

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

**NÚMERO MÍNIMO DE INDIVÍDUOS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE
ONÇA-PARDA (*Puma concolor*) NO NÚCLEO SANTA VIRGÍNIA,
PARQUE ESTADUAL DA SERRA DO MAR, SÃO PAULO.**

NIARA MARTINS

SÃO CARLOS, SP

2011

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

NÚMERO MÍNIMO DE INDIVÍDUOS E DIVERSIDADE GENÉTICA DE ONÇA-PARDA
(*Puma concolor*) NO NÚCLEO SANTA VIRGÍNIA, PARQUE ESTADUAL DA SERRA
DO MAR, SÃO PAULO.

NIARA MARTINS

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

Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior

SÃO CARLOS, SP

2011

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

M386nm

Martins, Niara.

Número mínimo de indivíduos e diversidade genética de onça-parda (*Puma concolor*) no Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo / Niara Martins. -- São Carlos : UFSCar, 2011.

63 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2011.

1. Conservação da natureza. 2. DNA mitocondrial. 3. Microssatélites. 4. DNA fecal. 5. Mata atlântica. I. Título.

CDD: 574.5 (20ª)

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

**Número Mínimo de Indivíduos e Diversidade Genética de
Onça-Parda (*Puma concolor*) no núcleo Santa Virgínia,
Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo**

Dissertação de Mestrado de NIARA MARTINS

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Prof. Dr. Ronaldo Gonçalves Morato

Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco



.....
.....
.....
Mercival Roberto Francisco

Dedico esse trabalho aos
meus pais, Donivaldo e Sueli,
e à minha avó Nadir.

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

Ao meu orientador, Professor Pedro Manoel Galetti Junior, pela oportunidade, confiança e orientação.

À Renata Miotto pela amizade, ajuda, orientação e por tudo o que me ensinou desde a iniciação científica até à etapa final desse mestrado.

À CAPES pela bolsa concedida.

Ao CENAP/ICMBio pelas amostras de sangue cedidas.

Ao pessoal do Laboratório de Biologia da Conservação, coordenado pelo Professor Mauro Galetti Rodrigues, da UNESP de Rio Claro, pelas amostras de fezes fornecidas e pela ajuda em campo.

Ao Marcio Henrique Bertazi pela paciência infinita ao me ajudar com os mapas, e à Carol Zanelli pelos desenhos das armadilhas.

Ao pessoal do laboratório por tornar o dia-a-dia mais agradável e pela disponibilidade incansável em ajudar, especialmente na fase final.

À Felfys pela companhia nas infundáveis extrações de DNA e, principalmente, pela amizade construída nesses dois anos de mestrado.

À Dany pela amizade, por suas "dicas únicas", pelos momentos sérios e mais ainda pelos divertidos!

À Ana Lúcia, à Eliana e à Carol por todo o suporte e amizade na etapa final.

A todos os meus amigos, sobretudo à Raquel, amiga e companheira de morada, e àqueles que estão distantes, porém sempre presentes.

Ao meu pequeno Lobo e ao gigante e desengonçado Beethoven pelo carinho desinteressado que só os cachorros conseguem dar.

À minha família e a todos que estiveram envolvidos nesse trabalho de alguma forma!

Por fim, às pessoas mais importantes da minha vida: meu irmão Ricardo, por todo o apoio e ajuda e pelas poucas, porém indispensáveis, conversas nos momentos difíceis; minha vó Nadir, meu suporte nesses anos todos, a casa pra qual eu voltava; minha mãe Sueli "*Sussuzinha linda*", sempre ao meu lado mesmo distante, e sempre disposta a estar por perto todas as vezes que precisei; e meu pai Donivaldo, que sempre me apoiou em tudo e cujos conselhos, críticas e cobranças me fazem crescer e amadurecer como pessoa. Enfim, aos dois pelos pais carinhosos e amigos que são.

OBRIGADA POR TUDO!

*Que é loucura: ser cavaleiro andante
ou segui-lo como escudeiro?
De nós dois, quem o louco verdadeiro?
O que, acordado, sonha doidamente?
O que, mesmo vendado,
vê o real e segue o sonho
de um doido pelas bruxas embruxado?
Eis-me, talvez, o único maluco,
e me sabendo tal, sem grão de siso,
sou – que doideira – um louco de júzo.*

("Disquisição na Insônia", Carlos Drummond de Andrade)

RESUMO

A onça-parda (*Puma concolor*) é a segunda maior espécie de felino do Brasil. Possui uma ampla distribuição pelo continente americano, ocorrendo desde o sudoeste do Canadá até o Estreito de Magalhães, no extremo sul da Argentina e do Chile, passando por todo o território brasileiro. Nesse estudo foi estimado o número mínimo de indivíduos e a diversidade genética da onça-parda a partir de DNA fecal, no Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar (PESM), São Paulo. Armadilhas de pelos também foram utilizadas para uma mais uma tentativa na obtenção de amostras. Para o diagnóstico da espécie foi amplificado um pequeno fragmento do gene citocromo b do DNA mitocondrial. Ao todo foram utilizados seis locos de microssatélites para a individualização das amostras de fezes, estimativa do número mínimo de indivíduos e caracterização genética da população. Nenhuma amostra de pelo foi obtida durante o estudo. Dentre as 40 amostras de fezes obtidas, 34 foram diagnosticadas com sucesso, sendo encontradas 25 amostras de *P. concolor*, oito de *Leopardus tigrinus* e uma de *Leopardus pardalis*. Os genótipos multilocos foram obtidos para apenas 15 amostras, pertencentes a 12 indivíduos diferentes de onça-parda. A taxa média de *allelic dropout* foi de 10,43%. A heterozigosidade média observada foi de 0,6202, inferior a encontrada para a espécie em áreas fragmentadas do Cerrado, na região nordeste do Estado de São Paulo. Houve desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para um dos locos e déficit de heterozigotos para o conjunto de locos utilizados. Contudo, não houve evidência de gargalo populacional recente. Dessa forma, o desvio no HWE pode ter sido causado pela presença de alelos nulos ou pelo baixo número de amostras. Pouca relação foi encontrada entre os indivíduos (6,1% de HS), indicando um possível fluxo contínuo de onças-pardas na região. Sendo assim, o PESM merece especial atenção por ser o maior remanescente contínuo da Mata Atlântica brasileira e, por isso, estudos similares são necessários nos demais Núcleos desse Parque para que juntos possam fornecer uma visão mais abrangente da situação da espécie *P. concolor* nesse bioma.

Palavras-chave: Conservação, microssatélite, DNA mitocondrial, DNA fecal, *Puma concolor*, Mata Atlântica.

ABSTRACT

The cougar (*Puma concolor*) is the second largest feline species in Brazil. It has a wide distribution across the Americas, occurring from southwestern Canada to the Strait of Magellan, in the extreme south of Argentina and Chile, throughout the Brazilian territory. In this study we estimated the minimum number of individuals and genetic diversity of cougars in the Santa Virginia Unit, Serra do Mar State Park (PESM), São Paulo, based on fecal DNA analysis. Hair snares were also used to an attempt to obtain more samples. For the diagnosis of the species, we amplified a 146bp fragment of the cytochrome b gene of mitochondrial DNA. We used six microsatellite *loci* for the fecal samples individualization, to estimate the minimum number of individuals and genetic characterization of the population. No hair sample was obtained during the study. Among the 40 fecal samples obtained, 34 were successfully diagnosed, and we found 25 samples of *P. concolor*, eight of *Leopardus tigrinus* and one of *Leopardus pardalis*. The *multiloci* genotypes were obtained for only 15 samples belonging to 12 different puma individuals. The allelic dropout average rate was 10.43%. The mean observed heterozygosity was 0.6202, lower than that found for the species in fragmented areas of Cerrado, in the northeastern São Paulo. There were deviations in Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) for one *locus* and a deficit of heterozygous for the set *loci* used. However, there was no evidence of recent population bottleneck. Therefore, the deviation in HWE could be caused by the presence of null alleles or the low number of samples. Little relationship was found between individuals (6.1% Half-Sibs), indicating a possible continuous stream of cougars in the region. Thus, the PESM deserves special attention for being the largest continuous remnant of Brazilian Atlantic Forest and, therefore, similar studies are needed in the others Units of this Park so that together they can provide a more comprehensive view of the *P. concolor* situation in this biome.

Keywords: Conservation; microsatellite; mitochondrial DNA; fecal DNA; *Puma concolor*; Atlantic Forest.

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Informações sobre as amostras de fezes coletadas em campo.	19
Tabela 02 – Informações sobre as armadilhas de pelos distribuídas no NSV.	20
Tabela 03 – Sequências <i>forward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites isolados para a onça-parda (<i>P. concolor</i>) (Kurushima <i>et al.</i> 2006).	24
Tabela 04 – Informações sobre os indivíduos de <i>P. concolor</i>	37
Tabela 05 – Características observadas para os locos de microssatélites utilizados.	37
Tabela 06 – Dados agrupados da diversidade genética observada no trabalho.	38
Tabela 07 – Valores de "p" para desequilíbrio de ligação.	39
Tabela 08 – Frequências de alelos nulos estimadas por diferentes métodos para os locos de microssatélites.	40
Tabela 09 – Valores de p para análise de gargalo populacional.	40

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Distribuição original da Mata Atlântica e seus remanescentes.	4
Figura 02 – Divisão do Parque Estadual da Serra do Mar nos oito Núcleos que o compõe.	5
Figura 03 – Onça-parda (<i>Puma concolor</i>).	7
Figura 04 – Distribuição atual de <i>P. concolor</i> pelas Américas.	9
Figura 05 – Mapa do Núcleo Santa Virginia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo.	16
Figura 06 – Armadilha de pelos descrita por Weaver <i>et al.</i> (2005).	17
Figura 07 – Desenho do primeiro modelo de armadilha de pelos instalado no NSV (A) e do segundo modelo (B).	18
Figura 08 - Mapa da distribuição das armadilhas de pelos no NSV (A). Armadilhas na base Itamambuca (B) e na base Vargem Grande (C).	21
Figura 09 – Reação de amplificação usando a cauda universal M13 marcada com fluorescência.	25
Figura 10 – Fotos das armadilhas de pelos distribuídas no NSV em julho de 2010. (A) Primeiro modelo de armadilha de pelos e o (B) segundo e definitivo modelo de armadilha de pelos.	30
Figura 11 – Árvore <i>neighbor-joining</i> das sequências de referência de citocromo b e das amostras de fezes analisadas, com <i>Panthera onca</i> como grupo externo.	31
Figura 12 – Fragmentos do citocromo b nos quais é possível observar os sítios de diferenciação entre as diferentes espécies de felinos Neotropicais.	33
Figura 13 – Sequência de exclusões das amostras de fezes de <i>P. concolor</i>	34
Figura 14 – Distribuição das amostras de fezes coletadas no NSV (A). Amostras de fezes coletadas em Itamambuca (B) e em Vargem Grande (C).	35
Figura 15 – Indivíduos de onça-parda no NSV (A). Indivíduos encontrados em Itamambuca (B) e em Vargem Grande (C).	36
Figura 16 – Distribuição da frequência alélica para cada loco, utilizada na escolha do modelo mutacional, e para o conjunto de locos utilizados.	63

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Mata Atlântica	2
1.1.1. Parque Estadual da Serra do Mar.....	4
1.1.2. Núcleo Santa Virgínia	6
1.2. A espécie <i>Puma concolor</i> (Linnaeus, 1771).....	7
1.3. Análises genéticas não invasivas	10
1.4. Marcadores moleculares.....	12
1.4.1. DNA mitocondrial.....	13
1.4.2. Microsatélites	13
2. OBJETIVOS	15
2.1. Objetivo geral.....	15
2.2. Objetivos específicos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1. Área do estudo	16
3.2. Obtenção das amostras	17
3.3. Extração de DNA.....	22
3.4. Diagnóstico da espécie	23
3.5. Individualização das amostras	23
3.6. Determinação do sexo	25
3.7. Análise dos resultados	26
4. RESULTADOS.....	30
5. DISCUSSÃO	41
6. CONCLUSÕES	48
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49
APÊNDICE A – Modelo mutacional para cada loco.....	63

1. INTRODUÇÃO

A Biologia da Conservação é uma ciência multidisciplinar que foi desenvolvida em resposta à crise com a qual a diversidade biológica se confronta atualmente (Soulé 1985). Ela possui dois objetivos: primeiro, entender os efeitos da atividade humana nas espécies, comunidades e ecossistemas; e, segundo, desenvolver abordagens práticas para prevenir a extinção de espécies e, se possível, reintegrar as espécies ameaçadas ao seu ecossistema funcional (Primack e Rodrigues 2008).

Dentro desses objetivos, a Biologia da Conservação busca melhorar a sobrevivência em longo prazo das espécies e dos ecossistemas dos quais elas dependem (Wayne e Morin 2004). Assim, seu foco é a proteção da biodiversidade biológica, a qual deve ser considerada em três níveis: (i) a diversidade de comunidades, que abrange a variação entre as comunidades biológicas, os ecossistemas e as interações entre esses níveis; (ii) a diversidade de espécies existentes; e (iii) a diversidade genética, a qual inclui a variação genética dentro as espécie (Primack e Rodrigues 2008).

Devido à diversidade genética, as populações naturais possuem a capacidade de se adaptarem às mudanças ambientais. Porém, com o atual ritmo de destruição, alteração e fragmentação de ambientes naturais causados pelo crescimento das atividades humanas, essas populações estão reduzindo sua habilidade de adaptação, ou mesmo perdendo-a por completo, levando-as à extinção (Frankham *et al.* 2008).

Nesse cenário surge a Genética da Conservação, a qual usa a teoria ecológica aliada às técnicas genéticas para reduzir o risco de extinção das espécies ameaçadas. Sua meta, então, é preservar em longo prazo as espécies como entidades dinâmicas, mantendo essa habilidade de adaptação às mudanças ambientais (Frankham *et al.* 2008).

As iniciativas de conservação e manejo de animais silvestres exigem informações sobre o seu tamanho populacional (Creel *et al.* 2003; Frantz *et al.* 2004), bem como informações sobre a estrutura genética das populações e como ela influencia no seu comportamento e demografia (Wayne e Morin 2004).

Desse modo, o primeiro passo para projetos de conservação é determinar a presença e a abundância dessas espécies, uma tarefa muito difícil quando se trata particularmente de grandes carnívoros como os felinos (Palomares *et al.* 2002), os quais vivem em baixas densidades e apresentam hábitos de difícil observação (Kohn e Wayne 1997; Palomares *et al.* 2002).

No passado, as técnicas utilizadas para estudar a ecologia dos grandes mamíferos eram geralmente invasivas, exigindo a captura e a manipulação dos animais (Gompper *et al.* 2006). Em relação aos estudos moleculares, os problemas eram semelhantes, apresentando dificuldades logísticas e éticas para a obtenção das amostras de tecidos ou sangue a partir das quais é possível a extração do DNA (Palomares *et al.* 2002; Vidya e Sukumar 2005).

Atualmente, o meio científico vem sofrendo pressões cada vez maiores para reduzir ou eliminar por completo a utilização desses métodos invasivos em estudos populacionais de intuito conservacionista (Taberlet e Luikart 1999). Assim, surgem as abordagens não invasivas, métodos muito promissores de monitoramento de populações ameaçadas, que evitam a perturbação e os possíveis danos causados pelo manuseio dos indivíduos (Sloane *et al.* 2000; Morin *et al.* 2001; Waits *et al.* 2001). Materiais como fezes, pelos, urina ou penas, restos deixados pelos animais de um modo geral, podem ser usados para a obtenção de DNA, permitindo acessar informações necessárias para identificar os diferentes indivíduos, estimar o tamanho populacional e estabelecer relações intra e interpopulacionais, informações úteis para o monitoramento ecológico e genético das populações de vida livre ameaçadas de extinção (Bellemain e Taberlet 2004).

1.1. Mata Atlântica

A Mata Atlântica, segunda maior floresta do continente americano, é considerada uma das grandes prioridades para a conservação da biodiversidade (Oliveira-Filho e Fontes 2000; Tabarelli *et al.* 2005; São Paulo 2008). Inicialmente, ela ocupava cerca de 150 milhões de hectares, porém mais de 88% da sua área foi perdido, restando apenas

11,7% da vegetação original, aproximadamente 16 milhões de hectares (Ribeiro *et al.* 2009).

Ela é reconhecida como um dos 25 *hotspots* mundiais e encontra-se entre os cinco mais importantes por possuir uma grande diversidade biológica e apresentar alto grau de endemismo (Myers *et al.* 2000). Possui aproximadamente 250 espécies de mamíferos, mais de mil espécies de aves, e cerca de 20 mil espécies de plantas vasculares, das quais 8 mil só ocorrem neste bioma (São Paulo 2009a).

O estado de conservação desse bioma brasileiro é considerado crítico (Villani 2007), devido ao forte impacto sofrido pela ação antrópica sob as formas de devastação florestal, exploração dos recursos naturais, poluição, ocupação humana desordenada, fragmentação e caça (Cullen *et al.* 2000; Gomiero *et al.* 2007, 2010). A maior parte das espécies de animais brasileiros ameaçada de extinção é originária dela, como os micos-leões, a lontra, a onça-pintada, o tatu-canastra e a arara-azul-pequena (São Paulo 2008). Essa condição altamente devastada e ameaçada torna urgente sua necessidade de conservação e restauração (São Paulo 2009a).

Os principais remanescentes da Mata Atlântica (Figura 01) concentram-se nos estados das regiões Sul e Sudeste, recobrando parte da Serra do Mar e da Serra da Mantiqueira (Gomiero e Braga 2007). O maior fragmento está localizado na Serra do Mar, a qual possui 36,5% da vegetação original, principalmente ao longo das montanhas costeiras do estado de São Paulo, estendendo-se do sul ao norte do estado até a fronteira com a parte sul do estado do Rio de Janeiro (Ribeiro *et al.* 2009).

As Unidades de Conservação da Mata Atlântica representam 14,4% da sua cobertura florestal remanescente, porém protegem apenas 9,3% dessa floresta, por incluir outros tipos de vegetação ou paisagem (Ribeiro *et al.* 2009). A Serra do Mar, por sua vez, representa 63% desse total sob proteção, e o Parque Estadual da Serra do Mar (PESM) é a maior Unidade de Conservação, possuindo a maior porção contínua dos remanescentes (Gomiero e Braga 2007; Ribeiro *et al.* 2009).

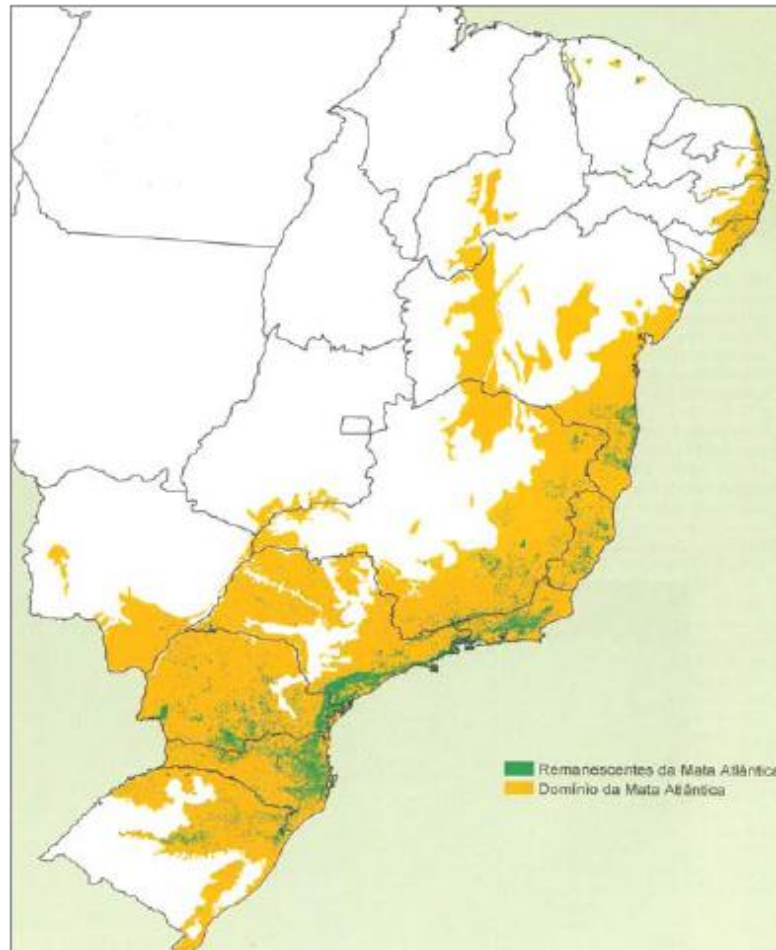


Figura 01 – Distribuição original da Mata Atlântica e seus remanescentes.

Fonte: São Paulo, Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar (2008).

1.1.1. Parque Estadual da Serra do Mar

O Parque Estadual da Serra do Mar é a maior área de proteção integral da Mata Atlântica brasileira (São Paulo 2009a). Criado em 30 de agosto de 1977, por meio do Decreto nº 10.251, seus 315.390 ha abrangem parte de 23 municípios, desde Ubatuba, na divisa com o estado do Rio de Janeiro, até Pedro de Toledo no litoral sul (Villani 2007). Situado na porção leste do estado de São Paulo, na escarpa da Serra do Mar, o Parque ocupa pequenas porções do planalto atlântico e planície costeira adjacentes, apresentando continuidade com as florestas remanescentes do litoral e do planalto fora de seus limites (São Paulo 2008).

Na divisa com o Rio de Janeiro, os limites do PESH encontram a orla marinha, sobrepondo-se em parte ao Parque Nacional da Serra da Bocaina, criado em 1971 (São Paulo 2008). Já na região sul, o PESH é conectado com a Estação Ecológica de Juréia-

Itatins e com o Parque Estadual do Jurupará por meio da Área de Proteção Ambiental (APA) Serra do Mar e da APA Federal Cananéia Iguape Peruíbe, que formam o contínuo florestal do Vale do Ribeira (São Paulo 2008). Desta forma, é possível concluir que o PESH constitui um verdadeiro corredor ecológico, conectando os mais significativos remanescentes de Mata Atlântica do país (Marques 2004).

O PESH é gerenciado por núcleos administrativos (Figura 02), uma divisão regional que facilita sua gestão devido à sua enorme extensão. Dos oito núcleos, três sedes estão no planalto: Cunha, Santa Virgínia e Curucutu, e cinco na região litorânea: Picinguaba, Caraguatatuba, São Sebastião, Itatinga-Pilões e Pedro de Toledo (São Paulo 2008). O Parque é cortado por 5 rodovias estaduais e um sem-número de estradas municipais, a exemplo do Núcleo Santa Virgínia cortado pela Rodovia Oswaldo Cruz (Marques 2004).

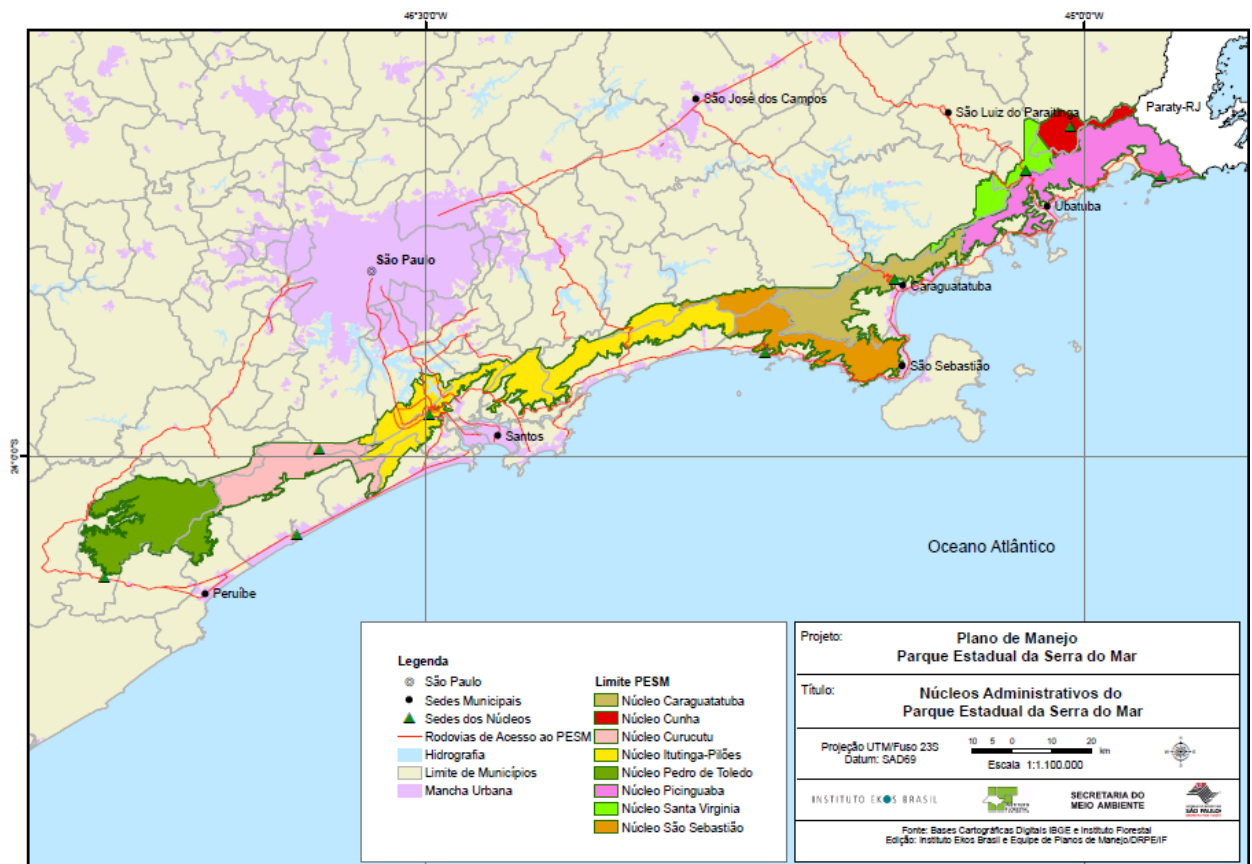


Figura 02 – Divisão do Parque Estadual da Serra do Mar nos oito Núcleos que o compõe.

Fonte: São Paulo, Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar (2008).

1.1.2. Núcleo Santa Virgínia

O Núcleo Santa Virgínia (NSV) foi criado em 02 de maio de 1989, pela desapropriação das fazendas Santa Virgínia e Ponte Alta. Situado em uma estreita faixa do planalto atlântico entre a costa e o Vale do Paraíba, possui uma área aproximada de 17.500 ha (São Paulo 2008), das quais 68% são de domínio público e 32% de áreas particulares (Fundação Florestal 2011). Dentre as áreas particulares há fazendas e sítios com atividades voltadas à pecuária, à silvicultura, à subsistência e ao lazer (Villani 2007).

No NSV há áreas alteradas utilizadas para pastagem e áreas moderadamente alteradas pela retirada de madeira e palmito ou plantio de eucalipto (Marques 2004). Assim, a área do Núcleo encontra-se na forma de mosaico, uma vez que é composta por áreas de floresta madura, pastagens, plantios de *Eucalyptus spp.* e florestas secundárias em diferentes idades de regeneração (Tabarelli e Mantovani 1997). As unidades que compõem esse mosaico representam um gradiente de regeneração entre a pastagem e a floresta madura (Tabarelli e Mantovani 1997).

Em relação à fauna, foram registradas 39 espécies de mamíferos, 41 espécies de anfíbios e sete de répteis na região do Núcleo. Algumas espécies de mamíferos encontradas são: a onça-pintada (*Panthera onca*) e a ariranha (*Pteronura brasiliensis*), as quais merecem atenção especial pela escassez de registros no Parque e por serem sensíveis à perturbação ambiental e à presença humana; a onça-parda (*Puma concolor*); a anta (*Tapirus terrestris*); o cateto (*Pecari tajacu*); a queixada (*Tayassu pecari*); e o veado (*Mazama bororo*) (São Paulo 2008).

Apesar de já haver alguns estudos realizados no NSV, eles ainda são insuficientes para revelar uma parte significativa da riqueza de mamíferos presente nesta região. Por ser a composição da comunidade de mamíferos muito importante como indicadora do estado de conservação do ambiente, torna-se necessário detectar a presença de espécies de vários níveis ecológicos, como os herbívoros, os dispersores de sementes e os predadores (São Paulo 2008).

1.2. Biologia e conservação de *Puma concolor* (Linnaeus, 1771)

A região Neotropical é habitada por dez espécies de felinos (Eizirik e Johnson 2006), das quais oito ocorrem no Brasil: jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Linnaeus 1758), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*, Schinz 1821), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, Schreber 1775), gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*, d'Orbigny e Gervais 1843), gato-palheiro (*Leopardus colocolo*, Molina 1810), gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*, E. Geoffroy 1803), onça-parda (*Puma concolor*, Linnaeus 1771) e onça-pintada (*Panthera onca*, Linnaeus 1758) (Oliveira e Cassaro 2005).

Dentre elas, a onça-parda (Figura 03) é a segunda maior espécie representante da família Felidae no país. É uma espécie predadora de topo de cadeias e teias alimentares, popularmente conhecida como onça-vermelha, suçuarana, leão-baio, puma ou leão-da-montanha. Possui um corpo longo e esguio com comprimento médio de 108 cm (cabeça e corpo) e uma longa cauda que pode chegar a 81,5 cm. O seu peso médio é de 39,2 kg, variando de 22,7 a 73,8 kg. Os filhotes nascem com manchas escuras que desaparecem com o seu crescimento, por volta dos 10 meses de idade. Já no adulto, a coloração é uniforme, alternando entre o marrom-acinzentado bem claro, mais comum em áreas abertas, e o marrom-avermelhado escuro, comum na região Norte do país (Oliveira e Cassaro 2005).



Figura 03 – Onça-parda (*Puma concolor*).

Fonte: Savana Diegues.

Os indivíduos dessa espécie vivem de 8 a 10 anos, podendo chegar aos 13 anos (Adani *et al.* 2005). Sweanor *et al.* (2000) dividem as onças-pardas em três amplas classes etárias: (i) filhotes dependentes de suas mães; (ii) subadultos independentes, mas que ainda não estão em idade reprodutiva; e (iii) adultos residentes que já possuem uma área de vida, na qual se reproduzem.

A sua dieta é bastante variada e quase que exclusivamente constituída de mamíferos (Oliveira e Cassaro 2005). Entre as presas citadas para *P. concolor* estão: capivaras, pacas, cotias, pequenos roedores, marsupiais, tatus, tamanduás-mirins, veados, queixadas, lebres nativas e exóticas, quatis e ouriços, além de teídeos, aves, como emas, peixes e insetos (Iriarte *et al.* 1990).

A onça-parda é um animal territorialista que têm o hábito de marcar o seu território depositando pequenos volumes de fezes em locais proeminentes como trilhas, rochas ou ninhos já desocupados (Chame 2003). Essa espécie possui hábito solitário, com maior atividade ao entardecer e à noite (Miranda 2003). Ela difere dos demais felinos solitários por apresentar um padrão de dispersão muito jovem, com poucas semanas após se tornar independente (Seidensticker *et al.* 1973 *apud* Schaller e Crawshaw 1980), sendo que o mais longo movimento de dispersão observado para machos de onça-parda foi de 700 km (Logan e Sweanor 2001).

De acordo com Oliveira e Cassaro (2005), a área de vida da onça-parda na América tropical varia entre 56 e 155 km². Para as onças-pardas da América do Norte, Sweanor *et al.* (2000) encontraram uma área de vida que varia de 73,5 km² a 187,1 km², para fêmeas e machos, respectivamente. Apesar de reduzido, o tamanho da área de vida da fêmea deve ser satisfatoriamente grande para fornecer presas suficientes para elas e para os seus filhotes (Anderson *et al.* 2004).

Em relação a sua ampla distribuição pelo continente Americano (Figura 04), a onça-parda ocorre desde o sudoeste do Canadá até o Estreito de Magalhães, no extremo sul da Argentina e do Chile (Miranda 2003). No Brasil, está presente em todo o território, sendo seus habitats os mais variados, incluindo florestas tropicais e subtropicais,

caatinga, cerrado e pantanal, tanto em áreas primárias quanto secundárias (Oliveira e Cassaro 2005).



Figura 04 – Distribuição atual de *P. concolor* pelas Américas.

Fonte: modificado de IUCN (2008).

Apesar da onça-parda, quando comparada à onça-pintada, apresentar certa plasticidade na ocupação de hábitat alterado, a degradação de seus hábitats e a consequente perda de suas presas naturais tem restringido estes grandes predadores a uma fração de suas áreas de ocorrência original (Cavalcanti 2003; Adani *et al.* 2005). Outro fator de impacto para a espécie está relacionado ao hábito de usar áreas abertas para locomoção, tornando-os mais fáceis para captura ou morte, além de vítimas de atropelamento (Verdade e Campos 2004).

Além disso, houve um aumento no número de conflitos entre as onças-pardas e os humanos devido à predação de criação doméstica. Isso é especialmente verdade em regiões como o estado de São Paulo, uma das áreas mais desenvolvidas do Brasil e, ao mesmo tempo, a que abriga uma das maiores porções de remanescentes da Mata Atlântica (Verdade e Campos 2004).

A IUCN (2008) enquadra a espécie *P. concolor* na categoria pouco preocupante (LC), devido à sua ampla distribuição territorial. No Brasil (Brasil 2008), bem como no estado de São Paulo (São Paulo 2009b), a onça-parda é classificada como vulnerável (VU), em função da perda e fragmentação do seu hábitat.

O grau de ameaça e a importância ecológica da espécie como espécie guarda-chuva tornam, portanto, evidente a necessidade de se incluir informações sobre esse mamífero terrestre de grande porte em inventários e diagnósticos ambientais (Pardini *et al.* 2003).

Como os felinos são animais de difícil observação, geralmente ocorrem em baixa densidade populacional ($<1/10 \text{ km}^2$) e sua captura é difícil e de alto custo, eles representam um grupo apropriado para estudos com amostras não invasivas (Ernest *et al.* 2000; Downey *et al.* 2007).

Dessa forma, o emprego da metodologia não invasiva tem aumentado em projetos de pesquisa sobre a *P.concolor*, uma vez que permite a individualização e caracterização genética dos animais e corrobora com o propósito da conservação.

1.3. Análises genéticas não invasivas aplicadas à conservação

Há aproximadamente 50 anos, os animais eram frequentemente mortos para a realização dos estudos científicos. Os cientistas foram pressionados a evitar esse tipo de abordagem invasiva e estimulados a desenvolver e utilizar novas técnicas de amostragem que não fossem agressivas (Taberlet e Luikart 1999). Somada a essa pressão, havia também a dificuldade de observação e de captura de indivíduos em estudos com grandes carnívoros (Foran *et al.* 1997).

Assim, surgiu um novo método de amostragem que utiliza materiais coletados de forma não invasiva como pelos soltos, fezes, ossos ou regurgito, que não exigem a captura dos animais para a sua obtenção (Taberlet e Luikart 1999; Morin *et al.* 2001; Creel *et al.* 2003). Além disso, esse método é uma alternativa atraente por requerer menos habilidade, tempo e dinheiro do que a coleta de amostras de sangue ou biopsia de tecido (Goossens *et al.* 1998; Downey *et al.* 2007).

Dentre os materiais não invasivos as fezes são particularmente interessantes, uma vez que todos os animais defecam regularmente (Fernando *et al.* 2003) e a sua presença indica a presença do animal na área (Pires e Fernandes 2003). Elas também são úteis, porque podem fornecer informações sobre a biologia comportamental, o tamanho populacional, a área de vida, o tamanho territorial, a dieta e as doenças (Kohn e Wayne 1997).

A partir das fezes é possível a extração de DNA (Taberlet *et al.* 1993; Gagneux *et al.* 1997), o qual está presente nas células epiteliais descartadas durante a passagem pelo intestino (Kohn e Wayne 1997). Porém, a quantidade e qualidade do DNA obtido podem variar com o estado fisiológico do indivíduo amostrado, da dieta e do sistema digestivo da espécie (Fernando *et al.* 2003).

Embora geralmente produzam quantidades pequenas e de baixa qualidade de DNA (Goossens *et al.* 1998), as amostras não invasivas podem ser usadas para a análise da variação genética individual (Mowat e Paetkau 2002) como uma ferramenta poderosa para responder questões sobre a diversidade genética, parentesco e relações populacionais (Sunnucks 2000).

Nas duas últimas décadas, vários estudos populacionais foram desenvolvidos utilizando técnicas moleculares a partir de amostras não invasivas de fezes e pelos, como em trabalhos com: chimpanzés (*Pan troglodytes verus*) (Gagneux *et al.* 1997; Bradley *et al.* 2000, 2001); ursos (*Ursus arctos*) (Taberlet *et al.* 1997; Roon *et al.* 2005); wombats (*Lasiorninus krefftii*) (Sloane *et al.* 2000); gorilas (*Gorilla gorilla*) (Bradley *et al.* 2000, 2001); lincos ibéricos (*Lynx pardinus*) (Palomares *et al.* 2002; Pires e Fernandes 2003); elefantes africanos (*Loxodonta cyclotis*) (Eggert *et al.* 2003); jaguatiricas (*Leopardus*

pardalis) (Weaver *et al.* 2005); leões marinhos (*Eumetopias jubatus*) (Deagle *et al.* 2005); onças-pardas (*P. concolor*) (Miotto *et al.* 2007a, 2011a, 2011b); leopardos-da-neve (*Panthera uncia*) (Janečka *et al.* 2008); tigres (*Panthera tigris*) (Mondol *et al.* 2009); lêmures (*Propithecus tattersalli*) (Quéméré *et al.* 2010); e lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) (Ramalho 2011).

1.4. Marcadores moleculares

O estudo da variabilidade genética permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes (Solé-Cava 2001) e os marcadores moleculares têm sido muito úteis para esses fins.

Nos anos 80 foi desenvolvida a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Taberlet e Luikart 1999) e com ela surgiram novas ferramentas moleculares que permitiram os estudos genéticos das populações (Sunnucks 2000). O RAPD (*Randon Amplified Polymorphic DNA*), os minissatélites (VNTR – *Variable Number of Tandem Repeats*) e os microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*) são alguns exemplos de marcadores moleculares disponíveis para esses estudos populacionais (Ferreira e Gratapaglia 1995).

O mais importante, do ponto de vista da Genética de Conservação, é o fato dos marcadores moleculares diferentes possuírem taxas de substituição/evolução diferentes, o que possibilita a escolha correta do marcador de acordo com o que se quer estudar, seja solucionar problemas de identificação de indivíduos à identificar espécies crípticas ou formular hipóteses filogenéticas em grupos supraespecíficos (Solé-Cava 2001). Dessa forma, cada vez mais os marcadores moleculares são utilizados em investigações sobre o grau de polimorfismo genético presente nas populações naturais, servindo como base para a compreensão de fenômenos evolutivos, demográficos ou ecológicos (Eizirik 1996), bem como para a identificação de indivíduos desconhecidos, suas relações de parentesco e o papel desses indivíduos na população (Haig 1998). A partir da análise dos dados obtidos utilizando-se essas ferramentas moleculares, também é possível estabelecer a

existência e o nível das relações entre as populações, além das diferenças entre as espécies (Haig 1998).

Para o estudo de indivíduos, famílias e populações, os melhores marcadores são aqueles que evoluem rapidamente, enquanto que os que evoluem mais lentamente são melhores utilizados no estudo de espécies ou taxa supraespecíficos (Solé-Cava 2001).

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados atualmente estão as sequências de DNA mitocondrial (mtDNA) e os microssatélites, ambos considerados de grande eficiência em estudos de conservação (Eizirik 1996).

1.4.1. DNA mitocondrial

O mtDNA é uma pequena molécula de DNA circular, haplóide, de herança uniparental materna, na maioria das vezes, e relativamente abundante no genoma eucarioto (Sunnucks 2000; Frankham *et al.* 2008).

A ausência de recombinação associada à alta taxa de evolução e ao alto polimorfismo de algumas de suas porções entre espécies distintas, torna o mtDNA um marcador ideal para se investigar a diferenciação entre espécies intimamente relacionadas (Perez-Sweeney *et al.* 2003; Frankham *et al.* 2008).

Muitos trabalhos utilizam o mtDNA para identificação da espécie de origem de amostras não invasivas (Foran *et al.* 1997; Murphy *et al.* 2003; Reed *et al.* 2004; Miotto *et al.* 2007a; Haag *et al.* 2009), tornando-o uma ferramenta importante para a genética da conservação (Mills *et al.* 2000).

Mesmo pequenas sequências podem revelar o diagnóstico entre as espécies de carnívoros (Farrell *et al.* 2000). O gene citocromo b, do mtDNA, apresenta moderada variação interespecífica, sendo o mais indicado para a identificação das espécies (Johns e Avise 1998; Kohn e Wayne 1997).

1.4.2. Microssatélites

Os microssatélites foram detectados nos eucariotos há mais de 15 anos, embora tenham sido considerados como sequências de pouco interesse na época. Com o

surgimento da PCR, percebeu-se que esses poderiam ser os marcadores mendelianos mais poderosos já descobertos (Jarne e Lagoda 1996).

Eles consistem em pequenas sequências de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento (CA, CAAC, ou GGAACC), repetidas lado a lado, ou em tandem (Ferreira e Grattapaglia 1995). São abundantes no genoma nuclear de eucariotos (Weber e Wong 1993) e apresentam herança codominante, em que cada um dos alelos de um loco de um indivíduo pode ser identificado separadamente (Sunnucks 2000; Oliveira *et al.* 2006). Possuem também altas taxas de mutação (Jarne e Lagoda 1996), exibindo alto grau de polimorfismo (Culver *et al.* 2001).

Os microssatélites não são regularmente distribuídos no genoma, havendo diferenças na sua distribuição em regiões não-codificadoras e codificadoras (Arcot *et al.* 1995; Wilder e Hollocher 2001). Mesmo sendo encontrados em regiões codificadoras do genoma (Sutherland e Richards 1995) é esperada uma baixa densidade de microssatélites nessas regiões, caso contrário elas seriam significativamente alteradas, levando a perda de funções (Oliveira *et al.* 2006).

Esse marcador molecular é muito usado para determinar a variação genética, a estrutura populacional, o fluxo gênico e as relações de parentesco nas populações (Vidya e Sukumar 2005). O grande número de locos variáveis encontrados nos microssatélites aumenta o detalhamento com o qual as populações podem ser descritas e diferenciadas (Haig 1998).

Os microssatélites apresentam-se como uma poderosa ferramenta usada para testar a variedade de hipóteses ecológicas e evolutivas em populações de vida livre (Dewoody *et al.* 2006). Eles se tornaram parte do kit de ferramentas dos geneticistas da conservação, rotineiramente usados para acessar níveis de variabilidade genética em pequenas e ameaçadas populações de espécies silvestres (Lorenzini *et al.* 2004). Juntamente com o uso de amostras não invasivas, estes marcadores se tornaram imprescindíveis para estudos de genética populacional, importante área da Genética da Conservação (Cornuet e Luikart 1996; Pritchard *et al.* 2000; Lorenzini *et al.* 2004).

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi realizar um estudo demográfico, estimando o número mínimo de indivíduos da espécie *Puma concolor* presente no Núcleo Santa Virgínia, localizado no Parque Estadual da Serra do Mar, estado de São Paulo; e a diversidade genética dessa espécie, a partir da análise de DNA obtido em fezes e pelos coletados em campo.

2.2. Objetivos específicos

- Realizar o diagnóstico da espécie de origem das amostras de fezes e pelos;
- Estimar o número mínimo de indivíduos através da individualização das amostras fecais e de pelos, utilizando para isso um painel multilocos de *primers* de microssatélite descritos por Kurushima *et al.* (2006) especificamente para *P. concolor*;
- Caracterizar a variação genética da população utilizando esses mesmos *primers* de microssatélites específicos;
- Determinar o sexo dos indivíduos; e
- Identificar as relações de parentesco entre os seus pares.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Área do estudo

O Núcleo Santa Virgínia (coordenadas entre 23°17'-23°24'S e 45°03'- 45°11'W) possui área aproximada de 17.500 ha, inserida na região conhecida como Vale do Paraíba, abrangendo os municípios paulistas de São Luiz do Paraitinga, Natividade da Serra, Cunha e Ubatuba (São Paulo 2008) (Figura 05).

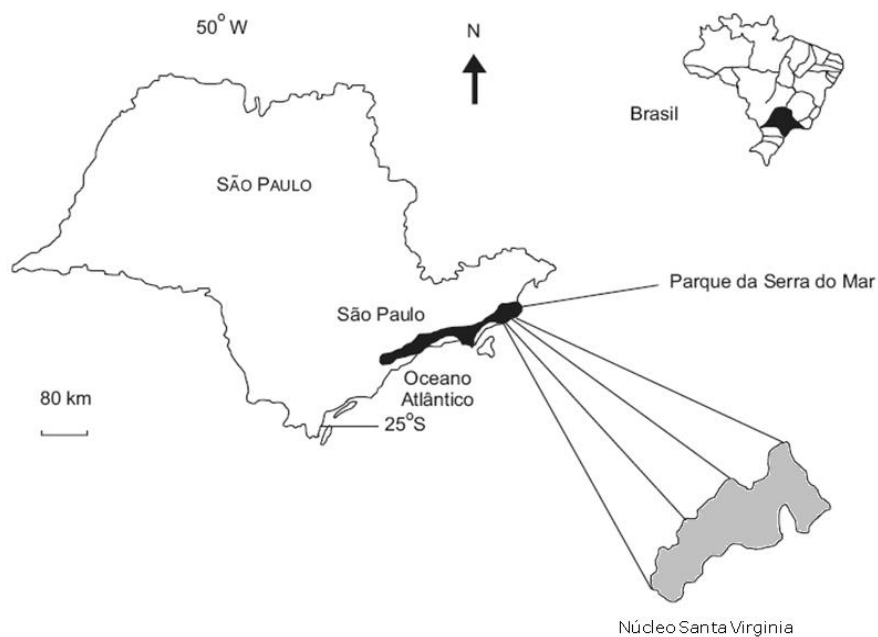


Figura 05 – Mapa do Núcleo Santa Virgínia, Parque Estadual da Serra do Mar, São Paulo.
Fonte: modificado de Tabarelli e Mantovani (1999).

A vegetação da área é classificada como Floresta Ombrófila Densa Montana ou Alto Montana (Veloso *et al.* 1991), caracterizada por mosaicos, onde 60% das áreas é composta por florestas primitivas ou pouco antropizadas e o restante por campo limpo, campo sujo, capoeira, capoeirão, floresta secundária e reflorestamento de eucalipto (Tabarelli *et al.* 1994). Os tipos de solos predominantes na região são Latossolo Vermelho-Amarelo, Cambissolo e Litólico (Radambrasil 1983 *apud* Medeiros 2009).

O NSV possui três bases administrativas, sendo que sua sede está localizada na base Itamambuca (Fundação Florestal 2011).

3.2. Obtenção das amostras

Quarenta amostras de fezes, supostamente de felinos, (Tabela 01) foram fornecidas pelo grupo do Laboratório de Biologia da Conservação, coordenado pelo Professor Doutor Mauro Galetti Rodrigues, da UNESP de Rio Claro (Universidade Estadual Paulista, campus de Rio Claro). Elas foram coletadas de modo aleatório percorrendo trilhas e estradas já existentes no NSV e no Parque Estadual Turístico do Alto Ribeira (PETAR), entre os meses de junho a setembro de 2007.

Adicionalmente, para a obtenção de novas amostras, foram distribuídas 20 armadilhas de pelos adaptadas das descritas por Weaver *et al.* (2005) no NSV e testadas anteriormente por Martins (2009) (Figura 06 e Tabela 02). Para a atração dos animais às armadilhas foi utilizada canela em pó, cujo efeito atrativo foi avaliado anteriormente por (Martins 2009).



Figura 06 – Armadilha de pelos descrita por Weaver *et al.* (2005).

Foram instalados em campo dois modelos diferentes de armadilhas de pelos. O primeiro, instalado em junho de 2010 apenas na base Itamambuca, era formado por uma placa de velcro fêmea de 25 cm x 20 cm composta de quatro fitas de velcro de 25 cm x 5 cm. Sobrepondo-se às fitas de velcro fêmea foram colocadas duas fitas adesivas de mesma medida, como mostra a Figura 07. As armadilhas montadas foram grampeadas nos troncos das árvores ao longo das trilhas com o auxílio de um

grampeador automático. Sobre as armadilhas já grampeadas foi polvilhada a canela em pó em quantidade suficiente para deixar um forte odor.

O segundo modelo foi distribuído em julho de 2010 nas duas bases pertencentes ao NSV (Itamambuca e Vargem Grande), substituindo as armadilhas do modelo anterior, sendo mantido em campo até dezembro de 2010. Este segundo tipo de armadilha de pelos era composto por uma placa de velcro fêmea de 20 cm x 20 cm, composta de quatro fitas de velcro fêmea de 20 cm x 5 cm. No centro dessa placa foi grampeado um pedaço de feltro de 15 cm x 15 cm, no qual foram grampeados dois pedaços de 2,5 cm x 15 cm de velcro macho (Figura 07). Do mesmo modo do modelo anterior, a canela em pó foi polvilhada sobre as armadilhas já montadas e devidamente grampeadas nos troncos das árvores.

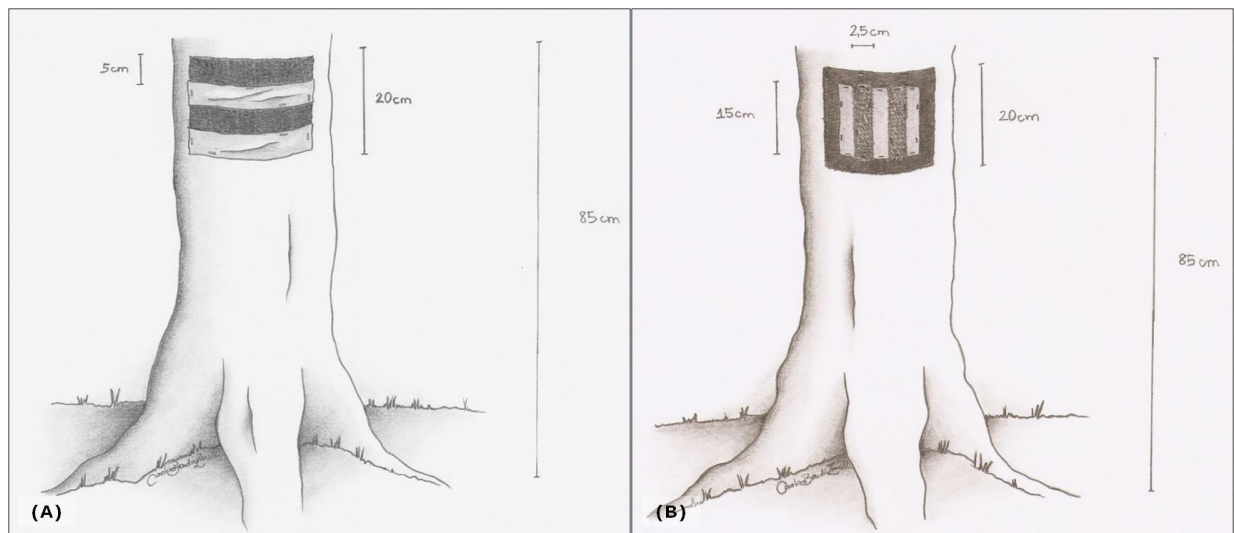


Figura 07 – Desenho do primeiro modelo de armadilha de pelos instalado no NSV (A) e do segundo modelo (B).

Fonte: Carolina Brandão Zanelli.

No total foram instaladas 20 armadilhas em duas das três bases que constituem o NSV (Tabela 02). Dez armadilhas foram distribuídas pelas trilhas de Itamambuca da seguinte forma: três na Pau de Bala, três na Rio do Veado e quatro na Itamambuca-Cunha. As dez restantes foram instaladas em Vargem Grande, distribuídas também em três trilhas: Garcêz, Cachoeira da Boneca e Corcovado (duas, três e cinco armadilhas, respectivamente) (Figura 08).

Tabela 01 – Informações sobre as amostras de fezes coletadas em campo.

amostra	data	local de coleta / trilha	GPS
1	21/7/2007	NSV - ITA	23K 0487321 / 7420768
2	21/7/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23K 0478777 / 7408640
3	21/7/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23K 0479434 / 7409324
4	23/8/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23 k 0478575 / 7408601
5	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 k 0478425 / 7408516
6	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0477800 / 7408482
7	25/8/2007	NSV - ITA / Itamambuca-Cunha	23 k 0491716 / 7421796
8	26/8/2007	NSV - ITA	23 k 0491401 / 7421092
9	23/8/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23 k 0478954 / 7408792
10	---	---	---
11	---	---	---
12	---	---	---
13	17/6/2007	PETAR - NC / Estrada do Monjolinho	22J 0743366 / 7292952
14	16/6/2007	PETAR - NC / Monjolinho	---
15	18/6/2007	PETAR - NC / Estrada Parque	22J 0746399 / 7298105
16	16/6/2007	PETAR - NC / Monjolinho	22J 0743392 / 7292661
17	16/6/2007	PETAR - NC / Monjolinho	---
18	27/9/2007	NSV - VG / Corcovado	23 k 0477706 / 7408335
19	27/9/2007	NSV - VG / Corcovado	23 k 0477808 / 7408491
20	11/6/2007	NSV - VG / Corcovado	---
21	---	---	---
22	20/7/2007	NSV - VG / Corcovado	23K 0476722 / 7408377
23	21/7/2007	NSV - VG / Corcovado	23K 0477678 / 7408286
24	21/7/2007	NSV - VG / Corcovado	23K 0477769 / 7408366
25	22/7/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23k 0478777 / 7408640
26	22/7/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23k 0478777 / 7408641
27	21/7/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23K 0479425 / 7409328
28	23/8/2007	NSV - VG / Cachoeira da Boneca	23 K 0478862 / 7408741
29	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0478404 / 7408485
30	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0478397 / 7408472
31	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0478003 / 7408308
32	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0477820 / 7408486
33	22/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0477810 / 7408493
34	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0477799 / 7408486
35	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0477773 / 7408461
36	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 K 0476567 / 7408359
37	23/8/2007	NSV - VG / Corcovado	23 k 0475504 / 7408059
38	23/8/2007	NSV - VG / Garcêz	23 k 0475458 / 7408047
39	23/8/2007	NSV - VG / Garcêz	23 k 0475211 / 7408063
40	24/8/2007	NSV - VG / Garcêz	23 k 0475546 / 7408040

(NSV) Núcleo Santa Virgínia; (NC) Núcleo Caboclos; (VG) Vargem Grande; (ITA) Itamambuca.

Tabela 02 – Informações sobre as armadilhas de pelos distribuídas no NSV.

armadilha	base / trilha	data	GPS
1	ITA/ Pau de Bala	30.06.2010	23K 0490298 / 7420800
2	ITA/ Pau de Bala	30.06.2010	23K 0490233 / 7420815
3	ITA/ Pau de Bala	30.06.2010	23K 0490264 / 7420834
4	ITA / Rio do Veado	30.06.2010	23K 0491138 / 7421646
5	ITA / Rio do Veado	30.06.2010	23K 0491025 / 7421517
6	ITA / Rio do Veado	30.06.2010	23K 0491425 / 7421093
7	ITA / Itamambuca-Cunha	30.06.2010	23K 0491601 / 7421551
8	ITA / Itamambuca-Cunha	30.06.2010	23K 0491862 / 7421929
9	ITA / Itamambuca-Cunha	30.06.2010	23K 0492637 / 7422114
10	ITA / Itamambuca-Cunha	30.06.2010	23K 0492211 / 7422129
11	VG / Corcovado	05.07.2010	23K 0475396 / 7408067
12	VG / Garcêz	05.07.2010	23K 0475648 / 7407697
13	VG / Garcêz	05.07.2010	23K 0475729 / 7408052
14	VG / Corcovado	05.07.2010	23K 0476508 / 7408240
15	VG / Corcovado	05.07.2010	23K 0477691 / 7408273
16	VG / Corcovado	05.07.2010	23K 0478411 / 7408479
17	VG / Corcovado	05.07.2010	23K 0478800 / 7408321
18	VG / Cachoeira da Boneca	05.07.2010	23K 0479153 / 7408880
19	VG / Cachoeira da Boneca	05.07.2010	23K 0479328 / 7409141
20	VG / Cachoeira da Boneca	05.07.2010	23K 0479470 / 7409262

(ITA) Itamambuca^{*}; (VG) Vargem Grande.

(*) A data da instalação das armadilhas de Itamambuca corresponde à data da substituição do primeiro modelo pelo segundo modelo de armadilhas de pelos.

As armadilhas ficaram em campo de julho a dezembro de 2010 e as visitas ocorreram a cada quinze dias para verificar a presença de amostras de pelos, conseqüente coleta dos mesmos e reposição da canela.

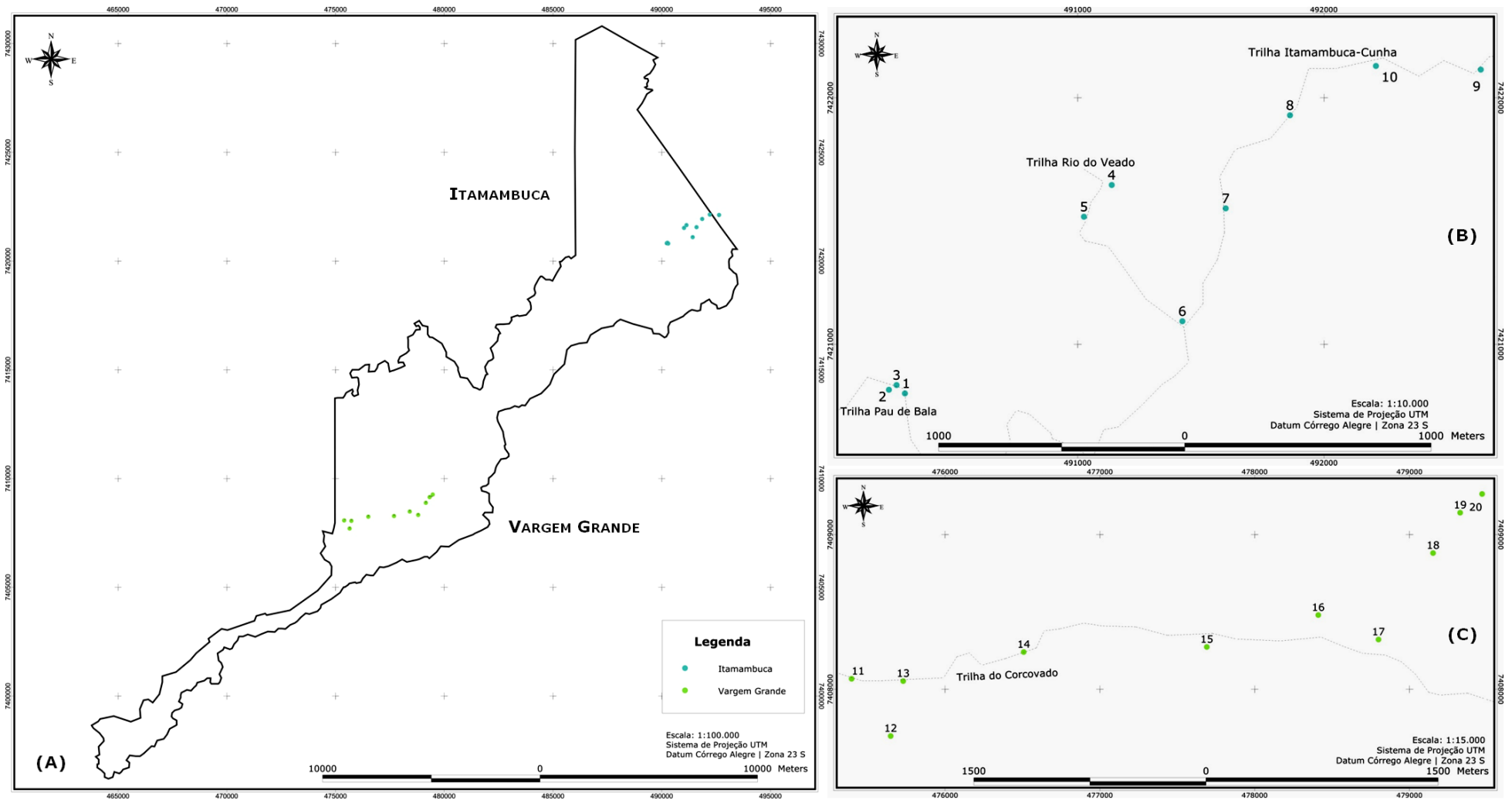


Figura 08 - Mapa da distribuição das armadilhas de pelos no NSV (A). Armadilhas na base Itamambuca (B) e na base Vargem Grande (C).

Fonte: Marcio Henrique Bertazi.

3.3. Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de fezes foi realizada a partir do *kit* de extração "PSP® Spin Stool DNA Kit" (Invitex), desenvolvido para esse tipo de material.

Protocolo:

1. Colocar 200-400 µL da amostra armazenada* no 2,0 mL Safe-Lock-Tube. Adicionar 1,2 mL de Lysis Buffer P em cada amostra armazenada. Vortexar vigorosamente por um minuto. Incubar a amostra por 15 minutos a 95°C agitando constantemente. Centrifugar a amostra a 13200 rpm (rotações por minuto) por dois minutos.

* Amostra líquida obtida do seguinte modo: adicionar álcool 100% às amostras sólidas e vortexar para obter um líquido homogêneo que deve ser transferido para um novo tubo de 1,5 mL. Repetir o procedimento até obter o volume necessário (500-1000 µL).

2. Transferir o sobrenadante para o InviAdsorb-Tube e vortexar vigorosamente por 15 segundos. Incubar a suspensão por um minuto à temperatura ambiente. Centrifugar a amostra a 13200 rpm por seis minutos.

3. Transferir o sobrenadante completamente para um novo tubo de 1,5 mL e descartar o pellet. Centrifugar a amostra a 13200 rpm por seis minutos.

4. Pipetar 25 µL de Proteinase K em um novo tubo de 1,5 mL e transferir 400 µL do sobrenadante do passo 3 para o tubo de 1,5 mL contendo a Proteinase K, vortexar rapidamente e incubar a amostra por 15 minutos a 70°C agitando constantemente.

5. Adicionar 400 µL de Binding Buffer P na mistura do passo 4 e vortexar rapidamente ou pipetar para cima e para baixo várias vezes.

6. Colocar o Spin Filter no 2,0 mL Receiver Tube e transferir toda a mistura para o Spin Filter. Incubar por um minuto à temperatura ambiente e centrifugar a 12000 rpm por 90 segundos. Descartar o filtrado.

7. Adicionar 500 µL do Wash Buffer I para o Spin Filter e centrifugar a 12000 rpm por 90 segundos. Descartar o filtrado.

8. Adicionar 800 µL do Wash Buffer II para o Spin Filter e centrifugar a 12000 rpm por 90 segundos. Descartar o filtrado.

9. Para remover o etanol centrifugar a 13200 rpm por três minutos.
10. Colocar o Spin Filter em um novo 1,5 mL Receiver Tube e adicionar 100-200 µL pré aquecidos (70°C) do Elution Buffer D. Incubar por sete minutos. Centrifugar a 8000 rpm por dois minutos para eluir o DNA. Finalmente descartar o Spin Filter.
11. Armazenar o DNA a -20°C.

3.4. Diagnóstico da espécie

A espécie de origem das amostras de fezes coletadas foi identificada por amplificação de um fragmento específico de 146 pb do gene citocromo b do genoma mitocondrial por meio da PCR utilizando um par de *primers* (5'-AAA CTG CAG CCC CTC AG AAT GAT ATT TGT CCT CA-3', 5'-ATT CTT TAT CTG CCT ATA CAT RCA CG-3') descritos por Farrell *et al.* (2000). Esse procedimento teve como objetivo encontrar sítios de diferenciação entre as espécies que fossem característicos para cada uma.

Cada PCR (25 µL) continha 12,5 µL de *GoTaq* (Promega) - tampão *Buffer* 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, uma unidade de *Taq* DNA polimerase - 3 pmol do *primer forward*, 3 pmol do *primer reverse*, 150 µg/mL de BSA, 5 mM de MgCl₂ e 6,5 µL de DNA. Todas as reações de amplificação seguiram a seguinte programação: um ciclo inicial de desnaturação à 95°C por cinco minutos; 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 49°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos; extensão final de 20 minutos à 72°C. Após as reações, os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 1,0%.

As amostras foram purificadas utilizando o método de precipitação de polietileno glicol (PEG) proposto por Lis (1980) e os produtos de PCR foram quantificados em gel de agarose 1,0% com o auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Todas as reações de sequenciamento foram realizadas em sequenciador automático *ABI3730XL* (Applied Biosystems) pela empresa Macrogen Inc (Coréia do Sul).

3.5. Individualização das amostras

A individualização das amostras por microsatélites foi realizada apenas para as amostras de *P. concolor* a partir de um painel de oito pares de *primers* de

microssatélites, sendo sete dinucleotídeos e um tetranucleotídeo (Tabela 03) desenvolvidos para a espécie por Kurushima *et al.* (2006).

Tabela 03 – Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* de microssatélites isolados para a onça-parda (*P. concolor*) (Kurushima *et al.* 2006).

Primer	Tamanho do fragmento (pb)	Sequências	
		Forward	Reverse
PcoA106	237 – 257	GTTGGAAGGTCACAAAGTCCT	gttcttCACAAGGTCTGGTTCTACAGTGT
PcoA208	180 – 200	TGGCAGCTTTAGTGGAAAGAC	CCCTATTAATAACCGCCTCACT
PcoA216	240 – 260	CTTGGCTCCTTGAATGTGATC	GCTGTGTGACTGTAAGCAGGTTA
PcoA339	259 – 277	AGTGGCAAACCTTTCTGGGT	gttcttGCCTCCCTCTGAAGTGCATAT
PcoB003	263 – 289	CCTCAGGTTCTTGTCTGTAAA	gttcttCAGTCCTAACAGGGACGTGTAC
PcoB010	201 – 229	TACGGAAAGGTACTGGCAACT	gttcttCCTGGTAATAGAGGCAGGTGT
PcoB210	157 – 185	CTTGGGATGTCTCATGTGGTT	CATCTTGGTGTGATCCTCTAGTC
PcoC108	117 – 141	CCCCTGCTTTGAAAAACTCTC	CCTGTTCTCCAACCTACAGATAGC

Para a realização das genotipagens dos locos microssatélites em sequenciador automático foi utilizado o procedimento proposto por Schuelke (2000), em que uma “cauda” universal de 18 pares de bases é adicionada na posição 5’ das sequências *forward* dos primers. De mesma sequência e marcado com fluorescência, é adicionado à reação um *primer* universal M13, incorporado ao produto de PCR nos ciclos subsequentes da reação (Figura 09).

Cada 15 µL de PCR continha tampão *Buffer* 1x, 0,20 mM de dNTPs, 2,0 mM de MgCl₂, 2,0 pmol do *primer forward*, 8,0 pmol do *primer reverse*, 8,0 pmol da sequência M13 (Shuelke 2000) marcada com o fluoróforo 6-FAM (Applied Biosystems), 150 µg/mL de BSA, 0,5 unidade de *Taq* DNA Platinum (Invitrogen), 4,5 µL de DNA e 2,7 µL de H₂O para completar o volume. Todas as reações de amplificação seguiram a seguinte programação: um ciclo inicial de desnaturação à 95°C por cinco minutos; 40 ciclos de 95°C por um minuto, 47°C por um minuto, 72° por um minuto; 15 ciclos para acrescentar a cauda M13 de 95°C por 30 segundos, 53°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; extensão final de 15 minutos à 72°C. Os fragmentos resultantes da amplificação do DNA foram observados em gel de agarose a 1,0% corado com brometo de etídeo. Com um marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen) foi possível

confirmar o tamanho dos fragmentos de acordo com o previsto (número de pares de bases).

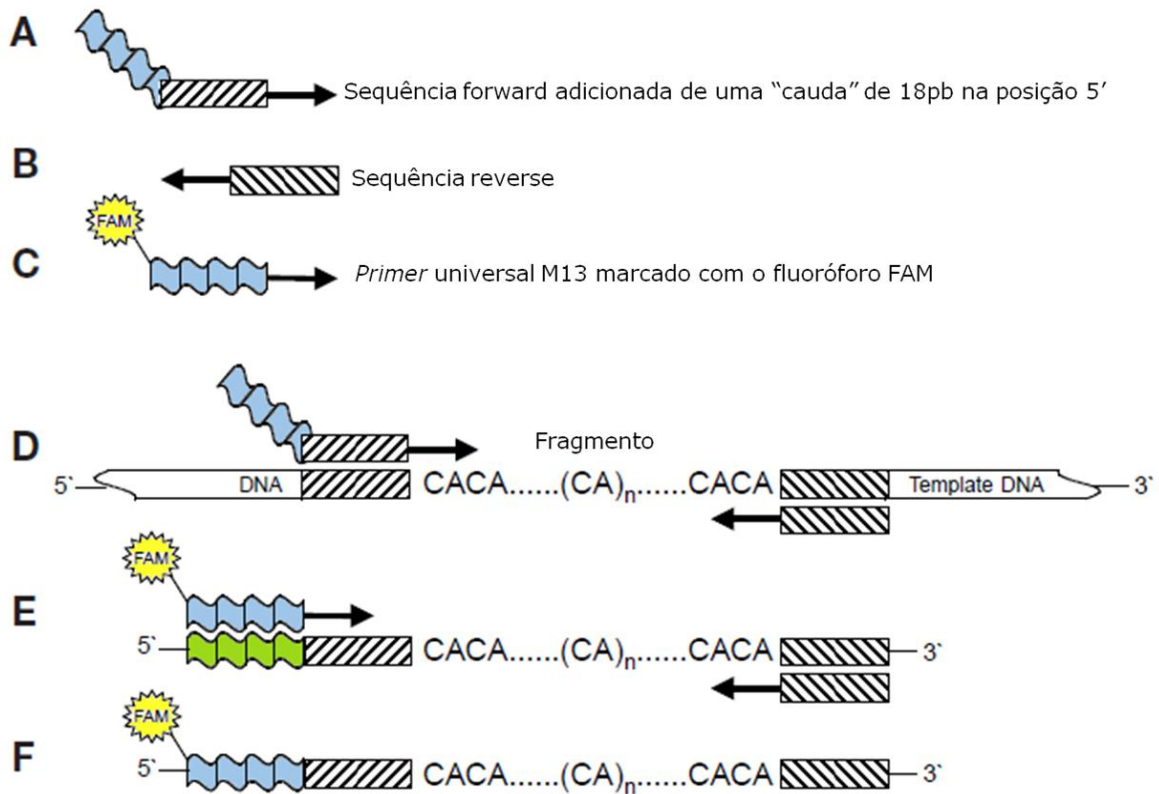


Figura 09 – Reação de amplificação usando a cauda universal M13 marcada com fluorescência.
Fonte: modificado de Schuelke (2000).

Os fragmentos amplificados foram analisados em um sequenciador automático *MegaBACE ET-550R Size Standard* (Amersham Biosciences) pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil) e analisados no programa *MegaBace™ Fragment Profiler* (GE Healthcare Life Science).

Algumas réplicas foram realizadas para confirmar os genótipos homocigotos e heterocigotos.

3.6. Determinação do sexo

O sexo dos indivíduos amostrados foi determinado utilizando marcadores moleculares específicos aos cromossomos sexuais descritos por Pilgrim *et al.* 2005. Esses *primers* amplificam uma porção do gene Amelogenina presente em ambos os

cromossomos sexuais, sendo que nas fêmeas há a amplificação de dois fragmentos de 214 pb, e nos machos ocorre a amplificação de um fragmento de 214 pb e outro de 194 pb, devido à deleção de 20 pb existente no cromossomo Y (Pilgrim *et al.* 2005).

Cada 15 µL da reação continha 7,5 µL de *GoTaq* (Promega) - tampão *Buffer* 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, uma unidade de *Taq* DNA polimerase - 2 pmol do *primer forward*, 2 pmol do *primer reverse*, 150 µg/mL de BSA e 4,5 µL de DNA. A reação ocorreu em termociclador (*PTC-100 Thermocycler*, MJ Research, Inc.) com a seguinte programação: um ciclo inicial de desnaturação à 94°C por cinco minutos; 45 ciclos de 94°C por um minuto, 47°C por um minuto, 72°C por um minuto e extensão final de dez minutos à 72° C.

Após as reações, os produtos amplificados foram separados por eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com brometo de etídeo (100 volts por 120 minutos). Para a identificação de fêmeas foi observada uma única banda de aproximadamente 200 pb devido à sobreposição dos dois fragmentos de mesmo tamanho, já para os machos foram observadas duas bandas, uma de 200 pb e outra de 190 pb, aproximadamente.

Foram realizadas três réplicas para cada sexagem, evitando, assim, a identificação de falsas fêmeas.

Em todas as reações de identificação da espécie, individualização das amostras e determinação do sexo foram incluídos controles negativos para monitoramento de possíveis contaminações.

3.7. Análise dos resultados

Para o diagnóstico da espécie, os fragmentos de citocromo b obtidos a partir do DNA fecal foram comparados às sequências de referência para onça-parda (*P. concolor*), jaguatirica (*L. pardalis*) e gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) disponíveis no GenBank (AF266475, AF266473 e AY886752, respectivamente), além dos fragmentos obtidos a partir do DNA de sangue de onça-parda, gato-mourisco (*P. yagouaroundi*) e de gato-maracajá (*L. wiedii*). Como grupo externo foi utilizada a sequência de outro felino

neotropical, a onça-pintada (*P. onca*), disponível no GenBank (AF266474). As sequências obtidas foram alinhadas no programa CLUSTALX 2.0 (Larkin *et al.* 2007) e verificadas visualmente e editadas com o auxílio do programa BIOEDIT 7.0 (Hall 1999). No programa MEGA v.5.03 (Tamura *et al.* 2011) foram calculadas as distâncias genéticas entre os fragmentos de DNA através do Modelo de 2 Parâmetros de Kimura (1980) e realizada a análise de Neighbor-Joining (Saitou e Nei 1987) para inferir a espécie de origem das amostras de fezes. A significância estatística foi avaliada pelo método de *bootstrap* com 1000 replicações para acessar o nível de confiança na ordem dos braços obtida no agrupamento. Para o diagnóstico de identificação da espécie foi considerado o agrupamento das amostras de DNA às sequências de referência.

Para a individualização das amostras, os genótipos foram classificados como homozigotos quando apenas um fragmento foi observado e como heterozigotos quando dois fragmentos foram observados. Foram consideradas somente as amostras que apresentaram ao menos quatro dos seis locos genotipados. Para reduzir os erros de genotipagem como o *allelic dropout*, em que um dos dois alelos do indivíduo não é detectado (Taberlet *et al.* 1996), cada genótipo homozigoto encontrado foi confirmado por um mínimo de três e um máximo de cinco réplicas, e os heterozigotos por uma ou duas réplicas realizadas aleatoriamente.

A taxa de *allelic dropout* por loco foi calculada dividindo o número de erros encontrados pelo número total de casos em que o erro poderia ocorrer. Já a taxa total de *allelic dropout* foi calculada pela média das taxas individuais encontradas para cada loco, ou seja, pela soma das taxas por loco dividida pelo número total de locos utilizados.

A identificação dos indivíduos através dos painéis de genótipos multilocos foi realizada com o auxílio do programa GIMLET (Valière 2002). Esse mesmo programa foi utilizado para o cálculo da Probabilidade de Identidade (P_{ID}), $P_{ID(unbiased)}$ (Paetkau e Strobeck 1994) e $P_{ID(sibs)}$ (Waits *et al.* 2001), a qual determina o poder de discriminação do painel multilocos empregado no processo de individualização das amostras (Paetkau *et al.* 1998, Waits *et al.* 2001).

O programa CERVUS 3.0 (Marshall *et al.* 1998; Kalinowski *et al.* 2007) foi utilizado para calcular o conteúdo de informação polimórfica (PIC - *Polymorphism Information Content*). Os locos foram classificados em pouco informativos (até 0,25), razoavelmente informativos (de 0,25 a 0,5) e altamente informativos (acima de 0,5), de acordo com os valores obtidos (Botstein *et al.* 1980).

Para os cálculos de desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), excesso ou déficit de heterozigoto, heterozigosidades esperada e observada, e desequilíbrio de ligação foi utilizado o programa GENEPOP 4.0.10 (Raymond e Rousset 1995; Rousset 2008). Os testes para os desvios no HWE e deficiência de heterozigotos foram realizados utilizando o algoritmo Cadeia de Markov-Monte Carlo (MCMC), o qual estimou os valores estatísticos. A correção sequencial de Bonferroni (Rice 1989) foi utilizada para corrigir os intervalos de significância.

O programa FSTAT v.2.9.3 (Goudet 2001) foi utilizado para se obter os valores de riqueza alélica e do coeficiente de endocruzamento (F_{IS}).

A ausência ou presença de alelos nulos, *allelic dropout* e *stutters* foi verificada pelo programa MICRO-CHECKER 2.2.3 (Oosterhout *et al.* 2004). Nesse programa são utilizados vários métodos para estimar a frequência dos alelos nulos a partir de um aparente déficit de heterozigotos. O método escolhido foi o de Oosterhout (Oosterhout *et al.* 2004), uma vez que ele assume a não existência de homozigotos nulos e considera as amostras não amplificadas como ocorrência do uso de DNA degradado ou de erros de genotipagem, ou seja, como resultado de falha humana. Os outros dois métodos, Chakraborty (Chakraborty *et al.* 1992) e Brookfield (Brookfield 1996), consideram que o déficit é causado por alelos nulos ao invés de serem justificados por erros de genotipagem, não sendo, portanto, aplicáveis a esse estudo.

O programa FREENA (Chapuis e Estoup 2007), por sua vez, também foi utilizado para estimar a frequência de alelos nulos (fNA) para cada um dos locos, servindo-se do método de Dempster (Dempster *et al.* 1977). Esse método demonstra melhor performance quando comparado aos métodos de Chakraborty e Brookfield (ambos utilizados pelo programa MICRO-CHECKER), uma vez que promove estimativas

imparciais e menos variáveis para as frequências de alelos nulos (Chapuis e Estoup 2007). Os valores estimados pelo FREENA foram comparados aos do MICRO-CHECKER, a fim de se obter valores mais precisos das frequências de alelos nulos.

A possível existência de eventos demográficos recentes, como gargalo populacional, foi verificada pelo programa BOTTLENECK (Cornuet e Luikart 1996). O teste de Wilcoxon foi o escolhido para as análises, já que possui alto poder estatístico e pode ser utilizado para menos de 20 locos. O modelo mutacional empregado foi o *Two-Phase Model* (TPM), estabelecido com 65% para o *Stepwise Mutation Model* (SMM) e 35% para o *Infinite Alleles Model* (IAM), valores obtidos de acordo com os gráficos de distribuição das frequências alélicas para cada loco (Apêndice A); e com 95% para SMM e 5% para IAM, proporção recomendada para microssatélites (Luikart *et al.* 1998).

Para as análises de parentesco foi utilizado o programa ML-RELATE (Kalinowski *et al.* 2006), o qual calcula a estimativa de máxima verossimilhança para supostas relações de parentesco. As relações são categorizadas em: não relacionados (U), meio-irmãos (HS), irmãos completos (FS) ou pais/filhos (PO). Optou-se, nesse estudo, por indicar ao programa os locos com presença de alelos nulos ao invés de excluí-los das análises de parentesco, a fim de evitar a perda de informação pela redução no número de locos utilizados.

4. RESULTADOS

As armadilhas de pelos (Figura 10) permaneceram em campo por um período de seis meses, sendo realizadas 12 visitas ao todo. Durante todo o tempo em que estiveram expostas nenhuma amostra foi obtida e nenhum vestígio dos indivíduos de onça-parda foi encontrado próximo às armadilhas. Assim, não foi possível, por nenhum dos dois modelos de armadilhas instalados no NSV, a obtenção de amostras de pelos durante o estudo.



Figura 10 – Fotos das armadilhas de pelos distribuídas no NSV em julho de 2010. (A) Primeiro modelo de armadilha de pelos e o (B) segundo e definitivo modelo de armadilha de pelos.

Em relação às fezes, das 40 amostras fornecidas, 17 tinham sido devidamente armazenadas em freezer, porém as outras 23 estavam secas e velhas, como consequência do armazenamento incorreto desde a sua coleta.

Inicialmente, seis amostras foram excluídas pelo não sucesso na extração do DNA e pela falta de informações (amostras 5, 8, 10, 11, 36 e 37). As 34 amostras restantes foram diagnosticadas com sucesso para a espécie de origem, ou seja, 100% de amplificação para o gene citocromo b. Baseado na similaridade entre as espécies e tendo as sequências de referência de onça-parda, jaguatirica, gato-do-mato-pequeno, gato-mourisco, gato-maracajá e onça-pintada, foram identificadas 25 amostras pertencentes a espécie *P. concolor*, oito a *L. tigrinus* e uma a *L. pardalis* (Figura 11).

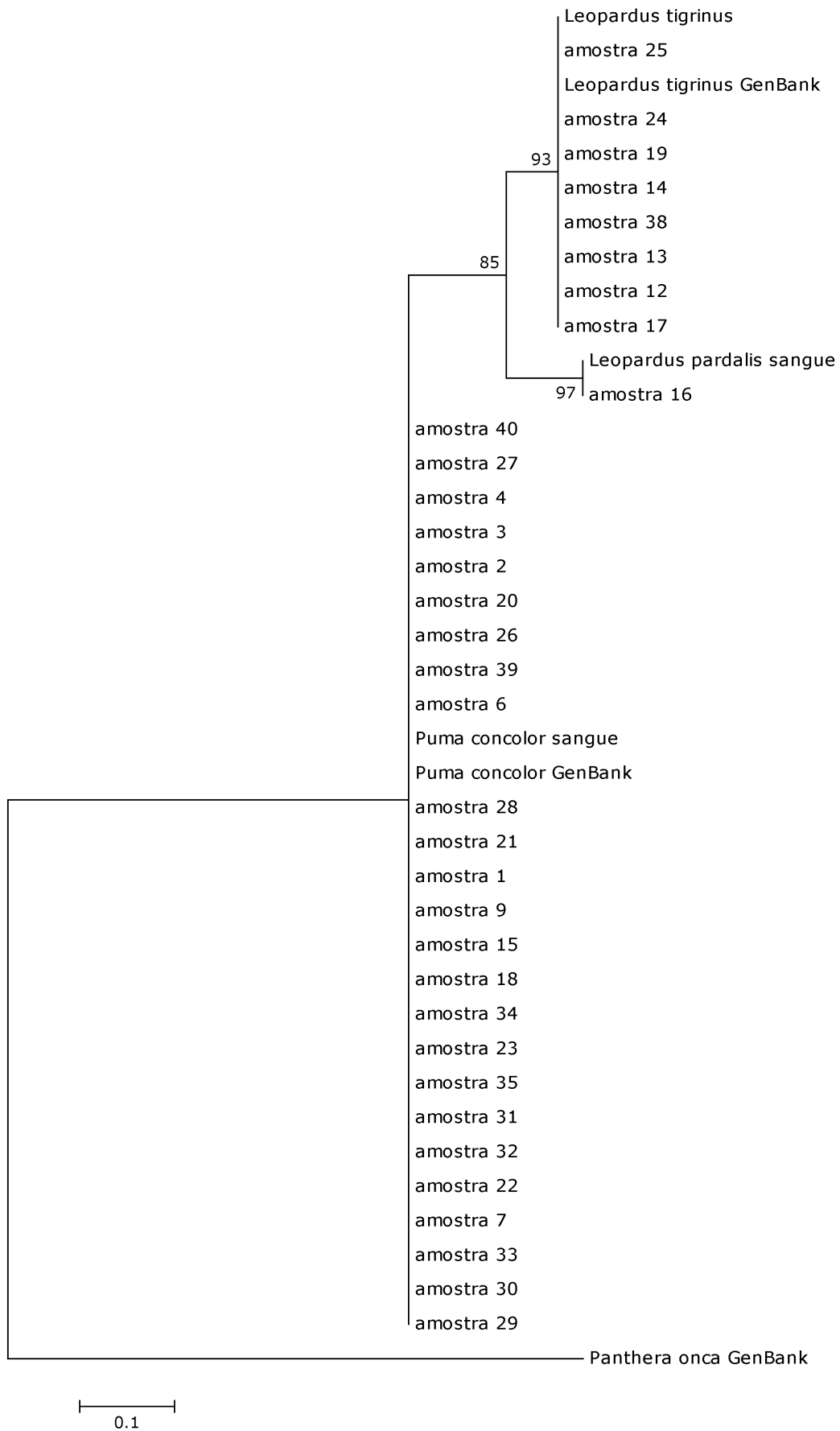


Figura 11 – Árvore *neighbor-joining* das sequências de referência de citocromo b e das amostras de fezes analisadas, com *Panthera onca* como grupo externo.

Dentre o fragmento de 146 pb amplificado do mtDNA, em uma sequência de 59 pb foram encontrados nove sítios polimórficos entre as sequências de onça-parda e jaguatirica; oito entre onça-parda e gato-do-mato-pequeno; e quatro, dez e 33, entre onça-parda e gato-mourisco, gato-maracajá e onça-pintada, respectivamente. Através desses sítios de diferenciação foi possível o diagnóstico das amostras pertencentes às diferentes espécies (Figura 12).

Dentre as oitos amostras de gato-do-mato-pequeno, quatro foram coletadas no Núcleo Santa Virginia, três no Núcleo Caboclos (PETAR) e uma não possuía informações sobre o local da coleta. A única amostra de jaguatirica encontrada foi obtida também no Núcleo Caboclos (PETAR).

Dos oito *primers* de microssatélites utilizados, dois (PcoA106 e PcoA216) foram descartados devido a baixa amplificação (menos de 12%) dos respectivos fragmentos nas amostras de *P. concolor*.

Em relação a utilização das amostras de fezes para a etapa de individualização, somente foram consideradas as diagnosticadas para a espécie de interesse, *P. concolor*. Inicialmente, das 25 amostras de onça-parda identificadas, três tiveram que ser descartadas, duas por falta de informações como data, local e ponto GPS da coleta (amostras 20 e 21); e uma por pertencer ao Núcleo Caboclos (PETAR) (amostra 15).

As 22 amostras restantes foram amplificadas e genotipadas para o painel de seis locos de microssatélites. Para as análises de caracterização genética da população de onça-parda estudada foram consideradas somente as que apresentaram ao menos 66,67% do painel multilocos preenchido, ou seja, ao menos quatro dos seis locos genotipados. Seguindo esse mínimo estipulado, mais sete amostras foram descartadas das análises: duas por não apresentarem resultados para nenhum dos seis locos utilizados (amostras 27 e 32); uma por só ter o genótipo para apenas um loco (amostra 31); três para dois locos (amostras 22, 29 e 30); e uma para três locos (amostra 33).

Dessa forma, restaram apenas 15 amostras de onça-parda para serem analisadas (amostras 1, 2, 3, 4, 6, 7, 9, 18, 23, 26, 28, 34, 35, 39 e 40). O sucesso de genotipagem para essas amostras analisadas foi superior a 80% por loco e a 90%, em média, quando calculado para o conjunto de locos.

Na Figura 13, um esquema simplificado das amostras de fezes disponíveis inicialmente e a sucessão de fatores que as tornaram descartáveis até chegar ao número final de amostras possíveis de serem analisadas.

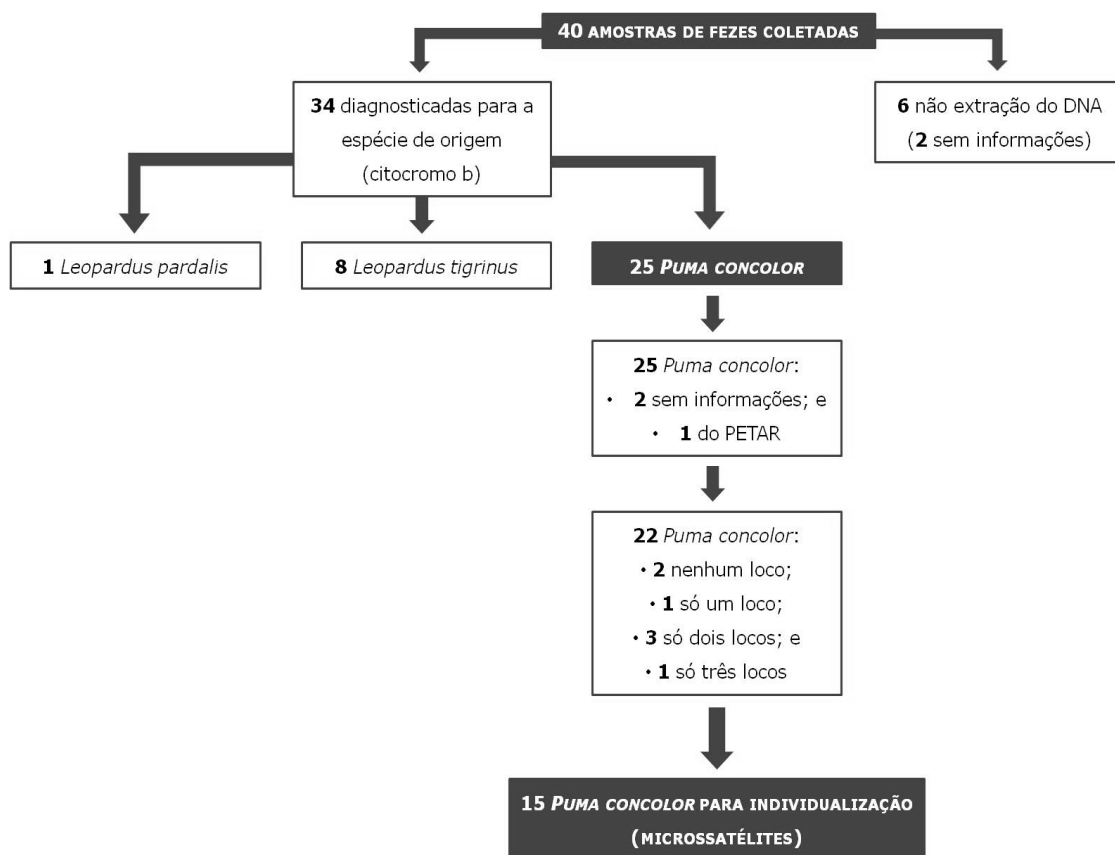


Figura 13 – Sequência de exclusões das amostras de fezes de *P. concolor*.

Na Figura 14, observa-se a distribuição das amostras de fezes coletadas no NSV, diferenciando as amostras pertencentes a onça-parda e as pertencentes ao gato-do-mato-pequeno.

Das 15 amostras analisadas foram definidos 12 indivíduos de *P. concolor*. Apenas dois indivíduos foram amostrados mais de uma vez, enquanto para o restante só houve uma amostragem. O sexo foi determinado para todos os indivíduos encontrados (Tabela 04). A distribuição dos indivíduos de onça-parda pode ser observada na Figura 15.

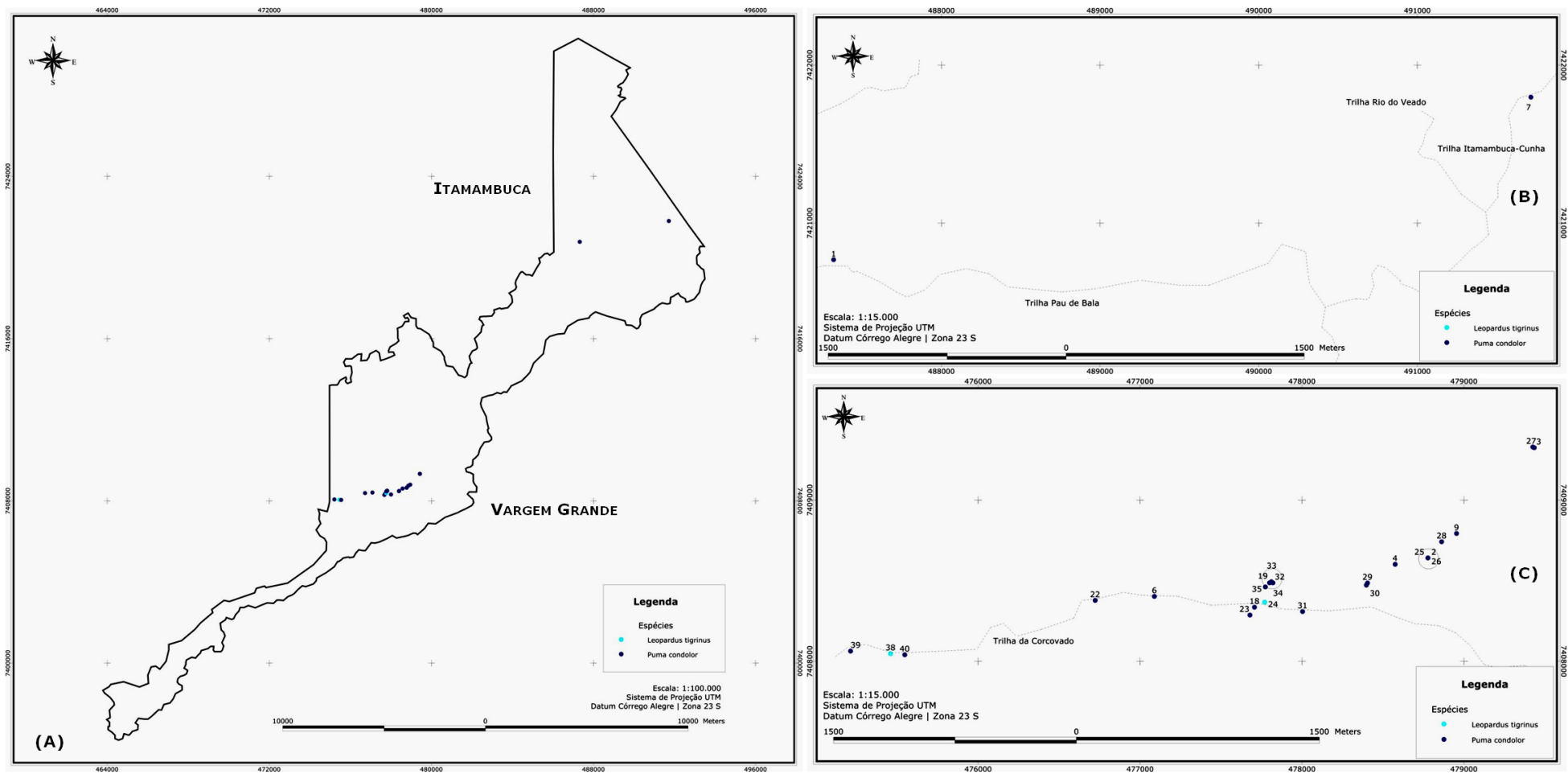


Figura 14 – Distribuição das amostras de fezes coletadas no NSV (A). Amostras de fezes coletadas em Itamambuca (B) e em Vargem Grande (C).

Fonte: Marcio Henrique Bertazi.

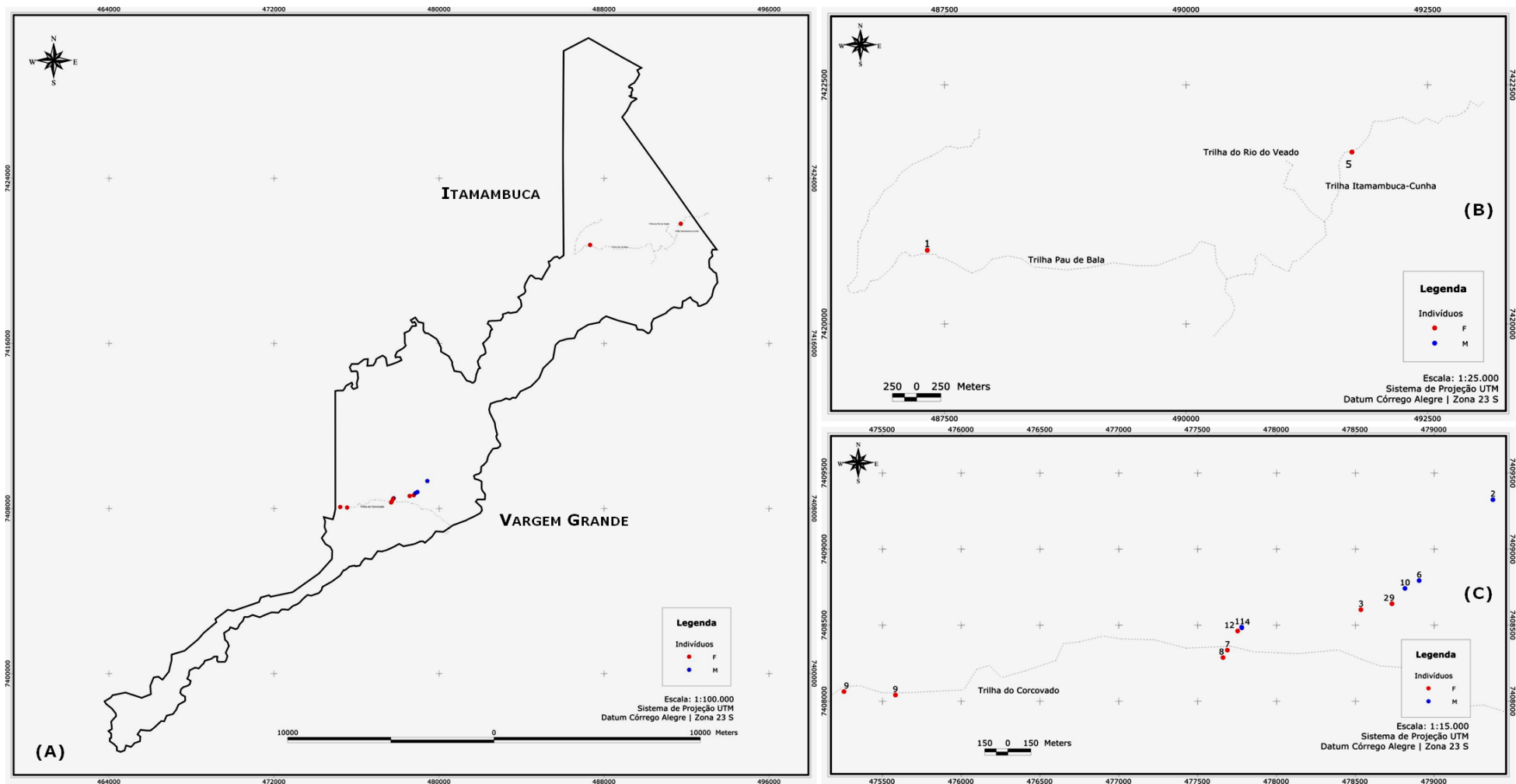


Figura 15 – Indivíduos* de onça-parda no NSV (A). Indivíduos encontrados em Itamambuca (B) e em Vargem Grande (C).

Fonte: Marcio Henrique Bertazi

(*) há sobreposição dos indivíduos, porém cada número corresponde a um único indivíduo.

Tabela 04 – Informações sobre os indivíduos de *P. concolor*.

indivíduo	amostras	sexo
P01	1	♀
P02	2, 3	♂
P03	4	♀
P04	6	♂
P05	7	♀
P06	9	♂
P07	18	♀
P08	23	♀
P09	26, 39, 40	♀
P10	28	♂
P11	34	♂
P12	35	♀

A taxa média de *allelic dropout* observada foi de 10,43%. Os valores estimados para a Probabilidade de Identidade foram de $5,695 \times 10^{-8}$, $P_{ID(\text{unbiased})}$ e $6,854 \times 10^{-3}$, $P_{ID(\text{sibs})}$. De acordo com os valores de PIC calculados não houve nenhum loco pouco informativo ($PIC < 0,25$) e apenas um (PcoB010) dos seis locos utilizados foi considerado razoavelmente informativo ($0,5 < PIC < 0,25$). Os demais locos foram considerados altamente informativos ($PIC > 0,5$). Quando avaliados em conjunto, o painel de locos utilizados foi altamente informativo ($PIC = 0,6744$). O tamanho dos fragmentos obtidos, o número de alelos por loco, a taxa de *allelic dropout*, os valores de P_{ID} e de PIC estão descritos na Tabela 05.

Tabela 05 – Características observadas para os locos de microssatélites utilizados.

Loco	TF (pb)	NA	$P_{ID(\text{unbiased})}$	$P_{ID(\text{sibs})}$	PIC	<i>Allelic dropout (%)</i>
PcoA208	203 – 219	8	0,08786	0,4837	0,6534	13,33
PcoA339	280 – 298	8	0,02718	0,3647	0,7554	1,92
PcoB003	285 – 319	10	0,02727	0,3951	0,7721	10,42
PcoB010	229 – 237	3	0,35580	0,6496	0,3694	12,22
PcoB210	179 – 199	6	0,05943	0,3924	0,7265	18,94
PcoC108	130 – 182	8	0,04136	0,3858	0,7698	5,77
média/total	---	7,167	$5,695 \times 10^{-8}$	$6,854 \times 10^{-3}$	0,6744	10,43

(TF) tamanho dos fragmentos em pares de bases; (NA) número de alelos; ($P_{ID(\text{unbiased})}$ e $P_{ID(\text{sibs})}$) probabilidade de identidade; (PIC) conteúdo de informação polimórfica.

A diversidade genética foi estimada pelo número de alelos, pelas heterozigosidades esperada (H_E) e observada (H_O) e pela riqueza alélica. Os valores para H_E variaram de 0,4529 (PcoB010) a 0,8316 (PcoB003), sendo 0,7375 o valor da heterozigosidade média esperada. Já H_O variou entre 0,4167 (PcoB010) e 1,000 (PcoB210), e o valor da heterozigosidade média observada foi 0,6202, inferior à média esperada. O número médio de alelos encontrados foi de aproximadamente 7,0. A compilação dos dados pode ser observada na Tabela 06.

Tabela 06 – Dados agrupados da diversidade genética observada no trabalho.

	Locos						Média
	PcoA208	PcoA339	PcoB003 ⁺	PcoB010	PcoB210	PcoC108 ⁺	
TF (pb)	203 - 219	280 - 298	285 - 319	229 - 237	179 - 199	130 - 182	---
N	12	12	10	12	12	11	---
NA	8	8	10	3	6	8	7,167
RA	7,413	7,455	10,000	2,833	5,665	7,719	6,8475
DHW	0,0968	0,0131	0,1119	1,0000	0,0800	0,0073*	---
pL	0,2332	0,0150	0,0066*	0,5609	1,0000	0,0001*	---
pS	0,8341	0,9880	0,9985	0,8059	0,0580	0,9999	---
H_E	0,7029	0,8152	0,8316	0,4529	0,7971	0,8312	0,7375
H_O	0,5833	0,6667	0,6000	0,4167	1,0000	0,4545	0,6202
F_{is}	0,176	0,189	0,289	0,083	-0,269	0,465	0,167

(TF) Tamanho do fragmento em pares de bases; (N) tamanho amostral; (NA) número de alelos; (RA) riqueza alélica; (DHW) desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $0,0083 < \alpha < 0,05$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); (pL) valores de p para o déficit de heterozigotos; (pS) valores de p para o excesso de heterozigotos; (H_E) heterozigosidade esperada; (H_O) heterozigosidade observada; (F_{is}) coeficiente de endocruzamento. (*) valores significativos após correção sequencial de Bonferroni; (+) presença de alelos nulos.

Foi observado desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg, após a correção sequencial de Bonferroni ($0,0083 < \alpha < 0,05$), somente para o loco PcoC108. Houve déficit significativo de heterozigotos para dois locos, PcoB003 e PcoC108.

O valor observado para o coeficiente de endocruzamento (F_{is}), quando os locos foram analisados em conjunto, foi de 0,167, sugerindo que há déficit de heterozigotos na população estudada. Quando são olhados separadamente, apenas o loco PcoB210 apresenta valor negativo de F_{is} (-0,269), sugerindo excesso de heterozigotos para esse loco.

Não foi encontrado desequilíbrio de ligação para os pares de locos analisados (Tabela 07), indicando que a frequência observada da combinação entres os alelos do par de locos é próxima à esperada.

Tabela 07 – Valores de "p" para desequilíbrio de ligação.

Pares de locos	Valores de p
PcoA208 x PcoA339	0,673099
PcoA208 x PcoB003	1,000000
PcoA339 x PcoB003	1,000000
PcoA208 x PcoB010	0,878413
PcoA339 x PcoB010	0,382279
PcoB003 x PcoB010	0,291885
PcoA208 x PcoB210	0,895497
PcoA339 x PcoB210	0,161112
PcoB003 x PcoB210	1,000000
PcoB010 x PcoB210	0,683187
PcoA208 x PcoC108	1,000000
PcoA339 x PcoC108	1,000000
PcoB003 x PcoC108	1,000000
PcoB010 x PcoC108	1,000000
PcoB210 x PcoC108	1,000000

O programa MICRO-CHECKER apontou dois locos com presença de alelos nulos, PcoB003 e PcoC108 (11,63% e 19,88%, respectivamente, estimados pelo método de Oosterhout, escolhido dentre os utilizados pelo MICRO-CHECKER por se apresentar mais adequado para o tipo de amostra trabalhada. Para confirmar as frequências de alelos nulos, foram estimados seus valores através do programa FREENA. A Tabela 08 apresenta os valores das frequências de alelos nulos estabelecidos pelos vários métodos utilizados nos programas.

Tabela 08 – Frequências de alelos nulos estimadas por diferentes métodos para os locos de microssatélites.

loco	alelos nulos	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2	fNA
PcoA208	Ausente	0,1011	0,0718	0,0539	0,0539	0,00000
PcoA339	ausente	0,0647	0,0791	0,0643	0,0643	0,08635
PcoB003	Presente	0,1163	0,1367	0,1061	0,3569	0,10922
PcoB010	Ausente	0,0099	0,0204	0,0121	0,0121	0,01167
PcoB210	Ausente	-0,1709	-0,1339	-0,1339	0	0,00000
PcoC108	presente	0,1988	0,2715	0,1889	0,3193	0,20166

(fNA) frequência de alelos nulos estimada pelo método de Dempster (Dempster *et al.* 1977).

Não foi encontrada evidência de gargalo populacional recente (Tabela 09).

Tabela 09 – Valores de p para análise de gargalo populacional.

SMM – IAM (%)	Valores de p
65 – 35	0,96094
95 – 5	0,99219

(SMM) *Stepwise Mutation Model*; (IAM) *Infinite Alleles Model*.

Para todos os pares possíveis comparados foi encontrado 93,9% de indivíduos não relacionados (U) e apenas 6,1% de possíveis meio-irmãos (HS).

5. DISCUSSÃO

As armadilhas desenvolvidas nesse projeto não foram bem sucedidas para obtenção de amostras de pelos de *P. concolor*, uma vez que nenhum pelo foi encontrado em seis meses de exposição dessas armadilhas em campo.

Alguns fatores na técnica de amostragem utilizada podem ter contribuído para o insucesso das armadilhas, como: (1) o modelo de armadilha; (2) o atrativo aplicado; (3) o baixo número de armadilhas distribuídas; (4) as características ambientais da área; e (5) as trilhas utilizadas para a fixação das armadilhas.

Um dos fatores que pode ter colaborado para ausência de coleta dos pelos está relacionado ao modelo utilizado, o qual era individualmente fixado nos troncos das árvores (Figura 10). Essas armadilhas de coloração pouco chamativa também podem ter influenciado a não atração das onças-pardas. Martins (2009) utilizou canos brancos de PVC nos quais o velcro era preso e, provavelmente, esse objeto ao longo das trilhas deve ter apresentado um impacto visual maior do que simplesmente prender o velcro aos troncos das árvores. Além disso, o mais usual é que as armadilhas sejam dispostas em estações móveis e compostas, aumentando as chances de atração da espécie alvo (Mowat e Strobeck 2000; Valderrama *et al.* 1999; Downey *et al.* 2007; Martins 2009; Portella 2011), principalmente quando associados a bons atrativos.

Diferente de Martins (2009) que utilizou a canela em pó como principal atrativo e obteve resultados positivos, ao utilizar a mesma substância o presente estudo fracassou, assim como Portella (2011) que ao testar a canela em pó em cativeteiro também demonstrou o seu baixo poder de atração para a onça-parda.

Além disso, a densidade de armadilhas de pelos distribuídas foi de pouco mais de 0,1 armadilha a cada km² (0,114 armadilhas/km²), enquanto Martins (2009) utilizou uma densidade de 0,45 armadilhas/km², ou seja, o número amostral para as armadilhas de pelos no NSV foi extremamente baixo, possivelmente dificultado a atração das onças-pardas aos seus pontos fixos.

Mais um fator limitante pode ter sido a característica ambiental de alta umidade das florestas tropicais (Oliveira-Filho e Fontes 2000), como o caso do NSV, que não

permitiu a fixação e manutenção do atrativo por muito tempo. Esse fato, associado à baixa visitação às armadilhas e consequente reposição da canela em pó, pode ter reduzido a chance de sucesso das mesmas.

Sobre as trilhas onde as armadilhas foram instaladas, havia informações prévias da sua utilização pelas onças-pardas, já que foram as mesmas nas quais as fezes foram coletadas no ano de 2007 e as indicadas pelos monitores do Parque. Porém, em 2008 e 2009, de acordo com o grupo coletor das fezes, nenhuma nova amostra foi encontrada, da mesma forma como não o foi em 2010. Por essas trilhas serem frequentadas por turistas, a intensa passagem de humanos pode ter contribuído para afugentar a espécie do local.

Em relação às fezes, 45% das amostras recebidas tiveram que ser descartadas ainda no início das análises por quatro principais motivos: (1) não extração do DNA; (2) ausência de informações sobre as coleta; (3) amostras pertencentes a outra área que não a do estudo; e (4) amostras pertencentes a outras espécies de felinos que não *P. concolor*. Outras sete amostras foram retiradas das análises de individualização e caracterização genética da população por não terem amplificado para o mínimo de quatro dentre os seis locos utilizados.

A etapa de identificação da espécie de origem foi realizada com 100% de aproveitamento. Isso ocorreu, provavelmente, porque sendo o DNA degradado, como geralmente é o obtido das fezes, é mais fácil a amplificação de fragmentos mais curtos (Kohn *et al.* 1995; Frantzen *et al.* 1998; Taberlet *et al.* 1999; Farrell *et al.* 2000), como é o caso do fragmento de 146 pb do gene citocromo b utilizado.

Métodos tradicionais de identificação da espécie depositora das fezes, como por tamanho, forma ou cheiro, são pouco confiáveis, uma vez que o tamanho do corpo do animal pode variar dentro da mesma espécie e o mesmo indivíduo pode gerar fezes em uma ampla faixa de tamanhos (Farrell *et al.* 2000; Miotto *et al.* 2007b).

Das 40 amostras iniciais, 85% continha DNA amplificável, valor comparável aos encontrados para outros estudos com amostras não invasivas. Ernest *et al.* (2000) obtiveram DNA amplificável para mais de 75% das amostras de fezes de *P. concolor*;

Eggert *et al.* (2003) tiveram um sucesso de 60 a 72% para amostras de *Loxodonta cyclotis*; Lorenzini *et al.* (2004), 75% para *Ursus arctos*; e Dreher *et al.* (2007), 83% de DNA amplificável para amostras de pelos de *Ursus americanus*.

Ao considerar somente as 22 amostras de *P. concolor*, apenas 15 forneceram dados satisfatórios para as análises posteriores. O baixo aproveitamento do DNA extraído das fezes foi resultado da baixa qualidade das fezes obtidas. De acordo com as categorias estabelecidas por Palomares *et al.* (2002), 42,5% das fezes utilizadas eram de amostras em idade média, ou seja, elas possuíam uma coloração mais clara, mas ainda tinham algum odor. O restante das amostras, mais de 50%, era composto por fezes consideradas velhas, de coloração muito clara e sem qualquer odor. Além de velhas, essas amostras estavam secas e não haviam sido armazenadas corretamente em tubos contendo álcool 100%, em freezer a -20°C.

Por estarem na superfície externa das fezes, as células da onça-parda foram, provavelmente, as primeiras a sofrerem a degradação do DNA (Pires e Fernandes 2003) e, por isso, o DNA extraído desse material envelhecido estava em baixa concentração e altamente fragmentado (Miller *et al.* 2002).

Apesar do número crescente de publicações, os dados obtidos a partir de análises não invasivas podem estar associados a erros de genotipagem gerados pela baixa quantidade e/ou qualidade do DNA utilizado (Taberlet *et al.* 1996; Broquet e Petit 2004). Dentre os possíveis erros encontrados, principalmente para os microssatélites, estão: (i) o *allelic dropout*, ou seja, a falha na amplificação de um dos dois alelos de um indivíduo; ou (ii) a amplificação de alelos falsos (Taberlet *et al.* 1996; Prugh *et al.* 2005).

A taxa média de *allelic dropout* encontrada foi de 10,43%, variando de 1,92 a 18,94% entre os locos. Esse valor está de acordo com o esperado para o tipo de material utilizado, como indicam os valores obtidos em estudos similares, os quais variaram de 0 a 39% por loco (Taberlet *et al.* 1996, 1999; Gagneux *et al.* 1997; Goossens *et al.* 1998; Ernest *et al.* 2000; Sloane *et al.* 2000; Morin *et al.* 2001; Lorenzini *et al.* 2004; Miotto *et al.* 2007a; Ramalho 2011).

A presença desses erros pode acarretar uma individualização errônea das amostras, sendo principalmente preocupante em estudos genéticos de censo (Creel *et al.* 2003), já que podem gerar distorções no tamanho populacional estimado (Morin *et al.* 2001). Para solucionar esse viés das análises não invasivas, Taberlet *et al.* (1996) propuseram a realização de repetidas genotipagens independentes para confirmar o homocigoto. Posteriormente, outros autores também sugeriram medidas para acessar e quantificar esses erros das análises não invasivas por meio de probabilidades e múltiplas amplificações (Creel *et al.* 2003; Piggott *et al.* 2004; Roon *et al.* 2005).

Uma forma complementar para acessar a confiança estatística da identificação individual é estimar a probabilidade de identidade (P_{ID}) (Mills *et al.* 2000). A P_{ID} calcula a chance de que dois indivíduos aleatoriamente de uma população tenham o mesmo genótipo multilocus, sendo particularmente útil no planejamento de estudos que requerem a identificação individual, já que pode ser estimada para diferentes números de locos sem a necessidade de comprovação forense dos genótipos em mãos (Waits *et al.* 2001). Valores de P_{ID} no intervalo entre 0,01 – 0,0001 são considerados satisfatórios e confirmam que o número de locos analisados foi suficiente para a identificação confiável dos indivíduos (Paetkau *et al.* 1998, Waits *et al.* 2001).

Corroborando a confiabilidade da escolha dos *primers* de microssatélites, o valor médio de PIC foi 0,6744, o qual indica que, quando analisado em conjunto, o painel multilocus foi altamente informativo.

O aumento no número de locos de microssatélites para esse estudo poderia ter aumentado a resolução dos dados obtidos, porém, como se trata de material não invasivo, isso também aumentaria a chance de observar maiores erros de genotipagem (Waits e Paetkau 2005).

A obtenção de amostras não invasivas e o seu armazenamento inadequado foram uns dos maiores problemas encontrados neste estudo. Ao contrário do Cerrado, a densa serrapilheira existente nas florestas tropicais (Oliveira-Filho e Fontes 2000) e os hábitos elusivos da onça-parda (Ernest *et al.* 2000) tornaram difícil a localização das suas fezes em campo.

Apesar da qualidade ruim do DNA, foi possível finalizar as genotipagens dos locos de microssatélites para as 15 amostras restantes de *P. concolor*. Quando analisados os genótipos individuais multilocos em conjunto, obteve-se 12 indivíduos para o tamanho populacional mínimo dessa espécie na área do estudo. Já Miotto *et al.* (2011a) observaram uma população mínima de 17 indivíduos em um conjunto de áreas fragmentadas do Cerrado. Porém, convém ressaltar que não é possível comparar os resultados obtidos entre o presente trabalho e o de Miotto *et al.* (2011a), uma vez que as áreas estudadas possuem características diferentes. Além disso, faltam estudos para avaliar o quão significativas são essas estimativas de tamanho populacional.

No Brasil, são poucos os estudos sobre a diversidade genética de *P. concolor* (Castilho *et al.* 2010; Miotto *et al.* 2011b). A diversidade genética observada para as onças-pardas do NSV foi mais baixa ($H_0 = 0,6202$ e $H_E = 0,7375$, média de 7,167 alelos por loco) quando comparada à obtida por Miotto *et al.* (2011b) ($H_0 = 0,82$, $H_E = 0,79$, média de 10 alelos por loco), estudando uma população de onças-pardas na região nordeste do estado de São Paulo. No entanto, Castilho *et al.* (2010) descreveram uma heterozigosidade observada média de 0,61 e uma média de alelos de 5,89, resultados que não podem ser comparados aos encontrados no presente estudo, uma vez que o conjunto de locos utilizado foi diferente.

Todavia, a heterozigosidade observada para a população de onça-parda do NSV foi maior do que as obtidas em diferentes áreas da América do Norte para a mesma espécie. Sinclair *et al.* (2001) relataram uma heterozigosidade observada de 0,47 e 4,4 alelos em média; Culver *et al.* (2000) entre 0,42 – 0,52 e 11,1; Anderson *et al.* (2004) 0,535 e 4; e Kurushima *et al.* (2006) 0,47 e 5,5; valores de heterozigosidade observada e número médio de alelos, respectivamente.

Sabe-se que as populações de onça-parda da América do Sul possuem maiores níveis de diversidade genética do que as da América do Norte (Culver *et al.* 2000). Essa diferença ao longo do continente pode ser explicada pelo recente período de recolonização da *P. concolor* na América do Norte após uma glaciação do Pleistoceno (Culver *et al.* 2000).

Houve desvio no equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) para o loco PcoC108, e o déficit de heterozigotos foi observado. Como não há evidência do efeito Wahlund, uma vez que a população da área do estudo pertence a uma única subespécie (Culver *et al.* 2000), e também não houve evidência de gargalo populacional recente. O desvio no HWE pode estar relacionado à presença de alelos nulos, apontada em dois locos analisados (PcoB003 e PcoC108); à falta de heterozigotos, indicada pelo valor positivo de F_{is} (0,167); e/ou ao baixo número amostral, sendo este último o mais provável.

Ao analisar as relações de parentesco para os pares de indivíduos dessa população, pouca relação foi observada (6,1% de HS), situação oposta a encontrada por Miotto *et al.* (2011b), que observaram um alto número de animais relacionados em uma área altamente fragmentada, incluindo relações de PO entre indivíduos de fragmentos distantes. Avaliando esses resultados, Miotto *et al.* (2011b) sugerem que os movimentos estão sendo limitados entre os fragmentos estudados e que, por esse motivo, talvez estejam ocorrendo acasalamentos entre indivíduos aparentados. Diferentemente, as onças-pardas do NSV parecem apresentar um fluxo contínuo de indivíduos, o que justificaria a baixa relação de parentesco observada para a espécie. Situação semelhante a essa foi observada por Biek *et al.* (2006) em uma área contínua dos EUA. De acordo com os autores, o movimento de dispersão de machos e fêmeas mantinha um baixo número de indivíduos relacionados em territórios adjacentes (Biek *et al.* 2006).

Em cinco séculos, a Mata Atlântica teve sua área reduzida a menos de 12% da cobertura vegetal original (Ribeiro *et al.* 2009). A Serra do Mar, por sua vez, forma, junto com os fragmentos próximos, o maior grupo funcionalmente ligado de fragmentos remanescentes da Mata Atlântica, totalizando 2.803.000 ha (Ribeiro *et al.* 2009). Dentro desse grupo está o PESH, o maior remanescente contínuo protegido, que merece atenção especial por sua capacidade em manter grandes populações, principalmente por manter populações de espécies que necessitam de mais de 100 m para dispersão, e por sua perspectiva em manter essas populações em longo prazo (Brooks *et al.* 1999, Lindborg e Eriksson 2004, Ribeiro *et al.* 2009).

Nesse panorama, o presente estudo mostrou-se útil para estudos populacionais futuros ao apresentar as dificuldades existentes desde a obtenção das amostras e dos problemas decorrentes das análises genéticas utilizando DNA degradado e em baixas concentrações, até a exposição de algumas soluções para esses problemas.

Esse foi o primeiro passo para um possível monitoramento genético da onça-parda no PESH. São necessários estudos posteriores para avaliar a tendência da variabilidade genética de *P. concolor* no Núcleo Santa Virgínia; além do desenvolvimento de projetos semelhantes nos demais Núcleos do Parque, abrangendo, dessa forma, a maior área contínua de Mata Atlântica remanescente do país.

6. CONCLUSÕES

- Os modelos de armadilhas de pelos desenvolvidos neste projeto não foram bem sucedidos para obtenção de amostras de *P. concolor* em uma área da Mata Atlântica.
- Os locos de microssatélites utilizados foram confiáveis e altamente informativos, possibilitando a caracterização genética da população de *P. concolor*.
- Foram detectados 12 indivíduos de *P. concolor* no NSV.
- Há um possível fluxo contínuo de onças-pardas no NSV, o qual justificaria as poucas relações de parentesco observadas.
- Esse estudo fornece informações iniciais para o monitoramento populacional e genético de *P. concolor* na Mata Atlântica. Porém, deve-se enfatizar a necessidade de estudos similares nos demais Núcleos do PESH, os quais juntos possam fornecer uma visão mais abrangente da situação da espécie nesse bioma.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADANI, C. H.; SILVA, J. C. R.; HASHIMOTO, C. Y.; SANTOS, E. F. **Studbook dos Grandes Felinos Brasileiros: Registro Genealógico da onça pintada (*Panthera onca*) e suçuarana (*Puma concolor*) em cativeiro**. Jundiaí, SP: Livraria Conceito, 2005. 80 p.
- ANDERSON JR, C. R.; LINDZEY, F. G.; MCDONALD, D. B. Genetic structure of cougar populations across the Wyoming Basin: metapopulation or megapopulation. **Journal of Mammalogy**, v. 85, n. 6, p. 1207–1214, 2004.
- ARCOT, S. S.; WANG, Z.; WEBER, J. L.; DEININGER, L.; BATZER, M. A. Alu repeats: A source for the genesis of primate microsatellites. **Genomics**, v. 29, p. 136–144, 1995.
- BELLEMAIN, E.; TABERLET, P. Improved noninvasive genotyping method: application to brown bear (*Ursus arctos*) faeces. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p. 519–522, 2004.
- BIEK, R.; AKAMINE, N.; SCHWARTZ, M. K.; RUTH, T. K.; MURPHY, K. M.; POSS, M. Genetic consequences of sex-biased dispersal in a solitary carnivore: Yellowstone cougars. **Biology Letters**, v. 2, p. 312–315, 2006.
- 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.
- BRADLEY, B. J.; BOESCH, C.; VIGILANT, L. Identification and redesign of human microsatellite markers for genotyping wild chimpanzee (*Pan troglodytes verus*) and gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) DNA from feces. **Conservation genetics**, v. 1, p. 289–292, 2000.
- BRADLEY, B. J.; CHAMBERS, K. E.; VIGILANT, L. Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. **Conservation Genetics**, v. 2, p. 179–181, 2001.
- BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. Belo Horizonte, MG : Fundação Biodiversitas; Brasília, DF: MMA, 2008. 2v. 1420p.
- BROOKFIELD, J. F. Y. A simple new method for estimating null allele frequency from heterozygote deficiency. **Molecular Ecology Technical Note**, v. 5, p. 453–455, 1996.

BROOKS, T.; PIMM, S. L.; OYUGI, J. O. Time lag between deforestation and bird extinction in tropical forest fragments. **Conservation Biology**, v. 13, p. 1140–1150, 1999.

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

CASTILHO, C. S.; MARINS-SÁ, L. G.; BENEDET, R. C.; FREITAS, T. R. O. Habitat loss and evidence of a bottleneck in mountain lions in southern Brazil. 2010, submetido para publicação.

CAVALCANTI, S. M. C. Manejo e controle de danos causados por espécies da fauna. In: CULLEN JR L, RUDRAN R, VALLADARES-PADUA C. **Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná: Editora UFPR, 2003. p. 203-242.

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.

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

CHAPUIS MP, ESTOUP A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621-631, 2007.

CORNUET, J. M.; LUIKART, G. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. **Genetics**, v. 144, p. 2001-2014, 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, p. 2003–2009, 2003.

CULLEN JR, L.; BODMER, R. E.; PÁDUA, C. V. Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. **Biological Conservation**, v. 95, p. 49-56, 2000.

CULVER, M.; JOHNSON, W. E.; PECON-SLATTERY, J.; O'BRIEN, S. J. Genomic Ancestry of the American Puma (*Puma concolor*). **The American Genetic Association**, v. 91, p. 186-187, 2000.

CULVER, M.; MENOTTI-RAYMOND, M. A.; O'BRIEN, S. J. Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite *loci* in Pumas (*Puma concolor*). **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 1151-1156, 2001.

DEAGLE, B. E.; TOLLIT, D. L.; JARMAN, S. N.; HINDEL, M. A.; TRITES, A. W.; GALES, N. J. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 1831-1842, 2005.

DEMPSTER, A. P.; LAIRD, N. M.; RUBIN, D. B. Maximum likelihood from incomplete data via the EM algorithm. **Journal of the Royal Statistical Society B**, 39: 1-38, 1977.

DEWOODY, J.; NASON, J. D.; HIPKINS, V. D. Mitigating scoring errors in microsatellite data from wild populations. **Molecular Ecology Notes**. 2006.

DOWNEY, P. J.; HELLGREN, E. C.; CASO, A.; CARVAJAL, S.; FRANGIOSO, K. Hair snares for noninvasive sampling of felids in North America: do gray foxes affect success? **Journal of Wildlife Management**, v. 71, n. 6, p. 2090-2094, 2007.

DREHER, B. P.; WINTERSTEIN, S. R.; SCRIBNER, K. T.; LUKACS, P. M.; ETTER, D. R.; ROSA, G. J. M.; LOPEZ, V. A.; LIBANTS, S.; FILCEK, K. B. Noninvasive Estimation of Black Bear Abundance Incorporating Genotyping Errors and Harvested Bear. **Journal of Wildlife Management**, v. 71, n. 8, p. 2684-2693, 2007.

EGGERT, L. S.; EGGERT, J. A.; WOODRUFF, D. S. Estimating population sizes for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 1389-1402, 2003.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Brazilian Journal of Genetics**, suplemento, v. 19, n. 4, p. 23-29, 1996.

EIZIRIK, E.; JOHNSON, W. E. Sistemática molecular, história evolutiva e genética da conservação de felídeos Neotropicais. In: FREITAS, T. R. O.; VIEIRA, E.; PACHECO, S.; CHRISTOFF, A. **Mamíferos do Brasil: genética, sistemática, ecologia e conservação**. São Carlos, São Paulo: Editora Suprema, 2006. 176p.

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.

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.

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.

FERREIRA, M. E.; GRATAPPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília: EMBRAPA – CENARGEN, 1995, 220 p.

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.

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

FRANTZ, A. C.; SCHAUL, M.; POPE, L. C.; FACK, F.; SCHLEY, L.; MULLER, C. P.; ROPER, T. J. Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. **Journal of Applied Ecology**, v. 41, p. 985-995, 2004.

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.

Fundação para a Conservação e a Produção Florestal do Estado de São Paulo. **Parque Estadual da Serra do Mar, Núcleo Santa Virgínia**. Disponível em: <http://www.fflorestal.sp.gov.br/hotsites/hotsite/sobre.php>. Acesso em: 15 de janeiro de 2011.

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.

GOMIERO, L. M.; BRAGA, F. M. S. Reproduction of Pirapitinga do Sul (*Brycon opalinus* Cuvier, 1819) in the Parque Estadual da Serra do Mar-Núcleo Santa Virgínia, São Paulo, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, n. 3, p. 541-549, 2007.

GOMIERO, L. M.; CARMASSI, A. L.; BRAGA, F. M. S. Crescimento e mortalidade de *Brycon opalinus* (Characiformes, Characidae) no Parque Estadual da Serra do Mar, Mata Atlântica, Estado de São Paulo. **Biota Neotropica**, v. 7, n. 1, p. 21-26, 2007.

GOMIERO, L. M.; VILLARES JR, G. A.; BRAGA, F. M. S. Relação peso-comprimento e fator de condição de *Oligosarcus hepsetus* (Cuvier, 1829) no Parque Estadual da Serra do Mar - Núcleo Santa Virgínia, Mata Atlântica, estado de São Paulo, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 10, n. 1, p. 102-105, 2010.

GOMPPER, M. E.; KAYS, R. W.; RAY, J. C.; LAPOINT, S. D.; BOGAN, D. A.; CRYAN, J. R. A Comparison of Noninvasive Techniques to Survey Carnivore Communities in Northeastern North America. **Wildlife Society Bulletin**, v. 34, n. 4, p. 1142-1151, 2006.

GOOSSENS, B.; WAITS, L. P.; TABERLET, P. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 1237-1241, 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.

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, p. 505-512, 2009.

HAIG, S. M. Molecular Contributions to Conservation. **Ecology**, v. 79, n. 2, p. 413-425, 1998.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symp Series**, v. 41, p. 95-98, 1999.

IRIARTE, J. A.; FRANKLIN, W. L.; JOHNSON, W. E.; REDFORD, K. H. Biogeographic variation of food habits and body size of the American puma. **Oecologia**, v. 85, p. 185-190, 1990.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE (IUCN). **Red List of Threatened Species**. New York, 2008.

JANEČKA, J. E.; JACKSON, R.; YUQUANG, Z.; DIQIANG, L.; MUNKHTSOG, B.; BUCKLEY-BEASON, V.; MURPHY, W. J. Population monitoring of snow leopards using noninvasive collection of scat samples: a pilot study. **Animal Conservation**, v. 11, p. 401-411, 2008.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. L. Microsatellites, from molecules to populations and back. **TREE**, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996.

JOHNS, G. C.; AVISE, J. C. A Comparative Summary of Genetic Distances in the Vertebrates from the Mitochondrial Cytochrome b Gene. **Molecular Biology and Evolution**, v. 15, n. 11, p. 1481-1490, 1998.

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. Blackwell Publishing Ltd Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular Ecology**, v. 16, p. 1099-1106, 2007.

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

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.

KURUSHIMA, J. D.; COLLINS, J. A.; WELL, J. A.; ERNEST, H. B. Development of 21 microsatellite *loci* for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. **Molecular Ecology Notes**, 2006.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A. Clustal W and Clustal X version 2.0. **Bioinformatics**, v. 23, p. 2947-2948, 2007.

LINDBORG, R.; ERIKSSON, O. Historical landscape connectivity affects present plant species diversity. **Ecology**, v. 85, p. 1840-1845, 2004.

LIS, J. T. Fractionation of DNA fragments by polyethyleneglycol induced precipitation. **Methods Enzimol.**, v. 65, p. 347-353, 1980.

LOGAN, K. A.; SWEANOR, L. L. **Desert puma: evolutionary ecology and conservation of an enduring carnivore**. Covelo, California: Island Press, 2001. 464 p.

LORENZINI, R.; POSILLICO, M.; LOVARI, S.; PETRELLA, A. Non-invasive genotyping of the endangered Apennine brown bear: a case study not to let one's hair down. **Animal Conservation**, v. 7, p. 199–209, 2004.

LUIKART, G.; ALLENDORF, F. W.; CORNUET, J. M.; SHERWIN, W. B. Distortion of Allele Frequency Distributions Provides a Test for Recent Population Bottlenecks. **The American Genetic Association**, v. 89, p. 238-247, 1998.

MARQUES, R. M. **Diagnóstico das populações de aves e mamíferos cinegéticos do Parque Estadual da Serra do Mar, SP, Brasil**. 2004. 164 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

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

MARTINS, N. **Padronização de um protocolo para a extração de DNA a partir de pêlos e individualização de amostras de pêlos de onça-parda (*Puma concolor*) obtidos por meio de armadilhas não invasivas**. 2009. 45 f. Monografia - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2009.

MEDEIROS, M. C. M. P. de. **Caracterização fitofisionômica e estrutural de áreas de Floresta Ombrófila Densa Montana no Parque Estadual da Serra do Mar, SP, Brasil**. 2009. 94 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) - Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2009.

MILLER, C. R.; JOYCE, P.; WAITS, L. P. Assessing Allelic Dropout and Genotype Reliability Using Maximum Likelihood. **Genetics**, v. 160, p. 357–366, 2002.

MILLS, L. S.; PILGRIM, K. L.; SCHWARTZ, M. K.; MCKELVEY, K. Identifying lynx and other North American felids based on MtDNA analysis. **Conservation Genetics Technical Note**, v. 1, p. 285–288, 2000.

MIOTTO, R. A.; RODRIGUES, F. P.; CIOCHETI, G.; GALLETI JR, P. M. Determination of the Minimum Population Size of Pumas (*Puma concolor*) Through Fecal DNA Analysis in Two Protected Cerrado Areas in the Brazilian Southeast. **Biotropica**, v. 39, p. 647–654, 2007a.

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 (número especial), p. 631-637, 2007b.

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**, p. 1-7, 2011a.

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**, no prelo, 2011b.

MIRANDA, E. E. DE. **Natureza, conservação e cultura: Ensaio sobre a relação do homem com a natureza no Brasil**. São Paulo: Metalivros, 2003, 179 p.

MONDOL, S.; KARANTH, K. U.; KUMAR, N. S.; GOPALASWAMY, A. M.; ANDHERIA, A.; RAMAKRISHNAN, U. Evaluation of non-invasive genetic sampling methods for estimating tiger population size. **Biological Conservation**, v. 142, n. 10, p. 2350-2360, 2009.

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, p. 1835-1844, 2001.

MOWAT, G.; PAETKAU, D. Estimating marten *Martes americana* population size using hair capture and genetic tagging. **Wildlife Biology**, v. 8, n. 3, p. 201-209, 2002.

MOWAT, G.; STROBECK, C. Estimating population size of grizzly bears using hair capture, DNA profiling, and mark-recapture analysis. **Journal of Wildlife Management**, v. 64, p. 183-193, 2000.

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, 2000.

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

OLIVEIRA, E. J.; PÁDUA, J. G.; ZUCCHI, M. I.; VENCovsky, R.; VIEIRA, M. L. C. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 294-307, 2006.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES, M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. **Biotropica**, v. 32, n. 4, p. 793-810, 2000.

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

PAETKAU, D.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. **Molecular Ecology**, v. 3, p. 489-495, 1994.

PAETKAU, D.; WAITS, L. P.; CLARKSON, P. L.; CRAIGHEAD, L.; VYSE, E.; WARD, R.; STROBECK, C. Variation in Genetic Diversity across the Range of North American Brown Bears. **Conservation Biology**, v. 12, n. 2, p. 418-429, 1998.

PALOMARES, F.; GODOI, J. A.; PIRIZ, A.; O'BRIEN, S. J.; JOHNSON, W. E. Fecal genetic analysis to determinate the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the *Iberian lynx*. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 2171-2182, 2002.

PARDINI, R.; DITT, E. H.; CULLEN JR, L.; BASSI, C.; RUDRAN, R. Levantamento rápido de mamíferos terrestres de médio e grande porte. In: CULLEN JR L, RUDRAN R, VALLADARES-PADUA C. **Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná: Editora UFPR, 2003. p. 343-380.

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

PIGGOTT, M. P.; BELLEMAIN, E.; TABERLET, P.; TAYLOR, A. C. A multiplex pre-amplification method that significantly improves microsatellite amplification and error rates for faecal DNA in limiting conditions. **Conservation Genetics**, v. 5, p. 417-420, 2004.

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, p. 60-61, 2005.

PIRES, A. E.; FERNANDES, M. L. Last lynxes in Portugal? Molecular approaches in a pre-extinction scenario. **Conservation Genetics**, v. 4, p. 525-532, 2003.

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

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação**. Londrina, Paraná: Gráfica e Editora Planta, 2008. 328 p.

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

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.

QUÉMÉRÉ, E.; LOUIS JR, E. E.; RIBÉRON, A.; CHIKHI, L.; CROUAU-ROY, B. Non-invasive conservation genetics of the critically endangered golden-crowned sifaka (*Propithecus tattersalli*): high diversity and significant genetic differentiation over a small range. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 675-687, 2010.

RAMALHO, F. P. **Tamanho populacional de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) em uma área protegida de Cerrado no Sudeste do Brasil**. 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Evolução) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2011.

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

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, p. 685-692, 2004.

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

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

ROON, D. A.; THOMAS, M. E.; KENDALL, K. C.; WAITS, L. P. Evaluating mixed samples as a source of error in non-invasive genetic studies using microsatellites. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 1, p. 195-201, 2005.

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

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

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. **Plano de Manejo do Parque Estadual da Serra do Mar**. Secretaria do Meio Ambiente, Instituto Florestal, Divisão de Reservas e Parques Estaduais. São Paulo: SMA, 2008, 441p.

SÃO PAULO (Estado). Secretaria do Meio Ambiente. **Unidade de conservação da natureza**. Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo, Fundação Florestal. São Paulo: SMA, 2009a. 104p.

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, 2009b. 648p.

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

SCHALLER, G.B.; CRAWSHAW JR, P. G. Movement Patterns of Jaguar. **Biotropica**, v. 12, n. 3, p. 161-168, 1980.

SINCLAIR, E. A.; SWENSON, E. L.; WOLFE, M. L.; CHOATE, D. C.; BATES, B.; CRANDALL, K. A. Gene flow estimates in Utah's cougars imply management beyond Utah. **Animal Conservation**, v. 4, p. 257-264, 2001.

SLOANE, M. A.; SUNNUCKS, P.; ALPERS, D.; BEHEREGARAY, L. B.; TAYLOR, A. C. Highly reliable genetic identification of individual northern hairy-nosed wombats from single remotely collected hairs: a feasible censuring method. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 1233-1240, 2000.

SOLÉ-CAVA, A. M. Biodiversidade molecular e genética da conservação. In: MATIOLI SR. **Biologia Molecular e Evolução**. Ribeirão Preto: Editora Holos, 2001, p. 171-192.

SOULÉ, M. E. What Is Conservation Biology? **BioScience**, v. 35, n. 11, p. 727-734, 1985.

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

SUTHERLAND, G. R.; RICHARDS, R. I. Simple tandem DNA repeats and human genetic disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences, USA**, v. 92, p. 3636-3641, 1995.

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, 2000.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. Colonização de clareiras naturais na floresta Atlântica no Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 20, p. 57-66, 1997.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A regeneração de uma floresta tropical após corte e queima (São Paulo – Brasil). **Revista Brasileira de Biologia**, v. 59, n. 2, p. 239-250, 1999.

TABARELLI, M.; VILLANI, J. P.; MANTOVANI, W. Estudo comparativo da vegetação de dois trechos de floresta secundária no Núcleo Santa Virgínia/SP. **Revista do Instituto Florestal**. São Paulo, v.6, n. 1, p. 1-11, 1994.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, J. M. C.; HIROTA, M.; BEDÊ, L. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695-700, 2005.

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

TABERLET, P.; MATTOCK, H.; DUBOIS-PAGANON, C.; BOUVET, J. Sexing free-ranging brown bears *Ursus arctos* using hairs found in the field. **Molecular Ecology**, v. 2, p. 399-403, 1993.

TABERLET, P.; GRIFFIN, S.; GOOSSENS, B.; QUESTIAU, S.; MANCEAU, V.; ESCARAVAGE, N.; WAITS, L. P.; BOUVET, J. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 16, p. 3189-3194, 1996.

TABERLET, P.; CAMARRA, J. J.; GRIFFIN, S.; HANOTTE, O.; WAITS, L. P.; DUBOIPAGANON, C.; BURKE, T.; BOUVET, J. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. **Molecular Ecology**, v. 6, p. 869-876, 1997.

TABERLET, P.; WAITS, L. P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 14, p. 323-327, 1999.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (submitted), 2011.

VALDERRAMA, X.; KARESH, W. B.; WILDMAN, D. E.; MELNICK, D. J. Noninvasive methods for collecting fresh hair tissue. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 1749-1752, 1999.

VALIÉRE, N. GIMLET: a computer program for analyzing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Notes**, 2002.

VELOSO, H. P.; RANGEL-FILHO, A. L. R.; LIMA, J. C. A. **Classificação da vegetação brasileira adaptada a um sistema universal**. Rio de Janeiro: IBGE, 1991.

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

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, 2005.

VILLANI, J. P. **Zona de amortecimento do Parque Estadual da Serra do Mar – Núcleo Santa Virgínia: subsídios ao manejo sustentável dos fragmentos de Mata Atlântica**. 2007. 83 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais) – Universidade de Taubaté, Taubaté, 2007.

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

WAITS, L. P.; LUIKART, G.; TARBELET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 249-256, 2001.

WAYNE, R. K.; MORIN, P. A. Conservation genetics in the new molecular age. **Frontiers in Ecology and the Environment**, v. 2, n. 2, p. 89-97, 2004.

WEAVER, J. L.; WOOD, P.; PAETKAU, D.; LAACK, L. L. Use of scented hair snares to detect ocelots. **Wildlife Society Bulletin**, v. 33, n. 4, p. 1384-1391, 2005.

WEBER, J. L.; WONG, C. Mutation of human short tandem repeats. **Human Molecular Genetics**, v. 2, p. 1123-1128, 1993.

WILDER, J.; HOLLOCHER, H. Mobile elements and the genesis of microsatellites in dipterans. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, p. 384-392, 2001.

APÊNDICE A – Modelo mutacional para cada loco.

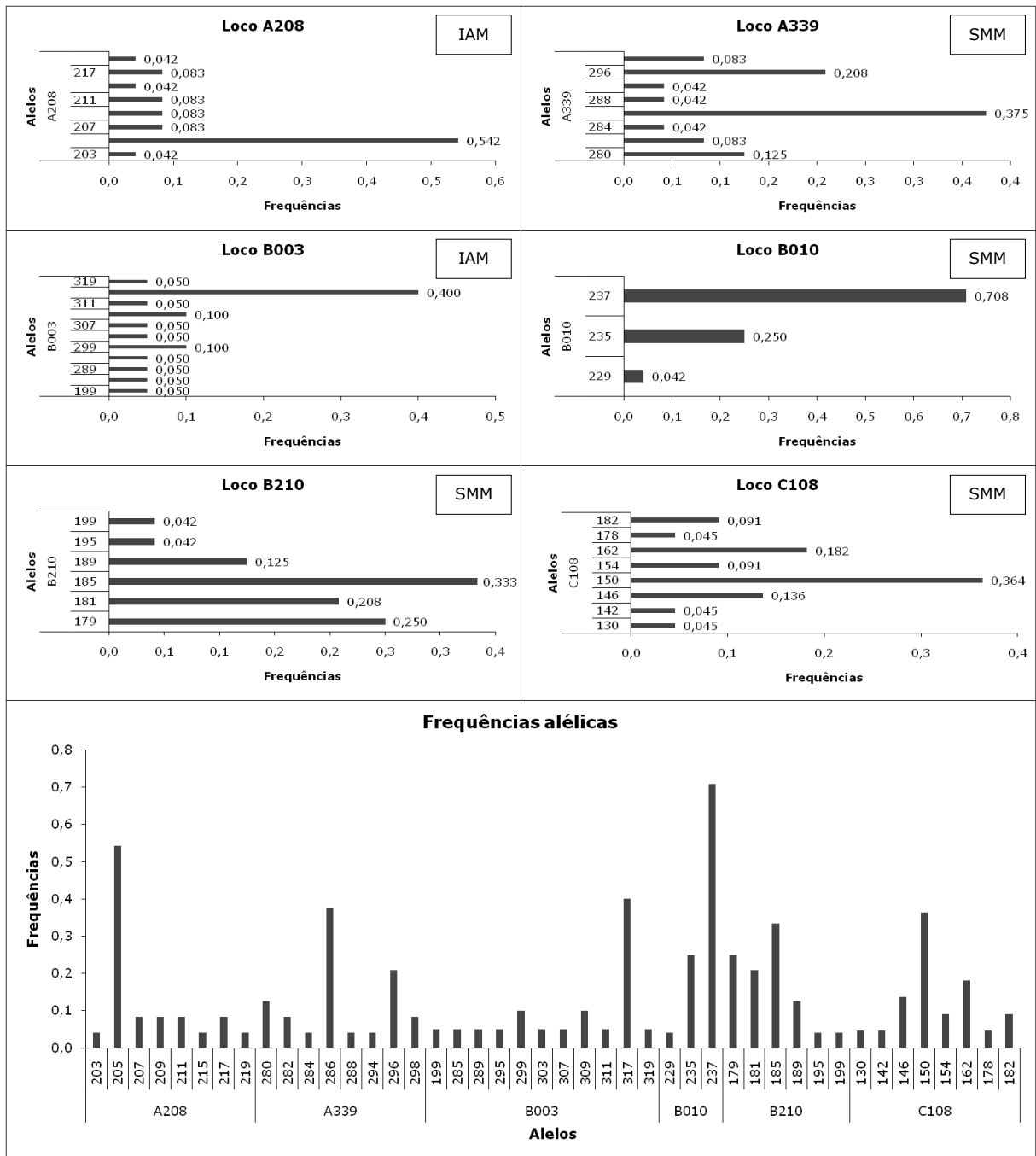


Figura 16 – Distribuição da frequência alélica para cada loco, utilizada na escolha do modelo mutacional, e para o conjunto de locos utilizados.

(IAM) *Infinite Alleles Model*; (SMM) *Stepwise Mutation Model*.