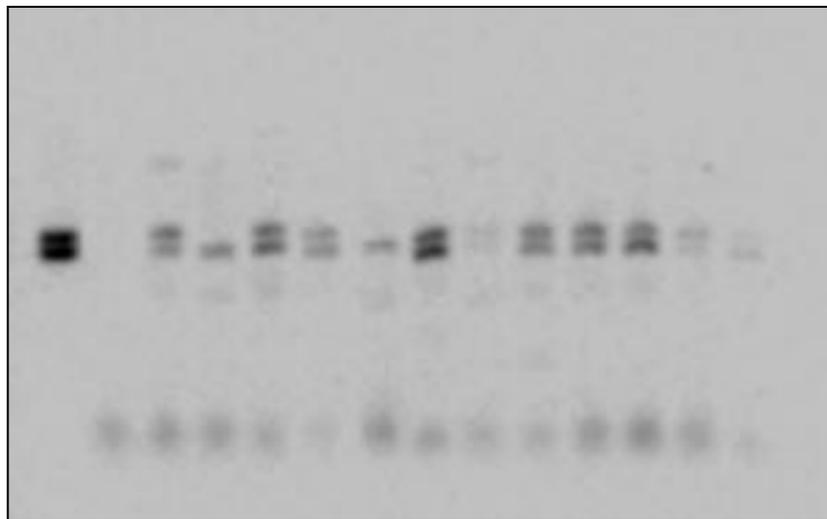
**Tabela 8.** Heterozigocidade observada e esperada para cada um dos loci microssatélites estudados.

<b>Locus</b>	<b>Heterozigocidade Observada</b>	<b>Heterozigocidade Esperada</b>	<b>P-value</b>
PcoA208	0.63636	0.84848	0.01332
PcoC108	0.72727	0.70130	0.95603
PcoB003	0.54545	0.68398	0.52930
PcoB010	0.81818	0.90043	0.34346
PcoA216	0.90909	0.90909	0.60009
PcoB210	0.70000	0.82105	0.07647
PcoA339	0.63636	0.79654	0.20282

Nenhum dos valores é significativo após a correção sequencial de Bonferroni,  $0.005 < \alpha < 0.05$

#### 1.4.4. Determinação do sexo dos indivíduos

A análise dos geis de agarose das amostras amplificadas para o gene da amelogenina permitiu determinar o sexo de cada um dos 10 indivíduos identificados a partir das amostras de fezes (Figura 11). Obtendo-se como resultado a identificação de 4 indivíduos fêmeas e 6 machos (Tabela 9).

**Figura 11.** Gel de eletroforese de um fragmento do gene da amelogenina das amostras de fezes individualizadas.

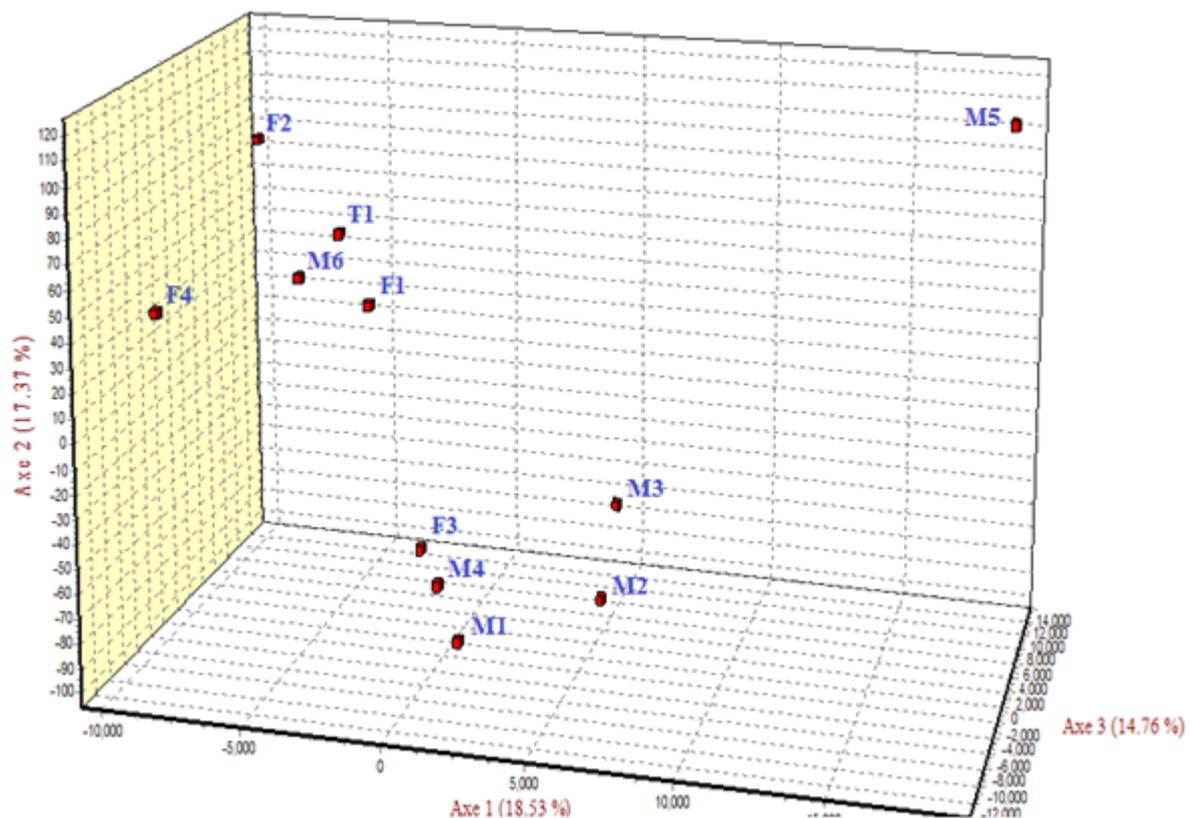
O primeiro poço contém a amostra de tecido de *P. concolor*, o segundo corresponde ao controle negativo. Nos poços 3 e 4 são encontrados um macho e uma fêmea.

**Tabela 9.** Identificação dos indivíduos de *P. concolor* coletados na Estação Ecológica de Itirapina.

Indivíduo	Sexo	Número de vezes coletado	Data das Coletas	Coordenadas dos pontos de coleta
F1	Feminino	2	12 - Julho – 2011 24 - Setembro – 2011	23K 201738,04 E 7538961,49 S 23K 200925,59 E 7539588,63 S
F2	Feminino	2	23 - Setembro – 2011 20 - Outubro – 2011	23K 200602,79 E 7539628,68 S 23K 202318,99 E 7537780,82 S
F3	Feminino	3	10 - Dezembro – 2011 23 - Abril – 2012 25 - Junho – 2012	23K 200457,06 E 7539700,17 S 23K 201138,34 E 7539343,29 S 23K 200981,50 E 7539643,13 S
F4	Feminino	1	20 - outubro – 2011	23K 202159,05 E 7537986,01 S
M1	Masculino	11	19 - Setembro – 2011 19 - Setembro – 2011 21 - Setembro – 2011 24 - Setembro – 2011 23 - Fevereiro – 2012 23 - Fevereiro – 2012 23 - Abril – 2012 05 - Maio – 2012 05 - Maio – 2012 25 - Junho – 2012 25 - Junho – 2012	23K 201387,62 E 7538965,25 S 23K 201206,52 E 7539300,31 S 23K 200903,98 E 7539503,46 S 23K 199649,31 E 7540782,24 S 23K 201289,00 E 7539187,50 S 23K 201287,97 E 7539466,52 S 23K 201172,83 E 7539294,62 S 23K 200884,79 E 7539499,40 S 23K 201070,70 E 7539387,18 S 23K 200860,95 E 7539475,58 S 23K 200550,66 E 7539655,07 S
M2	Masculino	3	20 - Outubro – 2011 28 - Novembro – 2011 28 - Novembro – 2011	23K 200877,56 E 7539479,64 S 23K 201126,81 E 7539351,23 S 23K 200858,86 E 7539508,38 S
M3	Masculino	2	19 - Setembro – 2011 19 - Setembro – 2011	23K 201168,38 E 7539265,08 S 23K 200845,78 E 7539457,81 S
M4	Masculino	1	24 - Agosto – 2011	23K 201207,79 E 7539342,99 S
M5	Masculino	1	25 - Junho – 2012	23K 199665,49 E 7540532,43 S
M6	Masculino	3	24 - Agosto – 2011 21 - Setembro – 2011 10 - Dezembro – 2011	23K 201190,21 E 7539341,07 S 23K 202165,98 E 7538004,29 S 23K 201546,04 E 7538591,56 S

### 1.4.5. Identificação de relações de parentesco

A análise fatorial de correspondência, utilizando os genótipos dos 10 indivíduos identificados das amostras fecais e o do indivíduo macho atropelado (T1), deu como resultado 3 grupos, sendo dois deles mais próximos quando comparados com o terceiro (constituídos apenas pelo indivíduo M5) (Figura 12). O qual poderia estar acontecendo devido a que eles pertencem ou os seus parentais pertenciam a duas populações diferentes.



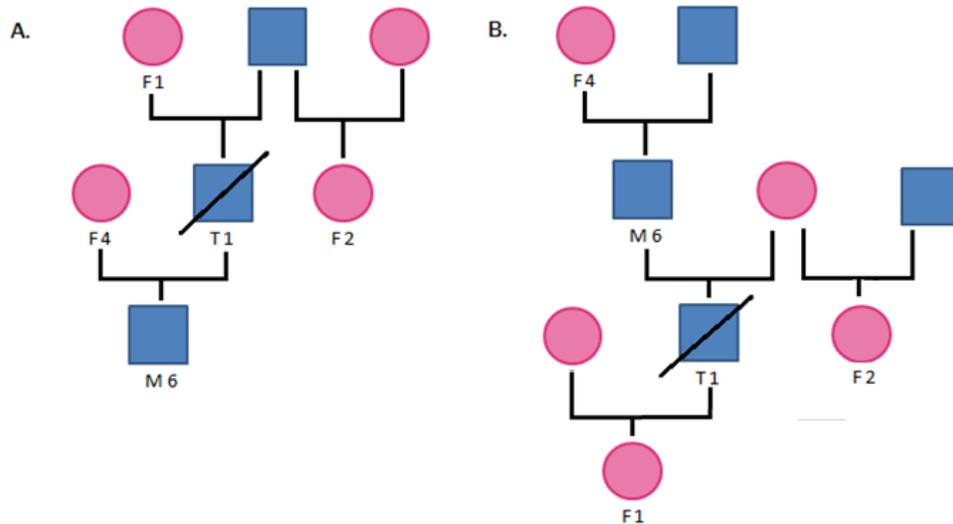
**Figura 12.** Gráfico da análise fatorial de correspondência mostrando três possíveis grupos dentro da população de *P. concolor* na estação Ecológica de Itirapina.

Para a análise de parentesco, também foi incluída a amostra de um indivíduo macho adulto atropelado (T1). Determinou-se que vários indivíduos presentes na estação encontram-se aparentados (tabela 10). Um grande grupo familiar composto por 5 indivíduos pode ser

identificado, possibilita inferir que (1) os 5 indivíduos pertencem a 3 gerações ou (2) eles pertencem a 4 gerações (Figura 13). Dois grupos menores compostos de 2 indivíduos cada, também foram identificados; em um deles uma fêmea e um macho apresentam uma relação parental/prole e no outro dois machos são meios irmãos.

**Tabela 10.** Relações de parentesco entre os indivíduos de *P. concolor* amostrados na Estação Ecológica de Itirapina.

<i>Indivíduo</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Relação de parentesco</i>
T1	F1	Parental / Prole
T1	F2	Meio irmãos
T1	M6	Parental / Prole
F4	M6	Parental / Prole
F3	M1	Parental / Prole
M3	M2	Meio irmãos

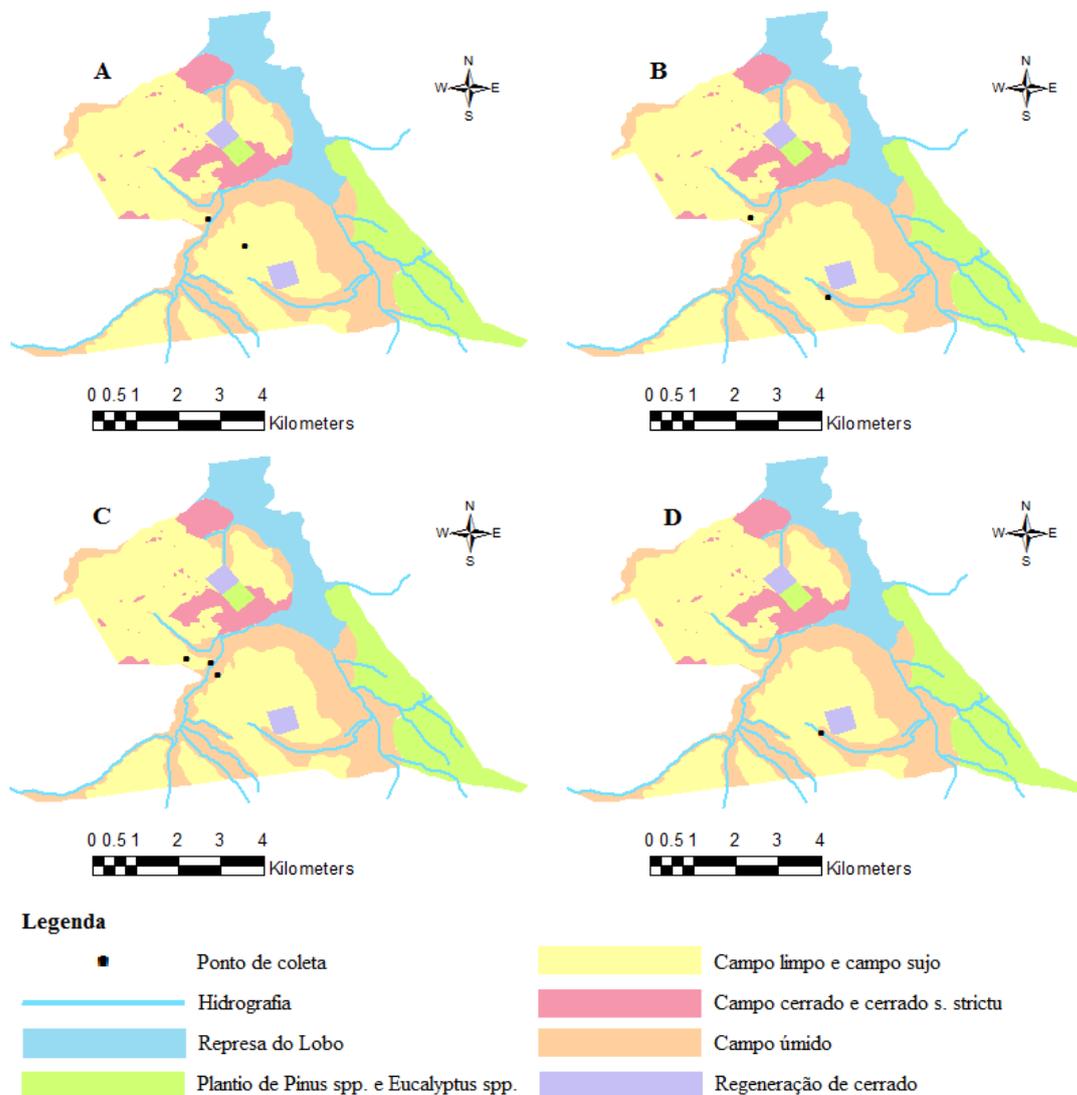


**Figura 13.** Possíveis heredogramas das amostras aparentadas de *P. concolor* na Estação Ecológica de Itirapina. (A) Possível heredograma envolvendo 7 indivíduos em três gerações. (B) Possível heredograma envolvendo 9 indivíduos em quatro gerações.

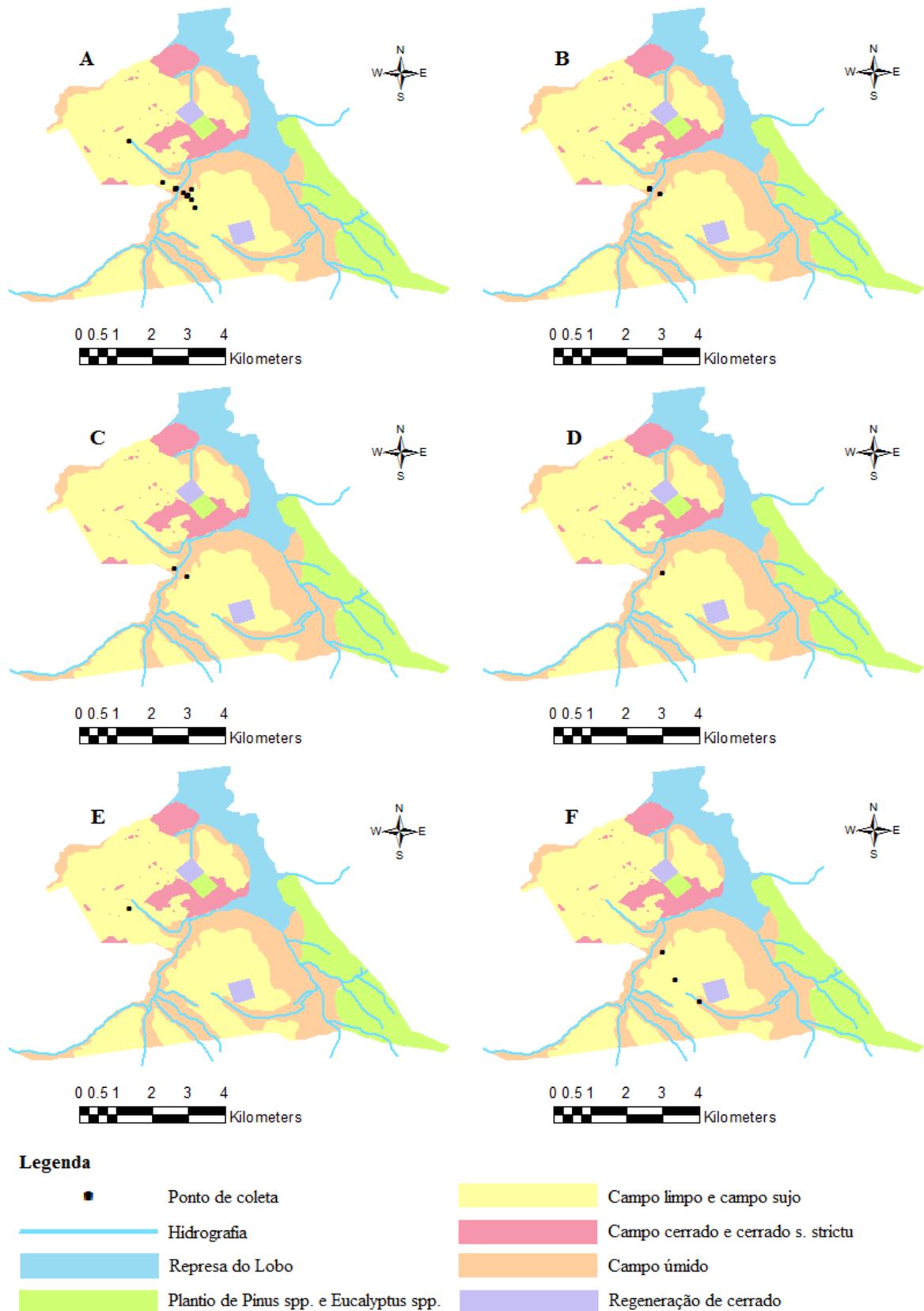
Dentre os dois heredogramas obtidos do maior grupo de indivíduos aparentados (Figura 13), o mais provável de estar acontecendo é o heredograma A, por apresentar o menor número de indivíduos e gerações.

#### 1.4.6. Localização das amostras individualizadas de *P. concolor*

Nas figuras 14 e 15, observa-se a distribuição das amostras de fezes, por indivíduo, coletadas na unidade de conservação.



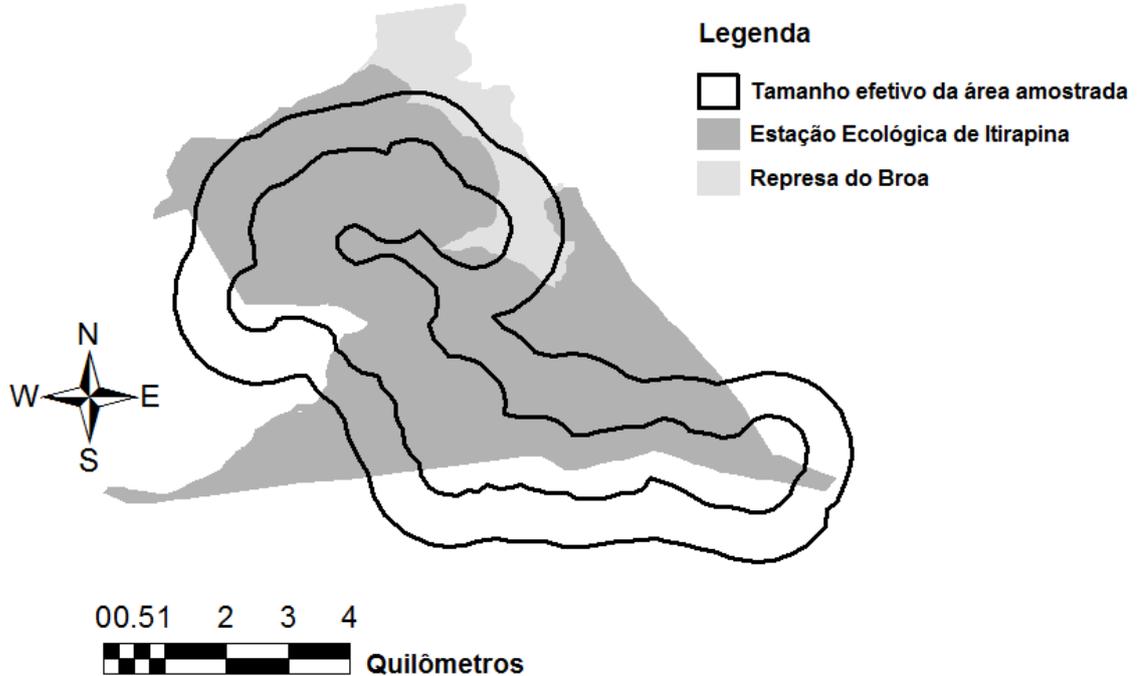
**Figura 14.** Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo fêmea de *P. concolor* na Estação Ecológica de Itirapina. (A) Indivíduo F1. (B) Indivíduo F2. (C) Indivíduo F3. (D) Indivíduo F4.



**Figura 15.** Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo macho de *P. concolor* na Estação Ecológica de Itirapina. (A) Indivíduo M1. (B) Indivíduo M2. (C) Indivíduo M3. (D) Indivíduo M4. (E) Indivíduo M5. (F) Indivíduo M6.

#### 1.4.7. Tamanho efetivo da área amostrada

O tamanho efetivo da área amostrada obtido a partir da informação da  $\frac{1}{2}$  MMDM 13,81 km<sup>2</sup>, e o obtido a partir da MMDM foi 34,51 km<sup>2</sup> (Figura 16).



**Figura 16.** Tamanho efetivo da área amostrada. As duas áreas correspondem às obtidas em base à  $\frac{1}{2}$  MMDM (menor área) e à MMDM (maior área).

#### 1.4.8. Tamanho e densidade populacionais

O tamanho populacional calculado para a área de estudo foi de 6 indivíduos. As densidades obtidas com base no raio e diâmetro da área de vida de *P. concolor* foram de 17,38 indivíduos / 100km<sup>2</sup> e 43,45 indivíduos / 100km<sup>2</sup> (Tabela 11).

**Tabela 11.** Tamanho populacional e densidades estimadas para *P.concolor* na Estação Ecológica de Itirapina.

	N	95% CI	Tamanho do intervalo
<b>Tamanho populacional</b>	6	4 – 11	7
	D	95% CI	Tamanho do intervalo
<sup>1</sup> Densidade (ind/100km <sup>2</sup> )	43.45	28.96 – 79.65	52.69
<sup>2</sup> Densidade (ind/100km <sup>2</sup> )	17.38	11.66 – 31.87	20.21

<sup>1</sup> Densidade calculada a partir da área efetivamente amostrada obtida pela ½ MMDM

<sup>2</sup> Densidade calculada a partir da área efetivamente amostrada obtida pela MMDM

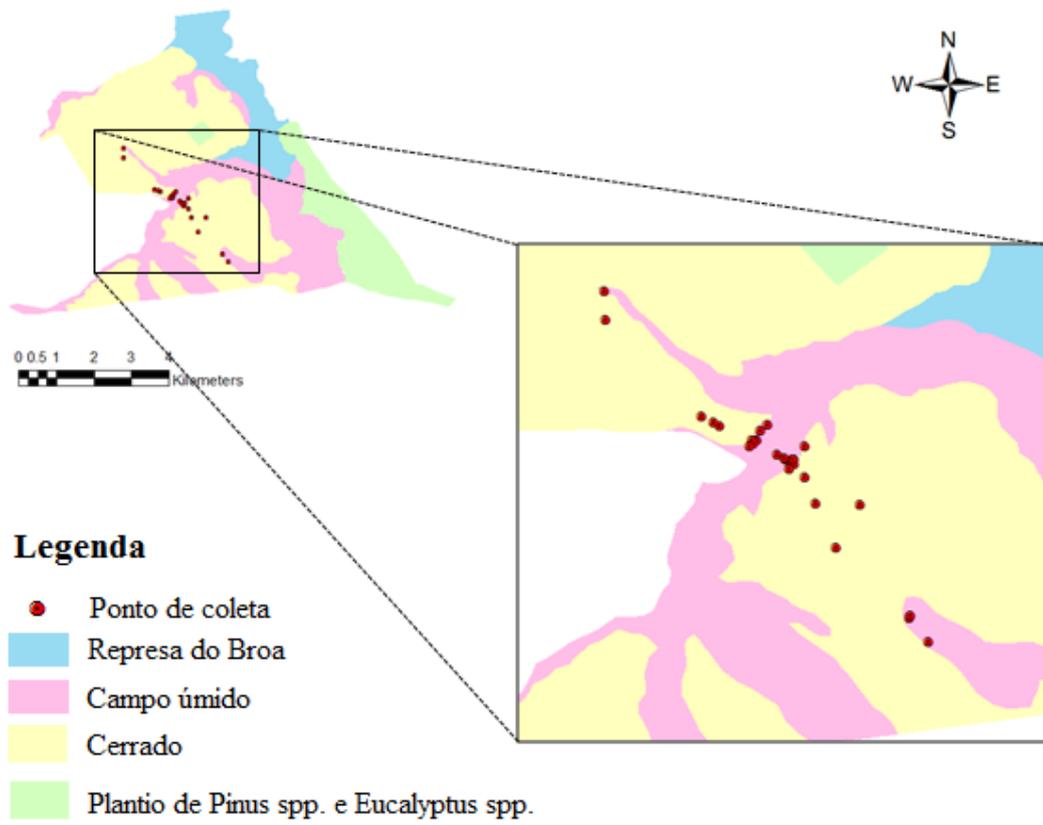
#### 1.4.9. Tamanho Efetivo populacional

O tamanho efetivo populacional de *P. concolor* para a estação Ecológica de Itirapina foi estimado em 41.8 ( $\pm$  11.1), valor elevado quando comparado com os 10 indivíduos amostrados.

#### 1.4.10. Seletividade de habitat de *P.concolor* na Estação Ecológica de Itirapina

Das 29 amostras identificadas como *P. concolor*, 11 foram coletadas na porção de cerrado, 18 no campo úmido e nenhuma nas áreas de plantio de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. (Figura 17) Cada um destes fragmentos possui uma área aproximada de 15.019 km<sup>2</sup>, 11.401 km<sup>2</sup> e 5.708 km<sup>2</sup>, respectivamente.

A população de *P. concolor* localizada na Estação Ecológica de Itirapina apresenta uma alta seletividade pelas áreas de campo úmido (D = 0.872) e de cerrado (D=0,705), e ignora a área de plantios de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp (D = 0).



**Figura 17.** Localização dos pontos de coleta das fezes de *P. concolor* na Estação Ecológica de Itirapina.

## 1.5. DISCUSSÃO

---

As análises corroboram que indivíduos de onça-parda podem ser identificados molecularmente com sucesso a partir de amostras de fezes. No entanto, as análises baseadas apenas em características morfológicas das fezes como tamanho e composição podem culminar em resultados errôneos, já que eles podem variar de acordo com a idade e tamanho do animal, assim como a dieta alimentar (FARREL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E., 2000; MIOTTO *et al.*, 2007).

Apesar da obtenção de resultados satisfatórios, a utilização de técnicas moleculares em amostras fecais resulta ser mais difícil em comparação com o uso de tecidos ou sangue em virtude da baixa quantidade e qualidade do DNA (TABERLET *et al.*, 1999; FARREL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E., 2000), das 42 amostras 35 foram amplificadas e sequenciadas. Esse resultado está provavelmente relacionado ao nível de degradação do DNA, favorecendo a amplificação de fragmentos mais curtos (KOHN *et al.*, 1995; FRANTZEN *et al.*, 1998; TABERLET *et al.*, 1999; FARREL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E., 2000) como é o caso do fragmento de 96 pb do gene citocromo b utilizado.

O sucesso de amplificação obtido neste trabalho foi de 83,33% o qual é semelhante aos 85% obtido por Martins (2011), que trabalhou com amostras fecais de *P. concolor* no Núcleo Santa Virgínia, na Serra do Mar. Assim mesmo, Ernest *et al.* (2000) obtiveram um sucesso de 75% trabalhando com a mesma espécie no vale Yosemite na Califórnia. Ao igual que Farrel e colaboradores (2000), neste trabalho também pode se apreciar uma diferença entre as taxas de sucesso de amplificação dependendo da estação da coleta. Obteve-se que a época seca a melhor para a obtenção de amostras com DNA amplificável, o qual está em concordância com os resultados de Brinkman e colaboradores (2009), que reportaram que as contínuas precipitações incrementam a taxa de degradação do DNA nas amostras fecais.

A etapa de individualização, a partir das 35 amostras identificadas como *P. concolor*, foi realizada com 100% de aproveitamento. Isto provavelmente em razão das contínuas saídas a campo, num curto intervalo de tempo (aproximadamente entre 12 e 20 dias). Embora o DNA obtido das fezes seja de melhor qualidade nos primeiros cinco dias depois destas serem depositadas, depois de 14 dias ainda é possível obter DNA de boa qualidade e com baixa taxa de erro no processo da genotipagem (BRINKMAN *et al.*, 2009; PANASCI *et al.*, 2011). Um segundo fator importante, foi a conservação das amostras em álcool 96% e -20 °C. Tem sido demonstrado que o álcool fornece melhores resultados na eficiência da preservação do DNA fecal, de espécies de carnívoros e carnívoros facultativos, quando comparado com o buffer de lise e o buffer DET (PANASCI *et al.*, 2011). Por último, a escolha das regiões de retirada de amostras nas fezes, também foi crucial no sucesso da genotipagem. Stenglein e colaboradores (2010) determinaram que a área externa dos extremos das fezes são as que apresentam DNA de maior qualidade, e que a sua obtenção a partir dessas áreas será benéfica para análises posteriores, uma vez que comparado com DNA de outras áreas apresenta uma menor taxa de *allelic dropout*.

A análise de microssatélites em amostras não invasivas tende a apresentar erros de genotipagem, ocasionados pela baixa quantidade e qualidade do DNA utilizado, como são o *allelic dropout* e amplificação de alelos falsos (TABERLET *et al.*, 1996; BROQUET; PETIT, 2004, PRUGH *et al.*, 2005). Os valores de *allelic dropout* variaram entre 0,0 e 0,4%, com média de 0,15%; esses valores, no entanto, se mostraram menores em comparação com outros trabalhos que envolviam o mesmo tipo de amostra (GAGNEUX; BOESCH; WOODRUFF, 1997, MARTINS, 2011; MIOTTO *et al.*, 2007, 2012). A probabilidade de amplificação de alelos falsos em cada loci foi de zero. Os baixos valores obtidos na quantificação dos possíveis erros das genotipagens dão robustez a este trabalho, ao diminuir a probabilidade de uma individualização errônea o qual é indesejável em estudos de censo (CREEL *et al.*, 2003).

A probabilidade de identidade (PIDsib) obtida para o conjunto de 7 loci microsatélites foi 0,001121, valor que encaixa dentro dos limites (0,01 – 0,0001) estabelecidos para pesquisas forenses (WAITS; LUIKART; TABERLET, 2001), propiciando uma maior confiabilidade para a individualização das amostras.

Ao estabelecer-se o sexo dos indivíduos e analisar as relações de parentesco pudemos observar que uma grande quantidade de animais são aparentados, obtendo em alguns casos, relações de parental - prole. Miotto e colaboradores (2012), após identificar um grande número de indivíduos aparentados numa área altamente fragmentada, sugerem que, neste tipo de área, o acasalamento entre aparentados estaria acontecendo devido à limitação de movimentação dos indivíduos. No presente estudo não foi possível identificar nenhum acasalamento entre parentes, provavelmente, devido ao fato de que, embora a estação ecológica de Itirapina esteja localizada numa área fragmentada, ainda existe o fluxo de indivíduos de outras áreas.

Os indivíduos machos M2, M3, M4 e M5 foram reportados entre uma e duas vezes em períodos curtos de tempo, o qual os converte em possíveis migrantes. Esta hipótese poderia ser fortalecida no caso do indivíduo M5, que se manteve separado dos demais grupos formados a partir da análise fatorial de correspondência. Porém, não se pode descartar a ideia de que o indivíduo M5 não esteja tão aparentado como os outros indivíduos e por tal motivo esteja isolado na análise fatorial de correspondência. Os machos M1 e M6 foram amostrados ao longo dos 13 meses de coleta (Tabela 3), indicando que a Estação Ecológica de Itirapina encontra-se dentro da área de vida deles, a qual em média é de 45,6 km<sup>2</sup> (SILVEIRA, 2004).

As quatro fêmeas capturadas foram coletadas entre 1 e 3 vezes e, seguindo o raciocínio anteriormente exposto, estas poderiam ser consideradas migrantes. Isso, no entanto, parece não condizer com a realidade, uma vez que cada uma delas apresenta uma relação de parentesco com algum indivíduo, situação que não seria possível se fossem indivíduos

residentes. Esta ideia de ter pelo menos um macho proveniente de outra população e fêmeas residentes está em concordância com os padrões de dispersão evidenciados para a espécie, cuja característica é que os machos migrem mais que as fêmeas (LOGAN; SWEANOR, 2001).

Na obtenção das relações de parentesco foi possível observar que o indivíduo M5 foi o único que não estava relacionado, ao passo que F1, F2, F4, M6 e T1 se mostraram fortemente aparentados, o que favoreceu a construção de prováveis heredogramas. Adicionalmente, 2 pares de indivíduos estão aparentados exclusivamente um com outro. A falta de relacionamento entre esses grupos poderia ser causada pela incapacidade do programa ML-relate para determinar com 100% de certeza as relações de parentesco, diminuindo o número de relacionamentos existentes (WOLTMANN; SHERRY; KREISER, 2012).

*P. concolor* na estação Ecológica de Itirapina, apresenta um tamanho populacional de 6 indivíduos com uma densidade que varia entre 17,38 indivíduos / 100km<sup>2</sup> e 43,45 indivíduos / 100km<sup>2</sup> o qual é maior às densidades reportadas no Brasil, como são os 4.4 indivíduos/100km<sup>2</sup> estimada para uma área do Pantanal (CRAWSHAW; QUIGLEY, citado por NOWELL; JACKSON, 1996) e os 3.40 pumas/100 km<sup>2</sup> numa área de transição entre o cerrado e Amazônia (NEGRÕES *et al.*, 2010).

O tamanho efetivo populacional obtido para a população de *P. concolor* na unidade de conservação foi de 41.8, este valor elevado pode ser explicado pela existência de migração na área. O programa LDNe (WAPLES; DO, 2008) estima o tamanho efetivo populacional com base no desequilíbrio de ligação. Este desequilíbrio pode ser aumentado ou diminuído pela presença de fluxo gênico, de modo que, se os indivíduos imigrantes são geneticamente parecidos com os indivíduos da população local, eles podem diminuir o desequilíbrio de ligação existente e provocar superestimação do tamanho efetivo (WAPLES, 2006). Este resultado reforça a ideia da presença de indivíduos migrando na área.

Andreasen e colaboradores (2012) identificaram uma dinâmica populacional fonte - sumidouro em populações de onça-parda, na qual a população fonte mantém viáveis as populações sumidouros mediante a exportação de indivíduos migrantes (PULLIAM, 1988). A possibilidade de que indivíduos de outras populações estejam ingressando na Estação Ecológica de Itirapina poderia implicar na caracterização da população que se faz presente na unidade de conservação como sumidouro, a qual estaria importando indivíduos de outras áreas. Esta observação sugere também que existe outra população próxima à área seja a população fonte. Miotto e colaboradores (2012), após estudarem a população de *P. concolor* presente na Estação Ecológica de Jataí e no Parque Estadual de Vassununga, sugerem que essa seria uma população fonte, cujos indivíduos estão constantemente migrando a procura de novas áreas de vida. Se levarmos em consideração que essas áreas distam aproximadamente 100 km da Estação Ecológica de Itirapina (em linha reta) existe a possibilidade de que esta última seja a população sumidouro.

Enquanto a localização das amostras na área da Estação Ecológica de Itirapina tem-se podido observar uma tendência ou preferência das por determinadas áreas. Para determinar a seletividade de habitat por parte dos indivíduos de *P. concolor*, foi utilizado o índice de Jacob (D) (JACOBS, 1974), adaptado para amostras de fezes (KHOROZYAN *et al.*, 2010). Como esperado, se estimou uma seletividade alta pela área de campo úmido, o que pode ser justificado pela presença de corpos de água e eventualmente, uma maior quantidade de potenciais presas. Contudo a vegetação presente serviria de refúgio (LOGAN; SWEANOR, 2001). Igualmente existe uma seletividade alta pela área de cerrado, no entanto a maioria das amostras encontradas nessa região tem sido adjacentes às áreas de campo úmido. Os indivíduos de *P. concolor* tendem a evitar o contato com humanos e áreas com atividade humana (LOGAN; SWEANOR, 2001), não sendo surpresa que estejam ignorando as áreas com plantios de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp. As áreas de plantios além de fomentar o

ingresso de pessoas na estação para a coleta de resina ocasiona o depósito de rejeitos da resinagem (como sacos plásticos). Do mesmo modo, a presença de uma estrada altamente movimentada adjacente a estas áreas poderia influenciar no deslocamento de *P. concolor*.

Um fator importante também a destacar é que a presença da estrada torna a Estação Ecológica de Itirapina vulnerável à entrada de pessoas não autorizadas, podendo resultar eventualmente em deposição de lixo, a ocorrência de queimadas, caça e depredação. Na borda da represa do Broa têm sido achados vestígios de acampamentos e grandes quantidades de lixo (plásticos e metal).

## Capítulo II

**Dinâmica populacional dos indivíduos *P. concolor* da  
Estação Ecológica de Itirapina no nordeste do estado de São Paulo**

## 2.1. INTRODUÇÃO

---

### 2.1.1. Metapopulações

A ideia da existência de populações espacialmente estruturadas esteve por muitos anos presente na mente de diversos investigadores. Uma das primeiras pesquisas a respeito foi a de Andrewartha e Birch (1954), a qual descrevia a existência de porções de habitat favoráveis à ocorrência de uma determinada população, mas que ainda se encontravam desocupados, isto segundo eles, em virtude da falha dos indivíduos da população em questão em colonizá-las. Anos depois MacArthur e Wilson (1967) contribuíram significativamente para o desenvolvimento deste pensamento com a publicação da teoria de biogeografia de ilhas, na qual procuram explicar os fatores que afetam a riqueza de espécies de uma determinada comunidade isolada. Em 1969, Levins utiliza o termo metapopulação pela primeira vez e faz referência ao conjunto de populações espacialmente delimitadas que estão conectadas por meio de certo grau de migração, as quais se encontram num contínuo processo de colonização e extinção.

As abordagens atuais estão baseadas no conceito de metapopulações de Levins (1969) e propõem que a metapopulação está em um equilíbrio estocástico entre extinções de determinadas populações nos habitats ocupados e colonizações de habitats vazios, e que a migração de um indivíduo depende da distância e localização desses habitats, sendo eles os que finalmente afetam a dinâmica da metapopulação (HANSKI, 1994; HASTINGS; HARRISON, 1994; HANSKI & GILPIN, 1997). Em razão disso, a conectividade dos habitats torna-se um ponto crítico na ecologia das metapopulações ao afetar as taxas de migração, e com isso, a persistência da metapopulação na paisagem (GONZALEZ *et al.*, 1998; KINDVALL, 1999).

Keymer e colaboradores (2000) determinaram que a persistência e extinção das metapopulações se encontram fortemente influenciados pela taxa a qual muda a paisagem. A perda e fragmentação de habitats geralmente resultam na formação de áreas remanescentes de vegetação nativa rodeadas por uma matriz agrícola ou de algum outro tipo, reduzindo o tamanho dos habitats e aumentando o isolamento de fragmentos (ANDRÉN, 1994). A heterogeneidade na qualidade dos habitats remanescentes potencialmente afetará a dinâmica populacional gerando metapopulações do tipo fonte – sumidouro (DONOVAN *et al.*, 1995). Esse tipo de dinâmica é reportada em populações de felinos (STONER; WOLFE; CHOATE, 2006; NEWBY *et al.*, 2013).

#### **2.1.1.1. Dinâmica Fonte – Sumidouro**

Pulliam (1988) argumentou que as diferenças na qualidade do habitat levam a uma diferenciação das taxas de natalidade e mortalidade entre as populações de uma metapopulação. Neste tipo de ambiente podem se diferenciar dois tipos de populações, as populações fonte e as populações sumidouro. As populações fonte são aquelas que habitam áreas de boa qualidade, a taxa de natalidade excede a taxa de mortalidade o que ocasiona um aumento do tamanho populacional, provocando que alguns indivíduos emigrem. As populações sumidouro, pelo contrário, habitam áreas de baixa qualidade, a taxa de mortalidade excede a taxa de natalidade, de modo que elas poderiam se extinguir, porém os indivíduos imigrantes provenientes das populações circundantes evitam que isso aconteça.

#### **2.1.2. Efeito da alteração da paisagem na estrutura metapopulacional.**

Em uma estrutura metapopulacional cada uma das subpopulações contribui à persistência da metapopulação. Assim, a metapopulação depende do tamanho populacional de cada subpopulação, da qualidade dos habitats e a conectividade entre eles (OVASKAINEN;

HANSKI, 2004). Os contínuos impactos causados pelo homem no ambiente, como perda, fragmentação e alteração dos habitats, causam, na maioria das vezes, a redução do tamanho das subpopulações por tornar a taxa de crescimento negativa (GAGGIOTTI, HANSKI, 2004). As pequenas subpopulações resultantes passam a ter um alto risco de extinção, ao serem mais suscetíveis aos efeitos de deriva, estocasticidade demográfica e ambiental, e como cada um desses eventos pode diminuir ainda mais o tamanho populacional, esse efeitos funcionam como um reforço que é conhecido como vórtice de extinção (GILPIN, SOULÉ, 1986). A extinção de uma única subpopulação ou seu isolamento por perda de habitat ocasionará a diminuição da conectividade entre as subpopulações, diminuindo a capacidade da rede de habitats de suportar uma metapopulação viável (GAGGIOTTI, HANSKI, 2004).

### **2.1.3. Perda e Fragmentação de habitat no Estado de São Paulo**

No último século o estado de São Paulo tem atravessado diversas mudanças até se converter no estado de maior população e densidade demográfica do Brasil. Porém, esse aumento no tamanho da população humana têm lhe acarretado perdas de áreas naturais e biodiversidade, gerando remanescentes de vegetação natural distribuídos de forma fragmentada (JORGE; MOREIRA, 2000).

O elevado grau de fragmentação do Estado de São Paulo é devido às atividades agropecuárias, apresentando grandes extensões de áreas de pastagem e uma forte expansão agrícola. O estado concentra 52% da produção brasileira de cana-de-açúcar e 83% da produção de laranja. Além disso, a partir de 1965, a política de incentivos fiscais do Governo Federal aos projetos de reflorestamento contribuiu para à alteração do uso da terra em várias regiões do país, tendo como resultado o reflorestamento de vastas áreas com monocultivos de *Pinus* spp. e *Eucalyptus* spp., gerando a expansão da indústria de papel e celulose e dos

derivados de madeira, as quais tem se estabelecido principalmente nas áreas de cerrado (OLIVEIRA, 2001).

Atualmente, o estado de São Paulo ostenta o primeiro lugar em área remanescente de Mata Atlântica e terceiro lugar em vegetação savânica (ZANCHETTA, 2006). Para o desenvolvimento de estratégias efetivas de conservação da biodiversidade presente nesses remanescentes, é preciso saber como as espécies utilizam os fragmentos, bem como a matriz ao seu redor (FORMAN, 1995; LINDENMAYER *et al.*, 2000).

Uma das espécies presente nas áreas remanescentes do estado é *P. concolor*, espécie de grande porte que precisa de fragmentos de grande tamanho e baixos níveis de isolamento para se desenvolver (CROOKS, 2002). Devido aos requerimentos da espécie e à diminuição de áreas naturais, *P. concolor* tem sido classificada como espécie vulnerável para o estado de São Paulo. (SÃO PAULO, 2009). Medidas conservacionistas eficazes as populações de *P. concolor* precisam ter em consideração como elas interagem mutuamente e como em conjunto utilizam as áreas remanescentes.

#### **2.1.4. Estrutura metapopulacional de *P. concolor***

*P. concolor* caracteriza-se por não apresentar uma distribuição homogênea na paisagem, se mostrando constantemente como grupos de indivíduos que interagem separadamente por áreas, através das quais se dispersam, conseguindo vincular-se com os outros grupos, o que dificulta a delimitação das populações. A grade maioria das vezes esta delimitação populacional se realiza tendo em consideração o componente geográfico da paisagem, assim duas populações são delimitadas por um rio ou uma montanha. À vista disso, a distribuição heterogênea dos indivíduos faz necessário aceitar o importante papel do componente geográfico através de uma região determinada, situação que pode ser descrita melhor como uma metapopulação (HORNOCKER; NEGRI, 2010).

Diferentes metapopulações tem sido qualificadas, ao longo do tempo, como possuidoras de características de populações fonte-sumidouro, assim, Young e colaboradores (1946) perceberam que a “infiltração” de indivíduos do México ao Arizona aumentou a persistência de *P. concolor* na área, apesar dos esforços para reduzir o número deles. Lindzey e colaboradores (1988) determinaram que indivíduos que migravam das áreas protegidas contribuíam com a persistência de populações de áreas adjacentes, onde eles eram caçados. Beier e Cunningham (1996) e Sweanor e colaboradores (2000), realizaram pesquisas de longo prazo em populações de *P. concolor* visando fornecer informações substanciais sobre a estrutura metapopulacional da espécie, porém ambas as pesquisas apresentaram problemas, como a morte de algum dos indivíduos estudados, problemas com o equipamento de rastreamento e falta de conhecimento sobre as populações vizinhas, não se sabendo de que populações provinham os migrantes ou a que populações chegavam os emigrantes. Em 2012, Andreassen e colaboradores, determinaram a dinâmica de fonte-sumidouro para 5 subpopulações de *P. concolor* baseados na diferença entre as taxas de emigração e imigração entre elas. No entanto, eles encontraram que a população localizada em uma das áreas de maior qualidade comportava-se como sumidouro, isto devido, segundo os autores, ao alto índice de atropelamentos na área o qual impede a saturação dela e não promove a emigração.

A maioria das informações que se tem na literatura sobre a dinâmica populacional de *P. concolor* procedem de pesquisas realizadas em populações da América do Norte (ANDREASEN *et al.*, 2012; NEWBY *et al.*, 2013, SWEANOR; LOGAN; HORNOCKER, 2000), enquanto na América do Sul há um vazio nas informações da dinâmica populacional de *P. concolor*, assim como do efeito da fragmentação e perda de habitat onde elas habitam.

## 2.2. OBJETIVOS

---

A paisagem fragmentada presente no estado de São Paulo, assim como a exacerbada perda de áreas de vegetação natural têm levado à redução da biodiversidade, deixando a várias espécies em estado vulnerável ou em perigo de extinção. Tentando remediar este problema, alguns dos remanescentes de vegetação natural presentes no estado tem sido convertidos em unidades de conservação, que tem como principal objetivo a preservação da biodiversidade.

A Estação Ecológica de Itirapina é uma destas unidades de conservação, na qual habitam diferentes espécies de interesse conservacionista, como é o caso da onça-parda (*Puma concolor*). Tem se sugerido que a população de *P. concolor* presente na estação estaria interagindo com alguma outra população, possivelmente a presente na Estação Ecológica de Jataí e no Parque Estadual de Vassununga, e que ambas conformariam uma metapopulação do tipo fonte sumidouro.

Este trabalho tem se focado em tentar determinar se efetivamente a população de *P. concolor* presente na Estação Ecológica de Itirapina se comporta como uma população sumidouro e se as populações da Estação Ecológica de Jataí e Parque Estadual de Vassununga seriam a população fonte.

### 2.2.1. Objetivo geral

Determinar se a população de *P. concolor* presente na Estação Ecológica de Itirapina se comporta como uma população sumidouro das populações da Estação Ecológica de Jataí e Parque Estadual de Vassununga.

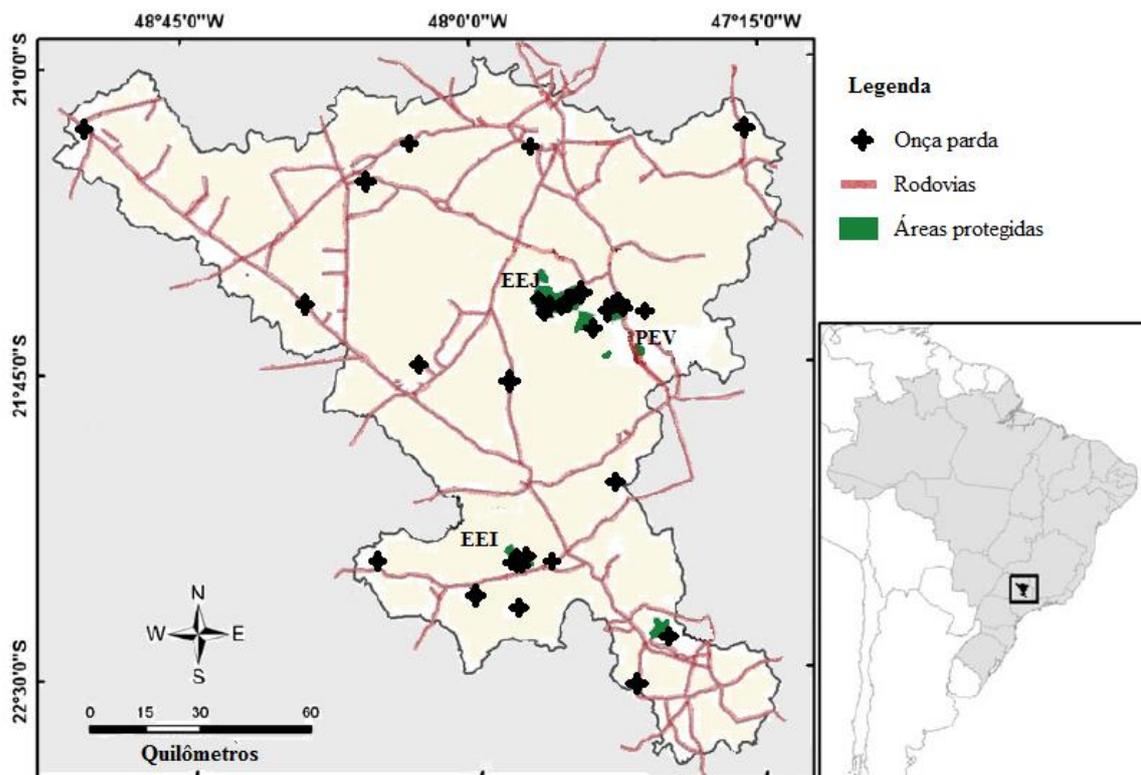
### 2.2.2. Objetivos específicos

- Determinar a existência de estruturação genética entre a população de *P. concolor* na região nordeste do estado de São Paulo;
- Identificar possíveis agentes geográficos que estejam causando a estruturação;
- Medir as taxas de migração entre as possíveis subpopulações;
- Determinar a dinâmica populacional das subpopulações.

## 2. 2. MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1. Obtenção das amostras

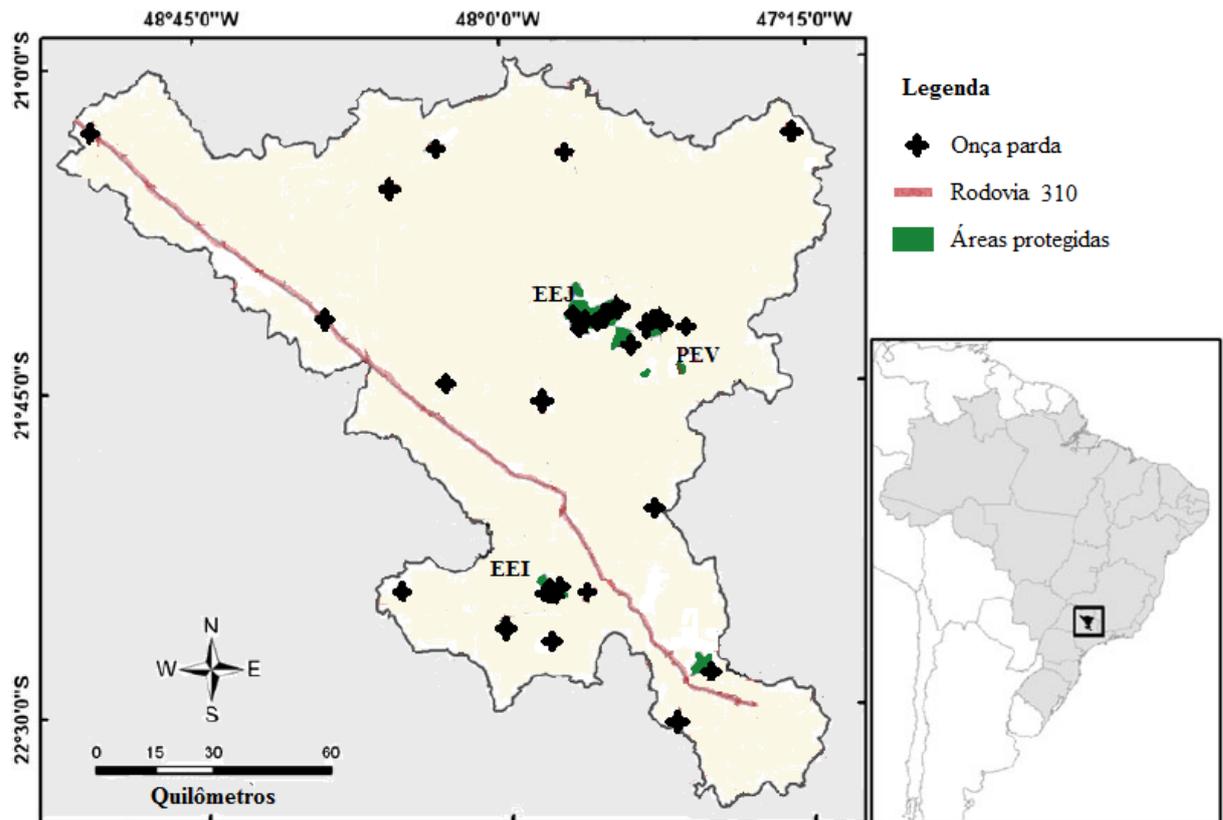
As amostras estudadas no capítulo I foram analisadas conjuntamente com as amostras de Miotto (2011). No total, foram analisados 48 indivíduos pertencentes à região nordeste do estado de São Paulo (Figura 18). A individualização dos indivíduos foi realizada com o mesmo conjunto de 7 loci, os quais foram detalhados no capítulo anterior.



**Figura 18.** Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo *P. concolor* na região nordeste do estado de São Paulo. EEI: Estação Ecológica de Itirapina; EEJ: Estação ecológica de Jataí; PEV: Parque Estadual de Vassununga. (Modificado de MIOTTO *et al.*, 2011).

Ante a dificuldade de delimitação das populações de *P. concolor* (HORNOCKER; NEGRI, 2010), se propõe a possível existência de duas populações, com base na distribuição

dos indivíduos na paisagem, as quais estariam se mantendo separadas pela rodovia SP 310 (Figura 19).



**Figura 19.** Distribuição espacial dos pontos de coleta de cada indivíduo *P. concolor* separados pela rodovia SP 310. EEI: Estação Ecológica de Itirapina; EEJ: Estação ecológica de Jataí; PEV: Parque Estadual de Vassununga. (Modificado de MIOTTO *et al.*, 2011).

### 2.2.2. Estruturação populacional

O programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000; FALUSH *et al.*, 2003) foi utilizado para determinar a estruturação genética populacional. Esse programa utiliza a técnica de *clusters* bayesianos para distribuir probabilisticamente  $n$  indivíduos a  $k$  populações, sendo  $k$  não conhecido. Essa distribuição de indivíduos nas populações não requer de uma delimitação subjetiva de uma população *a priori* (PRITCHARD *et al.*, 2000; CHEN *et al.*, 2007; DURAND *et al.*, 2009). Avaliou-se o logaritmo da probabilidade dos dados,  $\ln P(D | K)$  (PRITCHARD *et al.*, 2000), e as estimativas de  $\Delta k$  (EVANNO *et al.*, 2005) utilizando o

programa Structure Harvester (EARL, 2009) para determinar o número mais provável de *clusters*.

Adicionalmente, foi usado o programa TESS (CHEN *et al.*, 2007; DURAND; CHEN; FRANÇOIS, 2009) que, tal como o STRUCTURE, está implementado com o algoritmo Monte Carlo via Cadeias de Markov (Markov Chain Monte Carlo, MCMC), mas utiliza as coordenadas geográficas como informação *a priori*, conseguindo determinar a estrutura genética populacional através da paisagem. Para identificar o *k* mais provável foram plotados os valores de DIC (*deviance information criterion*) (SPIEGELHALTER *et al.*, 2002), sendo escolhido aquele que atingia ao platô da curva de DIC (DURAND; CHEN; FRANÇOIS, 2009; DURAND *et al.*, 2009; FRANÇOIS; DURAND, 2010).

### **2.2.3. Dinâmica populacional**

Utilizando o programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) cada indivíduo foi classificado em cada um dos *clusters* genéticos, os quais haviam sido obtidos por meio do programa TESS, baseados na média da proporção de miscigenação de cada indivíduo obtidas em cada uma das 10 repetições. Para estimar taxas de migração recentes entre os grupos identificados com as análises de clusters Bayesianos foi utilizado o programa BIMR 1.0 (FAUBET; GAGGIOTTI, 2008). Esse programa infere a proporção da população que imigrou durante a geração passada mediante a análise do desequilíbrio de fase gamética gerado pela migração.

Foram comparadas as taxas de emigração e imigração entre as populações para determinar a possível existência de populações fonte e sumidouro (ANDREASEN *et al.*, 2012). Aquela população cuja taxa de emigração fosse maior que a de imigração foi considerada como fonte e aquela cuja taxa de emigração foi menor que a de imigração como sumidouro.

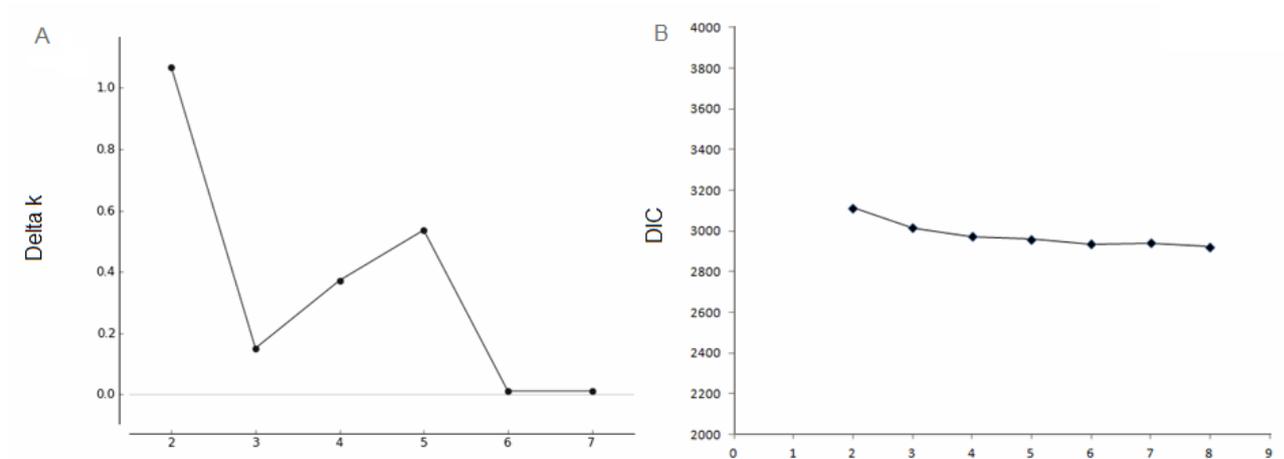
#### **2.2.4. Estatísticas descritivas dos *clusters***

Para detectar um possível desvio dos loci do equilíbrio de Hardy-Weinberg, foi utilizado o programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), o qual faz uso de uma versão modificada do algoritmo *Markov-chain random walk* descrito por Guo e Thomson (1992). O desequilíbrio de fase gamética também foi calculado com o programa ARLEQUIN 3.5 (EXCOFFIER, LISCHER, 2010), sendo que cada par de loci é testado usando o teste das taxas verossimilhança, cuja distribuição empírica é obtida por um procedimento de permutação (SLATKIN; EXCOFFIER, 1996). A análise de variância molecular foi feita no mesmo programa, e foi escolhida a opção de AMOVA locus por locus por ser a mais indicada no caso de ocorrer *missing data*. Adicionalmente foi calculada a distância genética ( $F_{st}$ ) para o par de populações, o qual pode ser utilizado para determinar curtas distâncias genéticas entre populações (REYNOLDS; WEIR; COCKERHAM, 1983; SLATKIN, 1995).

## 2.3. RESULTADOS

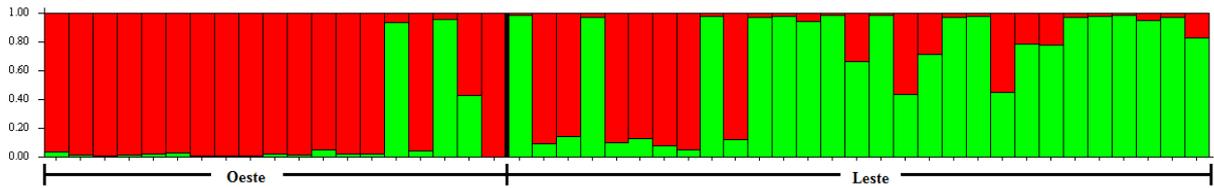
### 2.3.1. Estruturação populacional

Os programas STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000; FALUSH *et al.*, 2003) e TESS (CHEN *et al.*, 2007; DURAND; CHEN; FRANÇOIS, 2009) detectaram mediante a análise do  $\Delta k$  e DIC, respectivamente, a presença de dois grupos genéticos (Figura 20).

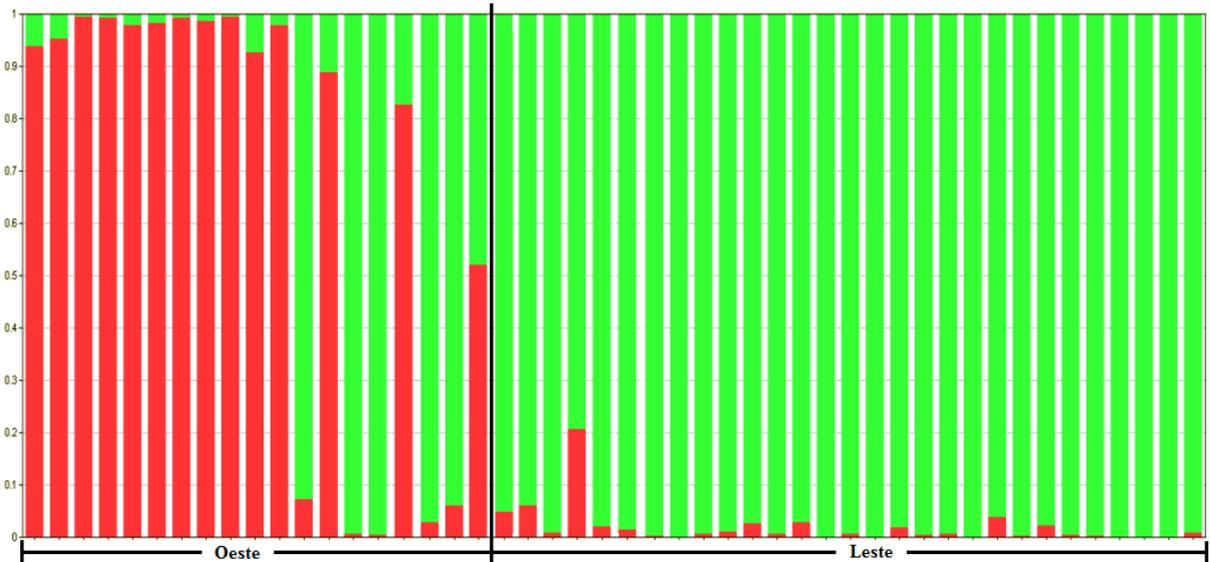


**Figura 20.** (A) Delta k (Dk) e (B) *Deviance information criterion* (DIC) calculados pelos programas Structure Harvester e TESS, respectivamente.

Os resultados do programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000; FALUSH *et al.*, 2003) mostram que a população estaria estruturada (Figura 21). No entanto, nos resultados do TESS (CHEN *et al.*, 2007; DURAND; CHEN; FRANÇOIS, 2009) fica mais evidente que os dois grupos genéticos estão relacionados com a divisão geográfica causada pela rodovia BR-310 (Figura 22). A diferença encontrada entre os resultados do TESS e o do STRUCTURE se deve à utilização da informação geográfica por um dos programas.



**Figura 21.** Gráfico de barras obtido pelo STRUCTURE com  $k=2$ .



**Figura 22.** Gráfico de barras obtido pelo TESS com  $k=2$ .

### 2.3.2. Dinâmica populacional

Utilizando o software CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) cada indivíduo foi colocado em cada um dos dois clusters genéticos obtidos por meio do software TESS (CHEN *et al.*, 2007; DURAND; CHEN; FRANÇOIS, 2009). A taxa de emigração obtida usando o software BIMR (FAUBET; GAGGIOTTI, 2008), foi maior na população do norte em comparação com a população do sul (Tabela 12). Em concordância com a diferença obtida entre as taxas de emigração e migração obteve-se que a população oeste seria uma população do tipo sumidouro e população leste uma população fonte.

**Tabela 12.** Taxa de migração obtida para duas subpopulações de *P. concolor* na região nordeste do estado de São Paulo.

De/Para	Leste	Oeste
Leste	0.915167 ( $\pm 0.089818$ )	0.084833 ( $\pm 0.089818$ )
Oeste	0.054921 ( $\pm 0.052320$ )	0.945079 ( $\pm 0.052320$ )

### 2.3.3. Estatísticas descritivas dos *clusters*

Foi observado desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg, para quatro dos loci da subpopulação do leste. No entanto, a subpopulação do oeste não apresentou nenhum loci em desequilíbrio (Tabela 13).

**Tabela 13.** Heterozigocidade observada e esperada para cada um dos loci microssatélites estudados.

	Locus	HO	HE	<i>P-value</i>
<b>Subpopulação do Leste</b>				
	PcoB003	0.96875	0.79514	<b>0.00000</b>
	PcoC108	0.91667	0.73670	<b>0.01499</b>
	PcoA208	0.78125	0.80010	<b>0.00263</b>
	PcoA216	0.75000	0.80260	0.02930
	PcoA339	0.85294	0.83055	0.03254
	PcoB010	0.72727	0.79534	0.15528
	PcoB210	0.97059	0.84767	<b>0.00000</b>
	Locus	Obs.Het.	Exp.Het.	<i>P-value</i>
<b>Subpopulação do Oeste</b>				
	PcoB003	0.42857	0.57672	0.33736
	PcoC108	0.71429	0.66667	0.92325
	PcoA208	0.71429	0.84921	0.01480
	PcoA216	0.85714	0.90741	0.24406
	PcoA339	0.64286	0.83598	0.17608
	PcoB010	0.78571	0.89418	0.15214
	PcoB210	0.66667	0.82971	0.09552

Em negrito se mostram os valores significativos, após a correção sequencial de Bonferroni ( $0.005 < \alpha < 0.05$ ).

Foram encontrados 6 pares de loci ligados (PcoB003 - PcoC108, PcoB003 - PcoB210, PcoA208 – PcoA216, PcoA208 – PcoB210, PcoC108 – PcoB210, PcoA216 – PcoB210) para a subpopulação do leste a partir da análise do desequilíbrio de ligação. No entanto, a subpopulação do oeste apresentou 4 pares de loci ligados (PcoB003 – PcoC108; PcoB003 - PcoA208; PcoA208 - PcoA339; PcoA339 – Pco210) (Tabela 13), indicativo a presença de estrutura populacional. Assim mesmo, o índice de endogamia Fis, deu como resultado -0.065 para a subpopulação do leste e 0.140 para a subpopulação do leste.

A distância genética (Fst) entre as duas subpopulações, obtida com o programa ARLEQUIN, foi de 0.10096, sendo esse valor significativo com um *P value* de 0.000. A análise de variância molecular (AMOVA) locus por locus determinou que a maior porcentagem da variação localiza-se dentro das subpopulações, no entanto a porcentagem da variação entre as subpopulações é bastante elevada (Tabela 14).

**Tabela 14.** Análises de variância molecular.

<b>Fonte da Variação</b>	<b>Soma dos quadrados</b>	<b>Componentes da variância</b>	<b>Porcentagem da variação</b>
Entre subpopulações	14.786	0.31399	10.09576
Dentro das subpopulações	245.102	2.79612	89.90424
Total	259.888	3.11011	

P value = 0.000

## 2.4. DISCUSÃO

---

Os resultados suportam a hipótese de que a população de *P. concolor* na região nordeste do estado de São Paulo é composta por duas subpopulações. Ao comparar os *clusters* obtidos pelos programas STRUCTURE e TESS com a paisagem observa-se como estes são separados geograficamente pela rodovia SP 310. Estudos anteriores no estado de São Paulo têm registrado como as rodovias diminuem o fluxo gênico entre as populações como consequência dos contínuos atropelamentos dos indivíduos migrantes (MIOTTO *et al.*, 2011; 2012). No entanto, não se tinham reportado estruturação das populações.

Apesar das baixas taxas de migração (0.055 e 0.084) estimadas neste estudo, a diferença entre elas apoia a ideia de que as duas subpopulações apresentam uma dinâmica de fonte – sumidouro. Andreasen e colaboradores (2012) obtiveram valores semelhantes de migração entre algumas das populações de *P. concolor* presentes na Grande Bacia (ao oeste dos Estados Unidos). A metapopulação que habita essa área apresenta valores de migração que variam entre 0.018 e 0.397, os valores mais baixos atingidos (0.018 – 0.397) correspondem às populações separadas por grandes desertos e a aquelas que sofrem as consequências da caça legal (ANDREASEN *et al.*, 2012). A rodovia BR-310 estaria causando um impacto do mesmo nível nas populações de *P. concolor* no estado de São Paulo.

Os resultados da análise de  $F_{st}$  (0.10096) foram significativos para as duas subpopulações, corroborando, juntamente com análise de variância molecular (AMOVA), a existência de duas subpopulações. A subpopulação do oeste apresentou um menor número de locus em desequilíbrio de Hardy-Weinberg e um menor número de loci ligados. A diferença entre o número de loci ligados poderia ser explicado pela maior taxa de imigração presente na população do oeste, assim como explicado no capítulo anterior. O desequilíbrio, por sua vez, pode ser diminuído pela presença de fluxo gênico, quando os indivíduos imigrantes são

geneticamente parecidos com os indivíduos da população local (WAPLES, 2006), o qual estaria acontecendo com as duas subpopulações.

Ciocheti e colaboradores (2009) determinaram que a taxa de atropelamento da rodovia SP 310 é de 1,96 animal/km, e evidenciaram que esta significava uma importante barreira entre as populações que são separadas por ela. Durante a execução desse estudo não haviam sido reportados atropelamentos de *P. concolor*, na pesquisa desenvolvida por Miotto e colaboradores (2012) foi encontrado um indivíduo atropelado na área norte da rodovia. Essa área poderia estar sendo evitada pela onça-parda, já que foi observado que a possível área de fluxo esteja na porção sul da estrada (área na qual, indivíduos pertencentes ao *cluster* da subpopulação do leste, localizam se do lado oeste da estrada).

Neste âmbito, é preocupante um futuro isolamento da subpopulação leste se for levado em consideração o seu caráter de sumidouro, pois a não presença de imigrantes poderia levá-la a sua extinção (PULLIAM, 1988). Como foi determinado no capítulo anterior, um grupo de cinco indivíduos fortemente aparentados foi identificado dentro da Estação Ecológica de Itirapina, os quais, por não haverem migrantes na região, possivelmente estariam acasalando entre si, elevando a endogamia e, conseqüentemente, tornando-a susceptível aos efeitos da deriva genética.

Pires e colaboradores (2000) baseados nas características comportamentais e ecológicas de *P. concolor* e *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) têm desenhado possíveis corredores ecológicos que conectem a Estação Ecológica de Itirapina, Estação Ecológica de Jataí e outras unidades de conservação com áreas não protegidas numa extensão de 19,8km<sup>2</sup> no estado de São Paulo. A aplicação deste ou de outros estudos que ajudem a manter o fluxo genético entre as populações de *P. concolor* são essenciais para a viabilidade destas.

### 3. CONCLUSÕES

Análises moleculares usando amostras não invasivas de fezes permitem determinar a espécie das amostras e individualizá-las. Apesar das dificuldades que este tipo de amostra apresenta, os estudos com esse tipo de amostragem fornecem dados valiosos para conservação da biodiversidade. Além disso, a identificação da espécie mediante a análise de um fragmento de DNA de apenas 96 pb foi bem sucedida, corroborando que não é preciso a captura dos animais, assim como geração de estresse e possíveis ferimentos para estudá-los.

A população de *P. concolor* presente na Estação Ecológica de Itirapina e áreas circundantes está se comportando como uma população sumidouro, sendo que a sua manutenção ao longo tempo dependerá da permanência das populações presentes na Estação Ecológica de Jataí e no Parque Estadual de Vassununga. Para tanto, iniciativas conservacionistas para esta espécie não devem estar restritas a uma determinada área, mas devem considerar também a dinâmica populacional.

A implantação de corredores de migração entre a Estação Ecológica de Itirapina, Estação Ecológica de Jataí e o parque Estadual de Vassununga é necessária a fim de evitar o isolamento das subpopulações, mantendo o fluxo gênico entre elas e a dinâmica metapopulacional.

Futuros estudos populacionais de *P. concolor* deverão focar-se na dinâmica dos indivíduos entre os fragmentos a fim de determinar os padrões de movimentação e estrutura populacional da espécie. Desse modo, planos de ação mais eficientes para a conservação das onças-pardas poderão ser melhor estabelecidos.

#### 4. REFERÊNCIAS

ANDERSEN L.W.; FOG, K.; DAMGAARD, C. Habitat fragmentation causes bottlenecks and inbreeding in the European tree frog (*Hyla arborea*). **Proc Biol Sci.**, v. 271, n.1545, p. 1293–1302, junho 2004.

ANDREASEN, A. M.; STEWART, K. M.; LONGLAND, W. S.; BECKMANN, J. P.; FORISTER, M. L. Identification of source-sink dynamics in mountain lions of the Great Basin. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 23, p. 5689–5701, dezembro 2012.

ANDREWARTHA, H.G., BIRCH, L. C. **The distribution and abundance of animals**. Chicago: Univ Chicago Press, 1954.

ANDRÉN, H. Effects of habitat fragmentation on birds and mammals in landscapes with different proportions of suitable habitat: a review. **Oikos**, v.71, p. 355–366, 1994.

AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v.36, p. 3–15, 2009

BEIER, P. Metapopulation models, tenacious tracking, and cougar conservation. In McCULLOUGH, D.R. **Metapopulation and wildlife conservation**. California: Island Press. 1996. p. 293-323.

BEIER, P.; CUNNINGHAM, S. C. Power of track surveys to detect changes in cougar populations. **Wildlife Society Bulletin**, v. 24, p. 540-546, 1996.

BELKHIR, K.; BORSA, P.; CHIKHI, L.; RAUFASTE, N.; BONHOMME, F. **Genetix 4.02, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. Laboratoire Génome, Populations, Interactions: CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier, France. 2001.

BELLEMAIN, E.; SWENSON, J.; TALLMON, D.; BRUNBERG, S.; TABERLET, P. Estimating population size of elusive animals using DNA from hunter-collected feces:

comparing four methods for brown bears. **Conservation Biology**, v.19, n.1, p. 150–161, fevereiro, 2005.

BERED, F.; NETO, J. F.; FELIX DE CARVALHO, F. I. MARCADORES MOLECULARES E SUA APLICAÇÃO NO MELHORAMENTO GENÉTICO DE PLANTAS. **Cienc. Rural**, v.27, n.3, July/Aug. 1997

BHAGAVATULA, J., SINGH L. Genotyping faecal samples of Bengal tiger *Panthera tigris tigris* for population estimation: A pilot study. **BMC Genetics**, v.7, n.48. outubro 2006. Disponível em: <[www.biomedcentral.com/1471-2156/7/48](http://www.biomedcentral.com/1471-2156/7/48)>

BORLAUG, N.E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. In: Bailey, R. **Global warming and other eco-myths**. Roseville: Enterprise Institute. 2002. p. 29-60.

BOTSTEIN, D.; WHITE, R. L.; SKOLNICK, M.; DAVIS, R. W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. **American Journal of Human Genetics**, v. 32, p. 314-331, 1980.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas; Brasília, DF: MMA, 2008. 2v. 1420p.

BRINKMAN, T. J. *et al.* Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. **Conservation Genetics**, v. 11, n. 4, p. 1547-1552, junho 2010.

BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology**, v.5, p. 453–455, 1996.

BROQUET, T.; PETIT, E. Quantifying genotyping errors in non-invasive population genetics. **Molecular Ecology**, v.13, p.3601– 3608, 2004.

BURKEY, T. V. Extinction in nature reserves: the effect of fragmentation and the importance of migration between reserve fragments. **Oikos**, v.55, n.1, p. 75-81, maio 1989.

CARDILLO, M., PURVIS, A. SECHREST, W., GITTLEMAN, J., BIELBY, J., MACE, G. Human Population Density and Extinction Risk in the World's Carnivores. **PLoS Biol.**, v.2, n.7, Disponível em: < e197. doi:10.1371/journal.pbio.0020197>. Acesso em: 08 febrero 2013.

CAVALCANTI, R.; JOLY, C. The conservation of the Cerrados. In: OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS R. J. **The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press, 2002. p. 351-367.

CHAME, M. Terrestrial Mammal Feces: a Morphometric Summary and Description. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, suplemento I, p. 71-94. 2003.

CHAKRABORTY, R.; DE ANDRADE, M.; DAIGER, S.P.; BUDOWLE, B. Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in forensic applications. **Annals of Human Genetics**, v. 56, p. 45–57, 1992.

CHEN, C.; DURAND, E.; FORBES, F.; FRANÇOIS, O. Bayesian clustering algorithms ascertaining spatial population structure: A new computer program and a comparison study. **Molecular Ecology Notes**, v. 7, n. 5, p. 747-756, setembro 2007.

CIOCHETI, G. ABRA, F. Taxas de atropelamento de mamíferos de médio e grande porte e relações com a estrutura da paisagem nas rodovias SP 225 e SP 310, São Paulo, SP. **Anais do IX Congresso de Ecologia do Brasil**, Mato Grosso , 2009.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, v.9, n.10, p. 1657-1660, 2000.

CRAWSHAW; QUIGLEY unpubl. In: NOWELL, K.; JACKSON, P. **Wild Cats**. Switzerland: IUCN/SSC Cat Specialist Group, Gland. 1996.

CREEL, S.; SPONG, G.; SANDS, J. L.; ROTELLA, J.; ZEIGLE, J.; JOE, L.; MURPHY, K. M.; SMITH, D. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. **Molecular Ecology Short Communication**, v.12, n.7, p. 2003–2009, julho 2003.

CROOKS, K. R. 2002. Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. **Conservation Biology**, v.16, n.2, p. 488-502, abril 2002.

CROOKS, K. R.; SOULÉ, M. E. Mesopredator release and avifaunal extinctions in a fragmented system. **Nature**, v. 400, p. 563-566, agosto 1999.

DELGADO, J. M. **Plano de Manejo Integrado das Unidades de Itirapina – SP**. IF Sér. Reg., São Paulo, n. 27, p. 1-153, 2004.

DILLON, A.; KELLY, M. Ocelot home range, overlap and density: comparing radio telemetry with camera trapping. **Journal of Zoology**, v.275, p. 391-398, 2008.

DONOVAN, T. M, THOMPSON III, F. R., FAABORG, J. AND PROBST, J. R. Reproductive success of migratory birds in habitat sources and sinks. **Conservation Biology**, v. 9, p. 1380–1395, 1995.

DURIGAN, G.; FRANCO, G. A. D. C.; SIQUEIRA, M. F. A vegetação dos remanescentes de cerrado no Estado de São Paulo. In: BITENCOURT, M. D.; MENDONÇA, R. R. **Viabilidade de conservação dos remanescentes de cerrado no Estado de São Paulo**. São Paulo: Annablume, Fapesp. 2004. p. 29-56.

DURAND, E.; CHEN, C.; FRANÇOIS, O. 2009. **TESS Version 2.3 Reference Manual**. Disponível em: [memberstimc.imag.fr/Olivier.FRANÇOIS/tess.html](http://memberstimc.imag.fr/Olivier.FRANÇOIS/tess.html).

DURAND, E.; JAY, F.; GAGGIOTTI, O.E.; FRANÇOIS, O. Spatial inference of admixture proportions and secondary contact zones. **Molecular Biology and Evolution**, v. 26, n. 9, p.1963–1973, maio 2009.

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, junho 2012.

ERNEST, H. B.; PENEDO, M. C. T.; MAY, B. P.; SYVANEN, M.; BOYCE, W. M. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 433–441, 2000.

ESRI, 2007. **ArcGis, the Complete Geographical Information System**. Redlands, California.

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, julho 2005.

EVETT, I. W.; WEIR, B. S. *Interpreting DNA Evidence*. 1998. Sunderland, MA: Sinauer Associates, Inc.

EXCOFFIER, L.; LISCHER H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v.10, p. 564-567, 2010.

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, n. 4, p.1567–1587, agosto 2003.

FARREL, L.E., ROMAN, J., SUNQUIST, M.E. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. **Molecular Ecology**, v.9, p. 1583-1590, 2000.

FAUBET, P.; GAGGIOTTI, O. E. A new Bayesian method to identify the environmental factors that influence recent migration. **Genetics**, v. 178, n. 3, p. 1491–1504, março 2008.

FERNANDO, P.; VIDYA, T. N. C.; RAJAPAKSE, C.; DANGOLLA, A.; MELNICK, D. J. Reliable Noninvasive Genotyping: Fantasy or Reality? **Journal of Heredity**, v. 94, n. 2, p. 115–123, 2003.

FORAN, D. R.; CROOKS, K. R.; MINTA, S. C. Species identification from scat: method an unambiguous genetic method. **Wildlife Society Bulletin**, v. 25, p. 835-839, 1997.

FORMAN, R. T. T. **Land Mosaics: the ecology of landscapes and regions**. Cambridge: Cambridge University Press, 1995. 632p.

FRANÇOIS, O.; DURAND, E. Spatially explicit Bayesian clustering models in population genetics. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 5, p. 773-784, settembre 2010.

FRANKHAM, R.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. **Introduction to Conservation Genetics**. 2 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 2010.

FRANTZEN, M. A. J.; SILK, J. B.; FERGUSON, J. W. H.; WAYNE, R. K.; KOHN, M. H. Empirical evaluation of preservation methods for fecal DNA. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1423-1428, 1998.

GAGGIOTTI, O. E.; HANSKI, I. Mechanisms of population extinction. In: HANSKI, I.; GAGGIOTTI, O. E. **Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulation**. Amsterdam: Elsevier Academic Press .2004. p. 337-366.

GAGNEUX, P.; BOESCH, C.; WOODRUFF, D. S. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified from shed hair. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 861-268, 1997.

GERLOFF, U. *et al.* Amplification of hypervariable simple sequence repeats (microsatellites) from excremental DNA of wild living bonobos (*Pan paniscus*). **Molecular Ecology**, v.4, p. 515–518, 1995.

GILPIN, M. E.; SOULE, M. E. Minimum viable populations: processes of species extinction. In: Soule, M. E. **Conservation biology: the science of scarcity and diversity**. Massachusetts: Sinauer Associates. 1986. p. 19-34.

GONZALEZ, A.; LAWTON, J. H.; GILBERT, F. S.; BLACKBURN, T. M.; EVANS-FREKE, I. Metapopulation Dynamics, Abundance, and Distribution in a Microecosystem. **Science**, v.281, n.5385, p. 2045-2047, settembre 1998.

GOUDET, J. **FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)**. Université de Lausanne, Dorigny, Switzerland, 2001.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-72, 1992.

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. **Genetica**, v. 136, n.3, p. 505–512, julho 2009.

HANSKI I. A practical model of metapopulation dynamics. **Journal of Animal Ecology**, v.63, p. 151-162, 1994.

HANSKI, I.; GILPIN, M.E. **Metapopulation Biology: Ecology, Genetics, and Evolution**. 1ed. San Diego: Academic Press. 1997. xvi + 512 pp.

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

HANSKI, I.; GAGGIOTTI, O.E. **Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulations**. 1 ed. San Diego: Elsevier Academic Press. 2004. 696 pp.

HASTINGS, A.; HARRISON, S. Metapopulation dynamics and genetics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.25, p. 167–188, 1994.

HEYMANN, E., HEISTERMANN, M., LÖTTKER, P., HUCK M., BÖHLE, U. Monitoreo no invasivo de animales silvestres análisis genéticos y endocrinológicos a base de muestras fecales en “pichicos barba blanca” (*Saguinus mystax*, Callitrichidae, Primates) en la Estación Biológica Quebrada Blanco (EBQB), Perú. **MEMORIAS: Manejo de Fauna silvestre en Amazonia y Latinoamérica**. 2004.

HORNOCKER, M.; NEGRI, S. **Cougar ecology and conservation**. 1 ed. Chicago: The University of Chicago Press. 2010. 306p.

HÜLLE, N.L. **Mamíferos de médio e grande porte num remanescente de Cerrado no sudeste do Brasil (Itirapina, SP)**. 2006. 78 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia). Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. São Paulo, 2006.

IUCN 2012. **IUCN Red List of Threatened Species**. Version 2012.2. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 08 febrero 2013.

JACOBS, J. Quantitative measurements of food selection. **Oecologia**, v.14, p. 413-417, 1974.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. J. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, v.23, n.14, p. 1801-1806, abril 2007.

JONES, M. G. K. Plant Biotechnology. In: WALKER, J.M.; RAPLEY, R. **Molecular Biology and Biotechnology**. Royal Society of Chemistry. 2009. pp 272 – 305.

JORGE; MOREIRA, Padrões da fragmentação do habitat na Cuesta de Botucatu (SP). **Ciência Florestal**, v.10, n.1, p. 141-157, 2000.

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

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, p. 1099-1106, 2007.

KENDALL, M.; STEWART, A. **The advanced Theory of statistics**. 1977. Volume 1. New York: Macmillan.

KEYMER, J. E.; MARQUET, P.A.; VELASCO-HERNÁNDEZ, J. X.; LEVIN, S. A. Extinction threshold and metapopulation persistence in dynamic landscapes. **Am Nat**, v.156, p. 478–494, 2000.

KHOROZYAN, I. G.; MALKHASYAN, A. G.; ASMARYAN, S. G.; ABRAMOV A. V. Using Geographical Mapping and Occupancy Modeling to Study the Distribution of the Critically Endangered Leopard (*Panthera pardus*) Population in Armenia. In: CUSHMAN, S. A.; HUETTMANN, F. **Spatial Complexity, Informatics, and Wildlife Conservation**. New York: Springer. 2010. p. 329-347.

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: 111–120, dezembro 1980.

KINDVALL, O. Dispersal in a metapopulation of the bush cricket, *Metrioptera bicolor* (Orthoptera: Tettigoniidae). **Journal of Animal Ecology**. v.68, n.1, p. 172–185, janeiro 1999.

KLINK, C.A.; MOREIRA, A.G. Past and current human occupation and land-use. In: OLIVEIRA, P.S.; MARQUIS, R.J. **The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna**. New York: Columbia University Press. 2002. pp. 69-88.

KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade** , v1, n1, julho 2005.

KOHN, M.; KNAUER, F.; STOFFELLA, A.; SCHRÖDER, W.; PÄÄBO, S. Conservation genetics of the European brown bear - a study using excremental PCR of nuclear and mitochondrial sequences. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 95–103, 1995.

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

KRONKA, F. J. N.; NALON, M. A.; MATSUKUMA, C. K.; PAVÃO, M.; GUILLAUMON, J. R.; CAVALLI, A. C.; GIANNOTTI, E.; IWANE, M. S. S.; LIMA, L. M. P. R., MONTES, J., DEL-CALI, I. H.; HAACK, P.G. **Áreas de domínio de cerrado no Estado de São Paulo**. São Paulo: Instituto Florestal, 1998.

KURUSHIMA, J. D.; COLLINS, J. W.; ERNEST, H. B. Development of 21 microsatellite loci for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. **Molecular Ecology Notes**, v.12, n.6, p. 1260-126, dezembro 2006.

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

LEVINS, R. Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. **Bulletin of the Entomological Society of America**, v.15, p.237–240, 1969.

LINDENMAYER, D.B; FISCHER, J. **Habitat Fragmentation and Landscape Change an ecological and conservation synthesis**. 1ed. Washington: Island Press. 2006. 328 p.

LINDENMAYER, D.B.; MCCARTY, M.A.; PARRIS, K. M.; POPE, M. L. Habitat fragmentation, landscape context, and mammalian assemblages in southeastern Australia. **Journal of Mammalogy**, v.81, n.3, p.787-792, agosto 2000.

LINDZEY, F. G.; ACKERMAN, B. B.; BARNHURST, D.; HEMKER T. P. Survival Rates of Mountain Lions in Southern Utah. **The Journal of Wildlife Management**, v. 52, n. 4, p. 664-667, outubro, 1988.

LOGAN, K.A.; SWEANOR. L.L. **Desert Puma: Evolutionary Ecology and Conservation of an Enduring Carnivore**. 1 ed. Washington: Island Press. 2001. 463 p.

MACDONALD, D. W. Patterns of scent marking with urine and faeces amongst carnivore communities. **Symposium of the Zoological Society of London**, v.45, p. 107–139, 1980.

MANTOVANI, J.E.; PEREIRA, A. Estimativas da integridade da cobertura vegetal do Cerrado/Pantanal através de dados TM/Landsat. In: **Anais IX Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**. Santos: INPE, 1998. p. 55-66.

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

MARTINS, N. **Tamanho populacional mínimo e diversidade genética de onça-parda (Puma concolor) no núcleo de Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo**. 2011. 59 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução). Universidade Federal de São Carlos. São Paulo, 2011.

MCINTYRE, S.; HOBBS, R.. A Framework for Conceptualizing Human Effects on Landscapes and Its Relevance to Management and Research Models. **Conservation Biology**, v.13, n.6, p. 1282–1292, dezembro 1999.

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, junho 2005.

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**, v.67, n.4 suppl.0, p. 631-637, Dezembro 2007.

MIOTTO, R.A., 2010. **Demografia e variação genética de *Puma concolor* (Linnaeus, 1771) na região nordeste do estado de São Paulo**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP.

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

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

MORIN, P. A.; CHAMBERS, K. E.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). **Molecular Ecology**, v.10, n.7, p. 1835-1844, julho 2001.

MORGULIS, A.; COULOURIS, G.; RAYTSELIS, Y.; MADDEN, T. L.; AGARWALA, R.; SCHÄFFER, A.A. Database Indexing for Production MegaBLAST Searches. **Bioinformatics**, v. 24, p. 1757-1764, 2008.

MOTTA-JUNIOR, J.; MONTEIRO, M.; FERREIRA, P. Aves da Estação Ecológica de Itirapina, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v.8, n.3, Jul./Set. 2008.

MURPHY, M. A.; WAITS, L. P.; KENDALL, K. C. The influence of diet on faecal DNA amplification and sex identification in brown bears (*Ursus arctos*). **Molecular Ecology**, v. 12, p. 2261–2265, 2003.

MYERS, N.; MITTERMEIER, R. A.; MITTERMEIER, C. G.; FONSECA, G. A. B.; KENT, J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v.403, p. 853–858, fevereiro 2000.

NAVIDI, W.; ARNHEIM, N.; WATERMAN, M. S. A multiple-tubes approach for accurate genotyping of very small DNA samples by using PCR: statistical considerations. **American Journal Human Genetics**. v. 50, p. 347-359, 1992.

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

NEWBY, J.R. *et al.*, Human-caused mortality influences spatial population dynamics: Pumas in landscapes with varying mortality risks. **Biological Conservation**, v. 159, p. 230–239, março 2013.

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

NOSS, R. F.; CSUTI, B. Habitat fragmentation. In: MEFFE, G. K.; CARROL, C. R. **Principles of conservation biology**. Sunderland: Sinauer Associates, 1997. p. 269-304.

O'BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**. v.91, p. 5748-5755, Junho 1994.

OLIVEIRA, P. S., MARQUIS, R. J. **The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna**. 1 ed. New York: Columbia University Press. 2001. 367 pp.

OPDAM, P. Metapopulation theory and habitat fragmentation: a review of holarctic breeding bird studies. **Landscape Ecology**, v.5, n.2, p. 93–106, 1991.

OVASKAINEN, O.; HANSKI, I. Metapopulation dynamics in highly fragmented landscapes. In: HANSKI, I.; GAGGIOTTI, O. E. **Ecology, Genetics, and Evolution of Metapopulation**. Amsterdam: Elsevier Academic Press. 2004. p. 73-104.

PAETKAU, D.; STRÖBECK, C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. **Molecular Ecology**, v.3, n.5, p. 489–495, outubro 1994.

PALMEIRA, F. B. L., CRAWSHAW J. R., P. G., HADDAD, C. M., FERRAZ, K. M. P. M. B., VERDADE, L. M. Cattle depredation by puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) in central-western Brazil. **Biological Conservation**, v.141, n.1, p. 118-125, janeiro 2008.

PANASCI, M. *et al.* Evaluation of fecal DNA preservation techniques and effects of sample age and diet on genotyping success. **The Journal of Wildlife Management**, v.75, n.7, p. 1616–1624, setembro 2011.

PARKS, S. A., HARCOURT, A. H. Reserve Size, Local Human Density, and Mammalian Extinctions in U.S. Protected Areas. **Conservation Biology**. v.16, n.3, p. 800–808, June 2002.

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, 2005.

PIRES, J.S.R. *et al.* Estrategia “Inter situ” de conservação: Elaboração de cenários regionais para conservação da biodiversidade. In: **Anais do V Simpósio de Ecossistemas Brasileiros: Conservação**. Vitória: ACIESP, 2000. v.1, p. 61-69.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–95, junho 2000.

PROBIO/SMA-SP. **Cerrado: Bases para Conservação e Uso Sustentável das Áreas de Cerrado do Estado de São Paulo**. São Paulo: SMA. 1997.

PRUGH, L. R.; RITLAND, C. E.; ARTHUR, M. A.; KREBS, C. J. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1585-1596, 2005.

PULLIAM, H. R. Sources, sinks, and population regulation. **The American Naturalist**, v. 132, n. 5, p. 652–661, novembro 1988.

QUIGLEY, H; HORNOCKER, M. Cougar Population Dynamics. In: **Cougar ecology and conservation**. Chicago: The University of Chicago Press. 2010. p. 59-75.

REED, J. E.; BAKER, R. J.; BALLARD, W. B.; KELLY, B. T. Differentiating Mexican gray wolf and coyote scats using DNA analysis. **Wildlife Society Bulletin**, v. 32, n.3, p. 685–692, 2004.

REYNOLDS, J.; WEIR, B. S.; COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: Basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v.105, n.3, p. 767-779, julho 1983.

RUANE, J; SONINNO, A. Marker-assisted selection as a tool for genetic improvement of crops, livestock, forestry and fish in developing countries: an overview of the issues. In: GUIMARÃES, E.; RUANE, J.; SCHERF, B.; SONNINO, A.; DARGIE, J. **Marker-assisted selection, current status and future perspectives in crops, livestock, forestry and fish**. Roma: FAO, 2007. pp 3 – 26.

SAMBROOK J, FRITSCH E. F, MANNIATS T. **Molecular cloning: A Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbour,1989.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. **Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Secretaria do Meio Ambiente. São Paulo: SMA, 2009. 648p.

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

SERVICE, S. *et al.* Magnitude and distribution of linkage disequilibrium in population isolates and implications for genome-wide association studies. **Nature Genetics**, v.38, p. 556-560, 2006.

SHAW, P. W.; PIERCE, G. J.; BOYLE, P. R. Subtle population structuring within a highly vagile marine invertebrate, the veined squid *Loligo forbesi*, demonstrated with microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, v.8, p. 407–417, 1999.

SILVA, D. Levantamento do meio físico das estações ecológica e experimental de Itirapina, São Paulo, Brasil. **Rev. Inst. Flor.** v.17, n.1, p. 113-128, junho 2005.

SILVEIRA, L. **Ecologia comparada e conservação da onça pintada (*Panthera onca*) e onça-parda (*Puma concolor*), no cerrado e pantanal.** 240. Tese (Doutorado em Biologia Animal). Universidade de Brasília. Brasília, 2004.

SOISALO, M.; CAVALCANTI, S. Estimating the density of a jaguar population in the Brazilian Pantanal using camera-traps and capture–recapture sampling in combination with GPS radio-telemetry. **Biological Conservation**, v.129, p. 487-496, 2006.

SLATKIN, M. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v.139, n.1, p. 457-462, janeiro 1995.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER, L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. **Heredity**, v.76, p. 377–383, 1996.

SPIEGELHALTER, J.; BEST, N. G.; CARLIN, B. P.; VAN DER LINDE, A.. Bayesian measures of model complexity and fit. **Journal of the Royal Statistical Society Series B**, v. 64, n. 4, p. 583–640, outubro 2002.

STENGLEIN, J.L.; DE BARBA, M.; AUSBAND, D. E., WAITS, L.P. Impacts of sampling location within a faeces on DNA quality in two carnivore species. **Molecular Ecology Resources**, v.10, n.1, p. 109-114, janeiro 2010.

STONER, D. C.; WOLFE, M. L.; CHOATE, D. M. Cougar Exploitation Levels in Utah: Implications for Demographic Structure, Population Recovery, and Metapopulation Dynamics. **Journal of Wildlife Management**, v.70, n.6, p. 1588-1600, 2006.

SUNQUIST M.; SUNQUIST F. **Wild Cats of the world**. 1 ed. Chicago: The University Chicago Press. 2002. 452 pp.

SWEANOR, L. L., LOGAN, K. A., HORNOCKER, M. G. Cougar dispersal patterns, metapopulation dynamics, and conservation. **Conservation Biology**, v. 14, n. 3, p. 798-808, junho 2000.

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

TABERLET, P.; LUIKART, G. Non-invasive genetic sampling and individual identification. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 68, p. 41-55, 1999.

TAMURA *et al.* MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution**, v.28, n.10, p. 2731–2739, maio 2011.

TANNUS, J.L.S.; ASSIS, M.A.; MORELLATO, L.P. Fenologia reprodutiva em campo sujo e campo úmido numa área de cerrado no sudeste do Brasil, Itirapina-SP. **Biota Neotropica**, v. 6, n.3. 2006. Disponível em: [www.scielo.br/scielo](http://www.scielo.br/scielo)

TEMPLETON, A. R. **Genética de populações e teoria microevolutiva**. Tradução de: Population genetics and microevolutionary theory. Ribeirão Preto: Editora SBG. 2011. 705 pp.

VALIÈRE, N. Gimlet: a computer program for analyzing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Notes**, v.2, p. 377–379, 2002.

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

VIDYA, T. N. C.; SUKUMAR, R. Amplification success and feasibility of using microsatellite loci amplified from dung to population genetic studies of the Asian elephant (*Elephas maximus*). **Current Science**, v. 88, n. 3, p. 489-492, abril 2005.

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. 249-256, janeiro 2001.

WAPLES, R. S. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. **Conservation Genetics**, v.7, p. 167-184, 2006.

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

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

WIEGAND, T.; REVILLA, E.; MONOLEY, K. A. Effects of habitat loss and fragmentation on population dynamics. **Conservation Biology**, v.19, n.1, p. 108 – 121, fevereiro 2005.

WOLTMANN, S.; SHERRY, T. W.; KREISER, B. R. A genetic approach to estimating natal dispersal distances and self-recruitment in resident rainforest birds. **J. Avian Biol.** v.43, p. 33–42, 2012.

YOUNG, S. P. History, life habits, economic status, and control, Part 1. In: Young S. P.; Goldman E. A. **The puma: Mysterious American cat**. Washington, D.C.: The American Wildlife Institute. 1946. p. 1–173.

ZANCHETTA, D. **Plano de manejo das unidades integradas de Itirapina SP. 1 rev.** São Paulo: Instituto Florestal de São Paulo. 2006.

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

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **Journal of Computational Biology**, v.7, n.1/2, p. 203-214, 2000.