

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

**Análise do DNA fecal para a determinação da presença e do número populacional mínimo de onças-pardas (*Puma concolor*, Felidae) em duas Unidades de Conservação do estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica de Jataí.**

**Renata Alonso Miotto**

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

São Carlos – SP  
Março de 2006

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

**Análise do DNA fecal para a determinação da presença e do número populacional mínimo de onças-pardas (*Puma concolor*, Felidae) em duas Unidades de Conservação do estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica de Jataí.**

**Renata Alonso Miotto**

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

São Carlos – SP  
Março de 2006

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

M669ad

Miotto, Renata Alonso.

Análise do DNA fetal para a determinação da presença e do número populacional mínimo de onças-pardas (*Puma concolor*, Felidae) em duas Unidades de Conservação do estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica de Jataí / Renata Alonso Miotto. -- São Carlos : UFSCar, 2006.

68 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2006.

1. Conservação da natureza. 2. DNA mitocondrial. 3. Microsatélite. 4. Metapopulação. 5. DNA fecal. I. Título.

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

**Renata Alonso Miotto**

Análise do DNA fecal para a determinação da presença e do número populacional mínimo de onças-pardas (*Puma concolor*, Felidae) em duas Unidades de Conservação do estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica de Jataí.

Aprovado em 24 de abril de 2006.

**Banca Examinadora**

**Presidente** \_\_\_\_\_

**Dr. Pedro Manoel Galetti Jr - UFSCar**

**Examinador** \_\_\_\_\_

**Dr. Mauro Galetti Rodrigues – UNESP/Rio Claro**

**Examinador** \_\_\_\_\_

**Dr. Nivaldo Nordi - UFSCar**

Dedico este trabalho aos  
meus pais, Edna e Renato,  
pela construção de um caráter  
e realização dos meus sonhos.

“Receio que os animais vejam o homem como um semelhante que perigosamente perdeu a sã razão animal – como o animal delirante, o animal ridente, o animal plangente, o animal infeliz”.

Friedrich Nietzsche, *Gaia ciência*.

## **Agradecimentos**

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior pela receptividade a novas idéias, por sua grande vontade de investigar problemas tão diferentes e por fornecer todas as condições à realização deste trabalho. Obrigada por confiar em mim, me acolher ao seu laboratório dominado por peixes e camarões e me dar total liberdade durante a realização deste projeto;

Aos professores Dr. Eduardo Eizirik, Dr. Manoel Martins Dias Filho, Dra. Silvia Nassif Del Lama e Dra. Patrícia Domingues Freitas, por todas as sugestões durante a elaboração do artigo;

À ONG Associação Mata Ciliar e ao CENAP/IBAMA por cederem amostras de sangue;

Aos meus pais, Edna e Renato, por viabilizarem e investirem na minha formação;

À todos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, pelo ótimo convívio. Aos queridos Fefê, Mercival, Priscila, Elo, Ana Karina e Terumi que acompanharam de perto o drama do trabalho com fezes e sempre me ajudaram;

Ao Dr. Fernando Pacheco Rodrigues, que tanto me ajudou na reta final do trabalho;

Ao querido amigo Eliot, vulgo Giordano, não só pelas coletas, mas também por estar ao meu lado e me ajudar no pior e mais difícil momento da minha vida. Nunca consegui expressar bem a minha gratidão, mas a deixo aqui registrada;

A quem agüentou todo o meu estresse-fim-de-mestrado! Obrigada, Sí, pela amizade, pelo amor, pelo apoio;

À Luci, minha melhor e mais especial amiga, praticamente minha irmã, por sempre estar ao meu lado e até coletar uma amostrinha de vez em quando;

Àqueles que direta ou indiretamente deram a sua contribuição ao trabalho: Nina, José, Terror (quanta filosofia!), Foca e Lua.

## Resumo

Onças-pardas (*Puma concolor*) são animais ameaçados devido à fragmentação, perda de habitats e ao crescente conflito com populações humanas em expansão. Utilizamos um método não invasivo de estudo, a análise genética de fezes, para determinar a presença e estimar o número populacional mínimo de onças-pardas (*Puma concolor*) em duas Unidades de Conservação ao nordeste do estado de São Paulo, Brasil: a Estação Ecológica do Jataí (EEJ) e o Parque Estadual do Vassununga (PEV). A partir da amplificação de uma porção do gene citocromo *b* do genoma mitocondrial e da comparação deste fragmento com seqüências de referência de outros carnívoros presentes na região, pudemos diagnosticar a espécie que originalmente depositou as fezes e, por meio de um painel de 4 *loci* de microssatélites, individualizar cada uma das amostras coletadas em campo. Dentre as 20 fezes coletadas, diagnosticamos 9 como realmente pertencentes à espécie e 2 como provenientes de jaguatiricas (*L. pardalis*), espécie simpátrica à *P. concolor*. Determinamos a presença de ao menos 9 indivíduos de *P. concolor* na região, e plotando os pontos de coleta das fezes sobre uma imagem de satélite, verificamos a ocorrência de 3 indivíduos na EEJ, 4 no PEV e dois nos entornos. A probabilidade de identidade (PID) foi de 0,0001 e a probabilidade de não detecção alélica (allelic dropout) de 10,6%. A determinação da presença, a estimativa do tamanho populacional mínimo e a distribuição de *P. concolor* nas áreas da EEJ e do PEV determinadas neste estudo podem fornecer subsídios para a implantação dos planos de manejo e conservação da espécie, assim como dessas áreas e de seus entornos.

## Sumário

|   |    |
|---|----|
| <b>1. Introdução</b>                                | 9  |
| 1.1. Análises genéticas não invasivas               | 11 |
| 1.2. Marcadores Moleculares                         | 12 |
| 1.2.1. Seqüências de DNA mitocondrial               | 14 |
| 1.2.2. Microssatélites                              | 14 |
| 1.3. Classificação e origem da Família Felidae      | 15 |
| 1.4. A espécie <i>Puma concolor</i> (Linnaeus 1771) | 16 |
| 1.5. Conservação de <i>Puma concolor</i>            | 20 |
| 1.6. Caracterização da área de estudo               | 23 |
| 1.6.1. Parque Estadual do Vassununga (PEV)          | 24 |
| 1.6.2. Estação Ecológica de Jataí (EEJ)             | 25 |
| 1.6.3. Importância biológica da EEJ e do PEV        | 26 |
| <b>2. Objetivos</b>                                 | 28 |
| <b>3. Material e Métodos</b>                        | 29 |
| 3.1. Obtenção das amostras                          | 29 |
| 3.2. Extração de DNA                                | 32 |
| 3.2.1. Fezes  | 32 |
| 3.2.2. Sangue                                       | 34 |
| 3.3. Diagnóstico da espécie                         | 35 |
| 3.4. Individualização das amostras                  | 37 |
| 3.4. Análise dos resultados                         | 39 |
| 3.5. Localização dos indivíduos na paisagem         | 41 |
| <b>4. Resultados</b>                                | 42 |
| <b>5. Discussão</b>                                 | 47 |
| 5.1. Análises genéticas                             | 47 |
| 5.2. Implicações conservacionistas                  | 51 |
| <b>6. Conclusões</b>                                | 54 |
| <b>7. Referências Bibliográficas</b>                | 56 |

## 1. Introdução

Um dos objetivos da biologia da conservação é o de possibilitar a sobrevivência, em longo prazo, das espécies e dos ecossistemas das quais elas dependem (Wayne e Morin 2004). A introdução de espécies exóticas, a fragmentação de habitats e o extermínio da fauna e flora por ações humanas são os principais responsáveis pela perda da diversidade biológica mundial (Pimm e Gilpin 1989).

Dentro das comunidades biológicas, certas espécies são importantes para determinar a persistência de muitas outras (Primack e Rodrigues 2001). Essas “espécies-chave”, representadas por predadores de topo de cadeia, afetam a organização da comunidade com base apenas na quantidade de indivíduos ou biomassa (Janzen 1986) e são importantes no controle de populações de herbívoros (Redford 1992). Desse modo, proteger espécies-chave, como por exemplo, os grandes carnívoros, deve ser prioridade para os esforços de conservação, uma vez que a perda da área de vida de uma espécie-chave pode levar à perda de muitas outras espécies que se encontram em níveis tróficos inferiores (Primack e Rodrigues 2001).

O declínio das populações de grandes predadores hoje é um problema global (Weber e Rabinowitz 1996). Na Ásia, na África e nas Américas, a maioria dessas populações sofre múltiplas pressões, como a degradação dos seus habitats, a caça, doenças transmitidas por animais domésticos e o comércio ilegal de partes de seus corpos (Weber e Rabinowitz 1996). O primeiro passo para o desenvolvimento de planos de conservação seria a determinação da presença e abundância de espécies ameaçadas (Palomares *et al.* 2002), mas a detecção de grandes carnívoros é dificultada pela baixa densidade de indivíduos, além dos hábitos elusivos, de difícil observação que apresentam (Kohn e Wayne 1997).

Uma nova possibilidade para monitorar a demografia de espécies que são difíceis de serem observadas ou capturadas utiliza materiais orgânicos que os organismos deixam para trás (Wayne e Morin 2004). Novas técnicas moleculares de extração de DNA aplicadas a

materiais como fezes, pêlos e ossos permitem uma análise não invasiva dos indivíduos (Morin e Woodruff 1996) e oferecem uma alternativa para a contagem e a identificação individual em populações, além da determinação do sexo e dos seus deslocamentos (Kohn e Wayne 1997). Estudos não invasivos também são métodos muito promissores de monitorar populações ameaçadas, pois evitam os danos causados pela captura (Wayne e Morin 2004).

Planos de conservação baseados em informações obtidas de maneira não invasiva podem então, integrar informações genéticas, ecológicas e fenotípicas para maximizar as chances de populações persistirem a futuras mudanças, assim como preservar seu legado histórico (Moritz 2002).

### ***1.1. Análises genéticas não invasivas***

A fim de minimizar o impacto de estudos em populações e, ao mesmo tempo, permitir a detecção de grandes carnívoros, vêm sendo desenvolvidos métodos não invasivos para o estudo populacional por meio de marcadores moleculares (Morin e Woodruff 1996; Kohn e Wayne 1997). Métodos não invasivos baseados no estudo do DNA foram propostos recentemente para estimar o tamanho populacional com grandes vantagens já que as amostras podem ser coletadas sem a necessidade de visualizar ou perturbar o animal (Taberlet *et al.* 1997).

Uma alternativa não invasiva para a identificação do indivíduo em estudos de campo é a utilização de fezes para a obtenção de DNA (Ernest *et al.* 2000). Fezes são abundantes, sua coleta não é invasiva e poucos gramas contêm DNA proveniente de milhares de células da mucosa intestinal (Albaugh *et al.* 1992). Uma vez que cada indivíduo pode ser caracterizado por um genótipo *multilocus* único, a análise do DNA fecal torna possível a determinação do número de animais diferentes que foram amostrados e permite que seja realizada uma estimativa do tamanho populacional (Bellemain *et al.* 2005). A grande variação de algumas porções do DNA mitocondrial entre espécies distintas também permite que as amostras possam ser individualizadas dentre diversos *taxa* (Farrel *et al.* 2000).

A análise de DNA das fezes de qualquer carnívoro apresenta a dificuldade de se discernir entre o DNA da espécie de interesse e o material genético de suas presas (Ernest *et al.* 2000). Outra condição à técnica molecular é que esta seja aplicável ao DNA degradado assim como ele é encontrado nas fezes (Palomares *et al.* 2002). Esses problemas podem ser resolvidos por meio de ampliações espécie-específicas de seqüências de DNA relativamente curtas (Palomares *et al.* 2002) já que a chance de amplificação de um fragmento íntegro de DNA aumenta à medida que o tamanho do fragmento diminui (Frantzen *et al.* 1998). Ernest *et al.* (2000), ao estudarem indivíduos de *Puma concolor*, realizaram a amplificação de microssatélites por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR) em amostras de sangue e

fezes de diferentes animais que poderiam levar à falsas individualizações. Constataram, porém, que não ocorreram ampliações para as presas não-felinas, o que demonstra a eficiência da técnica.

Estudos sobre a distribuição dos genótipos obtidos a partir de análises não invasivas têm demonstrado resultados similares àqueles encontrados em estudos com rádio-telemetria que determinaram o modo de deslocamento e as áreas de vida de espécies de grandes carnívoros (Wayne e Morin 2004). Estudando ursos negros da Noruega, Bellemain *et al.* (2005) compararam as estimativas de tamanho populacional fornecidas por dados genéticos com dados coletados em campo em uma mesma escala temporal e encontraram grande correspondência entre os dois métodos de amostragem.

Na última década, um grande número de estudos populacionais sobre as mais diversas espécies se baseou em análises genéticas não invasivas como, por exemplo: com lince ibéricos (*Lynx pardinus*) (Pires e Fernandes 2003; Palomares *et al.* 2002); com chimpanzés (*Pan troglodytes verus*) (Bradley *et al.* 2000, 2001; Morin *et al.* 2001); gorilas (*Gorilla gorilla gorilla*) (Bradley *et al.* 2000, 2001); ursos-negros americanos (Wasser *et al.* 1997); aves (*Otis tarda*) (Idaghdour *et al.* 2003); leões marinhos (*Eumetopias jubatus*) (Deagle *et al.* 2005); mustelídeos (Riddle *et al.* 2003; Gómez-Moliner *et al.* 2004; Hedmark *et al.* 2004); raposas (*Vulpes vulpes*) (Dalén *et al.* 2004); e elefantes africanos (*Loxodonta cyclotis*) (Eggert *et al.* 2003).

## **1.2. Marcadores moleculares**

A existência de variabilidade genética permite a comparação entre indivíduos, populações ou espécies diferentes (Solé-Cava 2001). Muitos biólogos populacionais estão aderindo às técnicas baseadas em DNA com o intuito de obter marcadores genéticos altamente informativos (Parker *et al.* 1998), isto é, que permitam acessar a variação genética, e dessa maneira estudar indivíduos e/ou seus genes sob as condições do campo. O trabalho com

marcadores de DNA pode fornecer uma “impressão digital” de cada indivíduo (Parker *et al.* 1998), informações sobre a estrutura populacional e diferenciação geográfica (Awise 2004), além da determinação das áreas de vida, tamanho territorial e tamanho populacional (Kohn e Wayne 1997). Ferramentas moleculares podem ser úteis quando o objetivo é elaborar um plano para a manutenção da diversidade genética e para elucidar aspectos demográficos e ecológicos de espécies ameaçadas (Haig 1998).

Na última década, com o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – *Polymerase Chain Reaction*) (Mullis e Faloona 1987; Saiki *et al.* 1988), um grande número de novas ferramentas moleculares tornou-se disponível a estudos genéticos ao nível populacional (Parker *et al.* 1998; Sunnucks 2000) como, por exemplo, RFLP (Restriction Fragment Length Polimorphisms), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), minissatélites (VNTR – Variable Number of Tandem Repeats) e microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats) (Ferreira e Gratapaglia 1995). A tecnologia de PCR envolve a síntese enzimática *in vitro* de milhares de cópias de uma seqüência específica de DNA e isso permitiu a obtenção de material suficiente para a análise genética, mesmo de fontes que forneçam uma quantidade mínima de DNA (Perez-Sweeney *et al.* 2003).

Cada marcador genético apresenta características próprias que o torna mais adequado à resolução de uma questão específica (Perez-Sweeney *et al.* 2003). Marcadores diferentes podem ter taxas de substituição/evolução diferentes, de modo que, por meio de uma escolha judiciosa desses marcadores, torna-se possível solucionar desde problemas de identificação de indivíduos à identificação de espécies crípticas ou formulação de hipóteses filogenéticas em grupos supraespecíficos (Solé-Cava 2001). Marcadores que evoluem rapidamente são úteis para o estudo de indivíduos, famílias e populações, enquanto que evoluem mais lentamente são melhor utilizados no estudo de espécies ou taxa supraespecíficos (Solé-Cava 2001). O método a ser usado na abordagem de um problema depende então da adequação do grau de variabilidade do marcador molecular escolhido ao nível de divergência que se deseja estudar

(Solé-Cava 2001). Dentre os marcadores moleculares mais utilizados atualmente destacam-se as seqüências de DNA mitocondrial e os microssatélites.

### **1.2.1. Seqüências de DNA mitocondrial**

As células da maioria dos eucariotos contêm um DNA nuclear de herança biparental, e também um DNA organelar (em mitocôndrias e cloroplastos) que, usualmente, tem herança uniparental (materna) (Sunnucks 2000; Parker *et al.* 1998). Essa diferença na transmissão e ainda outras em relação às propriedades evolutivas faz com que o DNA nuclear e o DNA organelar reflitam aspectos diferentes da biologia e da história de uma população. Devido à sua alta taxa de evolução, à ausência de recombinação e ao alto polimorfismo de algumas de suas porções entre espécies distintas, o DNA mitocondrial é o marcador adequado para se investigar a diferenciação entre espécies intimamente relacionadas (Hedrick e Miller 1992; Perez-Sweeney *et al.* 2003; Avise 2004). Menor do que o DNA nuclear, haplóide e de morfologia circular, o DNA mitocondrial (15-17 kb) propicia o diagnóstico de um determinado *taxa* mais rapidamente (Sunnucks 2000) além de fornecer informações sobre efeitos fundadores, hibridizações e introgressões (Parker *et al.* 1998).

A avaliação direta da variação genética existente entre organismos, espécies ou populações pode ser realizada por meio da determinação da seqüência de bases de algumas porções do DNA mitocondrial. A técnica de seqüenciamento envolve o isolamento do DNA, a amplificação da porção de interesse via PCR e a resolução da reação de seqüenciamento em um seqüenciador automático (Perez-Sweeney *et al.* 2003).

### **1.2.2. Microssatélites**

Microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats) consistem em pequenas seqüências de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento (como, por exemplo, CA, CAAC, ou GGAACC), repetidas lado a lado (Ferreira e Grattapaglia 1995). São abundantes no genoma nuclear de eucariotos

(Weber e Wong 1993) e têm herança codominante, isto é, cada um dos alelos de um *locus* de um indivíduo pode ser identificado separadamente (Sunnucks 2000). Microsatélites são detectados por meio da amplificação via PCR utilizando-se *primers* específicos que se ligam a regiões conservadas delimitando então, a seqüência de DNA que contém a região repetitiva (Perez-Sweeney *et al.* 2003). Os fragmentos resultantes da amplificação são então separados por eletroforese e, uma vez marcados com fluorescência, podem ser visualizados em seqüenciador automático (Perez-Sweeney *et al.* 2003). No genoma animal, em alguns casos, pode ocorrer conservação de sítios de microsatélites entre espécies relacionadas, tornando possível a utilização dos mesmos *primers*, comumente denominados heterólogos, entre espécies ou gêneros distintos (Menotti-Raymond e O'Brien 1995).

Microsatélites são marcadores largamente utilizados em estudos populacionais, pois poucos *loci* podem fornecer muitos alelos a serem examinados (Parker *et al.* 1998). Devido a uma grande variação no número de unidades repetitivas para qualquer *locus* entre membros de uma espécie, os *loci* de microsatélites exibem alto polimorfismo (Culver *et al.* 2001). Acredita-se que este alto nível de polimorfismo em *loci* de microsatélites seja resultado de erros de pareamento durante a replicação do DNA, causando o ganho ou a perda de uma ou mais unidades repetitivas (Culver *et al.* 2001). Esse mecanismo de mutação produz diferentes tamanhos de fragmentos repetitivos que por sua vez são diferentes entre indivíduos (Culver *et al.* 2001). A variação em microsatélites tornou-se, então, uma classe útil de marcadores genéticos em populações, já que permite a identificação individual e o estabelecimento de relações de parentesco (Goldstein e Pollock 1997), além de serem indicadores de mudanças na diversidade genética em curtos períodos de tempo (Haig 1998).

### ***1.3. Classificação e origem da Família Felidae***

Entre os carnívoros, a família Felidae representa uma única radiação evolutiva com numerosas espécies apresentando diferenças ecológicas, morfológicas e comportamentais

(Masuda *et al.* 1996). Registros fósseis indicam que os felinos divergiram de um ancestral comum aproximadamente 15-20 milhões de anos atrás (Wayne *et al.* 1989 *apud* Masuda *et al.* 1996).

Diversos estudos (Lopez *et al.* 1994; Johnson *et al.* 1996; Janczewski *et al.* 1995; Masuda *et al.* 1996) apontam a existência de ao menos três grandes linhagens de felinos: a linhagem do gato doméstico (“domestic cat lineage”) formada por gatos relacionados ao gato doméstico (*Felis catus*) e que inclui os gatos selvagens africanos e europeus; outra, a linhagem pantera (“pantherine lineage”) que inclui as cheetas, as onças-pardas e os grandes felinos como o leão, leopardo, tigre e a onça-pintada; e finalmente, a linhagem da jaguatirica (“ocelot lineage”) que consiste em 7 espécies de pequenos felinos encontrados nas Américas do Central e do Sul (Masuda *et al.* 1996).

A região neotropical é ocupada por 10 espécies selvagens de felinos que divergiram a partir do Pleistoceno, 1-5 milhões de anos atrás (Berta 1983). Reconstruções filogenéticas sugerem que dentre estas, as sete espécies de pequenos felinos da América do Sul foram as primeiras a divergir (Masuda *et al.* 1996; O’Brien 1994; Pecon Slattery *et al.* 1994).

A família Felidae é subdividida em três subfamílias, 18 gêneros e 36 espécies, sendo que, destas, oito ocorrem em território brasileiro (Oliveira e Cassaro 1999).

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

A onça-parda (*Puma concolor*) (Figura 2) é uma das espécies representantes da família Felidae que ocorre em território brasileiro (Oliveira e Cassaro 1999). O rápido declínio de populações de onças-pardas teve início durante os anos de 1960, quando mais de 15.000 peles de onças foram comercializadas a partir da Amazônia (Fitzgerald 1989).

A espécie tem uma distribuição muito ampla (Figura 1), desde oeste do Canadá até o extremo sul do continente sul-americano, passando por todo o Brasil (Oliveira e Cassaro 1999). Popularmente é conhecida como onça-vermelha, leão-baio, suçuarana, puma ou leão-

da-montanha (Oliveira e Cassaro 1999). O hábitat é variado, incluindo florestas tropicais e subtropicais, caatinga, cerrado e pantanal, bem como sua dieta, que inclui, geralmente, mamíferos, desde roedores até filhotes de pecuária doméstica (Oliveira e Cassaro 1999).



**Figura 1.** Distribuição atual de *Puma concolor* pelas Américas (modificado de IUCN 2002).

A onça-parda é um predador generalista e, provavelmente, sua grande adaptabilidade permitiu que a espécie resistisse às extinções do Pleistoceno que eliminaram os outros grandes felinos da América do Norte (IUCN 2005). As principais presas dos pumas são diferentes de acordo com a variação latitudinal da sua área de vida. Particularmente nos trópicos, presas de tamanho pequeno a médio parecem ser mais importantes enquanto na América do Norte, a predação é preferencial sobre grandes ungulados. Iriarte *et al.* (1990) sugeriu que o menor tamanho corporal das onças-pardas nos trópicos, e a baixa taxa de predação de presas grandes, estão ligados à competição interespecífica da espécie com a onça-pintada (*Panthera onca*), o maior felino americano. Farrel *et al.* (2000), estudando a dieta de carnívoros simpátricos a partir da análise do conteúdo de presas nas fezes, também encontraram mínima sobreposição de presas entre as duas espécies.

Pumas são animais territorialistas 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 prática se deve ao fato de que, quando defeca, a maioria dos carnívoros produz secreções odoríferas na glândula anal que aderem às fezes (Chame 2003). Uma vez que cada espécie produz um odor característico, a marcação territorial por meio das fezes permite que sejam reconhecidas informações interespecíficas de um território individual, sexo, e estado reprodutivo desempenhando importante papel na comunicação social desses animais (Gorman e Trowbridge 1989).

As onças-pardas necessitam de grandes áreas de habitat, geralmente maiores do que 100 km<sup>2</sup> (Sweaner *et al.* 2000), e quando em forrageamento, podem viajar, em média, 9 km por noite (Beier 1993). São animais que se dispersam por longas distâncias, até mesmo na presença de grande descontinuidade em seu habitat (Ruth *et al.* 1998). Já foram documentadas, para machos subadultos, dispersões maiores do que 450 km (Anderson *et al.* 2004).

Pumas são carnívoros solitários que exibem a poliginia como estratégia reprodutiva onde machos tipicamente dominantes acasalam com fêmeas que residem na sua área de vida (Murphy 1998 *apud* Anderson *et al.* 2004). Aparentemente, não há uma estação reprodutiva bem definida e acasalamentos podem ocorrer durante todo o ano (Ross e Jalkotzy 1992). Estima-se que a sobrevivência desses animais seja de 12 a 13 anos (Currier 1983).

Os machos agressivamente defendem o seu território contra outros machos intrusos enquanto as fêmeas permitem maior sobreposição com coespecíficos (Ross e Jalkotzy 1992). A área de vida das fêmeas tende a ser grande o suficiente para prover presas a elas e a seus filhotes, mas o território dos machos tende a ser maior ainda, se sobrepondo ao de várias fêmeas, aparentemente para maximizar o seu sucesso reprodutivo (Murphy 1998 *apud* Anderson *et al.* 2004). Os machos dispersam mais frequentemente e a maiores distâncias do que as fêmeas, que muitas vezes exibem filopatria (Sweaner *et al.* 2000). A filopatria em machos foi documentada somente na Flórida, onde restrições severas ao seu habitat aparentemente forçaram os machos a retornarem às vizinhanças da área de nascimento após tentativas frustradas de dispersão (Maehr 1997 *apud* Sweaner *et al.* 2000).

Em ambientes natural ou artificialmente fragmentados, geralmente as populações de onças-pardas exibem estrutura de metapopulação (Beier 1996; Sweaner *et al.* 2000) e os jovens entre 10 e 33 meses de idade dispersam a partir da área de vida da mãe à procura de um novo local apropriado para se estabelecerem (Sweaner *et al.* 2000). Apesar de estudos de telemetria e de estimativas de dispersão e migração (Beier 1996; Sweaner *et al.* 2000) confirmarem a tendência de estruturação em metapopulações, Anderson *et al.* (2004) encontraram dados consistentes com uma grande população panmítica de pumas nos EUA exibindo alto fluxo gênico entre subpopulações e baixa estruturação. Esses autores sugerem que a dispersão dos machos em corredores naturais de vegetação nas regiões do Colorado, sul de Dakota e Wyoming (EUA) está possibilitando a conectividade entre subpopulações.

### **1.5. Conservação de *Puma concolor***

Todas as oito espécies de felinos brasileiros estão em extinção (Ibama 2003) ou ainda, de acordo com a IUCN (2002), enquadram-se na categoria “próxima da extinção”. Os principais fatores responsáveis pela atual situação são a perda e fragmentação de habitat, a caça humana e a diminuição das suas principais presas alimentares (Mazzolli *et al.* 2002).

Weaver *et al.* (1996) estimaram que 75% da mortalidade de pumas adultos é resultado de conflitos com humanos. A predação de animais domésticos por felinos como a onça-parda e a onça-pintada (*Panthera onca*) é pouco documentada no Brasil (Conforti e Azevedo 2003), mas ocorre em locais em que os criadouros e as suas áreas de vida estão muito próximos (Schaller e Crawshaw 1980; Mazolli *et al.* 2002). Muitos são mortos por fazendeiros que vêem nesses animais uma ameaça às suas criações (Conforti e Azevedo 2003).

Animais domésticos tornam-se presas em potencial em consequência ao desflorestamento. O declínio dos refúgios e do número de presas (Mazolli *et al.* 2002) pode afetar negativamente o comportamento de forrageamento de predadores de topo de cadeia (Novack *et al.* 2005) e esse desequilíbrio aumenta o conflito entre grandes felinos e humanos (Mazolli *et al.* 2002). Conforti e Azevedo (2003) relataram um aumento na predação de animais domésticos nas redondezas do Parque Nacional do Iguaçu coincidente ao aparente desaparecimento de uma das principais presas dos felinos, o queixada (*Tayassu pecari*).

No Brasil, foram realizados poucos estudos intensivos a respeito da ecologia de onças-pardas em seu ambiente natural, ao contrário das onças-pintadas (*Panthera onca*), espécie simpátrica a *P. concolor* que vem sendo estudada desde os anos 80 por Crawshaw e colaboradores (Schaller e Crawshaw 1980; Crawshaw 1987; Crawshaw e Quigley 1991). Em alguns países da América Central, muito do que foi aprendido sobre as onças-pintadas e suas necessidades vem sendo aplicado à conservação de *P. concolor* (Weber e Rabinowitz 1996). Desde 1989, grupos governamentais e não-governamentais se empenham em preservar e manejar a diversidade biológica no plano multinacional, desde o México até o Panamá. O

foco dessa iniciativa está no corredor biológico utilizado por onças e outras espécies no istmo que promove a ligação entre as Américas do Norte e do Sul. Esse corredor foi funcional por três milhões de anos até o início do século passado quando o extensivo cultivo de banana e o estabelecimento de populações humanas fragmentaram a floresta que cobria a região (Weber e Rabinowitz 1996). Espera-se com esse programa restabelecer a funcionalidade desse corredor natural a partir da cooperação entre os países individualmente. Essa iniciativa, inicialmente planejada para a conservação de *P. onca* acaba por conservar também *P. concolor*.

Até o início da colonização européia, pumas distribuía-se amplamente em praticamente toda a América do Norte (Anderson 1983 *apud* McRae *et al.* 2005). Hoje em dia muitos estados americanos abrigam somente pequenas subpopulações remanescentes (McRae *et al.* 2005). A espécie vem sendo intensamente estudada neste continente uma vez que a expansão urbana está promovendo o desaparecimento dos animais e gerando conflitos entre estes e a população humana. Roelke *et al.* (1993) relataram, com base em diversos marcadores de DNA, que as populações da Flórida têm, nos dias de hoje, a mais baixa variação genética já encontrada para qualquer população de felinos estudada, menor até mesmo do que a dos guepardos africanos (O'Brien *et al.* 1983).

Além da baixa variação genética, os felinos podem enfrentar dificuldades reprodutivas e de sobrevivência quando sujeitos ao endocruzamento (Roelke *et al.* 1993). Dentre os principais problemas estão a baixa qualidade do sêmen produzido pelos machos, o criptorquidismo (a não descida dos testículos a partir do tórax em direção ao escroto), deficiência cardíaca e maior susceptibilidade a doenças infecciosas (Roelke *et al.* 1993).

Devido à importância dos carnívoros de topo no controle de processos ecológicos e à grande chance de conflitos futuros com populações humanas que crescem progressivamente, estudos sobre demografia e estrutura genética de onças-pardas são essenciais para a sua

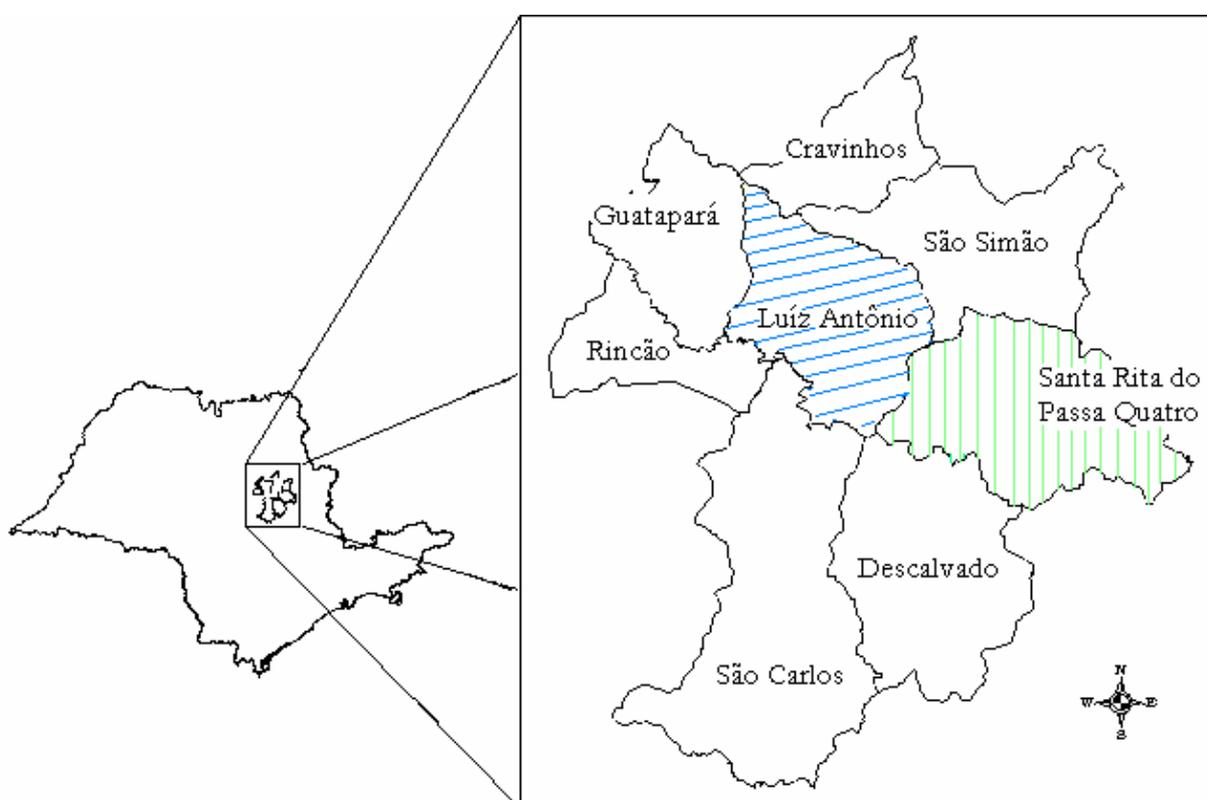
conservação, uma vez que grandes áreas devem ser mantidas para a persistência destes animais.



**Figura 2.** A espécie *Puma concolor*. Fotografia gentilmente cedida por José Pedro Nepomuceno Ribeiro.

### 1.6. Caracterização da área de estudo

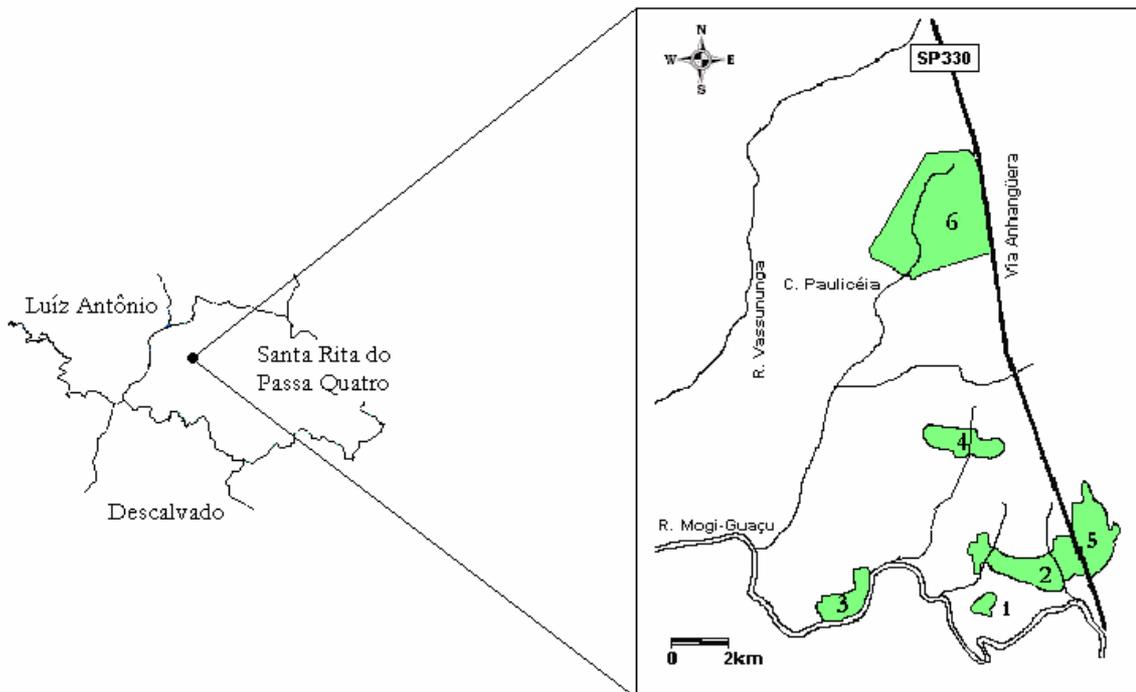
Realizamos este trabalho em duas Unidades de Conservação e seus entornos ao nordeste do estado de São Paulo: o Parque Estadual do Vassununga, localizado no Município de Santa Rita do Passa Quatro (coordenadas 21° 43' S, 47° 28' W) e a Estação Ecológica de Jataí, município de Luíz Antônio (coordenadas 21° 51' S, 47° 82' W), ambas sob o gerenciamento do Instituto Florestal/SP (Figura 3). As duas Unidades de Conservação encontram-se 3 km distantes uma da outra (Korman 2003).



**Figura 3.** Localização regional dos municípios de Luíz Antônio e Santa Rita do Passa Quatro no estado de São Paulo. (Modificado de “Acervo Cartográfico Digital/Laboratório de Análise e Planejamento Ambiental / UFSCar”).

### 1.6.1. Parque Estadual do Vassununga (PEV)

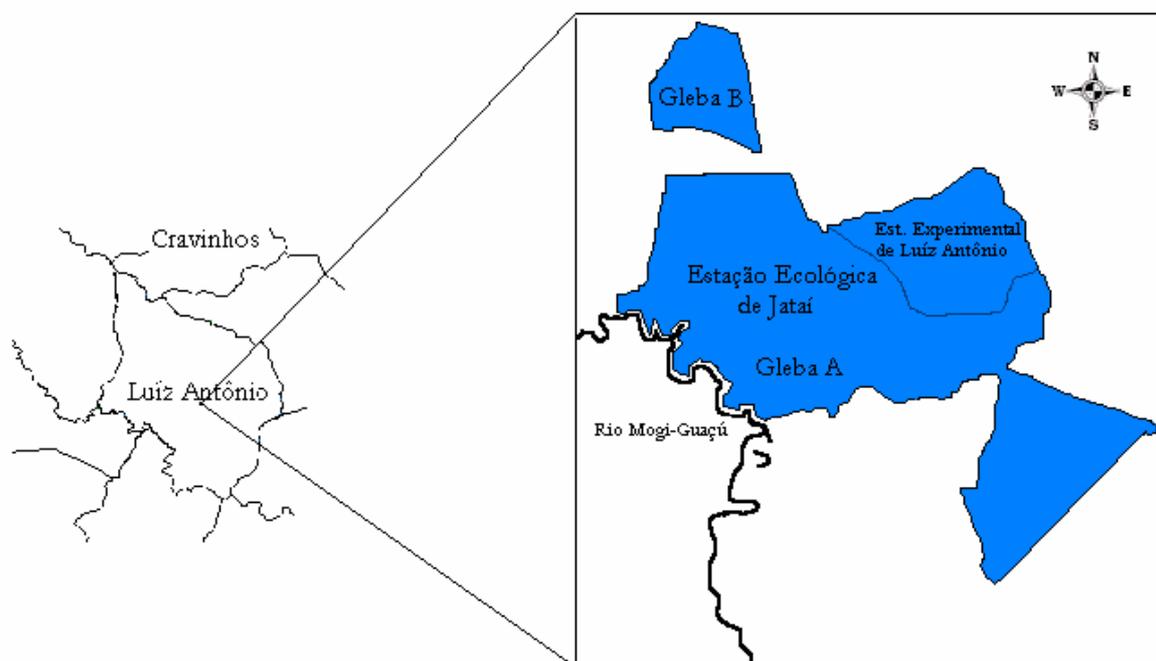
A área total do PEV é de 2.069,42 ha e este é subdividido em seis glebas distintas (Figura 4): Capão da Várzea (12,10 ha), Capetinga Oeste (327,83 ha), Praxedes (152,75 ha), Maravilha (127,08 ha), Capetinga Leste (236,56 ha) e Pé-de-Gigante (1212,92 ha) (Korman 2003). O PEV foi criado em 26/10/1970 pelo decreto lei 52.546/70 e abriga diversas formações vegetais (Korman 2003). A gleba Pé-de-Gigante é composta por fisionomias de cerrado, desde o campo sujo até o cerradão, além de mata ciliar, floresta estacional semidecídua e campo de várzea (Batalha 1997). As demais glebas são todas compostas por floresta estacional semidecidual (Korman 2003). O uso e ocupação das terras da região pode ser subdividido em seis classes: atividades agropecuárias, atividades agroflorestais, vegetação florestal de interflúvio, campo sujo, cerrado e vegetação ripária (Shida e Pivello 2002).



**Figura 4.** Diagrama esquemático dos limites do Parque Estadual do Vassununga e a delimitação das suas seis glebas. (1) Capão da Várzea (2) Capetinga (3) Maravilha (4) Praxedes (5) Capetinga Leste (6) Pé-de-Gigante.

### 1.6.2. Estação Ecológica de Jataí

Originalmente com 4532,18 ha de área, em 18/09/2002 por meio do Decreto Lei 47.096/SP, a EEJ passou a possuir 9010,7 ha (Figura 5) com a incorporação de parte da Estação Experimental de Luís Antônio, tornando-se então a maior unidade de conservação do estado de São Paulo com área contínua de cerrado *lato sensu*. Conhecida como Fazenda Jataí até o final da década de 50, a área pertencia à extinta Companhia Mogiana de Estradas de Ferro (Santos *et al.* 2000). Em 1959 a área foi adquirida pelo Instituto Florestal do estado de São Paulo para a criação de uma unidade de conservação devido a “necessidade da preservação do remanescente de vegetação ciliar do rio Mogi-Guaçu, do conjunto lagunar e do ecossistema de cerrado de grande valor cultural e científico” (decreto Lei 18.997, SP-15/06/1982) (LAPA 2000).



**Figura 5.** Diagrama esquemático dos limites da Estação Ecológica de Jataí (EEJ), município de Luís Antônio, SP.

A EEJ apresenta uma grande diversidade de habitats, distribuídos desde os ambientes verdadeiramente aquáticos como rios, córregos e lagoas, passando por banhados e formações periodicamente alagáveis, até as florestas e morros permanentemente livres de inundações (Santos *et al.* 1995). Os ecossistemas terrestres são representados, principalmente, por fisionomias de Cerrado (cerradão e cerrado *sensu stricto*), além de trechos de floresta estacional semidecidual (Toppa *et al.* 2002). A EEJ é cercada por intensa atividade de silvicultura (nas suas porções externa e interna) e por plantio de cana-de-açúcar. Enfrenta problemas com a caça recreacional, a pesca predatória, a contaminação por agroquímicos e o risco de incêndios devido às práticas agrícolas no entorno (Pires e Santos 1995).

### ***1.6.3. Importância biológica do PEV e da EEJ***

O PEV tem cinco de suas 6 glebas formadas por floresta estacional semidecídua ou Mata Atlântica de interior enquanto a gleba Pé-de-Gigante e a EEJ abrigam fisionomias de cerrado, sendo esta última a maior unidade de conservação do estado com área contínua de cerrado “*lato sensu*”. Esses biomas, da Mata Atlântica e do Cerrado, são considerados “pontos quentes” para a conservação (Conservation International 1999), devido ao número de espécies endêmicas que possuem e à grande ameaça de integridade as quais os seus ecossistemas estão expostos. Ambos vêm sendo destruídos e alterados pelas atividades humanas (Conservation International 1999).

Originalmente, a cobertura da Mata Atlântica era de mais de um milhão de km<sup>2</sup> ocupando toda a zona costeira brasileira e também, de forma esparsa, o interior dos estados das regiões sul e sudeste do país (Conservation International do Brasil *et al.* 2000). Nos dias de hoje, somente cerca de 8% da sua cobertura original preserva-se intacta em áreas dispersas e fragmentadas (Conservation International do Brasil *et al.* 2000). Também ameaçado, o Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil (Conservation International 1999) ocupando, aproximadamente, 2 milhões de km<sup>2</sup> (Ratter *et al.* 1992). Por fazer fronteira com outros

importantes biomas (a Amazônia ao norte, a Caatinga a nordeste, o Pantanal a sudoeste e a Mata Atlântica a sudeste), a fauna e a flora do Cerrado são extremamente ricas (Conservation International 1999). Apesar do seu tamanho e importância é um dos ambientes mais ameaçados do país restando, nos dias de hoje, pouco mais de 20% da sua cobertura de vegetação nativa (Conservation International 1999).

Apesar das áreas do PEV e da EEJ estarem cercadas por intensas atividades de silvicultura e plantio de cana-de-açúcar ainda mantém alta diversidade de fauna (Martuscelli e Olmos 1993; Talamoni *et al.* 2000; Jorge *et al.* 2001; Munari *et al.* 2001) e flora (Batalha 2000; Toppa *et al.* 2002). Martuscelli e Olmos (1993) realizaram um levantamento faunístico preliminar da região e encontraram 172 espécies de aves e 19 de mamíferos, muitas delas ameaçadas como, por exemplo, o urubu-rei (*Sarcoramphus papa*), o gavião de cabeça-cinza (*Leptodon caynnensis*), o curió (*Oryzoborus angolensis*), o macaco sauá (*Callicebus personatus*), e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Mesmo as divisas das unidades de conservação com os canaviais e reflorestamentos apresentam alta riqueza de espécies como foi demonstrado por Jorge *et al.* (2001) e Munari *et al.* (2001) que registraram a presença de mamíferos de pequeno, médio e grande porte como, por exemplo, tamanduá-mirim (*Myrmecophaga tridactyla*), tamanduá bandeira (*Tamandua tetradactyla*), cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), quati (*Nasua nasua*), jaritataca (*Conepatus chinga*), irara (*Eira barbara*), veado-campeiro (*Ozotocers bezoarcticus*), entre outras.

## 2. Objetivos

A partir da análise do DNA obtido de fezes coletadas em duas Unidades de Conservação da região nordeste do estado de São Paulo, a Estação Ecológica do Jataí e o Parque Estadual do Vassununga, procuramos:

1. Determinar a presença da espécie *P. concolor* na área de estudo;
2. Diferenciar as fezes de *P. concolor* de fezes similares, porém provenientes de outras espécies que também ocorrem na área de estudo;
3. Individualizar as fezes de *P. concolor* e estimar o número mínimo populacional das duas Unidades de Conservação;

Com base na determinação da presença, do número populacional mínimo e da distribuição de *P. concolor*, procuramos ainda fornecer subsídios para planos práticos de manejo, conservação e recuperação das áreas das duas unidades de conservação e dos seus entornos.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Obtenção das amostras

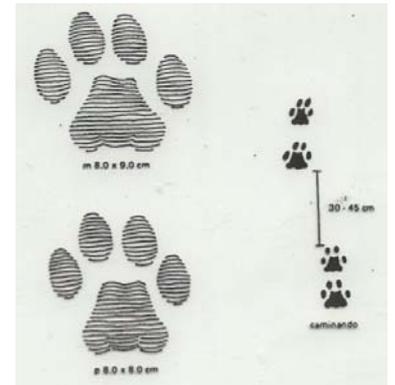
Coletamos amostras de fezes em caminhadas assistemáticas por trilhas previamente abertas e pelas estradas de terra que entrecortam as duas Unidades de Conservação durante o período outubro de 2004 e agosto de 2005. Utilizamos rastros, como por exemplo, pegadas no solo (Figura 6) e a morfologia das fezes (Figura 7) como evidências para a coleta das amostras que supostamente eram pertencentes a *P. concolor*. Uma vez encontradas, retiramos aproximadamente 5 cm da porção externa das fezes e as acondicionamos em tubos de polipropileno sem adição de qualquer conservante. Marcamos o ponto exato de coleta com o auxílio de um GPS. No laboratório, mantivemos as amostras no freezer a -22°C até realizarmos a extração de DNA. Ao todo foram coletadas 32 amostras de fezes, das quais somente 20 foram analisadas por estarem frescas ou íntegras. Descartamos das análises fezes muito antigas, já esbranquiçadas e atacadas por muitos insetos, e também aquelas que foram parcialmente dissolvidas pela chuva, pois grande parte da porção externa é perdida com a água.

Como controle durante as reações de amplificação, e a fim de comparar o tamanho, o número de alelos e as seqüências que obtivemos a partir do DNA fecal, utilizamos também 5 amostras de sangue de *P. concolor* e 5 amostras de sangue de *Leopardus pardalis* (jaguatirica) (Tabela 1), espécie presente nas áreas estudadas (Talamoni *et al.* 2000). As amostras de sangue foram cedidas pela ONG Associação Mata Ciliar e pelo Centro Nacional de Predadores (CENAP/IBAMA). Mantivemos as amostras sob refrigeração a -22°C.

A.

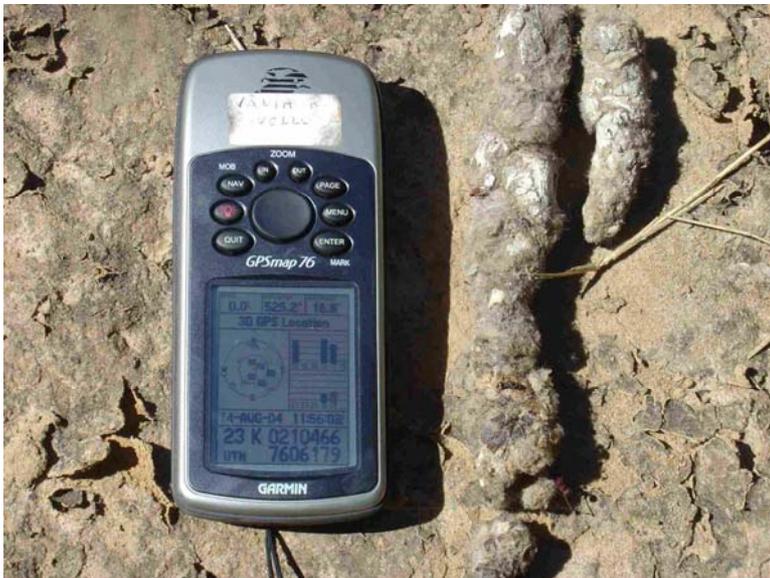


B.

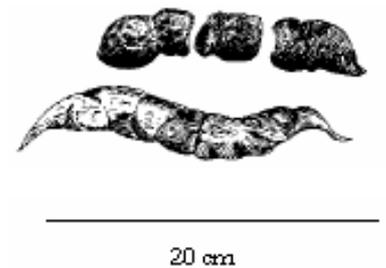


**Figura 6.** (A) Pegada de *P. concolor*. Parque Estadual do Vassununga, SP. (B) Morfologia e tamanho médio das pegadas e de uma passada de *P. concolor*.

A.



B.



**Figura 7.** (A) Fezes coletadas no Parque Estadual do Vassununga, SP. (B) Morfologia típica das fezes de felinos. As fezes são compactas e segmentadas, com uma das extremidades bem afunilada. O diâmetro médio é de 2.1 cm (modificado de Chame 2003).

**Tabela 1.** Informações sobre a origem do material coletado em campo (fezes) e das amostras de referência (sangue). PEV – Parque Estadual do Vassununga; EEJ – Estação Ecológica de Jataí.

| Código da amostra | Material                      | Origem          | Ponto de coleta (UTM) |
|-------------------|-------------------------------|-----------------|-----------------------|
| RAM – 1           | Fezes                         | EEJ             | 0210648 / 7607261     |
| RAM – 2           | Fezes                         | EEJ             | 0210031 / 7609090     |
| RAM – 3           | Fezes                         | Entorno da EEJ  | 0226132 / 7604301     |
| RAM – 4           | Fezes                         | EEJ             | 0210313 / 7610681     |
| RAM – 5           | Fezes                         | Entorno da EEJ  | 0210212 / 7609334     |
| RAM – 6           | Fezes                         | PEV             | 0213692 / 7616764     |
| RAM – 7           | Fezes                         | EEJ             | 0209479 / 7606340     |
| RAM – 8           | Fezes                         | EEJ             | 0209493 / 7606267     |
| RAM – 9           | Fezes                         | PEV             | 0226163 / 7606070     |
| RAM – 10          | Fezes                         | PEV             | 0228291 / 7608075     |
| RAM – 11          | Fezes                         | PEV             | 0226685 / 7607616     |
| RAM – 12          | Fezes                         | EEJ             | 0206918 / 7609520     |
| RAM – 13          | Fezes                         | EEJ             | 0216326 / 7607203     |
| RAM – 14          | Fezes                         | EEJ             | 0210182 / 7609255     |
| RAM – 15          | Fezes                         | EEJ             | 0209652 / 7607137     |
| RAM – 16          | Fezes                         | Entorno do PEV  | 0224908 / 7610253     |
| RAM – 17          | Fezes                         | EEJ             | 0210313 / 7610681     |
| RAM – 18          | Fezes                         | EEJ             | 0210808 / 7606781     |
| RAM – 19          | Fezes                         | PEV             | 0209186 / 7606375     |
| RAM – 20          | Fezes                         | PEV             | 0231194 / 7594996     |
| RAM – 21          | Sangue ( <i>L. pardalis</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM – 22          | Sangue ( <i>L. pardalis</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM – 23          | Sangue ( <i>P. concolor</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM – 24          | Sangue ( <i>P. concolor</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM – 25          | Sangue ( <i>P. concolor</i> ) | ONG Mata Ciliar | -                     |
| RAM – 26          | Sangue ( <i>L. pardalis</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM – 27          | Sangue ( <i>L. pardalis</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM – 28          | Sangue ( <i>L. pardalis</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM – 29          | Sangue ( <i>P. concolor</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |
| RAM - 30          | Sangue ( <i>P. concolor</i> ) | CENAP/IBAMA     | -                     |

## 3.2. Extração de DNA

### 3.2.1. Fezes

Para a extração de DNA das amostras de fezes utilizamos o kit de extração “QIAmp DNA Stool Mini Kit” (Quiagen), um kit especialmente desenvolvido para esse tipo de material, e seguimos as instruções do fabricante. Dentre os protocolos de extração oferecidos pelo produto, optamos pelo protocolo para o isolamento de DNA a partir de grandes quantidades de amostra por conferir os melhores resultados.

O processo de extração de DNA se resumiu aos seguintes passos:

1. Para a lise celular, adicionar o *Buffer ASL* a uma pequena porção da amostra e vortexar por 1 min;
2. Centrifugar a 10.000 rpm por 2 min para formar um pellet com as partículas;
3. Transferir 1,4 mL do sobrenadante a um novo tubo de 2 mL;
4. Adicionar uma pastilha *InhibitEX* e, imediatamente, vortexar continuamente por 1 min;
5. Incubar a suspensão por 1 min à temperatura ambiente;
6. Centrifugar a 10.000 rpm por 6 min para formar um *pellet* com os inibidores e as partículas aderidas à pastilha;
7. Transferir o sobrenadante para um novo tubo e centrifugar novamente a 10.000 rpm por 6 min;
8. Em um novo tubo, adicionar 25 µL de proteinase K, 600 µL do sobrenadante do passo anterior e por fim 600 µL de Buffer AL;
9. Agitar por 15 s e incubar a 70 °C durante 10 min;
10. Adicionar 600 µL de álcool 100% e agitar por alguns segundos;
11. Acoplar a coluna ao tubo coletor de 2 mL e, cuidadosamente, transferir a ela 600 µL do produto do passo anterior. Centrifugar a 10.000 rpm por 2 min;

12. Descartar o tubo que contém o filtrado, acoplar a coluna a um novo tubo coletor e transferir mais 600  $\mu\text{L}$  do produto da lise. Repetir esse processo até que toda a amostra tenha sido filtrada;
13. Adicionar à coluna 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer AW1*, centrifugar a 10.000 rpm por 2 min e descartar o tubo coletor que contém o filtrado;
14. Adicionar à coluna 500  $\mu\text{L}$  de *Buffer AW2*, centrifugar a 10.000 rpm por 6 min e descartar o tubo coletor que contém o filtrado;
15. Centrifugar novamente a coluna a 10.000 rpm por 2 min para que seja eliminado qualquer resíduo de *Buffer AW2*;
16. Transferir a coluna para um novo tubo coletor e adicionar 200 $\mu\text{L}$  de *Buffer AE* diretamente à membrana. Incubar por 1 min à temperatura ambiente e a seguir centrifugar a 10.000 rpm por 2 min para a eluição do DNA;
17. Armazenar o material no freezer a  $-22^{\circ}\text{C}$ .

Não quantificamos o DNA resultante do processo de extração, pois cada amostra não era constituída somente do material genético de *P. concolor*, mas também do material de todos os organismos que o animal havia ingerido.

No primeiro passo da extração de DNA, adicionamos 10 mL de *Buffer ASL* sobre toda a amostra armazenada em um tubo *falcon*. Com o auxílio de um vórtex, misturamos o conteúdo do tubo até a solução parecer homogênea e só então transferimos 1.600  $\mu\text{L}$  a um novo tubo para dar continuidade ao passo dois. Armazenamos o restante da solução (fezes e *Buffer ASL*) a  $-22^{\circ}\text{C}$  para posteriores tentativas de reextração.

Ainda durante o processo de extração de DNA, dividimos as amostras em três categorias quanto à coloração do sobrenadante: colorações clara, média e escura. Buscamos dessa maneira, correlacionar essa coloração com o sucesso de amplificação de cada amostra.

### 3.2.2. *Sangue*

Para a extração de DNA das amostras de sangue seguimos o protocolo proposto por Sambrook *et al.* (1989) com algumas modificações e que se resumiu, basicamente, aos seguintes passos:

1. Em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo 50  $\mu$ L de sangue, adicionar 500  $\mu$ L de solução de digestão contendo 25  $\mu$ L de SDS 10%, 5  $\mu$ L RNase 0,1 mg/mL, 100  $\mu$ L de EDTA 0,1 M, 2,5  $\mu$ L Tris-HCl 0,01 M, 322,5  $\mu$ L de água MilliQ;
2. Incubar por 1 h a 37°C;
3. Adicionar 5  $\mu$ L de proteinase K 0,1 mg/mL;
4. Incubar por 2 hs a 42°C;
5. Adicionar o mesmo volume de fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e verter o tubo suavemente durante 10 min;
6. Centrifugar a 10.000 rpm por 15 min e recuperar o sobrenadante;
7. Acrescentar NaCl 5 M de modo que a concentração final da solução seja de 1 M;
8. Adicionar 500  $\mu$ L de álcool 100% gelado e verter delicadamente o tubo para a precipitação do DNA;
9. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min e, cuidadosamente, descartar o sobrenadante invertendo o tubo;
10. Adicionar 500  $\mu$ L de álcool 70% gelado;
11. Centrifugar a 10.000 rpm por 10 min e, cuidadosamente, descartar o sobrenadante invertendo o tubo;
12. Secar o material em estufa a 37°C por 24hs;
13. Ressuspender o DNA em 200  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

Quantificamos 1  $\mu$ L do DNA resultante de cada uma das amostras de sangue em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, utilizando como parâmetro o marcador de peso

molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Após a quantificação, armazenamos as amostras a -22°C.

### 3.3. Diagnóstico da espécie

Embora sejam animais com tamanhos e pesos corporais distintos, as fezes de pumas e jaguatiricas adultas podem se sobrepôr em tamanho (Farrel *et al.* 2000). A fim de confirmar se as amostras que coletamos eram realmente da espécie *P. concolor*, amplificamos um fragmento específico de 146 pb do gene citocromo *b* do genoma mitocondrial por meio da reação em cadeia da polimerase (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 Farrel *et al.* (2000).

Cada reação de PCR (20 µL) continha: 1x do tampão *Buffer TM* e 2 x de *TaqMaster* (ambos pertencentes ao kit de amplificação *Taq Master*, Eppendorf), 200 µM de dNTPs, 1 unidade de Taq polimerase (LabTrade), 3 pmol do *primer forward*, 3 pmol do *primer reverse*, 150 µg/mL de BSA, 5 mM de MgCl<sub>2</sub>. Assim como para a amplificação dos microssatélites, completamos o volume restante dos 20 µL de reação com 7,2 µL DNA. Realizamos as amplificações em termociclador (*PTC-100 Thermocycler*, MJ Research, Inc.) com a seguinte programação: 1 ciclo inicial de desnaturação à 94°C por 5 min; 40 ciclos de 92 °C por 30 s, 49 °C por 45 s, 72 °C por 45 s; extensão final de 30 min à 72 °C. Incluímos também, controles negativos em todas as reações para monitorarmos possíveis contaminações.

Após as reações de PCR, separamos os produtos amplificados por meio de uma eletroforese em gel de agarose 1,4%. As amostras que possuíam somente um fragmento amplificado foram purificadas com os kits *GFX PCR DNA* (Amersham) e *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen) para a eliminação de nucleotídeos não incorporados e do excesso de *primers*.

Quando as amostras possuíam mais de um fragmento amplificado (bandas expúrias), realizamos um processo de eluição da amostra a partir do gel. Neste procedimento, cortamos do gel de agarose somente a banda amplificada de nosso interesse e a purificamos com o auxílio do kit de purificação *KIT WIZARD SV gel and PCR clean up systems* (Promega). Quantificamos os produtos de PCR em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo com o auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen).

Todas as reações de sequenciamento foram realizadas no Centro de Estudos do Genoma Humano – USP (CEGH – USP) utilizando-se o kit *DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit* e seqüenciador automático *MegaBACE ET-550R Size Standard* (Amersham Biosciences).

### 3.4. Individualização das fezes

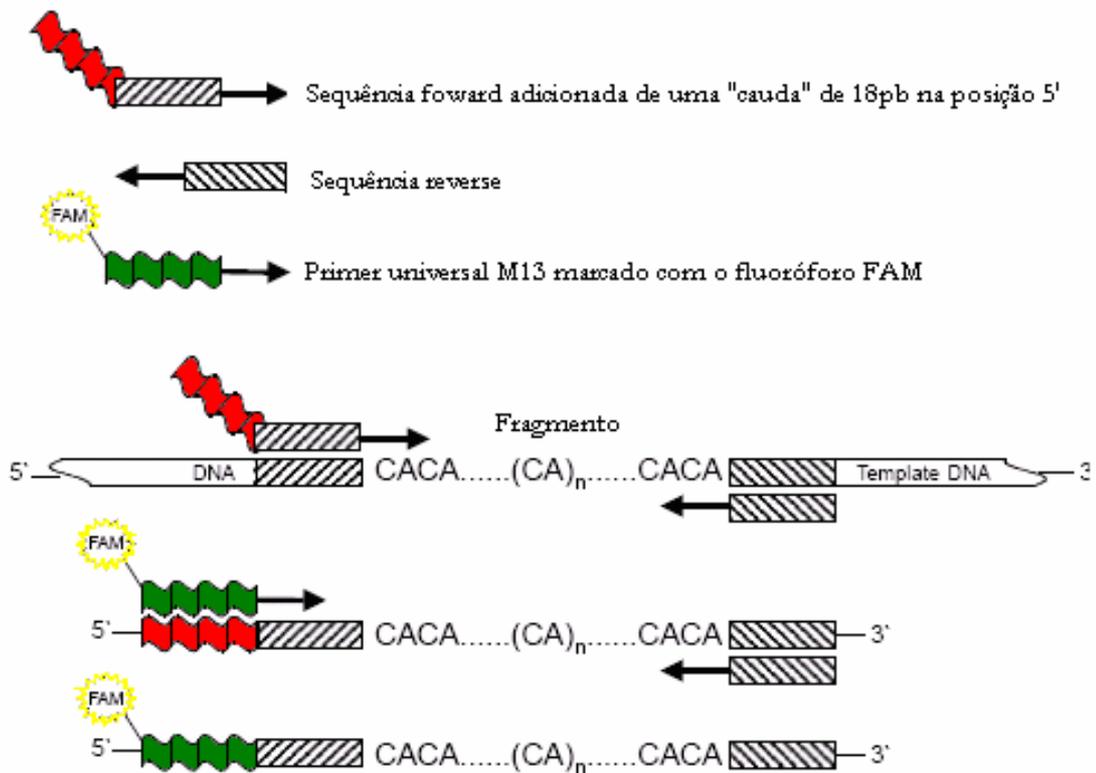
Para individualizar cada uma das amostras de fezes testamos 9 pares de *primers* (Tabela 2) desenvolvidos inicialmente para o gato doméstico (*Felis catus*) por Menotti-Raymond *et al.* (1995, 1999).

**Tabela 2.** Localização cromossômica e seqüências *foward* e *reverse* dos *primers* de microssatélites isolados para o gato doméstico (*Felis catus*) (Menotti-Raymond *et al.* 1999).

| <i>Primer</i>  | <i>Cromossomo</i> | <i>Seqüências</i>        |                          |
|----------------|-------------------|--------------------------|--------------------------|
|                |                   | <i>Foward</i>            | <i>Reverse</i>           |
| <i>FCA 008</i> | A1                | ACTGTAAATTTCTGAGCTGGCC   | TGACAGACTGTTCTGGGTATGG   |
| <i>FCA 026</i> | D3                | GGAGCCCTTAGAGTCATGCA     | TGTACACGCACCAAAAACAA     |
| <i>FCA 035</i> | D2                | CTTGCCTCTGAAAAATGTAAAATG | AAACGTAGGTGGGGTTATGGG    |
| <i>FCA 043</i> | C2                | GAGCCACCCTAGCACATATAACC  | AGACGGGATTGCATGAAAAG     |
| <i>FCA 077</i> | C2                | GGCACCTATAACTACCAGTGTGA  | ATCTCTGGGGAAATAAATTTTGG  |
| <i>FCA 078</i> | D2                | TGAACTGAAGTCAGATGCTTAACC | CGGAATCAGCTATTTTTACGG    |
| <i>FCA 090</i> | A1                | ATCAAAAAGTCTTGAAGAGCATGG | TGTTAGCTCATGTTTCATGTGTCC |
| <i>FCA 096</i> | A2                | CACGCCAAACTCTATGCTGA     | CAATGTGCCGTCCAAGAAC      |
| <i>FCA 126</i> | B1                | GCCCCTGCTACCCTGAATG      | CTATCCTTGCTGGCTGAAGG     |

Para as reações de amplificação (PCR), utilizamos o procedimento proposto por Schuelke (2000) (Figura 8) em que à seqüência *foward* dos *primers* é adicionada, na posição 5'-3', uma "cauda" universal de 18 pares de bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT). Durante os ciclos iniciais de PCR essa seqüência *foward* é incorporada ao produto de amplificação. Complementar a essa cauda, e marcada com fluorescência, é adicionada à reação um *primer* universal M13 (ACA TTT TGC TGC CGG TCA), incorporada ao produto de PCR nos ciclos subseqüentes da reação. A incorporação do *primer* M13 à "cauda" é que permite que o fragmento amplificado seja detectado pelo sistema de laser do seqüenciador automático.

Este método torna-se mais econômico porque permite que todos os primers *forward*, para todos os *loci*, sejam adicionados com a mesma cauda e assim somente uma seqüência M13 seja marcada.



**Figura 8.** Esquema de uma reação de amplificação com primers modificados pela adição de uma seqüência M13 marcada com fluorescência. (A, B, C) Os três primers utilizados durante a PCR para a amplificação do fragmento de interesse. O primer universal M13 é complementar à cauda adicionada ao primer *forward*. (D) Nos primeiros ciclos da reação de PCR o primer *forward* adicionado da “cauda” é incorporado ao produto de PCR. (E) Ciclos subseqüentes à temperatura de anelamento de 53°C promovem a incorporação da seqüência fluorescente M13. (F) O produto final pode ser analisado sob o sistema de detecção a laser. Modificado de Schuelke (2000).

Cada 20µL reação de PCR continha: do tampão *Buffer TM* 1x e *Taq Master* 2x (ambos pertencentes ao kit de amplificação *Taq Master*, Eppendorf), 200 µM de dNTPs, 1 unidade de Taq polimerase (LabTrade), 2 pmol do *primer forward*, 8 pmol do *primer reverse*, 8 pmol da seqüência M13 marcada com o fluoróforo 6-FAM (Applied Biosystems), 150 µg/mL de BSA. A concentração de MgCl<sub>2</sub> para todas as reações foi de 2,5 mM, exceto para o primer *FCA035* em que utilizamos a concentração de 1,5 mM. Completamos o volume restante dos 20 µL de reação com 9,8 µL DNA, uma vez que não é possível estimar a concentração de DNA somente de *P. concolor* que obtivemos a partir das fezes.

Observamos as amplificações dos fragmentos de DNA em gel de agarose 1,4% corado com brometo de etídeo. Em uma cuba de eletroforese (100 volts por 1h), aplicamos 5 µL do produto de PCR corado com 1,0 µL de azul de bromofenol. Com o auxílio de um marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen), sob luz ultravioleta (UV), confirmamos a presença do fragmento de DNA amplificado de acordo com o tamanho previsto (número de pares de bases). Enviamos as amostras ao Centro de Estudos do Genoma Humano – USP, São Paulo, onde foram analisadas em um seqüenciador automático *MegaBACE ET-550R Size Standard* (Amersham Biosciences) com o auxílio do programa *Genetic Profiler*. Cada *locus* foi genotipado ao menos duas vezes de forma independente.

### **3.5. Análise dos resultados**

Comparamos a coloração do sobrenadante das soluções de fezes com o sucesso de amplificação do DNA por meio de um teste de independência para dados qualitativos. Para o diagnóstico da espécie, comparamos os fragmentos de citocromo *b* obtidos a partir do DNA fecal com seqüências de referência para *P. concolor* e *L. pardalis* disponíveis no *GenBank* (AF266475 e AF266473, respectivamente), além de dois fragmentos obtidos por nós a partir de amostras de sangue destas espécies. Comparamos ainda as nossas seqüências com as de outras espécies de carnívoros que também ocorrem na área de estudo (dados não publicados)

como, por exemplo, cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, AF266472), raposinha-do-campo (*Pseudalopex vetulus*, AF028148), lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, AF028163), irara (*Eira barbara*, AF498154), gato mourisco (*Herpailurus yaguaroundi*, AY886751) e gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*, AY886752). As seqüências obtidas foram alinhadas umas às outras com o auxílio do programa CLUSTAL X 1.83 (Thompson *et al.* 1997). Conferimos o alinhamento visualmente e o editamos por meio do software BioEdit 5.9 (Hall 1999). Por meio do programa MEGA v.3.1. (Kumar *et al.* 2004) utilizamos o Modelo de 2 Parâmetros de Kimura (1980) para calcular as distâncias genéticas entre os fragmentos de DNA e a análise de neighbor-joining (Saitou e Nei 1987) para inferir a espécie de origem das fezes. Avaliamos a significância estatística pelo método de *bootstrap* com 1000 replicações para acessar o nível de confiança na ordem dos braços obtida no agrupamento. Consideramos diagnóstico para a identificação da espécie o agrupamento das amostras de DNA às seqüências de referência e a presença de sítios conservados dentro das seqüências de cada uma das espécies.

Uma vez identificada a espécie de origem de cada uma das fezes, realizamos reações de amplificação dos microssatélites a fim de individualizar cada uma das amostras de *P. concolor*. Classificamos os genótipos como heterozigotos quando dois fragmentos foram observados e como homozigotos quando um único fragmento foi observado. A fim de quantificar o poder de discriminação dos indivíduos por meio dos *loci* de microssatélites que utilizamos, determinamos a probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ), isto é, a probabilidade de dois indivíduos em uma população, aleatoriamente, compartilharem genótipos idênticos para todos os *loci* analisados (Paetkau *et al.* 1998; Waits *et al.* 2001; Prugh *et al.* 2005). A probabilidade de identidade foi estimada por meio da equação (Paetkau *et al.* 1998):

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

onde  $n$  é o tamanho da amostra,  $a_i$  é igual a

$$\sum p_j^i$$

e  $p_j$  é a frequência do  $j$  ésimo alelo. Calculamos os valores para cada *locus* e então os multiplicamos entre os *loci* para obter um  $P_{ID}$  total (Paetkau *et al.* 1998).

Determinamos a taxa de erro de genotipagem total e devido à não amplificação alélica (*allelic dropout*) dividindo o número de erros detectados para cada *locus* pelo número de casos em que algum erro poderia ser detectado. Com 2 repetições das amplificações via PCR procuramos confirmar a existência de genótipos homozigotos, reduzindo a possibilidade de ocorrência do fenômeno de “allelic dropout”, em que um dos dois alelos do indivíduo pode não ser detectado (Taberlet *et al.* 1996; Prugh *et al.* 2005). Consideramos então um indivíduo como homozigoto para um dado *locus* quando esse genótipo pode ser confirmado em duas replicações e descartamos das análises os genótipos homozigotos encontrados em apenas uma das réplicas.

### ***3.6. Localização dos indivíduos na paisagem***

Todos os pontos de coleta de fezes foram identificados, em UTM, com o auxílio de um GPS. Dessa maneira, pudemos sobrepor esses pontos sobre uma imagem de satélite da região por meio do programa *Spring* (Camara *et al.* 1996).

#### 4. Resultados

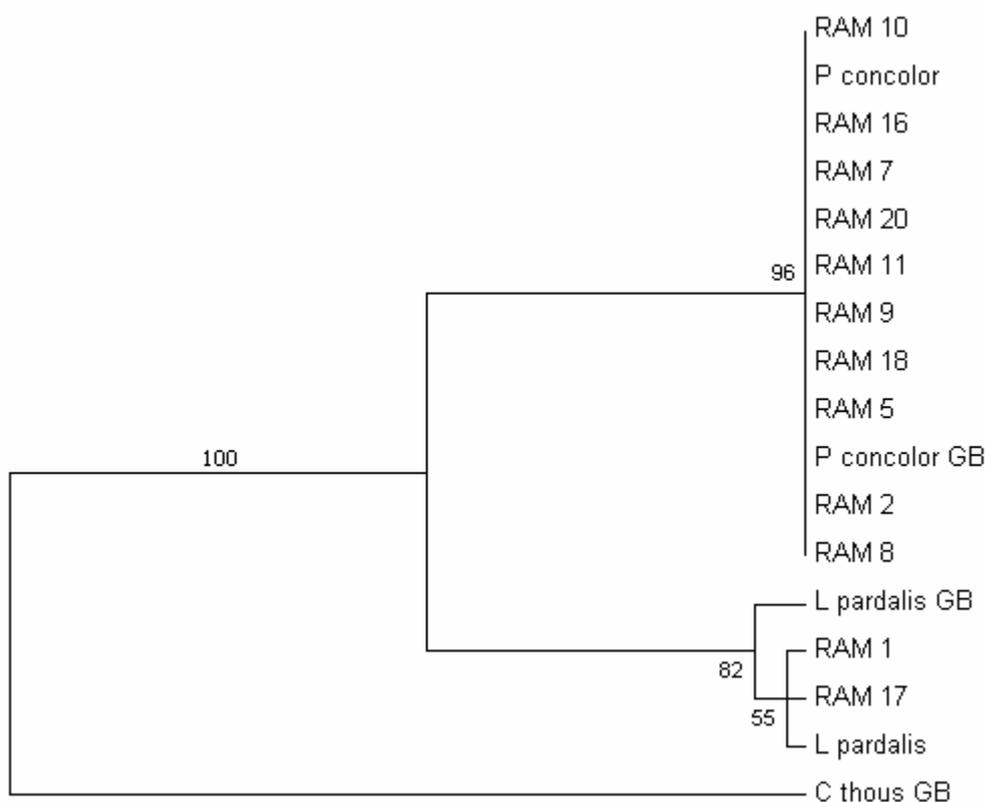
Extraímos com sucesso o DNA de 16 (80%) das 20 amostras de fezes analisadas. No processo de extração de DNA, as fezes cujo sobrenadante apresentou coloração clara e média produziram melhores resultados durante as reações de amplificação ( $n=20$ ;  $\chi^2=9,71$ ;  $p<0.005$ ) do que as fezes com o sobrenadante escuro. As taxas de sucesso de amplificação foram 45%, 30% e 5%, para fezes claras, médias e escuras respectivamente. O armazenamento das fezes dissolvidas em *Buffer ASL* e a  $-22^{\circ}\text{C}$  permitiu que realizássemos novas reextrações de DNA, mesmo após um período de 6 meses de estocagem.

Doze amostras (60%) amplificaram o fragmento de DNA mitocondrial (mtDNA) permitindo o diagnóstico da espécie de origem. Com base na similaridade entre essas seqüências e as seqüências de referência de *L. pardalis* e *P. concolor*, identificamos duas das fezes como provenientes de jaguatirica e dez de onça-parda (Figura 9) (número de acesso no GenBank DQ469940-DQ469953). Em 64 pares de bases do fragmento de mtDNA amplificado, a presença de 8 sítios polimórficos entre as seqüências de *P. concolor* e *L. pardalis* nos permitiu realizar o diagnóstico da espécie. Houve baixa similaridade entre as seqüências obtidas das fezes e as seqüências de outros carnívoros presentes na região (dados não apresentados, ver materiais e métodos).

Dentre o painel de nove pares de *primers* de microssatélites utilizados, não houve amplificação dos *loci* FCA008 e FCA078, e os *loci* FCA026, FCA035 e FCA043 apresentaram baixo de sucesso de amplificação, sendo, portanto descartados das análises. Obtivemos melhores amplificações para os *loci* FCA126, FCA096, FCA090, FCA077 e todos estes se mostraram polimórficos (Tabela 2). Houve correspondência do tamanho e do número de alelos entre as amostras de fezes e as amostras de sangue de *P. concolor* e *L. pardalis* utilizadas como parâmetro. Encontramos também sobreposição dos alelos entre essas duas espécies o que indica que ambas não podem ser diferenciadas somente com base nos 4 *loci* de microssatélites analisados. A freqüência de erro por não amplificação alélica (*allelic dropout*)

no total de replicações das genotipagens foi igual a 10,6% (Tabela 2). A probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ) total foi de 0,0001.

Restringimos as análises dos microssatélites às fezes que foram diagnosticadas quanto à espécie. Dentre as 12 fezes pudemos então, identificar 9 indivíduos distintos de *P. concolor* (RAM 2, 5, 7, 9, 10, 11, 16, 18 e 20) e 2 indivíduos de *L. pardalis* (RAM 1 e 17). Não pudemos individualizar a amostra RAM 8, de *P. concolor*, pois houve amplificação de somente um dos *loci* e seus alelos não eram exclusivos. Plotando as amostras individualizadas em um mapa de satélite da região, pudemos identificar 4 onças e 2 jaguatiricas na área da EEJ, 3 onças na área do PEV e duas onças no entorno dessas áreas (Figura 11).



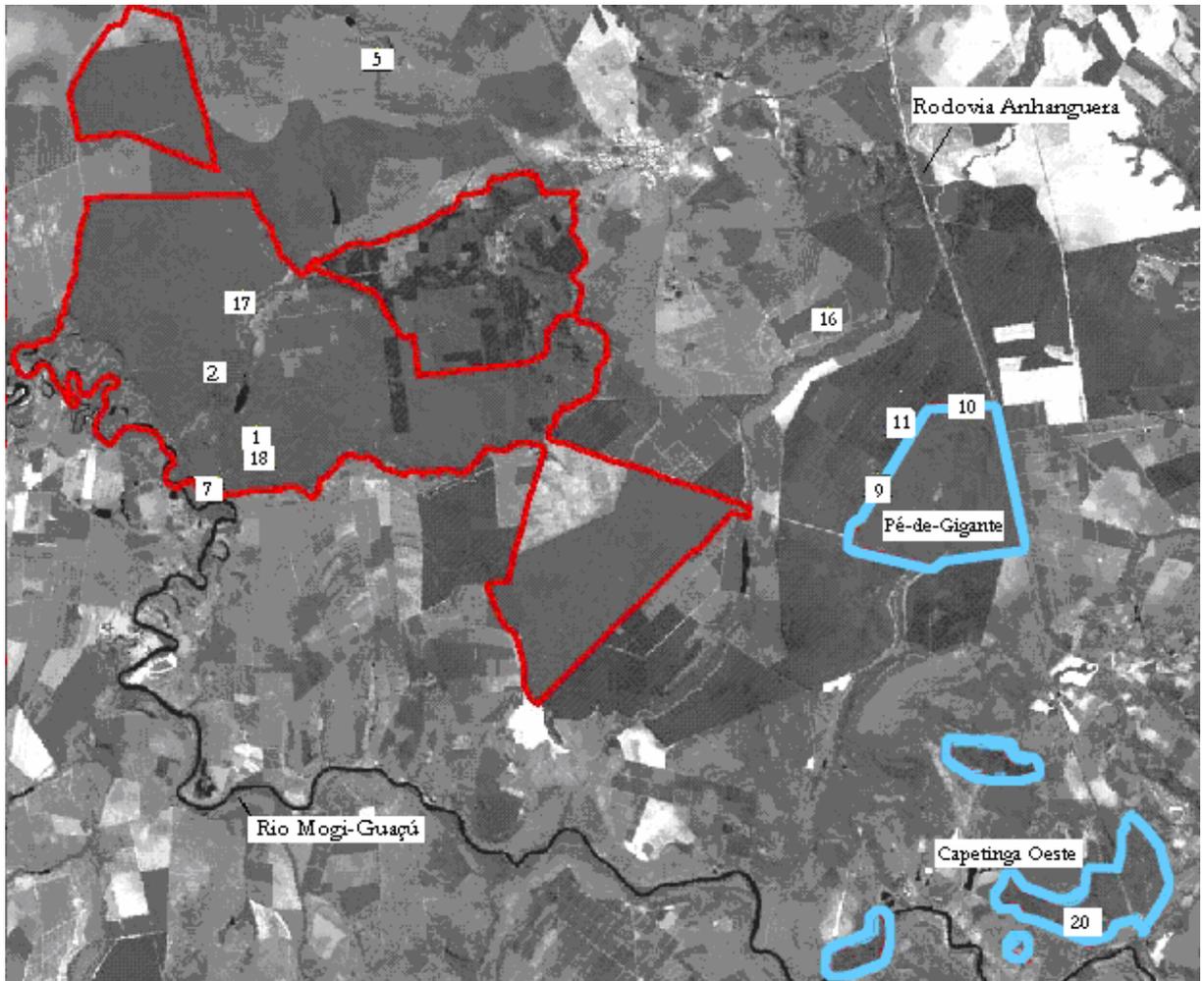
**Figura 9.** Árvore neighbor-joining das seqüências de citocromo b de referência e das amostras de fezes analisadas, com *Cerdocyon thous* como grupo externo. Os valores de bootstrap, baseados em 1000 replicações, são mostrados sobre os braços. A nomenclatura RAM refere-se às amostras de fezes (Tabela 1); GB refere-se às seqüências obtidas no GenBank, e as demais são seqüências obtidas a partir de amostras de sangue.

|                       | GGC | TAT | GAC | CGC | AAA | TAG | TAG | TAT | GAT | T-C  | CAA | TAT | TTC | ATG | TTT | CCG | AGA | AGG | TAT | A  |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----|
| RAM 16                | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 18                | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 10                | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 7                 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 8                 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 5                 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 2                 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 11                | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 20                | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 9                 | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| <i>P. concolor</i>    | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| <i>P. concolor</i> GB | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ..   | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | ... | .. |
| RAM 17                | ... | ... | A.. | T.. | G.. | ... | C.. | ... | ... | ..   | .G. | .G- | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | .G. | .. |
| <i>L. pardalis</i>    | ... | ... | A.. | T.. | G.. | ... | C.. | C.. | ... | ..   | .G. | .G. | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | .G. | .. |
| RAM 1                 | ... | ... | A.. | T.. | G.. | ... | C.. | ... | ... | ..   | .G. | .G. | ... | ... | ... | .T. | ... | ... | .G. | .. |
| <i>L. pardalis</i> GB | ... | ... | A.. | T.. | G.. | ... | C.. | ... | ... | ..   | .G. | .G. | ... | ... | ... | .T. | T.. | ... | .G. | .. |
| <i>C. thous</i> GB    | ... | ... | AGT | T.. | G.. | ..A | ... | ..C | ..C | ..A. | ... | ... | ... | ... | ... | .TA | T.. | .TA | C.. | .. |

**Figura 9.** Fragmentos de 64 pares de bases evidenciando os oito sítios de polimorfismo entre *P. concolor* e *L. pardalis*. *C. thous* é o grupo externo. A nomenclatura RAM refere-se às amostras de fezes (Tabela 1); GB refere-se às seqüências obtidas no GenBank, e as demais são seqüências obtidas a partir de amostras de sangue.

**Tabela 2.** Variação no tamanho dos alelos (em pares de bases – pb) e número de alelos encontrados para as espécies *P. concolor* e *L. pardalis* na região nordeste do estado de São Paulo para 4 *loci* de microssatélites. (P<sub>ID</sub>) probabilidade de identidade por *locus* e total; (AD) taxa de allelic dropout por *locus* e total.

| <i>Locus</i>  | Variação no tamanho dos alelos (pb) | Número de alelos | P <sub>ID</sub> | AD     |
|---------------|-------------------------------------|------------------|-----------------|--------|
| <i>FCA077</i> | 112 - 146                           | 3                | 0,156           | 0,16   |
| <i>FCA090</i> | 110 - 128                           | 6                | 0,132           | 0      |
| <i>FCA096</i> | 114 - 162                           | 4                | 0,161           | 0,21   |
| <i>FCA126</i> | 130 - 148                           | 6                | 0,003           | 0,05   |
| Média/Total   | -                                   | 4,75             | 0,0001          | 10,6 % |



**Figura 11.** Imagem de satélite Landsat 7 ETM<sup>+</sup>. O contorno vermelho delimita as áreas da Estação Ecológica de Jataí e o azul, as glebas que formam o Parque Estadual do Vassununga. Os números a correspondem às amostras identificadas: 2, 5, 7, 9, 10, 11, 16, 18, 20, indivíduos de *P. concolor*; 1, 17, indivíduos de *L. pardalis*.

## 5. Discussão

### 5.1. Análises genéticas

Apesar de possuírem pesos e tamanhos corporais muito diferentes, em algumas ocasiões onças-pardas (em média 40-50 kg) e jaguatiricas (em média 10 kg) podem produzir fezes de tamanhos similares (Farrel *et al.* 2000), e estudos demográficos e de dieta baseados somente na análise do tamanho e na morfologia de fezes podem fornecer resultados enviesados. Uma alternativa para a confirmação da espécie de origem das fezes é a análise do DNA nelas contido. Entretanto, a análise genética das fezes de qualquer carnívoro apresenta a dificuldade de se discernir entre o DNA da espécie de interesse e o material genético de suas presas (Ernest *et al.* 2000). Farrel *et al.* (2000) desenvolveram um método molecular baseado em seqüências de mtDNA para identificar a espécie que depositou as fezes. O mtDNA é uma das moléculas mais utilizadas em estudos filogenéticos e filogeográficos. A ausência de recombinação, associada à sua taxa de evolução mais rápida em relação às seqüências de DNA nuclear, fazem do mtDNA o marcador ideal para a construção de árvores filogenéticas e de genealogias gênicas, já que a ancestralidade pode ser recuperada mais facilmente quando não há recombinação (Perez-Sweeney *et al.* 2003).

A comparação entre seqüências de mtDNA nos permitiu distinguir cada uma das amostras coletadas em campo de acordo com a espécie. Coletamos amostras de fezes supostamente pertencentes a *P. concolor*, mas a confirmação da presença de duas fezes de jaguatirica dentre as amostras (Figura 9) indicou que, mesmo com a experiência do trabalho em campo, o diagnóstico molecular é necessário para a confirmação da espécie que originalmente depositou as fezes.

Nosso sucesso em relação ao seqüenciamento do mtDNA deve estar ligado, em parte, ao tamanho pequeno do fragmento a ser amplificado (146 pb). Devido à presença de centenas ou

milhares de cópias de mtDNA em cada célula diplóide, fragmentos de mtDNA podem ser acessados mais facilmente em amostras parcialmente degradadas e fornecer, mesmo com base em seqüências curtas, um diagnóstico de maior resolução entre as espécies (Farrel et al. 2000). Frantzen *et al.* (1998) relataram altas taxas de sucesso de amplificação de fragmentos de mtDNA de 190 pb a partir do material fecal, mas esse sucesso decrescia significativamente para produtos maiores. Se o DNA é degradado, assim como ocorre em amostras fecais, um fragmento curto tem maior probabilidade de ser perfeitamente amplificado (Kohn *et al.* 1995, Taberlet *et al.* 1999).

Apesar do número crescente de publicações, 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). Tais erros são revelados por diferenças entre os genótipos obtidos de forma independente, isto é, em reações distintas, a partir de uma mesma amostra e devem ser incorporados aos dados. Particularmente para microssatélites, problemas como a falha na amplificação de um dos dois alelos de um indivíduo, fenômeno conhecido como *allelic dropout*, ou ainda a amplificação de alelos falsos (Taberlet *et al.* 1996; Prugh *et al.* 2005) podem acarretar uma individualização errônea das amostras e, conseqüentemente, distorções no tamanho populacional estimado. Nos últimos anos têm sido propostas algumas medidas para acessar e quantificar esses vieses das análises não invasivas por meio de probabilidades e múltiplas amplificações (Miller *et al.* 2002; Creel *et al.* 2003; Piggott *et al.* 2004; Broquet e Petit 2004; Prugh *et al.* 2005; Roon *et al.* 2005). Falta de amplificação e a não detecção alélica foram encontradas em praticamente todos os estudos não invasivos com taxas que variaram entre 0,03 e 0,11 para não amplificação e 0,00 a 0,39 para não detecção alélica (Taberlet *et al.* 1996, 1999; Kohn e Wayne 1997; Gagneux *et al.* 1997; Ernest *et al.* 2000; Morin *et al.* 2001). Para contornar estes problemas optamos por realizar replicações das genotipagens e somente

assumir um genótipo como verdadeiro quando ele pudesse ser confirmado ao menos duas vezes. Em nosso trabalho encontramos uma taxa média de não detecção alélica de 10,6 % ( $0,05 \pm 0,21$ ).

A maioria dos *primers* isolados inicialmente para o gato doméstico (Menotti-Raymond *et al.* 1995, 1999) que utilizamos não foi capaz de amplificar o DNA fecal de *P. concolor* com sucesso. Observamos um grande número de amplificações de alelos falsos ou ainda a ausência total de amplificação e, do painel inicial de 9 microssatélites, optamos por analisar somente 4 *loci*. Melhores resultados poderiam ser alcançados com o desenvolvimento de *primers* específicos à *P. concolor*, mas esse procedimento é muito trabalhoso e de alto custo financeiro.

Outros fatores que também podem ter influenciado o sucesso das amplificações dos microssatélites são a presença de alelos nulos, ou seja, a não amplificação de um alelo devido à ocorrência de mutações nas seqüências do genoma complementares às seqüências dos *primers*, o que poderia impedir o anelamento entre as seqüências durante a PCR, e ainda o alto grau de degradação do DNA extraído das amostras de fezes. Prugh *et al.* (2005) também quantificaram outros fatores que poderiam afetar o sucesso das amplificações como: a coloração do sobrenadante durante o processo de extração de DNA, o método de armazenamento das fezes após a coleta, o tempo de armazenamento e a idade estimada das fezes no momento da coleta. Assim como estes autores, pudemos verificar que quanto mais clara a coloração do sobrenadante da mistura entre fezes e *Buffer ASL* (kit de extração) melhor foi a qualidade do DNA extraído e, conseqüentemente, maior o sucesso das amplificações ( $\chi^2 = 9,71$ ;  $p < 0,005$ ). Uma hipótese sugerida por Prugh *et al.* (2005) é a de que quanto mais escuro é o sobrenadante, maior é a concentração de inibidores de PCR na solução, como por exemplo, polissacarídeos de resíduos alimentares. Dessa maneira, a coloração do sobrenadante agiria como um indicador do nível de inibidores de PCR na amostra. Sabe-se

ainda que alguns componentes vegetais podem inibir as reações de extração de DNA e de PCR (Kohn e Wayne 1997) e nas fezes de felinos é comum serem encontrados fragmentos praticamente íntegros de gramíneas (observações pessoais). Palomares *et al.* (2002) também determinaram os efeitos da idade e das condições do material fecal sobre a acurácia e eficiência da técnica em um estudo piloto com lince ibérico (*Lynx pardinus*) na região da Andaluzia, Espanha. A estacionalidade não exerceu grande influência no sucesso de amplificação das amostras, mas alguns insetos são capazes de decompô-las em alguns minutos diminuindo a qualidade da amostra durante a extração de DNA.

A estimativa da probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ) vem sendo utilizada para acessar a confiança estatística da identificação individual (Kohn *et al.* 1999, Mills *et al.* 2000) e pode ser particularmente útil para o planejamento de estudos que necessitam de individualização, já que pode ser estimada para diferentes números de *loci* sem a necessidade de ter a comprovação forense dos genótipos em mãos (Waits *et al.* 2001). A  $P_{ID}$  demonstra se o número de *loci* analisados foi eficiente para a identificação de indivíduos, e valores compreendidos entre 0,01 – 0,0001 são considerados satisfatórios (Paetkau *et al.* 1998, Waits *et al.* 2001). O valor total de  $P_{ID}$  que obtivemos em nosso estudo foi de 0,0001, o que demonstra que os 4 *loci* analisados para uma população de 12 indivíduos foram suficientes para a individualização das fezes de *P. concolor*. O número de genótipos distintos é uma estimativa do tamanho mínimo de uma população (Kohn *et al.* 1999) e, baseando-se em um valor de  $P_{ID}$  inserido no intervalo de confiança, pudemos estimar um número populacional mínimo de 9 onças-pardas nas duas Unidades de Conservação estudadas na região nordeste do estado de São Paulo.

## 5.2. *Implicações conservacionistas*

Uma vez que grandes áreas devem ser mantidas para a persistência e viabilidade a longo prazo de grandes carnívoros, e que a região central do estado de São Paulo possui poucas unidades de conservação ou áreas naturais preservadas tão grandes quanto às necessárias, as populações de *P. concolor* desta região tornaram-se ameaçadas pela fragmentação antropogênica de seus habitats. Mesmo inseridas em uma paisagem altamente fragmentada, as áreas da EEJ e do PEV ainda mantêm uma ou mais populações de onças-pardas (Figura 11).

A determinação da presença, a estimativa do tamanho populacional mínimo, e a distribuição de *P. concolor* nas áreas do PEV e da EEJ determinadas neste estudo podem fornecer subsídios para a implantação dos planos de manejo e conservação dessas áreas e de seus entornos. As onças-pardas necessitam de grandes áreas de habitat, geralmente maiores do que 100 km<sup>2</sup> (Sweaner *et al.* 2000), e quando em forrageamento, podem percorrer até 9 km em uma única noite (Beier 1993). São animais que se dispersam por longas distâncias, até mesmo na presença de grande descontinuidade em seu habitat (Ruth *et al.* 1998). Essa capacidade de explorar habitats diferentes, aliada às grandes distâncias que costumam percorrer, pode explicar a ocorrência de pumas no entorno das áreas da EEJ e do PEV. Já foram documentadas, para machos subadultos, dispersões maiores do que 450 km (Anderson *et al.* 2004).

Beier (1993) simulou os efeitos de fatores demográficos e ambientais sobre a persistência de pequenas populações de *P. concolor* a fim de predizer as condições sob as quais uma população de pumas poderia evitar uma extinção estocástica durante um período de 100 anos, ignorando os efeitos de endocruzamento. Dessa maneira, este autor pode estimar a área mínima e os níveis de imigração necessários à manutenção de uma população viável. O modelo de Beier (1993) previu que, na ausência de imigração, uma área de 10.000-22.000 ha é

necessária para suportar uma população de *P. concolor* (de 15 a 20 animais adultos) com probabilidade igual ou maior do que 98% de persistência para 100 anos.

As predições de Beier (1993) reforçam a importância da manutenção das áreas da EEJ e do PEV, que juntas somam aproximadamente 11.000 ha, e também a necessidade da criação de corredores e pontos de ligação que permitam migrações entre as glebas distintas do PEV e entre as duas Unidades de Conservação. Onde o seu habitat é naturalmente ou artificialmente fragmentado, populações de onças-pardas exibem estrutura de metapopulação (Sweaner *et al.* 2000), definida como um conjunto de populações semi-isoladas com algum grau de migração regular e fluxo gênico entre elas, em que cada população individualmente deve se extinguir podendo então, ser recolonizada por outras populações (Meffe e Carroll 1997). Se a dispersão é impedida devido à distância ou barreiras entre os fragmentos, subpopulações em fragmentos pequenos podem vir a ter altas probabilidades de extinção, por meio da estocasticidade genética, demográfica ou ambiental ou por catástrofes (Shaffer 1987). Subpopulações pequenas podem ter um número efetivo cada vez menor e, sem o fluxo gênico promovido pela dispersão, os fragmentos tendem a perder toda a variabilidade genética e, assim, a capacidade de se adaptar às alterações ambientais. A redução das subpopulações a poucos indivíduos também facilita o endocruzamento e as suas conseqüências. O empobrecimento genético diminui o *fitness*, reduz o potencial para a reprodução e as defesas imunológicas acumuladas durante milhões de gerações podem não resistir a episódios de epidemias (Roelke *et al.* 1993).

Estruturadas como metapopulações, a sobrevivência em longo prazo das subpopulações de onças-pardas dependerá, provavelmente, do movimento da espécie entre os habitats formados por fragmentos. A implantação de corredores de migração e a manutenção de fragmentos podem diminuir os riscos de isolamento e de extinção das subpopulações da área permitindo a persistência dessa estrutura. O manejo de pequenas populações deve incluir também controles

sobre os limites de depredação e a construção de estradas, fatores que podem influenciar a taxa de sobrevivência de adultos (Beier 1993).

Aumentar o nosso conhecimento sobre os grandes carnívoros e reverter o seu declínio estão entre os desafios mais urgentes de conservação que enfrentamos nos dias de hoje (Weber e Rabinowitz 1996). Devido à importância dos carnívoros de topo no controle de processos ecológicos e à grande chance de conflitos futuros com populações humanas que crescem progressivamente, estudos sobre demografia como este, além de estudos sobre a estrutura e variação genética da espécie *P. concolor* são essenciais para a sua conservação.

## 6. Conclusões

- Mesmo inseridas em uma paisagem altamente fragmentada, as áreas da Estação Ecológica de Jataí e do Parque Estadual do Vassununga ainda mantêm uma ou mais populações de onças-pardas;
- A Estação Ecológica de Jataí abriga ao menos três indivíduos distintos de *P. concolor*, e o Parque Estadual do Vassununga ao menos 4 indivíduos;
- A ocorrência de pumas no entorno das Unidades de Conservação evidencia a necessidade de implantação de corredores de migração ou pontos de ligação entre as glebas que formam o Parque Estadual do Vassununga assim como entre o Parque e a Estação Ecológica de Jataí. A manutenção de fragmentos pode diminuir os riscos de isolamento e de extinção das subpopulações de *P. concolor* permitindo a persistência da estrutura de metapopulação na região;
- Mesmo com a experiência do trabalho em campo, a confirmação da presença de fezes de jaguatirica (*L. pardalis*) dentre as amostras de fezes supostamente pertencentes a onças-pardas (*P. concolor*), revela a necessidade de um diagnóstico molecular para a confirmação da espécie de origem das fezes. Estudos demográficos e de dieta baseados somente na análise do tamanho e na morfologia de fezes podem fornecer resultados enviesados;
- A maioria dos *primers* de microssatélites isolados inicialmente para o gato doméstico que utilizamos (*primers* heterólogos) não foi capaz de amplificar o DNA fecal de *P. concolor* com

sucesso. O desenvolvimento de *primers* específicos de microssatélites para *P. concolor* viabilizariam estudos futuros sobre variação e estruturação das populações da espécie;

- Para a análise do DNA fecal, quanto mais clara for a coloração das fezes em solução, melhor será a qualidade do DNA extraído e, conseqüentemente, maior será o sucesso das reações de amplificação. A coloração escura da solução pode indicar a presença de inibidores de PCR.

## 7. Referências bibliográficas

ALBAUGH, G.P., IYENGAR, V., LOHANI, A., 1992. Isolation of exfoliated colonic epithelial cells, a novel, non-invasive approach to the study of cellular markers. *International Journal of Cancer*, 52: 347-350.

ANDERSON, JR. C.R., LINDZEY, F.G., MCDONALD, D.B., 2004. Genetic structure of cougar populations across the Wyoming Basin: metapopulation or megapopulation. *Journal of Mammalogy*, 85(6): 1207-1214.

AVISE, J.C., 2004. *Molecular markers, natural history, and evolution*. 2ª edição, Sinauer Associates, Inc Publishers, Sunderland, Massachusetts.

BATALHA, M.A., 1997. Análise da vegetação da ARIE cerrado Pé-de-Gigante (Santa Rita do Passa Quatro, SP). São Paulo, 1997. 185p. Dissertação (Mestrado). Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo.

BATALHA, M.A., MANTOVANI, W., 2000. Reproductive phenological patterns of cerrado plant species at the Pé-de-Gigante Reserve (Santa Rita do Passa Quatro, SP, Brazil): a comparison between the herbaceous and woody floras. *Brazilian Journal of Biology*, 6: 129-145.

BEIER, P., 1993. Determining minimum habitat areas and habitat corridors for cougars. *Conservation Biology*, 7(1): 94-107.

BELLEMAIN, E., SWENSON, J.E., TALLMON, D., BRUNBERG, S., TABERLET, P., 2005. Estimating population size of elusive animals with DNA from hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology*, 19(1): 150-161.

BERTA, A., 1983. A new species of small cat (Felidae) from the late Pliocene-early Pleistocene Uquian of Argentina. *Journal of Mammalogy*, 64: 720-725.

BRADLEY, B.J., BOESCH, C., VIGILANT, L., 2000. Identification and redesign of human microsatellite markers for genotyping wild chimpanzee (*Pan troglodytes verus*) and gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*) DNA from feces. *Conservation genetics*, 1: 289-292.

BRADLEY, B.J., CHAMBERS, K.E., VIGILANT, L., 2001. Accurate DNA-based sex identification of apes using non-invasive samples. *Conservation Genetics*, 2: 179-181.

BROQUET, T., PETIT, E., 2004. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Molecular Ecology*, 13: 3601-3608.

CAMARA, G., SOUZA, R.C.M., FREITAS, U.M., GARRIDO, J., 1996. SPRING: Integrating remote sensing and GIS by object-oriented data modeling. *Computers and Graphics*, 20(3): 395-403.

Centro de Estudos do Genoma Humano – USP. <http://genoma.ib.usp.br/>

CHAME, M., 2003. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. *Memorial do Instituto Oswaldo Cruz*, 98(1): 71-94.

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

CONSERVATION INTERNATIONAL, 1999. *Hotspots – Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions*. Conservation International, 432 p.

CONSERVATION INTERNATIONAL DO BRASIL, FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA, FUNDAÇÃO BIODIVERSITAS, INSTITUTO DE PESQUISAS ECOLÓGICAS, SECRETARIA DO MEIO AMBIENTE DO ESTADO DE SÃO PAULO, SEMAD/INSTITUTO ESTADUAL DE FLORESTAS-MG, 2000. *Avaliação e ações prioritárias para a conservação da biodiversidade da Mata Atlântica e Campos Sulinos*. MMA/SBF, Brasília, 40 p.

- CRAWSHAW, P.G.JR., 1987. Top cat in a vast Brazilian marsh. *Animal Kingdom*, 90(5): 12-19.
- CRAWSHAW, P.G.JR., QUIGLEY, H.B., 1991. Jaguar spacing, activity and habitat use in a seasonally flooded environment in Brazil. *Journal of Zoology*, 233: 357-370.
- CREEL, S., SPONG, G., SANDS, J.L., ROTELLA, J., ZEIGLE, J., JOE, L., MURPHY, K.M., SMITH, D., 2003. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*, 12: 2003-2009.
- CULVER, M., MENOTTI-RAYMOND, M.A., O'BRIEN, S.J., 2001. Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in Pumas (*Puma concolor*). *Molecular Biology and Evolution*, 18: 1151-1156.
- CURRIER, M.J.P., 1983. *Felis concolor*. *Mammalian Species*, 200: 1-7.
- DALÉN, L., GOTHERSTROM, A., ANGERBJORN, A., 2004. Identifying species from pieces of faeces. *Conservation Genetics*, 5: 109-111.
- DEAGLE, B.E., TOLLIT, D.L., JARMAN, S.N., HINDEL, M.A., TRITES, A.W., GALES, N.J., 2005. Molecular scatology as a tool to study diet: analysis of prey DNA in scats from captive Steller sea lions. *Molecular Ecology*, 14: 1831-1842.
- EGGERT, L.S., EGGERT, J.A., WOODRUFF, D.S., 2003. Estimating population size for elusive animals: the forest elephants of Kakum National Park, Ghana. *Molecular Ecology*, 12: 1389-1402.
- ERNEST, H.B., PENEDO, M.C.T., MAY, B.P., SYVANEN, M.S., BOYCE, W.M., 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*, 9: 433-441.
- FARREL, L.E., ROMAN, J., SUNQUIST, M.E., 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology*, 9: 1583-1590.

FERREIRA, M.E., GRATAPAGLIA, D., 1995. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3ª edição, EMBRAPA - CENARGEN, Brasília, 220 p.

FITZGERALD, S., 1989. *International Wildlife trade: whose business is it?* World Wildlife Fund, Washington D.C.

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

GAGNEUX, P., BOESCH, C., WOODRUFF, D.S., 1997. Microsatellite scoring errors associated with noninvasive genotyping based on nuclear DNA amplified shed hair. *Molecular Ecology*, 6: 861-868.

GOLDSTEIN, D.B., POLLOCK, D.D., 1997. Launching microsatellites: a review of mutation process and methods of phylogenetic inference. *Journal of Heredity*, 88: 335-342.

GÓMEZ-MOLINER, B.J., CABRIA, M.T., RUBINES, J., GARIN, I., MADEIRA, M.J., ELEJALDE, A., AIHARTZA, J., FOURNIER, P., PALAZÓN, S., 2004. PCR-RFLP identification of mustelid species: European mink (*Mustela lutreola*), American mink (*M. vison*) and polecat (*M. putorius*) by analysis of excremental DNA. *Journal of Zoology of London*, 262: 311-316.

GORMAN, M.L., TROWBRIDGE, B.J., 1989. The role odor in the social lives carnivores. Em: *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*, Gittleman JL, Chapman & Hall, New York, pp. 57-88.

HAIG, S.M., 1998. Molecular contribution to conservation. *Ecology*, 79: 413-425.

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

HEDMARK, E., FLAGSTAD, O., SEGERSTROM, P., PERSSON, J., LANDA, A., ELLEGREN, H., 2004. DNA-based individual and sex identification from wolverine (*Gulo gulo*) faeces and urine. *Conservation Genetics*, 5: 405-410.

HEDRICK, P.W., MILLER, O.S., 1992. Conservation genetics: techniques and fundamentals. *Ecological Applications*, 2(1): 30-46.

IBAMA, 2003. Lista nacional das espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Ministério do Meio Ambiente, Brasília.

IDAGHDOUR, Y., BRODERICK, D., KORRIDA, A., 2003. Faeces as a source of DNA for molecular studies in a threatened population of great bustards. *Conservation Genetics*, 4: 789-792.

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

IUCN – The World Conservation Union, 2002. *2002 IUCN Red List of Threatened Species*. IUCN, New York. (Acessado em 12 de março de 2004).

IUCN – The World Conservation Union, 2005. *IUCN/SSC Cat Specialist Group*. [www.catsg.org](http://www.catsg.org). (Acessado em 28 de dezembro de 2005).

JANCZEWSKI, D.N., MODI, W.S., STEPHENS, J.C., O'BRIEN, S.J., 1995. Molecular evolution of mitochondrial 12S RNA and cytochrome b sequences in the pantherine lineage of Felidae. *Molecular Biology and Evolution*, 12: 690-707.

JANZEN, D.H., 1986. Keystone plant resources in the tropical Forest. Em: *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*, Soulé ME (ed), pp.330-344, Sinauer Associates, Sunderland.

JOHNSON, W.E., O'BRIEN, S.J., 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Journal of Molecular Evolution*, 44(1): S98-S116.

JORGE, M.C.L., PIVELLO, V.R., MEIRELLES, S.T., VIVO, M. DE, 2001. Riqueza e abundância de pequenos mamíferos em ambientes de cerrado e floresta na reserva Pé-de-Gigante, Parque Estadual do Vassununga (Santa Rita do Passa Quatro). *Naturalia*, 26: 287-302.

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

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

KOHN, M.H., YORK, E.C., KAMRADT, D.A., 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London B*, 266: 657-663.

KORMAN, V., 2003. Proposta de interligação das glebas do Parque Estadual do Vassununga (Santa Rita do Passa Quatro – SP). Piracicaba, 2003. 131p. Dissertação (Mestrado). Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, Universidade de São Paulo.

KUMAR, S., TAMURA, K., NEI, M., 2004. MEGA3: Integrated Software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and Sequence Alignment. *Briefings in Bioinformatics*, 5: 150-163.

- LOPEZ, J.V., YUHKI, N., MASUDA, R., MODI, W., O'BRIEN, S.J., 1994. *Numt*, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *Journal of Molecular Evolution*, 39: 174-190.
- MCRAE, B.H., BEIER, P., DEWALD, L.E., HUYNH, L.Y., KEIM, P., 2005. Habitat barriers limit gene flow and illuminate historical events in a wide-ranging carnivore, the American puma. *Molecular Ecology*, 14: 1965-1977.
- MARTUSCELLI, P., OLMOS, F., 1993. Reconhecimento preliminar da fauna do Parque Estadual do Vassununga e da Estação Ecológica do Jataí (santa Rita do Passa Quatro – Luís Antônio, SP). Secretaria do Meio Ambiente, Coordenadoria de Informações Técnicas, Documentação e Pesquisa Ambiental do Instituto Florestal. Processo SMA 40.797.
- MASUDA, R., LOPEZ, J.V., SLATTERY, J.P., YUHKI, N., O'BRIEN, S.J., 1996. Molecular Phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequence in the Felidae: Ocelot and Domestic Cats lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6: 351-365.
- MAZZOLLI, M., GRAIPEL, M.E., DUNSTONE, N., 2002. Mountain lion depredation in southern Brazil. *Biological Conservation*, 105: 43-51.
- MEFFE, G.K., CARROLL, C.R., 1997. *Principles of conservation biology*. 2<sup>a</sup> edição, Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- MENOTTI-RAYMOND, M.A., O'BRIEN, S.J., 1995. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *Journal of Heredity*, 86: 319-322.
- MENOTTI-RAYMOND, M., DAVID, V.A., LYONS, L.A., SCHÄFFER, A.A., TOMLIN, J.F., HUTTON, M.K., O'BRIEN, S.J., 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57, 9-23.
- MILLER, C.R., JOYCE, P., WAITS, L.P., 2002. Assessing allelic dropout and genotype reability using maximum likelihood. *Genetics*, 160: 357-366.

- MILLS, L.S., CITTA, J.J., LAIR, K.P., SCHWARTZ, M.K., TALLMON, D.A., 2000. Estimating animal abundance using noninvasive DNA sampling: promise and pitfalls. *Ecological Applications*, 10: 283-294.
- MORIN, P.A., WOODRUFF, D.S., 1996. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. *Molecular Genetics Approaches in Conservation*. Oxford University, New York, pp. 298-313.
- MORIN, P.A., CHAMBERS, K.E., BOESCH, C., VIGILANT, L., 2001. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). *Molecular Ecology*, 10: 1835-1844.
- MORITZ, C., 2002. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary process that sustain it. *Systematics Biology*, 51: 238-254.
- MUNARI, D.P., PIVELLO, V.R., MEIRELLES, S.T., 2001. Uso de silvicultura de eucalipto no entorno da gleba “Cerrado Pé-de-Gigante” (Parque Estadual do Vassununga, SP) pela mastofauna. Resumos do Congresso de Ecologia do Brasil V, Porto Alegre, UFRGS.
- MULLIS, K.B., FALOONA, F.A., 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, 155: 335-350.
- NOVAK, A.J., MAIN, M.B., SUNQUIST, M.E., LABISKY, 2005. Foraging ecology of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) in hunted and non-hunted sites within the Maya Biosphere Reserve, Guatemala. *Journal of Zoology*, 267: 167-178.
- O'BRIEN, S.J., WILDT, D.E., GOLDMAN, D., MERRIL, C.R., BUSH, M., 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science*, 251: 459-462.
- OLIVEIRA, T.G., CASSARO, K., 1999. *Guia de identificação de felinos brasileiros*. Fundação Pró-Carnívoros, Atibaia.

PAETKAU, D., WAITS, L.P., CLARKSON, P.L, CRAIBGHEAD, L., VYSE, E., WARD, R., STROBRCK, C., 1998. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology*, 12(2): 418-429.

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

PARKER, P.G., SNOW, A.A., SCHUG, M.D., BOOTON, G.C., FUERST, P.A., 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79(2): 361-382.

PECON-SLATTERY, J., JOHNSON W.E., GOLDMAN, D., O'BRIEN, S.J., 1994. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined y protein electrophoresis. *Journal of Molecular and Evolution*, 39: 296-305.

PEREZ-SWEENEY, B.M., RODRIGUES, F.P., MELNICK, D.J., 2003. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. Em: *Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre* (eds. Cullen Jr L, Rudran R, Valladares-Padua C), pp. 343-380. Editora UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná, Brazil.

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

PIMM, S.L., GILPIN, M.E., 1989. Theoretical issues in conservation biology. Em: *Perspectives in Ecological Theory*, Roughgarden RM, Levin SA (eds.). Princeton University, Princeton, pp. 287-305.

PIRES, J.S.R., SANTOS, J.E., 1995. Bacias Hidrográficas – Integração entre meio ambiente e desenvolvimento. *Ciência Hoje*, 40(110): 40-45.

- PIRES, A.E., FERNANDES, M.L., 2003. Last lynxes in Portugal? Molecular approaches in a pre-extinction scenario. *Conservation Genetics*, 4: 525-532.
- PRIMACK, R.B., RODRIGUES, E., 2001. *Biologia da Conservação*. Efraim Rodrigues (ed.), Londrina.
- PRUGH, L.R., RITLAND, C.E., ARTHUR, M.A., KREBS C.J., 2005. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, 14: 1585-1596.
- RATTER, J.A., RIBEIRO, J.F., BRIDGEWATER, S., 1997. The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of Botany*, 80: 223-230.
- REDFORD, K.H., 1992. The empty forest. *BioScience*, 42: 412-422.
- RIDDLE, A.E., PILGRIM, K.L., MILLS, L.S., MCKELVEY, K.S., RUGGIERO, L.F., 2003. Identification of mustelids using mitochondrial DNA and non-invasive sampling. *Conservation Genetics*, 4: 241-243.
- ROELKE, M.E., MARTENSON, J.S., O'BRIEN, S.J., 1993. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology*, 3(6): 340-350.
- ROON, D.A., THOMAS, M.E., KENDALL, K.C., WAITS, L.P., 2005. Evaluating samples as a source of error in non-invasive genetic studies using microsatellites. *Molecular Ecology*, 14: 195-201.
- ROSS, P.L, JALKOTZY, M.G., 1992. Characteristics of a hunted population of cougars in southwestern Alberta. *Journal of Wildlife Management*, 56: 417-426.
- RUTH, T.K., LOGAN, K.A., SWEANOR, L., HORNOCKER, M.G., TEMPLE, L.J., 1998. Evaluating cougar translocation in New Mexico. *Journal of Wildlife Management*, 62: 1264-1275.

SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T., MULLIS, K.B., ERLICH, H.A., 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239: 487-491.

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

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

SANTOS, J.E., FERESIN, E.G., BALLESTER, M.V.R., JESUS, T.P., 1995. Utilização da abordagem sistêmica para o manejo de áreas naturais. Caso de Estudo: Estação Ecológica do Jataí, Luís Antônio, SP. *Oecologia Brasiliensis*, I: 487-582.

SANTOS, J.E., PIRES, A.M.Z.C.R., PIRES, J.S.R., 2000. *Caracterização ambiental de uma unidade de conservação*. Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP. Encarte de divulgação.

SCHALLER, G.B., CRAWSHAW, P.G.JR., 1980. Movement patterns of jaguar. *Biotropica*, 12: 161-168.

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

SHAFFER, M., 1987. Minimum viable populations: coping with uncertainty. Em: *Viable populations for conservation*, Soulé ME (ed.). Cambridge University Press, New York, pp. 69-86.

SHIDA, C.N., PIVELLO, V.R., 2002. Caracterização fisiográfica e de uso das terras da região de Luiz Antônio e Santa Rita do Passa Quatro, SP, com o uso de sensoriamento remoto e SIG. *Investigaciones Geográficas, Boletín del Instituto de Geografía*, México, 49: 27-42.

SOLÉ-CAVA, A.M., 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. Em: *Biologia Molecular e Evolução*, Matioli SR (ed.). Editora Holos, Ribeirão Preto, pp. 171-192.

SUNNUCKS, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15(5): 199-203.

SWEANOR, L.L., LOGAN, K.A., HORNOCKER, M.G., 2000. Cougar dispersal patterns, metapopulation dynamics, and conservation. *Conservation Biology*, 14(3): 798-808.

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

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

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

TALAMONI, S.A., MOTTA-JUNIOR, J.C., DIAS, M.M., 2000. Fauna de mamíferos da Estação Ecológica de Jataí e da Estação Experimental de Luiz Antônio. Em: Estudos integrados em ecossistemas, Estação Ecológica de Jataí, 1º vol. (eds. Santos JE, Pires JSR), pp.317-329, São Carlos, São Paulo, Brazil.

THOMPSON, J.D., GIBSON, T.J., PLEWNIAK, F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D.G., 1997. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 24: 4876-4882.

TOPPA, R.H., PIRES, J.S.R., DURIGAN, G., DE FIORI, A., MAROTI, P.S., HENKE-OLIVEIRA, C., 2002. Fitofisionomias da Estação Ecológica do Jataí, Luís Antônio, SP. Em: *III Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação*. Fortaleza, Ceará, pp. 611-620.

WAITS, J.L., LEBERG, P.L., 2000. Biases associated with population estimation using molecular tagging. *Animal conservation*, 3: 191-199.

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

WASSER, S.K., HOUSTON, G.M., CADD, G.G., FAIN, R., 1997. Techniques for application of fecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology*, 6: 1091-1097.

WAYNE, R.K., MORIN, P.A., 2004. Conservation genetics in the new molecular age. *Front Ecology Enviroment*, 2: 89-97.

WEAVER, J.L., PAQUET, P.C., RUGGIERO, I.F., 1996. Resilience and conservation of large carnivores in the Rocky Mountains. *Conservation Biology*, 10: 1047-1054.

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

WEBER, W., RABINOWITZ, A., 1996. A global perspective on large carnivore conservation. *Conservation Biology*, 10: 1046-1054.