

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR

**GENÉTICA E CONSERVAÇÃO DO LEÃO-BAIO
(*Puma concolor*) NO SUL DO BRASIL**

Camila Schlieper de Castilho

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor. Orientador: Thales Renato Ochotorena de Freitas.

Porto Alegre, 2010



Foto gentilmente cedida por Juan Rivas Beasley

“Keeping large carnivores is a measure of how we are doing in the battle to save the planet’s biodiversity.”

Large Carnivores and the Conservation of Biodiversity
Ray e cols. 2005

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS

Programa de Pós Graduação em Genética e Biologia Molecular, UFRGS
www.ufrgs.br/ppgbm

Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, UFRGS
www.ufrgs.br/lce

Instituto Serrano de Conservação da Natureza (ISCN)
www.institutoserrano.org.br

Projeto Leão Baio
www.projetoleaobaio.com

Parque Nacional de São Joaquim, ICMBio
www.icmbio.gov.br

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)
www.cnpq.br

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
www.capes.gov.br



Foto: Camila S. Castilho

À minha mãe, minha irmã e meu irmão por estarem sempre presentes na minha vida e me apoiarem em tudo o que faço. Ao meu pai, pelo amor, pelo exemplo como profissional e pesquisador e por estar sempre presente, agora no meu coração. À Sophia, que tenha um mundo cheio de pumas para viver. Esta tese é dedicada a vocês.

AGRADECIMENTOS

Há algum tempo atrás li nos agradecimentos da tese do meu pai que uma tese se faz com a participação de muitas pessoas: do orientador, de outros pesquisadores, da família, de amigos e de muitas outras pessoas que têm diferentes papéis no andamento e término de uma tese de doutorado. Eu concordo com ele, uma tese se faz com muitas pessoas, e é para todos vocês que participaram da minha vida e do desenvolvimento do meu doutorado que vai o meu grande agradecimento.

Ao Thales um agradecimento especial por todos estes (muitos) anos de amizade e orientação. Obrigada!

Ao pessoal do laboratório da UFRGS, Paula, Tati Novinski, Rodrigo, Tati Trigo, Simone, Jorge, Josmael, José, Claiton, Tati, Laura, Livia, Chico, Darli, Patrícia e tantos outros que passaram ou passam por ali, obrigada pela convivência gostosa, discussões nos seminários, na salinha e toda a ajuda. Em especial a Carla, Gabi e Pedro também pelas ótimas sugestões nos artigos da tese. Um agradecimento enorme (enorme mesmo) para a Gislene pelas muitas conversas regadas a café e pela paciência de ler e criticar todas as partes desta tese. Muito obrigada, tua ajuda foi fundamental para mim.

Obrigada à Taiana e Ana Lúcia pela disponibilidade, discussões e ajuda com os programas de computador e bancos de dados.

Ao Luciano pela convivência e ajuda no laboratório e à Lúcia pela disponibilidade e ajuda em tudo.

Ao Elmo e Ellen pela ajuda e paciência em todos os momentos.

Aos museus LAMAQ/UFSC e Capão da Imbuia por disponibilizar as amostras para coleta de material. À Marcelo Mazzolli, Pedro V. Castilho, Maurício Graipel, Paulo César Simões-Lopes, Sérgio Althoff, Alexandre Fillippini, Maurício Matos Mendonça, Iran Croda, William Veronezi, Cláudio Silveira, Tereza Cristina Margarido, Raquel Von Hohendorff, Mere Erika Saito e a todos os parceiros do projeto pela ajuda na coleta de amostras. Um agradecimento muito especial ao Rodrigo C. Benedet pelo grande esforço nas coletas e por

acreditar e abraçar o projeto desde o primeiro encontro. A todos os proprietários de terras, seus familiares e amigos pela confiança e por permitir a visita em suas casas.

A Heinrich Hasenack pela ajuda com as imagens de cobertura vegetal e a todos os que responderam meus e-mails, telefonemas, me encontraram para conversar e deram sugestões variadas (e criativas) sobre os programas de geoprocessamento. Obrigada pela disposição em ajudar!

Ao Michel, Isaac, Edinho, Marcelino, Sílvia e todos os que trabalham no Parque Nacional de São Joaquim/ SC, obrigada pelo apoio e confiança.

Ao Jordan, Martha, Luiz, Gisele e Juan pela convivência e amizade, pelos churrascos e pizzas regadas a vinho, conversas e sonhos, pelo incentivo e confiança, e por sofrerem com as dificuldades e vibrarem com as conquistas junto comigo. Esta tese é um pouquinho de cada um de vocês.

A todos os associados, conselheiros e parceiros do Instituto Serrano de Conservação da Natureza pelo apoio, incentivo e carinho.

Ao CNPq por conceder a bolsa para a realização deste trabalho.

A todos do IX Curso Latino Americano de Biologia da Conservação pela amizade e por compartilhar a paixão pela conservação da natureza.

A Cila, mana, Shali, Carine, Carol, Fábio, Thaís, Gustavo, Ana Paula, Guilherme, Ana Luiza Rocha, Jussara, Naira, Sérgio, Pitchú, Nanda, Wagnão. A todos os amigos, nomeados e não nomeados, novos e velhos, obrigada por fazerem parte da minha vida e me fazerem mais feliz. Vocês moram no meu coração. Ao Beto, pelos bons momentos. E um agradecimento muito especial a Camila, pelas inúmeras tardes de chimarrão escutando minhas alegrias e ansiedades, pelas aulas de francês (que saudade), pelo apoio enorme e por estar sempre do meu lado quando precisei comemorar ou chorar. Tu és muito especial para mim. Obrigada também pela correção do português e sugetões no texto.

A toda minha família, pelo carinho, apoio e amor incondicionais. Em especial a vó pelo incentivo enorme e orações constantes.

Aos cunhados Alessandra e Fabiano, obrigada pelo carinho e por fazerem meu irmão e irmã felizes.

Ao meu irmão pelo incentivo, participação e grande empolgação em tudo o que faço. Pelo amor e carinho enormes e por estar presente na minha vida nos momentos maravilhosos e também nos menos maravilhosos. Obrigada pelos conselhos, e-mails, fotos, petits (hehe), jantas e conversas.

A minha irmã por estar do meu lado sempre, por fazer do mundo um lugar melhor e mais bonito para mim e por discutir comigo sobre densidades de pumas (foi ótima aquela conversa hehehe). Obrigada pelo colo, pela vibração, por acreditar, pelos porres, jantas e conversas. E a Phi, por me lembrar que o mundo é um lugar empolgante e maravilhoso.

A minha mãe para quem tenho tanto a agradecer que até é difícil de começar. Obrigada pelo amor, por me apoiar em tudo, por estar sempre do meu lado comemorando comigo as menores e maiores conquistas, tudo fica muito mais gostoso assim. Obrigada pelo colo e por enfrentar comigo os momentos difíceis. Obrigada por acreditar sempre, mesmo quando eu fico na dúvida. Uma parte enorme desta tese é tua.

Ao meu pai, pelo amor e exemplo. Aprendi contigo o amor pela pesquisa e a valorizar cada momento da vida.

Amo muito vocês.

E, finalmente, aos pumas, espero que este trabalho ajude na conservação desta espécie fascinante. 🐾

SUMÁRIO

RESUMO	09
ABSTRACT	10
INTRODUÇÃO	11
Grandes carnívoros e a conservação da biodiversidade.....	12
<i>Puma concolor</i>	13
Densidade populacional, área de vida e dispersão.....	17
Leões-baios da América do Sul e América do Norte.....	21
Status de <i>Puma concolor</i> no sul do Brasil.....	23
Conflito entre leões-baios e rebanhos domésticos	23
Fragmentação e perda de habitat.....	24
Genética da Conservação.....	26
Gargalo de garrafa, tamanho efetivo da população e perda do potencial evolutivo.....	28
Marcadores Moleculares e seu uso na Genética da Conservação.....	30
Microssatélites.....	31
Íntrons do cromossomo Y.....	33
Genética da Paisagem.....	34
OBJETIVOS	36
CAPÍTULO I - Habitat Loss and Evidence of a Bottleneck in Mountain Lions in Southern Brazil	38
CAPÍTULO II - Landscape Genetics of Mountain Lions (<i>Puma concolor</i>) in Southern Brazil	71
DISCUSSÃO	83
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
ANEXOS	103

RESUMO

O leão-baio (*Puma concolor*), segundo maior felino neotropical, tem a maior distribuição geográfica nas Américas. A subespécie que ocorre no sul do Brasil é listada como *least concern* e vulnerável nas listas de espécies ameaçadas da IUCN e do Ministério do Meio Ambiente brasileiro, respectivamente. Em áreas nas quais a onça-pintada (*Panthera onca*) foi localmente extinta, o leão-baio tem o papel de predador de topo de cadeia alimentar influenciando na manutenção de processos do ecossistema e na biodiversidade, como é o caso no sul do Brasil. Neste trabalho nós investigamos a existência de um gargalo de garrafa recente e a variabilidade genética dos leões-baios do sul do Brasil. Foi analisada também a existência de estrutura populacional utilizando métodos Bayesianos, estimada a densidade e realizadas análises de parentesco. A conectividade da paisagem foi correlacionada com os padrões de fluxo gênico para identificar sua permeabilidade à espécie e possíveis áreas fontes de migrantes para a população de leões-baios do sul do Brasil. Foram utilizados 18 locos de microssatélites e um *intron* do cromossomo Y. Um total de dois haplótipos de Y e 106 alelos de microssatélite foram identificados, o número de alelos/loco foi de 2 a 11. A heterozigosidade observada média, o número médio de alelos, a riqueza alélica e o PIC foram de 0,609; 5,89; 5,652 e 0,6255 respectivamente. Esta população mostrou evidências de um gargalo de garrafa recente, e o tamanho efetivo genético estimado foi de 16,5 e 23,54 utilizando diferentes algoritmos. Não foi observada estrutura genética entre amostras e a análise da paisagem indica que todos os pontos onde foram amostrados indivíduos estão conectados por áreas que são permeáveis ao movimento de leões-baios. A densidade estimada para esta população foi baixa, de 0,09 e 0,32 leões-baios/100 km² ($N_e/N=0,11$ e $N_e/N=0,4$ respectivamente). Análises de parentesco indicaram que indivíduos mortos em uma mesma área não eram aparentados sugerindo que leões-baios ainda são capazes de dispersar ao longo da paisagem. Evidências indicam que a perda de habitat severa e a consequente caça ilegal parecem ser os responsáveis pelo gargalo de garrafa e consequente perda de variabilidade genética observados. Nós demonstramos que a paisagem, embora fragmentada, ainda permite aos leões-baios se moverem, e que Unidades de Conservação do sul do Brasil podem estar agindo como áreas fonte para esta população. Estas informações indicam que ações que visem reduzir a caça ilegal e manter a conectividade da paisagem são prioritárias para a conservação do leão-baio no sul do Brasil.

ABSTRACT

The mountain lion (*Puma concolor*), the second-largest neotropical felid, occupies the largest geographical area in the Americas, with the subspecies that occurs in southern Brazil is listed as of least concern in the IUCN Red List and as vulnerable in Brazilian List of Threatened Species. In areas where the jaguars (*Panthera onca*) have been eradicated, mountain lions have played a key role in maintaining ecosystem processes and biodiversity as the top predator, as in southern Brazil. In this work we investigated the existence of a recent bottleneck and the genetic variability of mountain lions' population in southern Brazil. We search for evidences of population structure using Bayesian methods, estimated densities and parentage, and also we correlated landscape connectivity and patterns of gene flow to identify landscape permeability and possible sources of migrants for the population of mountain lions in southern Brazil, using circuit theory. We used 18 microsatellite loci and a Y-intron. A total of two Y-haplotypes and 106 alleles were identified, the number of alleles/locus ranged from 2 to 11. The mean observed heterozygosity, mean number of alleles, allelic richness, and polymorphism information content were 0.609, 5.89, 5.652, and 0.6255 respectively. This population showed evidence of a recent bottleneck, and the estimated effective population size was 16.5 and 23.54 using different algorithms. We did not find genetic structure between samples, and landscape analysis indicated that all individuals were connected by areas that are permeable to mountain lion movements. The estimated population density was low, 0.09 and 0.32 mountain lions/100 km² ($N_e/N=0.11$ and $N_e/N=0.4$, respectively). Kinship analysis indicated that individuals killed in the same spot were not related, suggesting that mountain lions are still able to disperse through the landscape. Habitat loss and illegal hunting may be responsible for a observed recent bottleneck and consequent loss of genetic variability, we demonstrated that the landscape still allows mountain lions to disperse widely, and that protected areas in southern Brazil may be acting as a source of migrants. This information indicates that actions to reduce illegal hunting and to maintain landscape connectivity are the priority for mountain lions conservancy in southern Brazil.

INTRODUÇÃO

Grandes carnívoros e a conservação da biodiversidade

A conservação da biodiversidade é uma prioridade nos dias de hoje, nos quais muitas espécies de fauna e flora estão extintas ou ameaçadas de extinção. Os carnívoros têm um papel importante na manutenção da biodiversidade e dos processos do ecossistema onde vivem (Estes 1996, Henke e Bryant 1999, Miller e cols. 2001, Ray e cols. 2005, Terborgh e cols. 2001, Terborgh e cols. 2006), sua presença pode ser considerada um indicador da integridade e do potencial de recuperação de um ambiente (Noss e cols. 1996).

Um dos fatores mais importantes é o controle do tamanho populacional de suas presas, tanto por predação quanto por mudança no comportamento dessas, que procuram diferentes habitats, fontes de alimentação, mudam seu horário de atividade ou reduzem o tempo se alimentando de forma a ficarem menos vulneráveis (Miller e cols. 2001). Tais mudanças de comportamento podem ter importantes significados ecológicos (Miller e cols. 2001). A ausência de grandes carnívoros também possibilita a ocorrência de explosões populacionais de predadores de médio porte, estes por sua vez aumentam a pressão de predação em suas espécies de presas, podendo levar a extinção de espécies mais raras (Noss e cols. 1996). A abundância das populações destas espécies pode aumentar de quatro a dez vezes, em áreas onde os predadores de grande porte são extintos (Noss e cols. 1996).

Herbívoros se alimentam de plantas e sementes e influenciam assim na estrutura da comunidade de plantas, já a comunidade de plantas influencia na distribuição, na abundância e nas interações de competição de espécies de aves, mamíferos e insetos (Miller e cols. 2001). Assim sendo, a regulação da população de herbívoros por carnívoros

influencia na dinâmica de todas as plantas e animais de um ecossistema, pois diminui a pressão dos herbívoros sobre as plantas (Miller e cols. 2001).

Quando carnívoros se alimentam preferencialmente de uma espécie superior competitivamente, regulando seu tamanho populacional, ou mudando seu comportamento de alguma forma, eles estão indiretamente protegendo os competidores mais fracos da exclusão, mantendo assim a biodiversidade (Henke e Bryant 1999, Miller e cols. 2001).

Dessa forma a presença dos predadores nos ambientes é de central interesse da biologia da conservação, sendo importante a manutenção de populações viáveis de maneira que desempenhem seu papel na regulação dos ecossistemas e na conservação da biodiversidade (Miller e cols. 2001, Terborgh e cols. 2001).

Além disso, por serem animais de topo da cadeia alimentar, as grandes áreas que precisam para suprir suas necessidades abrangem também áreas de ocorrência de outras espécies. A conservação de uma espécie-tôpo implica, portanto, na conservação das outras que vem abaixo na pirâmide alimentar. Por essas razões espécies como o leão-baio são chamadas de espécies guardachuva (Noss e cols. 1996) e podem ser utilizadas para estabelecer diretrizes no que diz respeito ao manejo de ecossistemas (Estes 1996).

Puma concolor

O *Puma concolor* é a segunda maior espécie de felino do Brasil e Américas, possui pelagem lisa variando do cinza ao avermelhado quando adulto (Anderson 1983, Nowell e Jackson 1996) (Figura 1) e apresenta pintas e olhos azuis quando filhote (Russel 1980) (Figura 2). As pintas tendem a desaparecer a partir do sexto mês de vida, não estando mais visíveis no final do primeiro ano (Currier 1983).

A espécie tem uma grande variedade de nomes populares, sendo chamado, entre outros, de puma, suçuarana, onça-parda, leão da montanha e leão-baio, como é popularmente conhecido no estado de Santa Catarina.

Tem a maior distribuição de um mamífero (exceto humanos) no continente americano (Figura 3), desde a Patagônia até o Canadá. Ocupando diversos tipos de habitats (de desertos áridos, florestas tropicais úmidas a frias florestas de coníferas) em diferentes altitudes que podem chegar até 5000 metros de altitude nos Andes (Redford e Eisenberg 1992, Nowell e Jackson 1996). Baseado em diferenças moleculares, são aceitas atualmente seis subespécies em toda a área de distribuição (Culver e col. 2000) em contraste com as 32 propostas anteriormente (Young e Goldman 1946, Jackson 1955, Cabrera 1963).

A média de peso fica entre 53-72 kg para machos adultos e 34-48 kg para fêmeas adultas na América do Norte (Russel, 1980, Anderson, 1983, Nowell e Jackson 1996). Este felino possui corpo longo e esguio, com comprimento variando de 50 a 153,7 cm. Os leões-baios tendem a ser menores quanto mais próximos do Equador e maiores em direção aos pólos (McNab 1971, Iriarte e cols. 1990, Nowell e Jackson 1996).

São animais solitários, com exceção de: (1) disputas entre machos pelo domínio de fêmeas ou território, (2) fêmeas com filhotes dependentes, (3) juvenis irmãos abandonados pela mãe que andam juntos por dois ou três meses, ou (4) durante breves períodos de acasalamento (Russel, 1980). O período de acasalamento dura de 2 a 5 dias (Russel 1980, Hemker e cols. 1984, Beier e cols. 1995, Sweanor e cols. 2000) e durante este tempo os animais não se deslocam e aparentemente não se alimentam (Beier e cols. 1995). O estro é de 8 dias, o ciclo de estro é de 23 dias (Russel 1980, Hansen 1992), a gestação dura de 91 a 95 dias (Russel 1980, Beier 1995, Nowell e Jackson 1996) e os nascimentos ocorrem aparentemente o ano todo (Russel 1980, Beier e cols. 1995).



Figura 1: Leão-baio adulto (Foto: Camila S. Castilho)



Figura 2: Leão-baio filhote (aproximadamente dois meses de vida) (Foto: Camila S. Castilho)

A toca está normalmente localizada em vegetação densa sem a presença de fezes ou restos de presas ou qualquer modificação aparente no local, exceto a vegetação amassada onde o animal se deita (Beier e cols. 1995).

As fêmeas têm de um a seis filhotes por gestação, sendo comum apenas um na primeira ninhada (Nowell e Jackson 1996). A idade de maturidade é de aproximadamente 24 meses para ambos os sexos (Russel 1980, Nowell e Jackson 1996), mas o primeiro cruzamento depende provavelmente do estabelecimento do território da fêmea (Nowell e Jackson 1996). Fêmeas em populações estáveis raramente cruzam com mais de um macho em um mesmo estro (Hemker e cols. 1984), e o intervalo entre os nascimentos é normalmente de 18 a 24 meses, embora possa ocorrer em 12 meses (Russel 1980, Currier 1983). A maioria dos estudos para a América do Norte mostra uma proporção sexual de 2:1 (fêmeas:machos) adultos. Para o sul do Brasil foi observada a proporção de 1:1,2 (fêmeas:machos), incluindo adultos e sub-adultos (Mazzolli e cols. 2002).

São animais prioritariamente noturnos e crepusculares, com limitada atividade diurna (Hansen 1992, Beier e cols. 1995, Silveira 2004, Paviolo e cols. 2009) podendo alterar seus horários preferenciais de atividade em áreas com mais ou menos pressão de caça (Paviolo e cols. 2009). Possuem dieta exclusivamente carnívora, oportunista, alimentando-se das presas disponíveis, incluindo animais domésticos (Currier 1983, Iriarte e cols. 1991, Oliveira 1994, Graipel e Cherem 1997, Brito 2000, Wallauer e cols. 2000, Silveira 2004, Azevedo 2008). As presas são arrastadas de 0 a 80 metros do local de ataque (Beier e cols. 1995) e cobertas normalmente com vegetação ou material disponível no local. O leão-baio retorna em geral para se alimentar da carcaça por vários dias (Beier e cols. 1995, Nowell e Jackson 1996), mas se raramente alimenta de carcaças que não caçou (Beier e cols. 1995).



Figura 3: Distribuição atual de *Puma concolor* no mundo (<http://www.iucnredlist.org/>)

Densidade populacional, área de vida e dispersão

As estimativas de densidade de leões-baios podem variar grandemente entre diferentes locais de estudo. Nos estudos foram utilizando diferentes métodos tais como: armadilhagem fotográfica, transectos lineares e telemetria (Tabela 1).

Tabela 1: Estimativas de densidade de leões-baios/100 km², local do estudo, método utilizado (AF- Armadilha fotográfica, TE- Telemetria, TL- Transectos lineares) e referência bibliográfica.

Estimativa de densidade (leões-baios/100 km ²)	Local	Método	Referência
0,3 e 0,74	Argentina alta pressão de caça	AF	Paviolo e cols. 2009
0,5 e 4,9	América do Norte	-	Anderson 1983
0,67 ± 0,16	Argentina	AF	Kelly e cols. 2008
0,66 e 2,19	Argentina média pressão de caça	AF	Paviolo e cols. 2009
1,55 e 2,89	Argentina baixa pressão de caça	AF	Paviolo e cols. 2009
1,57 e 3,01	Pantanal/Brasil	AF	Trolle e cols. 2007
3,42 ± 1,33	Belize	AF	Kelly e cols. 2008
3,4	Brasil	AF	Negrões e cols. 2010
4,4	Pantanal/Brasil	-	Crawshaw e Quigley citados em Nowell e Jackson 1996
6	Patagônia/Chile	TE TL	Franklin e cols. 1999
6,8 ± 1,5	Bolívia	AF	Kelly e cols. 2008

A área de vida também tem uma ampla variação de tamanho podendo ter entre 32 e 1031 km² (Nowell e Jackson 1996) e ocupa tanto áreas privadas quanto protegidas (Morrison e Boyle 2009). Áreas de vida de machos tendem a ser maiores do que as das fêmeas (Pierce e cols. 2000, Silveira 2004, Grigione e cols. 2002) com pelo menos algumas centenas de km². Fêmeas raramente ocupam áreas com mais de 100 km², ocupando áreas ainda menores quando acompanhadas de filhotes (Grigione e cols. 2002).

No entanto Morrison e Boyle (2009) chegaram a registrar uma área de 400 km² para uma fêmea e dois filhotes.

Territórios de machos tipicamente se sobrepõe a territórios de várias fêmeas e raramente aos territórios de outros machos. As maiores áreas de vida documentadas ocorrem em ambientes áridos, enquanto as menores são encontradas onde a maioria das presas não é migratória (Nowell e Jackson 1996, Pierce e cols. 2000). A ocupação dos territórios parece estar mais relacionada à disponibilidade de presas e sua distribuição temporal (Pierce e cols. 2000, Grigione e cols. 2002) do que à presença de outros indivíduos de mesma espécie (Pierce e cols. 2000).

Dispersão é um movimento permanente de distanciamento do território de nascimento (território da mãe) até o local onde o indivíduo estabelece seu território de adulto e onde ele se reproduz. A dispersão é responsável por grande parte do recrutamento de uma população, tendo um importante papel na dinâmica populacional de leões-baios. A dispersão permite que leões-baios expandam sua distribuição e recolonizem áreas onde a população local foi extinta quando conectada geograficamente a áreas-fontes (Beier 1995, LaRue 2007, LaRue e cols. 2008). Da mesma forma a dispersão permite que indivíduos de diferentes áreas achem territórios vagos devido à morte do residente, mesmo em áreas com forte pressão de caça (Logan e cols. 1986, Robinson e cols. 2008)

Quando os jovens se tornam independentes, alguns são recrutados na população local enquanto outros dispersam distâncias maiores tornando-se potenciais recrutas de outras subpopulações (Beier 1995, Sweanor e cols. 2000). No Novo México a estabilidade das subpopulações depende aparentemente do recrutamento de fêmeas nascidas na mesma área e de machos dispersores de diferentes locais, sendo que 68% das fêmeas recrutadas

nasceram na área de estudo, enquanto 78% dos machos recrutados nasceram em outras áreas (Sweator e cols. 2000).

Durante a dispersão, a probabilidade de mortalidade aumenta pois o indivíduo ainda não tem experiência em caçar e está atravessando território desconhecido, sendo hostilizado por residentes (Russel 1980). Esse processo ocorre normalmente quando os filhotes têm idade de 10 a 33 meses de vida (Ross e Jalkotzy 1992, Sweator e cols. 2000), sendo o mais comum aos 18 meses (Beier 1995) e antes de serem sexualmente ativos (Sweator e cols. 2000).

A dispersão parece ser parcialmente dependente da densidade de fêmeas (Sweator e cols. 2000), enquanto a densidade de machos não parece influenciar (Ross e Jalkotzy, 1992, Sweator e cols. 2000). A dispersão começa quando a mãe abandona o filhote em um dos limites do seu território e vai para o lado oposto, onde permanece de 2 a 3 semanas (Beier 1995). Os machos tendem a dispersar distâncias maiores do que as percorridas por fêmeas desde o território natal à independência (Pierce e cols. 2000, Lindzey e cols. 1994, Sweator e cols. 2000). As fêmeas normalmente exibem filopatria e estabelecem seu território de adulto próximo ao da mãe (Lindzey e cols. 1994, Sweator e cols. 2000).

Leões-baios têm capacidade de dispersar longas distâncias (Stoner e cols. 2008, Ruth e cols. 1998, Sweator e cols. 2000) tendo sido observado para um indivíduo o deslocamento total de 1341 km (357 km lineares) ao longo de um ano (Stoner e cols. 2008). Esta capacidade de dispersão de longo alcance (Pierce e cols. 1999) e de rápida expansão de distribuição (Riley e Malecki 2001) deve facilitar o fluxo gênico e reduzir a subestruturação genética. Tal fato foi observado em populações da Bolívia dos estados de Utah (Sinclair e cols. 2001), Wyoming e oeste de Dakota do Sul (Anderson e cols. 2004), nos Estados Unidos (Ruiz-Garcia e cols. 2009). Estudos demográficos em populações

norte-americanas indicam estruturação como metapopulação (Beier 1996, Sweanor e cols. 2000), resultado também observado em estudos utilizando marcadores moleculares (Ernest e cols. 2003).

Outros estudos encontraram estruturação populacional para leões-baios norte-americanos normalmente relacionada à distância e barreiras como desertos abertos, áreas de pastagem e agricultura (Walker e cols. 2000 Ernest e cols. 2003, McRae e cols. 2005).

A longevidade para a espécie é de aproximadamente 8 a 10 anos (Hansen 1992). A caça é um fator importante na mortalidade principalmente entre machos adultos e sub-adultos. Em um estudo realizado na América do Norte entre 1981 e 1989 foi registrado que 63% das mortes de machos adultos e 100% das mortes de machos sub-adultos haviam sido causadas por caça (Ross e Jalkotzy 1992). Weaver e cols. (1996) estimaram, com base em vários estudos, que 75% da mortalidade de leões-baios adultos resultam de conflitos com humanos, enquanto Morrison e Boyle (2009) estimaram que 50% da mortalidade de leões-baios com causa conhecida foi causada por ações humanas. Por outro lado a taxa de mortalidade por causas naturais é baixa, sendo <5% (Nowell e Jackson 1996, Sweanor e cols. 2000).

Leões-baios da América do Sul e América do Norte

Estudos moleculares e morfológicos indicam a origem do leão-baio no Mioceno há 5-8 milhões de anos atrás, apesar do registro fóssil datar de menos de 0,5 milhões de anos. Evidências moleculares indicam que o leão-baio e o gato-mourisco (*P. jaguaroundi*) são espécies irmãs, relacionadas ao guepardo (*Acinonyx jubatus*) que teria uma divergência mais basal (Johnson e O'Brien 1997, Slattery e O'Brien 1998, Mattern e McLennan 2000).

Os leões-baios originaram-se provavelmente na América do Norte e imigraram para a América do Sul a 2-4 milhões de anos atrás, quando carnívoros placentários imigraram pela primeira vez partindo da América do Norte através da ligação no Istmo do Panamá (Hunt 1996, Marshall e cols. 1982).

Os leões-baios da América do Norte parecem fazer parte de uma única e panmítica população que compartilha o mesmo haplótipo de DNA mitocondrial e apresenta baixa variabilidade genética. Essa situação pode ser decorrente da extinção da espécie há cerca de 0,3 milhões de anos na América do Norte juntamente com os demais grandes mamíferos norte-americanos durante o final do Pleistoceno. Os leões-baios atuais descendem provavelmente de um evento fundador no qual um pequeno número de indivíduos da América do Sul migrou para o Norte aproximadamente há 10.000-12.000 anos antes do presente (Culver e cols. 2000).

Culver e cols. (2000) observaram na América do Norte uma menor riqueza de alelos de microssatélites do que na América do Sul e Central. No leste da América do Sul os mesmos autores identificaram o haplótipo mais ancestral e central de DNA mitocondrial, o maior número de haplótipos e a maior diversidade de microssatélites, e sugeriram que a diversidade genômica do leão-baio atual teve sua origem provavelmente nesta região ou próximo a ela.

Atualmente são aceitas seis subespécies para *P. concolor*; *P. c. cougar* na América do Norte, *P. c. costaricensis* na América Central, as demais quatro sub espécies são descritas para a América do Sul, *P. c. concolor* no norte, *P. c. puma* no sul, *P. c. cabrarae* na área central e *P. c. capricornensis* no leste (Culver e cols. 2000).

Status de Puma concolor no sul do Brasil

O Puma concolor capricornensis, a subespécie descrita para o sul do Brasil, aparece com o status de vulnerável na Lista Brasileira de Fauna Ameaçada (MMA/Fundação Biodiversitas 2008) e como *Least concern* pela IUCN (2008). Nas listas de fauna ameaçada do Rio Grande do Sul e Paraná a espécie aparece como em perigo (Indrusiak e Eizirik 2003) e vulnerável (Margarido e Braga 2004), respectivamente. A espécie também é citada no apêndice II da CITES (CITES 2009).

Os leões-baios enfrentam atualmente duas principais ameaças em sua distribuição: o conflito com criadores de rebanhos domésticos e a fragmentação e perda de habitat.

Conflito entre leões-baios e rebanhos domésticos

Devido ao constante crescimento da população humana, à expansão cada vez maior das fronteiras rurais e ao desmatamento de áreas naturais, o conflito entre espécies da fauna silvestre e interesses humanos cresce a cada dia. Tal fato ocorre em todos os lugares do mundo onde vida silvestre e atividades humanas ocupam o mesmo espaço.

A predação de rebanhos domésticos por predadores naturais é um dos conflitos mais intensos entre seres humanos e animais silvestres devido ao prejuízo financeiro, ocorrendo no Brasil (Azevedo 2008, Marins-Sá 2005, Palmeira e cols. 2008, Michalski e cols. 2006, Mazzolli e cols. 2002) e em outros países (Rabinowitz 1986, Wang e McDonald 2006, Patterson e cols. 2004, Woodroffe e cols. 2005). A solução encontrada pelos fazendeiros na maior parte das vezes é o abate do predador (Quigley e Crawshaw 1992,

Mazzolli e cols. 2002), o que é uma das principais causas de mortalidade e da redução de suas populações (Nowell e Jackson 1996).

No sul do Brasil o conflito entre leões-baios e fazendeiros é registrado desde a década de 1990 e é citado como um importante fator de mortalidade para a espécie na região (Mazzolli e cols. 2002).

Fragmentação e perda de habitat

A sobrevivência a longo prazo de vertebrados de grande porte, como predadores de topo de cadeia alimentar e grandes herbívoros, só será assegurada se grandes áreas naturais forem protegidas conectadas entre si por ambientes favoráveis (Marsden e cols. 2005, Chetkiewicz e cols. 2006).

A Mata Atlântica é uma das maiores florestas das Américas, com área original de aproximadamente 150 milhões de hectares em condições ambientais bastante heterogêneas (Ribeiro e cols. 2009). Ela compreende de 1 a 8% de toda a biodiversidade mundial de espécies (Silva e Casteleti 2003), com alto grau de endemismo (Myers e cols. 2000, Fonseca 1985).

Por este motivo, um bioma de extrema importância nacional e internacional, sendo considerada Patrimônio Nacional na Constituição Federal Brasileira de 1988, Patrimônio Mundial pela ONU e com áreas consideradas Sítios Naturais do Patrimônio Mundial e Reserva da Biosfera da Mata Atlântica pela UNESCO (Organização das Nações Unidas para a Educação, a Ciência e a Cultura) (SOS Mata Atlântica/INPE 2009).

Atualmente cerca de 60% da população brasileira vive neste bioma (SOS Mata Atlântica/INPE 2009) e mesmo com leis e restrições ao desmatamento a taxa de perda de

floresta é alta, aproximadamente 0,25% (350km²) por ano (SOS Mata Atlântica/INPE 2008).

A Floresta com Araucária é uma importante fitofisionomia da Mata Atlântica no sul do Brasil. Seu domínio é de 25.379.316 hectares, dos quais 12,6% (3.202.134 hectares) ainda permanecem intocados (Ribeiro e cols. 2009). Do total de área original da Mata Atlântica 88,27% foi perdido, restando apenas 11,73% (Ribeiro e cols. 2009). A área remanescente está dividida em milhares de fragmentos sendo que 83,4% destes são menores do que 50 hectares e equivalem a 20,2% do total de floresta remanescente, enquanto apenas 0,03% dos fragmentos são maiores do que 10.000 hectares (Ribeiro e cols. 2009). A Floresta com Araucária ainda tem fragmentos com mais de 50.000 hectares incluindo a região do Parque Nacional de São Joaquim (Ribeiro e cols. 2009).

Do total de área remanescente da Mata Atlântica, apenas 9,3% são em áreas protegidas, o que corresponde a 1,05% da área original do bioma. No caso da Floresta com Araucária 3,1% da área remanescente está protegida, ou seja, 0,39% da área original dessa sub-região da Mata Atlântica (Ribeiro e cols. 2009).

Além do grande impacto da extração da madeira desde o início do século XX, a região da Mata com Araucária está atualmente sob profundo impacto do uso da terra devido à expansão de plantações de *Eucalyptus* (Bacha e Barros 2004, Baptista e Rudel 2006) e *Pinus*.

Das 633 espécies de animais ameaçadas de extinção no Brasil, 383 ocorrem na Mata Atlântica (SOS Mata Atlântica/INPE 2009).

Genética da Conservação

Atualmente, um grande número de espécies e populações da fauna e flora mundiais está extinto ou correndo risco de extinção em um futuro próximo. Os principais fatores de impacto são ações antrópicas, agravados pelo aumento da população humana nas últimas décadas. A necessidade de conservação da biodiversidade fez com que surgisse a biologia da conservação, uma iniciativa multidisciplinar que busca minimizar esses impactos e reduzir as taxas atuais de extinções de forma a preservar a biodiversidade (Frankham e cols. 2005).

Dentro da biologia da conservação, a genética aparece como uma importante ferramenta cujo uso vem crescendo com o desenvolvimento de diferentes marcadores moleculares, tipos de aplicação, aumento da replicabilidade e rigor estatístico.

A genética da conservação, assim como as demais disciplinas que compõe a biologia da conservação, é motivada pela necessidade de reduzir as taxas atuais de extinções e pela preservação da biodiversidade (Frankham e cols. 2005), tendo como objetivo a elaboração de estratégias conservacionistas e políticas públicas adequadas à conservação da natureza (DeSalle e Amato 2004, Vernesi e cols. 2008).

Assim, tal disciplina pode ser utilizada na resolução de muitos problemas ambientais. Uma de suas aplicações mais importantes é identificar fatores genéticos que possam levar uma população ou espécie a um estado de ameaça, analisando endogamia, tamanho efetivo populacional, variação genética e presença ou não de fluxo gênico. Desta forma, busca-se identificar padrões e processos que são relevantes para o manejo de populações ameaçadas (DeSalle e Amato 2004). É uma ferramenta especialmente útil para

o estudo com carnívoros que, devido aos seus hábitos secretivos e populações pequenas, têm poucas informações biológicas e populacionais disponíveis (Johnson e cols. 2006).

Muitas espécies consideradas ameaçadas de extinção por fatores como a fragmentação e a perda de habitat, ou a caça indiscriminada, tem suas populações diminuídas. Populações pequenas e em declínio tendem a uma maior vulnerabilidade à estocasticidade ambiental, demográfica e genética tornando-se mais susceptíveis a doenças e catástrofes ambientais, e aumentando o risco de extinção (Frankham e cols. 2005). Desta forma, tais populações são de central interesse da genética da conservação, pois estão vulneráveis à perda da variabilidade genética por endocruzamento e deriva genética (Spielman e cols. 2004, Frankham e cols. 2005).

A perda da variabilidade genética de uma espécie ou população diminui o potencial evolutivo e a viabilidade a longo prazo, aumentando o risco de extinção (Montgomery e cols. 2000, Reed e Frankham 2003, Frankham e cols. 2005, O'Grady e cols. 2008).

A deriva genética pode levar à fixação de alelos não-vantajosos em detrimento de outros vantajosos, pois sua ação independe de seleção (processo menos ativo em populações pequenas). O endocruzamento, por sua vez, leva a uma homogeneização genética da população, na qual indivíduos compartilham alelos idênticos por descendência (Frankham e cols. 2005). Os efeitos da deriva e do endocruzamento podem levar a uma depressão endogâmica na qual alelos com efeitos deletérios se acumulam na população. A depressão endogâmica é considerada uma grande ameaça para a maioria dos mamíferos com tamanhos populacionais pequenos a moderados e naturalmente não endogâmicos (O'Grady e cols. 2008) podendo causar problemas cardíacos e de fertilidade, bem como, mal-formações e alta mortalidade por doenças infecciosas (O'Brien e Evermann 1988, Roelke e cols. 1993, O'Brien 1994).

Populações pequenas ou em declínio de espécies ameaçadas de extinção têm diversidade genética menor do que espécies próximas não-ameaçadas (Spielman e cols. 2004) podendo chegar a apenas 60% da heterozigosidade e menor riqueza alélica (50%) (Frankham e cols. 2005).

Gargalo de garrafa, tamanho efetivo da população e perda do potencial evolutivo

A redução brusca e intensa do tamanho populacional é chamada de gargalo de garrafa, que leva à redução no tamanho efetivo de uma população (a quantidade de indivíduos que participam reprodutivamente de uma população) além do tamanho de censo.

A detecção de um gargalo de garrafa é de grande importância para a conservação das espécies e das populações (Frankham e cols. 1999, Frankham e cols. 2005). No entanto, muitas vezes isto é difícil por causa da ausência de dados históricos de tamanhos populacionais e variação genética. Assim, foram desenvolvidos métodos para detectar evidências de gargalo de garrafa através do uso de marcadores moleculares (Cournet e Luikart 1996, Piry e cols. 1999).

Quando uma população experimentou recentemente uma redução em seu tamanho efetivo ela desenvolve, em geral, um excesso de heterozigosidade em locos seletivamente neutros. Isto ocorre por que a diversidade alélica é reduzida mais rapidamente do que a heterozigosidade em populações que sofreram gargalo de garrafa (Allendorf 1986, Spencer e cols. 2000). Esse fenômeno é observado apenas em dado número de gerações ($0,25$ a $2,5$ vezes $2N_e$ gerações) antes que a população volte a um equilíbrio entre mutação e deriva (Cournet e Luikart 1996). Durante esse período a existência de um gargalo de garrafa pode

ser detectada utilizando-se as frequências alélicas observadas em uma população (Cournet e Luikart 1996).

A diminuição do tamanho efetivo de uma população por gargalo de garrafa pode levar a uma perda de variabilidade genética e consequente diminuição do potencial evolutivo e do *fitness* desta população (Reed e Frankham 2003). Um tamanho efetivo (N_e) de 50 indivíduos seria suficiente para diminuir o risco de depressão endogâmica em curto prazo (Soulé 1980), enquanto $N_e = 500$ seria recomendado para manter o potencial evolutivo de uma população indefinidamente, evitando assim a perda de alelos e heterozigosidade por deriva genética (Franklin 1980, Frankel e Soulé 1981).

Uma redução no N_e de uma população pode ser causada por fragmentação populacional (normalmente por perda de habitat) ou exploração indiscriminada (por exemplo, caça) e aumenta as chances de depressão endogâmica em curto prazo (Frankham e cols. 2005).

A perda da variabilidade genética está diretamente relacionada com o tamanho efetivo de uma população, e deve ser medida em gerações, não em anos (O'Grady e cols. 2008). Metade da variação genética é perdida em $1,4N_e$ gerações, sendo o processo de perda da variabilidade cumulativo ao longo das gerações (Frankham e cols. 2005). A relação entre tamanho efetivo e tamanho de censo de uma população pode ser medida por diversas taxas, Frankham (1995) gerou o índice $N_e/N=0,11$ para diferentes populações naturais de animais e Eizirik e cols. (2002) $N_e/N=0,4$ para onça-pintada.

Como a variabilidade genética é perdida em gerações, ela pode demorar a ser detectada em populações com grande tempo de geração (Kuo e Janzen 2004, Bishop e cols. 2009). Além disso, existe um intervalo de tempo entre o início do processo de endocruzamento e deriva e o aumento do risco de extinção. Dessa forma, o manejo de

populações pequenas com perda de variabilidade genética não deve ser postergado considerando que, se a população se mantém com um tamanho populacional pequeno por algumas décadas, a depressão endogâmica terá efeito substancial em sua viabilidade (O'Grady e cols. 2008).

Uma diminuição no tamanho populacional, que é mantida ao longo do tempo, é a maior causa de perda de variabilidade genética (Frankham e cols. 2005). Depois de um longo período de pequeno tamanho populacional ou de subsequentes reduções populacionais, mesmo com um aumento no número de indivíduos a variabilidade genética perdida não será retomada (Bishop e cols. 2009) sendo necessário fluxo gênico com outras populações ou mutações ao longo de diversas gerações.

A intensa e prolongada mortalidade causada pela exploração humana inevitavelmente acarreta mudanças genéticas (Allendorf e cols. 2008). Tal fato pode ser observado em diversas espécies cujas populações sofreram gargalo de garrafa devido a caça indiscriminada (por exemplo: elefante-marinho, Bonnell e Selander 1974, lontra marinha, Larson e cols. 2002, leões-baios, Culver e cols. 2008, crocodilos, Bishop e cols. 2009). A caça também é responsável pelo declínio populacional de espécies de mamíferos de médio e grande porte na Mata Atlântica do Brasil e Argentina (Cullen e cols. 2000, Paviolo e cols. 2008, 2009).

Marcadores moleculares e seu uso para a conservação da natureza

Existem diversos tipos de marcadores moleculares que vem sendo empregados na genética da conservação, alguns são caracterizados a seguir.

Microsatélites

Os microsatélites estão incluídos dentro das sequências de DNA nuclear denominadas de SSRs *Simple Sequence Repeats* (Kashi e cols. 1997) ou VNTRs *Variable Number of Tandem Repeats* (Murray 1996). São sequências altamente repetitivas dispersas pelo genoma de eucariotos, formadas por repetições em tandem de 1 a 6 pares de bases, e formam conjuntos de cinco até centenas de repetições por loco, podendo variar em tamanho e possuem um caráter altamente polimórfico (Tautz 1993).

São geralmente seletivamente neutros, o que possibilita a manutenção de sua alta variabilidade e os torna compatíveis com vários pressupostos usualmente utilizados em genética de populações (Murray 1996). Outra característica marcante é a codominância, que permite determinar se os indivíduos são homozigotos ou heterozigotos para cada loco.

Não há um modelo definitivo que explique o processo de mutação dos microsatélite, porém, existem dois modelos extremos de uma série de modelos possíveis: *infinite allele model* (I.A.M.), que assume que cada mutação produz um novo alelo (Kimura e Crow 1964), e *stepwise mutation model* (S.M.M.), que assume que as mutações mudam o estado de um alelo um passo a frente ou um passo atrás com igual probabilidade (Ohta e Kimura 1973). Um modelo intermediário é *two-phase model* (T.P.M.) que assume que a maioria das mutações resulta em um aumento ou um decréscimo de uma unidade repetitiva embora mudanças maiores também possam ocorrer. Este parece ser o modelo que melhor explica o processo mutacional para microsatélites (Di Rienzo e cols. 1994, Piry e cols. 1999).

É cada vez maior a utilização de microsatélites em estudos em diversas áreas da genética da conservação, tais como: a identificação de indivíduos ou espécies (Woods e

cols. 1999, Ernest e cols. 2000), comparação da variabilidade genética entre espécies e populações (Menotti-Raymond e O'Brien 1995, Johnson e cols. 1999, Culver e cols. 2001, Moreno e cols. 2006, Grisolia e cols. 2007), determinação de parentesco e estrutura social (Morin e cols. 1994, Blouin e cols. 1996, Marshal e cols. 1998, Nesje e cols. 2000, Garcia e cols. 2002, Sherman e cols. 2004, Castilho e cols. *in press*), estudos em zonas de hibridação (Moulin e cols. 1996, Beaumont e cols. 2001, Castilho 2004 Gava e Freitas 2004, Trigo e cols. 2008, Trigo 2008), grau de estrutura das populações e dispersão (Ciofi e Bruford 1999, Paetkau e cols. 1999, Waits e cols. 2000, Walter e cols. 2001, Ernest e cols. 2003, McRae e cols. 2005, Dalén e cols. 2006, Hájková e cols. 2007, Ohnishi e cols. 2007, Haag e cols. 2010, Castilho e cols. *in press*), censo e tamanho efetivo da população (Kohn e cols. 1998, Frantz e cols. 2004, Bellemain e cols. 2005, Castilho e cols. *in press*), identificação de presas e predador (Ernest e cols. 2002), filogeografia (Culver e cols. 2000, Eizirik e cols. 2001, Tchaicka e cols. 2007) e genética da paisagem (McRae e Beier 2007, Lee-Yaw e cols. 2009, Pease e cols. 2009).

Alguns *primers* para locos de microssatélites podem ser aplicados em várias espécies – não apenas para as quais foram desenvolvidos – sendo caracterizados como *primers* heterologos. Por exemplo, *primers* descritos para o gato-doméstico (*Felis catus*) (Menotti-Raymond e cols. 1999, 2005) são amplamente utilizados em estudos com outras espécies de felinos (Culver e cols. 2000, Ernest e cols. 2000, Walker e cols. 2000, Eizirik e cols. 2001, Sinclair e cols. 2001, Ernest e cols. 2002, 2003, Anderson e cols. 2004, McRae e cols. 2005, Moreno e cols. 2006, Miotto e cols. 2007, Eizirik e cols. 2008, Trigo e cols. 2008, Haag 2009, Ruiz-Garcia e cols. 2009). Apesar dessa prática facilitar a comparação de dados entre espécies (Moreno e cols. 2006, Grisolia e cols. 2007, Trigo e cols. 2008), Garner e cols. (2005) observaram que a heterozigosidade e o número médio de alelos por

loco calculados usando primers heterologos é significativamente menor do que os valores obtidos usando primers espécie-específicos.

Íntrons do cromossomo Y

Outros marcadores amplamente utilizados são aqueles ligados ao sexo, tais como *íntrons* e microssatélites do cromossomo Y.

Marcadores para espécies de mamíferos não-humanos são escassos e, em sua maioria, não são polimórficos o suficiente para acessar variação entre populações de uma mesma espécie (Luo e cols. 2007). Eles têm sido mais utilizados para investigar hipóteses interspecíficas, como a filogenia dos felinos sob uma perspectiva patrilinear (Pecon-Slatery e O'Brien 1998, Pecon-Slatery e cols. 2000, Pecon-Slatery e cols. 2004), em estudos de hibridação e introgressão em pequenos felinos neotropicais (Trigo 2008). Estes marcadores foram também utilizados para estudar os padrões filogeográficos de espécies com ampla distribuição geográfica, tal como o leão-baio (*P. concolor*) (Culver e cols. 2000).

Luo e cols. (2007) desenvolveram *primers* para regiões do cromossomo Y para sete espécies de felinos (gato doméstico e outras seis espécies silvestres), nos quais encontraram quatro *íntrons* e um microssatélite polimórficos intra e interespecificamente. O que torna esses marcadores opções viáveis para estudos populacionais e de parentesco.

Outro importante uso desses marcadores moleculares é a possibilidade de identificação do sexo dos indivíduos amostrados em determinados tipos de amostra. Pele, fezes ou pelos são exemplos que não permitem a identificação direta pelo coletor.

Genética da Paisagem

A genética da paisagem é uma área emergente da genética da conservação que combina métodos e conceitos da genética de populações, ecologia da paisagem e estatística espacial (Manel e cols. 2003, DeSalle e Amato 2004, Holderegger e Wagner 2006, Balkenhol e cols. 2009). O objetivo desta disciplina é entender como a composição e configuração da paisagem influenciam o fluxo gênico, a estrutura populacional e a forma de adaptação local, determinando padrões espaciais de uma população ou espécie e ajudando a entender quais processos levaram à criação de tais padrões (Manel e cols. 2003, Storfer e cols. 2007). Um dos principais objetivos da genética da paisagem é inferir o grau em que a paisagem pode afetar o movimento dos organismos (conectividade da paisagem) através da relação de fluxo gênico e padrões da estrutura da paisagem (Holderegger e Wagner 2008).

A análise da paisagem pode ser feita de diversas formas, por exemplo, através da análise de variáveis múltiplas tais como a quantidade de área de campo ou florestada, a densidade de estradas, topografia, corpos d'água entre outras, quantificadas em um sistema de informação geográfica (GIS) (Holderegger e Walter 2008). Outra abordagem é a determinação do caminho menos custoso (*least-cost path-LCP*) na qual se inferem diferentes pesos de resistência espécie-específicos (que quantificam o quanto a paisagem é permeável para uma espécie em particular) para diferentes características da paisagem da área de interesse (Holderegger e Walter 2008). LaRue e Nielsen (2008) utilizaram o método do caminho menos custoso para determinar possíveis populações fonte de leões-baios para a região do meio-oeste norte americano recentemente recolonizada pela espécie. A paisagem foi categorizada com pesos de resistência específicos para a espécie onde

cobertura vegetal e a densidade humana foram as características que mais influenciaram o uso da paisagem por leões-baios (LaRue 2007, LaRue e Nielsen 2008).

Um método ainda mais recente é o isolamento por resistência (*isolation-by-resistance-IBR*) que demonstrou oferecer uma alternativa mais realista de possíveis padrões de fluxo gênico em uma paisagem do que outros métodos, pois considera múltiplos caminhos possíveis ao invés de apenas um caminho ótimo (McRae e Beier 2007). O isolamento pela resistência se baseia na teoria de resistência de circuitos elétricos para determinar a conectividade de uma paisagem para uma certa espécie (McRae 2006, McRae e Beier 2007, McRae e cols. 2008).

A genética da paisagem pode ser explorada para testar hipóteses de descontinuidades genéticas, identificar áreas prioritárias para conservação (Manel e cols. 2003), identificar possíveis áreas fonte de migrantes (LaRue e cols. 2007) e também determinar áreas de interesse para futuras pesquisas e ações de conservação.

Conhecer a influencia da paisagem no fluxo gênico e no deslocamento de carnívoros é de central interesse na conservação das espécies visto que são espécies que necessitam geralmente de grandes áreas de vida, que se encontram ameaçadas por caça ou conflito por depredação de animais domésticos e por perda de habitat e, se isoladas de outras populações, sofrem perda de variabilidade genética, podendo chegar a ser extintas localmente.

OBJETIVOS

Os objetivos desta tese são:

1. Investigar a variabilidade genética, a existência de gargalo de garrafa e a estruturação na população de leões-baios do sul do Brasil.
2. Determinar a permeabilidade da paisagem à espécie e sua relação com a existência de estruturação genética da população e o fluxo gênico entre indivíduos.
3. Observar relações de parentesco entre indivíduos e suas implicações no uso de territórios.
4. Determinar as principais ameaças enfrentadas pela espécie na área de estudo.
5. Sugerir ações prioritárias para a conservação do leão-baio no sul do Brasil com base nos resultados obtidos.

CAPÍTULO I

Habitat Loss and Evidence of a Bottleneck in Mountain Lions in Southern Brazil

CASTILHO C.S.^{1,2}, MARINS-SÁ L.G.¹, BENEDET R.C.³, FREITAS T.R.O.²

¹ Instituto Serrano de Conservação da Natureza, ISCN, Projeto Leão Baio, cx postal 33, Urubici, 88650-000, Santa Catarina, Brazil (Phone: +55 49 3278-5696, E-mail: cscastilho@hotmail.com)

² Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Projeto Puma, Lages, Santa Catarina, Brazil

Artigo submetido à revista *Journal of Zoology*

1 **Running title:** Bottleneck in Mountain Lions in Brazil

2

3 **Habitat Loss and Evidence of a Bottleneck in Mountain Lions in Southern Brazil**

4

5 Castilho C.S.*, Marins-Sá L.G., Benedet R.C., Freitas T.R.O.

6

7 *Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cx postal 15053,*

8 *CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil (CSC, TROF)*

9 *Instituto Serrano de Conservação da Natureza, cx postal 33, CEP 88650-000, Urubici, SC,*

10 *Brazil (CSC, LGMS)*

11 *Projeto Puma, CEP 88504-302, Lages, SC, Brazil (RCB)*

12 **Corresponding author: cscastilho@hotmail.com*

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24 **Abstract**

25 The Atlantic Forest in Brazil is one of the most endangered ecosystems in the world and
26 one of the most important world hotspots for biodiversity. It has been intensively logged
27 and the original area has been reduced to about 12% of its original size. Little is known
28 about the effect of this severe habitat loss on animal populations in this area. In this work
29 we investigated the existence of a recent bottleneck as a possible effect of severe loss of
30 habitat and also the genetic variability of the population in southern Brazil, using 18
31 microsatellite loci. A total of 106 alleles were identified, and the number of alleles/locus
32 ranged from 2 to 11. The mean observed heterozygosity, mean number of alleles, allelic
33 richness, and polymorphism information content were 0.609, 5.89, 5.652, and 0.6255
34 respectively. This population showed evidence of a recent bottleneck, and the estimated
35 effective population size was 16.5 and 23.54 using different algorithms. In southern Brazil,
36 poaching still occurs and may be increasing the extinction risk, as inferred from the recent
37 bottleneck and loss of genetic diversity.

38

39 **Keywords** Araucaria Forest; Atlantic Forest; conservation; genetic diversity;
40 microsatellite.

41

42 **Introduction**

43 The Atlantic Forest in Brazil is one of the most endangered ecosystems in the world and
44 one of the four most important world hotspots for biodiversity (Myers et al. 2000). This
45 biome has suffered from intense human exploitation and deforestation (Ribeiro et al.
46 2009). The Araucaria Forest, one of the Atlantic Forest physiognomies in southern Brazil,
47 has been heavily logged since the early 1900s. The Atlantic Forest is now legally protected

48 in Brazil (Federal law 285/99, Feb 2006). However, illegal exploitation continues and only
49 11.26 % of the Atlantic Forest and 12.6 % of the Araucaria Forest (Ribeiro et al. 2009)
50 remain of the original area. Of this small remnant, only 0.39 % of the Araucaria Forest lies
51 within some kind of legally protected area (Ribeiro et al. 2009).

52 Although almost 90% of the habitat was lost in less than 100 years, little is known
53 about the effect of this fragmentation on animal populations. There are no population
54 estimates made prior to the deforestation, and even today such estimates are lacking for
55 most Brazilian mammals. Mountain lion (*Puma concolor*) is a top predator, with their
56 presence influencing the ecosystem and prey populations. Therefore their conservation
57 became even more important to this ecosystem (Henke and Bryant 1999, Miller et al. 2001,
58 Terborgh et al. 2001).

59 The mountain lion *Puma concolor*, the second-largest Neotropical felid, occupies
60 the largest geographical area in the Americas, ranging from Canada to southern Argentina.
61 The subspecies that occurs in southern Brazil is *Puma concolor capricornensis* (Culver et
62 al. 2000). It is listed as of “Least Concern” (IUCN 2008). It is also listed in the Brazilian
63 National Red List as threatened, in the vulnerable category (MMA and Fundação
64 Biodiversitas 2008). Little is known about the mountain lion population in Brazil.
65 Although in southern Brazil this species has suffered severe habitat loss, there is no
66 information about population sizes and only scarce recent information.

67 In addition to the severe habitat loss, the species still suffers persecution due to
68 livestock depredation (Mazzolli et al. 2002, Marins-Sá 2005). In southern Brazil, livestock
69 depredation by mountain lions has been reported since the 1990s (Mazzolli et al. 2002).
70 The losses were much lower when the ranchers implemented management actions such as
71 corralling small animals (sheep and goats) at night (Mazzolli et al. 2002).

72 Previous studies have described the genetic variability, structure, and ecological
73 characteristics of mountain lions in North America (Sinclair et al. 2001, Ernest et al. 2003;
74 Anderson et al. 2004, McRae et al. 2005,) and South American (Culver et al. 2000,
75 Moreno et al. 2006, Miotto et al. 2007, Ruiz-Garcia et al. 2009). However, specific
76 information about the genetic variability status regarding recent process affecting mountain
77 lions, especially in a highly important ecosystem in Brazil, is still lacking.

78 Knowledge of possible recent bottlenecks is extremely important for present
79 management strategies. Identification of the existence of a recent bottleneck, evidence of
80 loss of genetic diversity, and genetic structure is important to evaluate the extinction risk
81 for a population (Montgomery et al. 2000, Reed and Frankham 2003, Frankham et al.
82 2005, O'Grady et al. 2006).

83 Thus, the aim of this study was to evaluate the genetic variation and structure
84 within mountain lion individuals in southern Brazil and to identify the existence of recent
85 bottleneck related to severe habitat loss and poaching. Our results contribute to the
86 conservation and management of this endangered species, as well as its ecosystem.

87

88 **Material and methods**

89 **Sample collection and laboratory procedures**

90 We collected 63 samples from the mountain lion (*Puma concolor* Linnaeus, 1771)
91 population in southern Brazil, 37 (58.7%) collected from the field, and 26 from museum
92 skins and skulls (41.3%). The samples were caught in the southern Brazilian states of Rio
93 Grande do Sul, Santa Catarina, and Paraná, and from the years 1983 through 2007.
94 Location, year, and cause of death/capture were recorded. All sample locations were
95 recorded (coordinates registered in museum samples and death/capture location in field

96 samples using GPS) and mapped using TrackMaker (Fig. 1). Genomic DNA was extracted
97 using the CTAB protocol (Doyle and Doyle 1987) for tissue samples, and phenol-
98 chloroform (Sambrook et al. 1989) for blood samples.

99 A total of 18 loci, four originally designated in *Felis catus* (Menotti-Raymond
100 1999) and 14 in *Puma concolor* (Kurushima et al. 2006, Rodzen et al. 2007), were
101 amplified to analyze the genetic variability of the wild mountain lion population in
102 southern Brazil. Each microsatellite locus was amplified individually in PCR reactions
103 performed as described by Castilho et al (in press). Allele sizes were determined by
104 separating the amplification products on a 6 percent polyacrylamide gel using a 25 bp
105 marker. We used the intron DBY-7 (Luo et al. 2007) for sex determination, under the same
106 PCR conditions as the microsatellites. Samples were genotyped at least twice for validated
107 allele scores.

108

109 **Data Analysis**

110 Genetic polymorphism was estimated as the number of alleles per locus (A),
111 observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E), polymorphic information
112 content (PIC), and allelic frequencies, using the program CERVUS 3.0.3 (Marshall et al.
113 1998). GENEPOP 3.3 (Raymond and Rousset 1995) was used to test linkage
114 disequilibrium (LD), and ARLEQUIN 3.1 to test the genotypic distribution for
115 conformance with the Hardy-Weinberg equilibrium (HWE).

116 Significance levels ($\alpha=0.05$) were corrected for multiple simultaneous comparisons
117 with the Bonferroni approach (Rice, 1989) to infer LD and departures from HWE. The
118 probability of the presence of null alleles, allele dropout, and scoring errors due to stutter
119 was tested using MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004). Allelic richness (A_R)

120 and inbreeding coefficient (F_{IS}) were calculated with the program FSTAT 2.9.3.2 (Goudet
121 2001).

122 To detect any genetic evidence of a population decline, we used the program
123 BOTTLENECK (Cornuet and Luikart 1996) through the infinite allele model (I.A.M.),
124 stepwise mutation model (S.M.M.), and two-phase model (T.P.M.) with 70 percent and 95
125 percent S.M.M., 20 percent variance, and 1,000 iterations as recommended by the authors
126 (Piry et al. 1999). The Wilcoxon sign-rank test was applied to determine the significance
127 ($P \leq 0.05$). To assess whether the small sample size ($n = 37$) was masking the results, we
128 used HYBRIDLAB 1.0 (Nielsen et al. 2006) to simulate a population with 500 individuals,
129 using $n=37$ as a base population, and ran BOTTLENECK with the same parameters
130 described above.

131 To infer the existence of population structure, we used a principal components
132 analysis (PCA), with the software PCAGEN
133 (<http://www.unil.ch/izea/software/pcagen.html>), respectively. GENECLASS 2 (Piry et al.
134 2004) was performed to infer assignment or exclusion of individuals, assuming that all the
135 sampled individuals belonged to the same population. To estimate the effective population
136 size (N_e) using genotypic data, we used the program LDNe 1.31 (Waples 2006) and
137 ONESAMP1.1 (Tallmon et al. 2008), using prior information about the upper ($N_e = 200$)
138 and lower ($N_e = 2$) effective population size.

139 We also calculated the probability of loss in one generation of alleles with
140 frequencies from 0.01 to 0.10, using $\Pr(A) = (1-p)^{2N}$ where p is the allele frequency
141 (Frankham et al. 2005) and considering N as calculated by LDNe. We also calculated the
142 loss of genetic variation in one generation using the equation $H_e = 1 - 1/(2N_e)^t$ where H_e is

143 the level of heterozygosity, N_e is the effective population size, and t is the number of
144 generations (Lowe et al. 2004).

145

146 **Results**

147 DNA extraction was successful for 37 individuals, $n= 28$ of the field samples (obtained
148 from poachers $n=25$, road kills $n=01$, and captured animals $n=02$) and $n= 09$ of the
149 museum samples. We failed to extract DNA from some field samples that contained excess
150 fat. Sixteen males and 21 females were successfully sexed using the intron DBY-7 from
151 the Y chromosome.

152 A total of 106 alleles were identified for the 18 microsatellite loci in the 37 samples
153 (Table 1). The number of alleles/locus ranged from 2 (PcoB115) to 11 (PcoB203w), with a
154 mean of 5.89 alleles/locus. The mean observed heterozygosity (H_o) was 0.609 (ranging
155 from 0.027 to 0.806), and the mean expected heterozygosity (H_E) was 0.6818 (ranging
156 from 0.027 to 0.850) (Table 1). Polymorphism information content (PIC) values for 16 of
157 the 18 loci used were higher than 0.5. Only Fca453 and Pco115 had PIC values of 0.463
158 and 0.026 respectively, and the mean PIC for all loci was 0.6255 (Table 1).

159 Tests showed that no loci were in linkage disequilibrium, and Hardy-Weinberg
160 equilibrium tests revealed that three loci (Fca391, Fca 424, Pco 210) deviated from the
161 expected ($P>0.05$ after Bonferroni correction) (Table 1). We calculated F_{IS} values to test if
162 inbreeding was responsible for deviations from HWE. The F_{IS} values ranged from -0.30 to
163 0.42 (mean $F_{IS} = 0.10$). The global F_{IS} and seven samples had significant values (Table 1).
164 The F_{IS} value for the sample Fca453 indicated heterozygote excess, whereas all the others
165 indicated heterozygote deficit. The MicroChecker results indicated that loci Fca 391 and
166 Fca 424 probably have null alleles.

167 Allelic frequencies varied from 0.013 to 0.986, with 17 percent of all alleles with an
168 allelic frequency of 0.01, and 34 percent and 46.2 percent of all alleles with a frequency
169 lower than 0.05 and 0.10 respectively. One allele had an allelic frequency of 0.98, and was
170 almost fixed in this population (locus Pco115). Seven alleles (6.6% of all alleles) appeared
171 only in samples dating from 1983 to 1995, and were missing from the more recent
172 samples.

173 Analyses by means of the software PCAGEN ($P > 0.05$, data not shown) did not
174 detect a population genetic structure in these mountain lion samples. The results from
175 GENECLASS corroborated this information by indicating that all individuals came from
176 the same population source ($P > 0.05$).

177 We found evidence of a recent bottleneck in this population based on the Wilcoxon
178 sign-rank test, using the infinite allele model (I.A.M.) and two-phase model (T.P.M.) with
179 the 70 percent stepwise mutation model (S.M.M.). No evidence of a recent bottleneck was
180 found with 95 percent S.M.M. ($P > 0.05$) or the stepwise mutation model (S.M.M.) for $n=37$
181 (Table 4). When we evaluated the existence of a bottleneck using $n=500$ simulated
182 genotypes, we observed evidence of a recent bottleneck for I.A.M. and T.P.M. with 70
183 percent and 95 percent of S.M.M. (Table 4).

184 We estimated that the effective population size (N_e) using LDNe ($P_{crit} = 0.05$) was
185 $N_e = 16.5$ for this population. ONESAMP estimated the mean $N_e = 23.54$ (confidence
186 limits 95% = 20.74 – 31.5). Although different software estimates different N_e , both results
187 indicated a low N_e for this population.

188 The probabilities of loss in the next generation of alleles with frequencies from 0.01
189 to 0.10, considering $N = 16.5$ as calculated by LDNe, were 0.72 for alleles with a frequency

190 of 0.01 (17%), and 0.51, 0.37, 0.26, 0.18, and 0.03 for alleles with allelic frequencies of
191 0.02 (3.8%), 0.03 (7.5%), 0.04 (5.7%), 0.05 (1.9%), and 0.10 (2.82%) respectively (Fig. 2).

192 There was a high percentage of alleles with allelic frequency of 0.01 (17%), lower
193 than 0.05 (32.1%) and 0.10 (46.2%), and these may be at risk of loss in the next
194 generations. The probability of losing alleles with frequency 0.01 (17%) is 0.72 for the
195 next generation. It is possible that 6.6 percent of all alleles have already been lost, since
196 they appeared only in samples dating from 1983 through 1995 and not in the more recent
197 samples. Using the equation $H_e = 1 - 1/(2N_e)^t$, we calculated that in one generation an
198 effective population size of 16.5 individuals loses 0.03 percent of the variation present in
199 the initial population.

200 The cause of death was recorded for the field samples (71.4% and 81.25% of all
201 females and males respectively). The principal cause of death was directly by farmers'
202 retaliatory hunting due to livestock depredation (74% of all deaths, and 92.8% and 53.8%
203 of the female and male deaths respectively). Human causes were responsible for 92.86 %
204 of all deaths/captures (100% and 84.6% of females and males respectively). Road kills
205 were responsible for 7.2 % and 7.7 % of female and male deaths. Only males were
206 captured (23.2%), and deaths in this group were from disease (15.4%).

207

208 **Discussion**

209 We did not find genetic structure in our study area. This corroborates data obtained by
210 Castilho et al. (in press) and may be a result of the long distances that mountain lions can
211 travel (Sweanor et al. 2000, Logan and Sweanor 2001), even through discontinuous
212 habitats (Logan and Sweanor 2001, Castilho et al. in press). Ruiz-Garcia et al. (2009)

213 found genetic similarity between individuals from the Bolivian Andes and samples from
214 Colombia, Peru, Ecuador, Venezuela, and the western Brazilian Amazon.

215 Severe habitat loss is one of the major causes of genetic loss and extinction risk in
216 animals in general and carnivore populations in particular (Nowell and Jackson 1996).
217 Bottlenecks caused by habitat loss are recorded for several species (Hoelzel 1999, Kuo and
218 Janzen 2004, Culver et al. 2008), and allways indicate a need for attention to the
219 population that suffered the reduction in population size, because of the increased
220 extinction risk of a population or species (Montgomery et al. 2000, Reed and Frankham
221 2003, Frankham et al. 2005, O'Grady et al. 2006).

222 Evidence of a recent bottleneck was found in the southern Brazil population. The
223 excess of heterozygosity observed when a population has suffered a recent bottleneck can
224 be detected during 0.25 to $2.5 \times 2 N_e$ generations (41 to 412 years for *P. concolor*), and
225 after that the allelic frequencies again reach equilibrium. The bottleneck that we detected
226 may have started when massive deforestation occurred in the Araucaria Forest in southern
227 Brazil, starting in earlies 1900's deforestation cause loss of almost 90% of original
228 vegetation cover. In that period, in addition to the extensive loss of habitat, many loggers
229 hunted mountain lions and their prey species for food or protection. Severe population
230 decrease caused by human actions will cause genetic loss (Allendorf et al. 2008), and
231 poaching is responsible for bottlenecks and consequent loss of genetic diversity in several
232 animal species (Bonnell and Selander 1974, Larson et al. 2002, Culver et al. 2008, Bishop
233 et al. 2009). Illegal hunting of mountain lions and prey species has continued up to the
234 present (Mazzolli et al. 2002).

235 Molecular markers show that North American mountain lions comprise a large
236 panmictic population and have reduced genetic variation relative to South American

237 mountain lions (Culver et al. 2000). Most likely, modern North American mountain lions
238 descended from a founder event involving a small number of individuals who migrated out
239 of South America approximately 10,000 years ago (Culver et al. 2000). Therefore, we
240 expected to find a higher genetic diversity in southern Brazil when compared with North
241 American studies. However, when we compared our data with the genetic diversity found
242 for the *Puma concolor* with North American mountain lions samples (Kurushima et al.
243 2006, Rodzen et al. 2007) (Table 3) we found that the observed mean number of
244 alleles/locus and the expected heterozygosity estimated in our study were lower than found
245 for North American mountain lions using the same species-specific primers (n=243
246 individuals from California and Nevada, and n= 23-25 individuals from California)
247 (Kurushima et al. 2006, Rodzen et al. 2007).

248 Also, individuals from southern Brazil show lower diversity than has been found
249 for previously analyzed South American mountain lion populations (Table 2). Although we
250 to cannot directly compare our results to other studies in South America since all studies
251 used different sets of microsatellites, we used species-specific primers and expected a
252 higher heterozygosity because of this. The individuals from southern Brazil showed lower
253 diversity than indicated for previously analyzed South-American mountain lions. The
254 mean number of alleles/locus was lower in the southern Brazil samples compared to other
255 South American individuals, except when compared with São Paulo and Bolivian samples,
256 and the mean heterozygosity was also lower for southern Brazil except when compared
257 with Bolivian samples, this may be caused by the small numbers of samples used in these
258 studies (9 and 8 individuals respectively) (Miotto et al. 2007, Ruiz-Garcia et al. 2009).
259 Because these studies used microsatellite loci designed for *Felis catus* and ours used
260 species-specific loci,

261 Seven loci showed evidence of inbreeding, and also the global value for this
262 population. This indicates the presence of inbreeding, and that this population may be in
263 the process of losing its genetic variability. Also, both the estimates of effective population
264 sizes were lower than $N_e \geq 50$, the number necessary to reduce the loss of genetic diversity
265 by inbreeding (Soulé 1980), and $N_e \geq 500$, the number necessary to prevent long-term loss
266 of variability by genetic drift (Franklin 1980, Frankel and Soulé 1981).

267 The loss of genetic diversity increases with inbreeding and low N_e , and can lead to
268 reduced adaptive potential and increased inbreeding depression, with vulnerability to
269 environmental, demographic, and stochastic variation, and consequently increases the
270 probability of extinction (Reed and Frankham 2003, Spielman et al. 2004, Frankham et al.
271 2005). Inbreeding may affect both individual and population performance (Keller and
272 Waller 2002).

273

274 **Conserving Brazilian mountain lions**

275 Carnivores have great influence in ecosystems and the maintenance of their ecological
276 processes (Henke and Bryant 1999, Miller et al. 2001, Terborgh et al. 2001, Ray et al.
277 2005). Environments where mountain lions have disappeared due to human presence show
278 decreasing biodiversity (Ripple and Beschta 2006). Carnivores generally have secretive
279 and nocturnal habits, small populations, and are mostly endangered. These characteristics
280 make it difficult to study them, but increase the need for more information, making
281 conservation genetics an essential tool for their study. Little is known about mountain lion
282 genetic variability in southern Brazil, which is crucial information for understanding this
283 population's evolutionary potential and determining the best strategy for their conservation
284 and management.

285 Poaching, human exploitation, and legal hunting are the major causes of death of
286 carnivores, especially from human persecution due to financial losses (Nowell and Jackson
287 1996). Although hunting wildlife is illegal in Brazil, it still occurs in many areas including
288 the southern part of the country. In our samples, human actions were responsible for 92.86
289 percent of all deaths/captures (100% and 84.6% of females and males respectively), and 74
290 percent of all deaths were caused by poaching, although this high percentage may be
291 observed due to our sampling method we believe that still indicates that this is an
292 important impact in the area. Weaver et al. (1996) found that 75 percent of all mountain
293 lion deaths in North America were caused by persecution by humans, and Morrison and
294 Boyce (2009) found that 50 percent of all deaths were caused by human actions. Poaching
295 also caused mammal population decreases in the Atlantic Forest (Cullen et al. 2000,
296 Paviolo et al. 2008, 2009). Decrease in population size may cause loss of genetic diversity
297 and increase the risk of extinction (Hoelzel 1999, Dalén et al. 2006, Hájková et al. 2007,
298 Culver et al. 2008).

299 The population studied did not appear to be structured or geographically isolated.
300 However, this population appears to have suffered a recent bottleneck and has a high
301 probability of losing its genetic diversity due to reduced effective population size and
302 inbreeding in the next generations. Also it is still subject to poaching and persecution by
303 farmers' retaliatory hunting. A bottleneck causes loss of low-frequency alleles and
304 consequent loss of genetic diversity through inbreeding and genetic drift (Allendorf and
305 Luikart 2007), making the population more susceptible to inbreeding depression effects
306 such as reproductive and cardiac problems and epidemic diseases (O'Brien and Evermann
307 1988, Roelke et al. 1993).

308 Many populations of many mammal species may be entering an extinction vortex.
309 Conservation efforts may focus on the population instead of the species level (Garner et al.
310 2005), since extinction rates for populations are estimated to be three to eight times higher
311 than for species (Hughes et al. 1997). For *P. concolor*, a species that has a geographically
312 diverse environment, different subspecies (Culver et al. 2000), different genetic diversity
313 across its range, and different intensity of threats, the best conservation strategy may be to
314 develop regional conservation plans.

315 The genetic data obtained in this study suggest that the remaining forest and
316 regional landscape appear to allow the mountain lions to disperse, because individuals
317 distributed over the entire study area share genetic similarities. Therefore, mountain lion
318 conservation efforts in southern Brazil should be directed toward mitigating human versus
319 predator conflict due to livestock depredation, because this appears to be an important
320 cause of mountain lion deaths in this area today. Because this population has suffered a
321 recent bottleneck, shows low effective population size and a decrease of genetic diversity,
322 poaching will increase the extinction risk of this population. Mazzolli et al. (2002),
323 studying the causes of mountain lion depredation in southern Brazil, observed that ranches
324 without management plans lost as much as 78 percent of the goats and 84 percent of the
325 sheep, and that losses were substantially reduced if the herds were corralled at night. The
326 authors observed that mountain lions often killed several free-ranging sheep and/or goats in
327 a single attack, but would take only a single animal from a corral. These results indicated
328 that ranchers that have management plans for their livestock suffer few or no losses to
329 mountain lions, suggesting that decreasing the conflict is possible with ranchers'
330 cooperation.

331 Educational programs should be intensified, since the local population has the
332 erroneous idea that the Brazilian national environmental agency (IBAMA) releases
333 individual mountain lions in the area and that they should not be there. Also, a genetic
334 monitoring program should be implemented for surveying this population and monitoring
335 the fluctuation of genetic variability, since there are indications of imminent loss of genetic
336 variability in the next generations.

337 **Acknowledgements**

338 The authors thank the LAMAQ/UFSC and Capão da Imbuia museums, M. Mazzolli, P. W.
339 V. Castilho, M. Graipel, S. Althoff, A. Fillippini, M. M. Mendonça, I. Croda, W. Veronezi,
340 C. Silveira, T. C. Margarido, R. Von Hohendorff, M. E. Saito, landowners, and partners of
341 the project for help in sample collection. We also thank the staffs of the São Joaquim
342 National Park/ICMBio and the Instituto Serrano de Conservação da Natureza-ISCN for
343 technical and logistical support. We are grateful to Martha T. B. Wallauer and Jordan P.
344 Wallauer for technical assistance. Also to P. Estrela, G. L. Gonçalves, C. M. Lopes, R.
345 Hoelzel, and anonymous reviewers for suggestions on earlier versions of this manuscript.
346 This research was financially supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and
347 the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). Thanks to Janet
348 W. Reid for assistance with the English text.

349

350 **References**

351 Allendorf, F.W. & Luikart, G. (2007) Conservation and the genetics of populations.
352 Blackwell Publishing, Oxford 642pp.

353 Allendorf, F.W., England, P.R., Luikart, G., Ritchie, P.A, & Ryman, N. (2008) Genetic
354 effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Biology and Evolution*, 23,
355 327-337.

356 Anderson, C.R., Lindzey, F.G. & McDonald, D.B. (2004) Genetic structure of cougar
357 populations across the Wyoming Basin: metapopulation or megapopulation. *Journal of*
358 *Mammalogy*, 85, 1207-1214.

359 Bishop. J.M., Leslie, A.J., Bourquin, S.L. & O’Ryan, C. (2009) Reduced effective
360 population size in na overexploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus*
361 *niloticus*). *Biological Conservation*, 142, 2335-2341.

362 Bonnell, M.L. & Selander, R.K. (1974) Elephant Seals: genetic variation and near
363 extinction. *Science*, 184, 908-909.

364 Castilho CS, Marins-Sá LG, Benedet RC, Freitas TRO (*in press*) Landscape genetics of
365 mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. *Mammalian Biology*.
366 doi:10.1016/j.mambio.2010.08.002

367 Cornuet, J.M. & Luikart, G. (1996) Description and power analysis of two tests for
368 detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144,
369 2001-2014.

370 Cullen, L., Bodmer, R.E. & Valladares-Padua, C. (2000) Effects of hunting in habitat
371 fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biological Conservation*, 95, 49–56.

372 Culver, M., Johnson, W. E., Pecon-Slattery, J. & O’Brien, S.J. (2000) Genomic ancestry of
373 the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity*, 91, 186–197.

374 Culver, M., Hedrick, P.W., Murphy, K., O’Brien, S. & Hornocker, M. G. (2008)
375 Estimation of the bottleneck size in Florida panthers. *Animal Conservation*, 11, 104-
376 110.

377 Dalén, L., Kvaloy, K., Linnell, J.D.C., Elmhagen, B., Strand, O., Tannerfeldt, M.,
378 Henttonen, H., Fuglei, E., Landa, A. & Angerbjörn, A. (2006) Population structure in a
379 critically endangered arctic fox population: does genetics matter? *Molecular Ecology*,
380 15, 2809-2819.

381 Doyle, J.J. & Doyle, J.L. (1987) A rapid isolation procedure for small quantities of fresh
382 leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 9, 11-15.

383 Ernest, H.B., Boyce, W.M., Bleich, V.C., May, B.P., Stiver, S.J. & Torres, S.G. (2003)
384 Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California.
385 *Conservation Genetics*, 4, 353–366.

386 Frankel, O.H. & Soulé, M.E. (1981) *Conservation and Evolution*. Cambridge University
387 Press.

388 Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D. (2005) *Introduction to conservation genetics*.
389 Cambridge University Press 617pp.

390 Franklin, I.R. (1980) Evolutionary change in small populations. In Soulé ME, Wilcox BA
391 eds *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sunderland,
392 Massachusetts: Sinauer.

393 Garner, A., Rachlow, J.L. & Hicks, J.F. (2005) Patterns of genetic diversity and its loss in
394 mammalian populations. *Conservation Biology*, 19, 1215-1221.

395 Goudet. J. (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation
396 indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.
397 Updated from Goudet J (1995) FSTAT v-1.2. A computer program to calculate F-
398 statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485–486.

399 Hájková, P., Pertoldi, C., Zemanová, B., Roche, K., Hájek, B., Bryja, J. & Zima, J. (2007)
400 Genetic structure and evidence for recent population decline in Eurasian otter

401 populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. Journal
402 of Zoology, 272, 1-9.

403 Henke, S.E. & Bryant, F.C. (1999) Effects of coyote removal on the faunal community in
404 western Texas. Journal of Wildlife Management, 63, 1066-1081.

405 Hoelzel, A. R., (1999) Impact of population bottlenecks on genetic variation and the
406 importance of life-history, A case study of the northern elephant seal. Biological
407 Journal of the Linnean Society 68: 23-39.

408 Hughes, J.B., Daily, G.C. & Ehrlich, P.R. (1997) Population diversity: its extent and
409 extinction. Science, 278, 689-692.

410 IUCN (2008) IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.
411 Downloaded in April, 2009.

412 Kuo, C. and Janzen, F. J. (2004) Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural
413 population of ornate box turtles *Terrapene ornate*. Conservation Genetics 5: 425–437.

414 Kurushima, J.D., Collins, J.A., Well, J.A. & Ernest, H.B. (2006) Development of 21
415 microsatellite loci for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. Molecular
416 Ecology Notes, 6, 1260–1262.

417 Larson, S. et al (2002) Microsatellite DNA and mitochondrial DNA variation in remnant
418 and translocated sea otter (*Enhydra lutris*) populations. Journal of Mammalogy, 83,
419 893–906

420 Logan, K.A. & Sweanor, L.L. (2001) Desert Puma: Evolutionary ecology and conservation
421 of an enduring carnivore. Island Press. Washington, DC.

422 Lowe, A., Stephen, H. & Ashton, P. (2004) Ecological Genetics: Design, Analysis, and
423 Application. Blackwell Publications 326pp.

424 Luo, S.J., Johnson, W.E., David, V.A., Menotti-Raymond, M., Stanyon, R., Cai, Q.X.,
425 Beck, T., Yuhki, N., Pecon-Slatery, J., Smith, J.L.D. & O'Brien, S.J. (2007).
426 Development of Y chromosome intraspecific polymorphic markers in the Felidae.
427 Journal of Heredity, 98, 400-413.

428 Marins-Sá, L. G. (2005) Análise de predação de Puma concolor em rebanhos domésticos
429 na região do Parque Nacional de São Joaquim e entorno, SC, Brasil. MSc Dissertation,
430 Curso de Pós-Graduação em Ecologia UFRGS, Porto Alegre 52p.

431 Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M. (1998) Statistical confidence for
432 likelihood-based paternity inference in natural populations. Molecular Ecology, 7, 639-
433 655.

434 Mazzolli, M., Graipel, M.E. & Dunstone, N. (2002) Mountain lion depredation in southern
435 Brazil. Biological Conservation 105:43-51.

436 McRae, B.H., Beier, P., Dewald, L.E., Huynh, Y., & Keim, P. (2005) Habitat barriers limit
437 gene flow and illuminate historical events in a wide-ranging carnivore, the American
438 puma. Molecular Ecology, 14, 1965-1977.

439 Menotti-Raymond, M., David, V.A., Lyons, L.A., Schaffer, A.A., Tomlin, J.F., Hutton,
440 M.K. & O'Brien, S.J. (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic
441 cat (*Felis catus*). Genomics, 57, 9–23.

442 Miller, B., Dugelby, B., Foreman, D., Del Rio, C.M., Noss, R., Phillips, M., Reading, R.,
443 Soulé, M.E., Terborgh, J. & Willicox, L. (2001) The importance of large carnivores to
444 healthy ecosystems. Endangered Species Update, 18, 202-210.

445 Miotto, R.A., Rodrigues, F.P., Ciocheti, G. & Galetti, P.M. (2007) Determination of the
446 Minimum Population Size of Pumas (*Puma concolor*) Through Fecal DNA Analysis in
447 Two Protected Cerrado Areas in the Brazilian Southeast. Biotropica 39(5): 647–654.

448 Moreno, V.R., Grisolia, A.B., Campagnari, F., Milazzotto, M., Adania, C.H., Garcia, J.F.
449 & Souza, E.B. (2006) Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor*
450 and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites.
451 *Genetics and Molecular Biology*, 29, 2, 290-293.

452 Morrison, A.S., Boyle, W.M. (2009) Conserving Connectivity: Some lessons from
453 mountain lions in southern California. *Conservation Biology*, 23, 275-285.

454 MMA & Fundação Biodiversitas (2008) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de
455 extinção. ed. Machado, A.B.M., Drummond, G.M., Paglia, A.P. Brasília, DF, Belo
456 Horizonte, MG.

457 Myers, N., Mittermeier R. A., Mittermeier C. G., Fonseca G. A. B. Kent J. (2000)
458 Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.

459 Nielsen, A. E. G, L. A. Bach, and P. Kotlicki. (2006) Hybridlab (version 1.0): a program
460 for generating simulated hybrids from population samples. *Molecular Ecology Notes* 6:
461 971-973.

462 Nowell, K. & Jackson, P. (1996) *Wild Cats: Status, Survey and Conservation Action Plan*.
463 IUCN, Gland, Switzerland.

464 O'Brien, S.J. & Evermann, J.F. (1988) Interactive influence of infectious disease and
465 genetic diversity in natural populations. *TREE*, 3, 254-259.

466 Paviolo, A., De Angelo, C.D., Di Blanco, Y.E. & Di Bitetti, M.S. (2008) Jaguar *Panthera*
467 *onca* population decline in the Upper Paraná Atlantic Forest of Argentina. *Oryx*,
468 42,554-561

469 Paviolo, A., Di Blanco, Y.E., De Angelo, C.D. & Di Bitetti, M.S. (2009) Protection affects
470 the abundance and activity patters of pumas in the Atlantic Forest. *Journal of*
471 *Mammalogy*, 90, 926-934.

- 472 Piry, S., Luikart, G. & Cornuet, J.M. (1999) Bottleneck: a computer program for detecting
473 recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of*
474 *Heredity*, 90, 502–503.
- 475 Piry, S., Alapetite, A., Cornuet, J.M., Paetkau, D., Baudouin, L. & Estoup, A. (2004)
476 *GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant*
477 *Detection. Journal of Heredity*, 95, 536-539.
- 478 Ray JC, Redford KH, Steneck RS, Berger J (2005) *Large Carnivores and the conservation*
479 *of biodiversity. Island Press. 526pp.*
- 480 Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (Version 1.2). Population genetics software for
481 exact test ecumenism. *Journal of Heredity* 86:248-249.
- 482 Reed, D.H. & Frankham, R. (2003) Correlation between fitness and genetic diversity.
483 *Conservation Biology*, 17, 230-237.
- 484 Ribeiro, M.C., Metzger, J.P., Martensen, A.C., Ponzoni, F.G. & Hirota, M.M. (2009) The
485 Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest
486 distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation*, 142, 1141-1153.
- 487 Rice, W.R. (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43, 223–225.
- 488 Ripple, W.J. & Beschta, R.L. (2006) Linking a cougar decline, trophic cascade, and
489 catastrophic regime shift in Zion National Park. *Biological Conservation*, 133, 397-
490 408.
- 491 Rodzen, J.A., Banks, J.D., Meredith, E.P. & Jones, K.C. (2007) Characterization of 37
492 microsatellite loci in mountain lions (*Puma concolor*) for use in forensic and population
493 applications. *Conservation Genetics*, 8, 1239–1241.

494 Roelke, M.E., Martenson, J.S. & O'Brien, S.J. (1993) The consequences of demographic
495 reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology*, 3,
496 340-350.

497 Ruiz-Garcia, M., Pacheco, L.F. & Alvarez, D. (2009) Caracterización genética del puma
498 andino boliviano (*Puma concolor*) en el Parque Nacional Sajama (PNS) y relaciones
499 con otras poblaciones de puma del noroccidente de Sudamérica. *Revista Chilena de*
500 *História Natural*, 82, 97-117.

501 Sambrook, J.E., Fritsch, F. & Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*,
502 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, New York, New York.

503 Sinclair, E.A., Swenson, E.L., Wolfe, M.L., Choate, D.C., Bates, B. & Crandall, K.A.
504 (2001) Gene flow estimates in Utah's cougars implies management beyond Utah.
505 *Animal Conservation*, 4, 257-264.

506 Soulé, M.E. (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential.
507 In Soulé, M.E., Wilcox, B.A. Eds *Conservation Biology: An evolutionary-ecological*
508 *perspective*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.

509 Spielman, D., Brook, D.W. & Frankham, R. (2004) Most species are not driven to
510 extinction before genetic factors impact them. *PNAS*, 101, 15261-15264.

511 Sweanor, L.L., Logan, K.A. & Hornocker, M.G. (2000) Cougar dispersal patterns,
512 metapopulation dynamics and conservation. *Conservation Biology*, 14, 798-808.

513 Tallmon, D.A., Koyuk, A., Luikart, G.H. & Beaumont, M.A. (2008) ONeSAMP: a
514 program to estimate effective population size using approximate Bayesian
515 computation. *Molecular Ecology Resources*, 8, 299-301.

- 516 Terborgh, J., Lopez, L., Nuñez, P., Rao, M., Shahabudin, G., Orihuela, G., Riveros, M.,
517 Ascanio, R., Adler, G.H., Lambert, T.D. & Balbas, L. (2001) Ecological meltdown in
518 predator-free forest fragments. *Science*, 294, 1923.
- 519 Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M. & Shipley, P. (2004) MICRO-
520 CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite
521 data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535-538.
- 522 Waples, R.S. (2006) A bias correction for estimates of effective population size based on
523 linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, 7, 167-184.
- 524 Weaver, J.L., Paquet, P.C. & Ruggiero, L.F. (1996). Resilience and conservation of large
525 carnivores in the Rocky Mountains. *Conservation Biology*, 10, 964–976.

526 **Figures**

527

528 **Figure 1** Study area. Southern Brazil in South America and in detail, sampling localities.

529 Dots represent sample points.

530

531 **Figure 2** Graph of probability of loss in one generation, and percentages of alleles with

532 frequencies from 0.01 to 0.10. Using $\Pr(A) = (1-p)^{2N}$ where p is the allele frequency and

533 $N = 16.5$.

534 **Tables**

535

536 **Table 1** Characterization of microsatellites for mountain lions in southern Brazil for 18
537 microsatellite loci. Locus name, number of individuals genotyped (N), number of alleles
538 (A), observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_E), HWE P -values,
539 polymorphic information content (PIC), allelic richness (A_R), and inbreeding coefficient
540 (F_{IS}). Bold Values: $P \leq 0.05$ after Bonferroni correction.

541

542 **Table 2** Genetic diversity estimates in mountain lions in South and North American
543 populations. N= number of individuals, L= number of loci analyzed.

544

545 **Table 3** Mean observed and expected heterozygosity and alleles/locus for 14 species-
546 specific loci used in this study, and in two others (Kurushima et al. 2006, Rodzen et al.
547 2007) using samples from North American mountain lion individuals.

548

549 **Table 4** P -values from heterozygosity (H) deficiency and/or excess from Wilcoxon sign-
550 rank test using the infinite allele model (I.A.M.), stepwise mutation model (S.M.M.), and
551 two-phase model (T.P.M.) with 70% and 95% stepwise mutation model and 20% variance.
552 Results for $n=37$ (field samples) and $n=500$ (simulated genotypes).

553 Fig. 1:

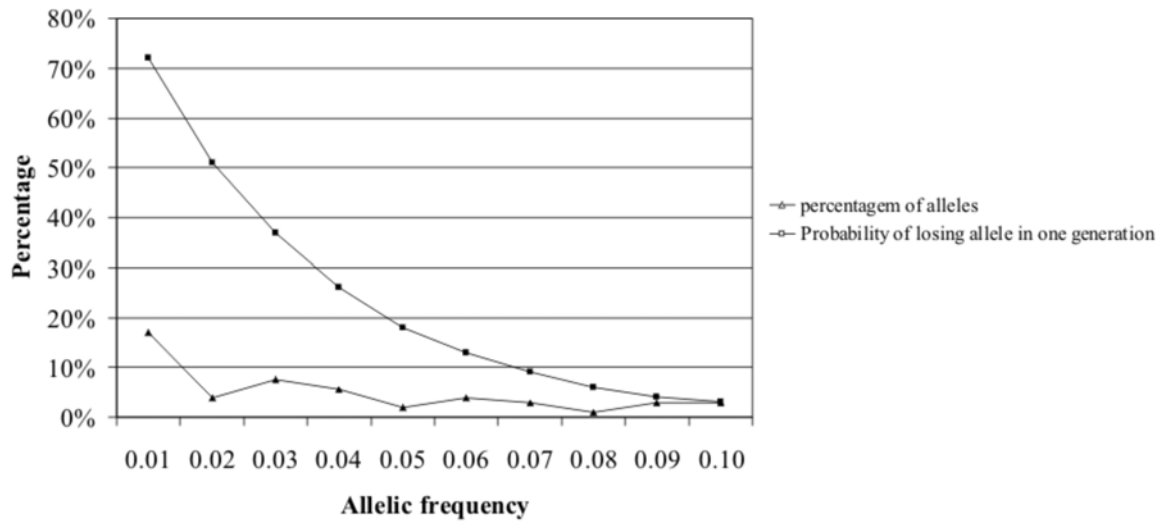


554

555

556

557 Fig. 2:



558

559 Table 1:

Locus	N	A	Ho	H _E	HWE <i>P</i> -values	PIC	A _R	<i>F</i> _{IS}
Fca391	34	7	0.529	0.739	0.00018	0.682	6.648	0.287
Fca424	32	5	0.406	0.698	0.00175	0.626	4.780	0.422
Fca441	37	5	0.676	0.766	0.32040	0.712	4.914	0.119
Fca453	31	5	0.742	0.570	0.18719	0.463	4.654	-0.309
PcoD8	26	5	0.769	0.747	0.35067	0.696	5.000	-0.030
PcoB105	36	4	0.778	0.725	0.11840	0.666	4.000	-0.074
PcoD329	35	6	0.571	0.742	0.08537	0.683	5.725	0.233
PcoB203w	32	11	0.750	0.850	0.33006	0.819	10.399	0.120
PcoB210w	31	7	0.806	0.840	0.00247	0.803	6.996	0.040
PcoD103w	35	5	0.543	0.677	0.46885	0.608	4.740	0.201
PcoD301	33	7	0.667	0.719	0.00625	0.666	6.574	0.074
PcoA2	31	8	0.677	0.667	0.54950	0.630	7.808	-0.015
PcoD217w	32	6	0.594	0.758	0.09523	0.706	5.812	0.220
PcoD303	29	6	0.586	0.753	0.06781	0.698	5.982	0.225
PcoD310	33	6	0.515	0.752	0.01904	0.694	5.745	0.318
PcoB323	34	6	0.706	0.655	0.39336	0.578	5.477	-0.079
PcoD323	32	5	0.625	0.587	0.28156	0.503	4.779	-0.066
PcoB115	37	2	0.027	0.027	1.00000	0.026	1.703	0.000
Mean	-	5.89	0.609	0.6818	-	0.6255	5.652	0.108

560 Table 2:

Continent/Country/State/Region	N	L	Mean number Alleles/locus	Mean Heterozygosity	Reference
North America					
Utah	50	9	4.44	0.653	Sinclair et al. 2001
California	431	12	4.4	0.44	Ernest et al. 2003
Colorado, Wyoming, South Dakota	312	9	4	0.535	Anderson et al. 2004
Utah, Colorado, Arizona, New Mexico	540	16	3.25-5.06	0.52-0.63	McRae et al. 2005
South América (SA)					
East ^a SA	22	10	8.6	0.71	Culver et al. 2000
North SA	25	10	9.1	0.75	Culver et al. 2000
Central SA	17	10	6.7	0.75	Culver et al. 2000
South SA	22	10	6.0	0.64	Culver et al. 2000
Bolivia - Andes	8	7	3.857	0.592	Ruiz-Garcia et al. 2009
Colombia, Peru, Ecuador, Venezuela, and western Brazilian Amazon	45	7	11	0.629	Ruiz-Garcia et al. 2009
Brazil - MG, GO, SC, PR, SP	18 ^b	4	9.25	-	Moreno et al. 2006
Brazil - SP	9	4	4	-	Miotto et al. 2007
Brazil - RS, SC, PR	37	18 ^c	5.98	0.609	This study

561 Brazilian state abbreviations: MG=Minas Gerais, GO= Goiás, SC= Santa Catarina, PR=

562 Paraná, SP= São Paulo, RS= Rio Grande do Sul

563 ^a This region corresponds to the distribution of the subspecies *Puma concolor*
564 *capricornensis*

565 ^b Samples from captive individuals

566 ^c This study used primers developed from *Felis catus* and *Puma concolor* loci; all others
567 used only primers based on *Felis catus* loci.

568 Table 3:

	H _o		H _E		Alleles	
	This	Kurushima et al. 2006 ^a	This	Kurushima et al. 2006 ^a	This	Kurushima et al 2006 ^a
	study	Rodzen et al. 2007 ^b	study	Rodzen et al. 2007 ^b	study	Rodzen et al 2007 ^b
PcoD8 ^b	0.769	0.79	0.747	0.83	5	8
PcoB105 ^b	0.778	1.00	0.725	0.74	4	7
PcoD329 ^b	0.571	0.71	0.742	0.77	6	8
PcoB203w ^a	0.750	0.46	0.850	0.57	11	7
PcoB210w ^a	0.806	0.62	0.840	0.74	7	7
PcoD103w ^a	0.543	0.58	0.677	0.71	5	6
PcoD301 ^b	0.667	0.58	0.719	0.78	7	7
PcoA2 ^b	0.677	0.76	0.667	0.68	8	6
PcoD217w ^a	0.594	0.45	0.758	0.59	6	5
PcoD303 ^b	0.586	0.67	0.753	0.68	6	4
PcoD310 ^b	0.515	0.5	0.752	0.62	6	5
PcoB323 ^b	0.706	0.71	0.655	0.69	6	5
PcoD323 ^b	0.625	0.33	0.587	0.57	5	5
PcoB115 ^b	0.027	0.75	0.027	0.67	2	5
Mean	0.615	0.636	0.678	0.689	6	6.07

569 Table 4:

	n=37				n=500			
	I.A.M	T.P.M		S.M.M.	I.A.M	T.P.M		S.M.M.
		70%	95%			70%	95%	
H deficiency	0.99979	0.95512	0.51694	0.18461	1.0	0.99998	0.99203	0.75246
H excess	0.00026	0.04937	0.50000	0.82673	0.0	0.00003	0.00912	0.26131
H excess and deficiency	0.00052	0.09874	1.00000	0.36922	0.00001	0.00005	0.01823	0.52261

CAPÍTULO II

Landscape Genetics of Mountain Lions (*Puma Concolor*) in Southern Brazil

CASTILHO C.S.^{1,2}, MARINS-SÁ L.G.¹, BENEDET R.C.³, FREITAS T.R.O.²

¹ Instituto Serrano de Conservação da Natureza, ISCN, Projeto Leão Baio, cx postal 33, Urubici, 88650-000, Santa Catarina, Brazil (Phone: +55 49 3278-5696, E-mail: cscastilho@hotmail.com)

² Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Projeto Puma, Lages, Santa Catarina, Brazil

Artigo aceito para publicação pela revista *Mamalian Biology*



Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Mammalian Biology

journal homepage: www.elsevier.de/mambio



Original Investigation

Landscape genetics of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil

Camila Schlieper Castilho^{a,b,*}, Luiz G. Marins-Sá^b, Rodrigo C. Benedet^c, Thales O. Freitas^{a,1}

^a Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cx postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Instituto Serrano de Conservação da Natureza, cx postal 33, CEP 88650-000, Urubici, SC, Brazil

^c Projeto Puma, CEP 88504-302, Lages, SC, Brazil

article info

Article history:

Received 19 March 2010
Accepted 18 August 2010

Key words:

Landscape connectivity
Dispersal Isolation-by-Resistance
Gene flow
Conservation

abstract

It is suggested that mountain lions have suffered a bottleneck and lost their genetic diversity in an area in southern Brazil. In this study, we correlated landscape connectivity and patterns of gene flow to identify landscape permeability and possible sources of migrants for the population of mountain lions in southern Brazil, using circuit theory. Population structure was analyzed with Bayesian methods, and density and parentage relationships were also estimated, to evaluate the population genetic profile. We did not find genetic structure between samples, and landscape analysis indicated that all individuals were connected by areas that are permeable to mountain lion movements. The estimated population density was low, 0.09 and 0.32 mountain lions/100 km² ($N_e/N = 0.11$ and $N_e/N = 0.4$, respectively). Parentage results indicated that individuals killed in the same spot were not related, suggesting that mountain lions are still able to disperse through the landscape. Evidence indicates that severe habitat loss and consequent illegal hunting were responsible for a bottleneck and consequent loss of genetic variability, we demonstrated that the landscape still allows mountain lions to move, and that protected areas in southern Brazil may be acting as a source of migrants. This information indicates that conservation actions to reduce illegal hunting and to monitor protected areas are important to understand the impact of hunted areas on source areas.

© 2010 Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde. Published by Elsevier GmbH. All rights reserved.

Introduction

Landscape genetics is an emerging field in conservation that combines methods and concepts from population genetics, landscape ecology, and spatial statistics (Manel et al. 2003; DeSalle and Amato 2004; Storfer et al. 2007; Balkenhol et al. 2009). It aims to understand and predict how landscape features interact with microevolutionary processes, such as gene flow (Manel et al. 2003). More importantly, landscape genetics uses inferences from conservation genetics studies and an understanding of landscape dynamics to implement successful conservation strategies (DeSalle and Amato 2004).

Several theories have been used in landscape genetics (Manel et al. 2003; McRae and Beier 2007; LaRue and Nielsen 2008). Circuit theory is a new method to predict gene flow and genetic structure, that considers multiple pathways rather than one single optimal pathway such as Least-Cost-Path (McRae and Beier 2007). This theory is the base for the Isolation-by-Resistance model, which uses

the resistance or conductance distance based on electrical circuit theory to predict all possible pathways connecting pairs of populations or individuals (McRae 2006; McRae and Beier 2007).

The Isolation-by-Resistance model has been used to predict the effects of landscape heterogeneity on gene flow and genetic structure in artificial (McRae 2006) and real populations (McRae and Beier 2007).

Carnivores around the world are threatened by hunting and/or habitat fragmentation (Nowell and Jackson 1996; Haag 2009), and mountain lions (*Puma concolor*) are no exception. Mountain lions are considered as of least concern and vulnerable by the international (IUCN 2008) and Brazilian (MMA/Fundac, ão Biodiversitas 2008) conservation agencies that list endangered species, respectively.

As the second-largest Neotropical carnivore, mountain lions are very important for biodiversity maintenance and ecosystem health. They are capable of long-distance movements (Ruth et al. 1998; Logan and Swenar 2001; Thompson and Jenks 2005) of over 1341 km (Stoner et al. 2008), and can travel through discontinuous landscape although they normally use forested areas with low human density (LaRue and Nielsen 2008).

This long-distance dispersal capability is important, because recruitment often occurs by immigration of juveniles from adjacent populations, enabling gene flow (Beier 1995; Swenar et al. 2000). Because habitat fragmentation is one of the major threats faced

* Corresponding author at: Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, cx postal 15053, CEP 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil.
Tel.: +55 51 33086726.

E-mail address: cscastilho@hotmail.com (C.S.).

Castilho). ¹ Tel.: +55 51 33086726.

1616-5047/\$ – see front matter © 2010 Deutsche Gesellschaft für Säugetierkunde. Published by Elsevier GmbH. All rights reserved. doi: 10.1016/j.mambio.2010.08.002

Please cite this article in press as: Castilho, C.S., et al., Landscape genetics of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. Mammal. Biol. (2010), doi: 10.1016/j.mambio.2010.08.002

by medium-sized and large carnivores, understanding the species' movements and land use will provide important information for conservation.

There is extensive information about North American populations of mountain lions (Anderson 1983; Ross and Jalkotzy 1992; Beier 1993; Lindzey et al. 1994; Beier 1995; Beier et al. 1995; Culver et al. 2000; Sweanor et al. 2000; Pierce et al. 2000; Walker et al. 2000; Logan and Sweanor 2001; Riley and Malecki 2001; Ernest et al. 2003; Anderson et al. 2004; McRae et al. 2005; Shaw et al. 2007; Culver et al. 2008; LaRue and Nielsen 2008; Stoner et al. 2008), although little is known about the species in the rest of its range (Mazzolli 1993; Culver et al. 2000; Mazzolli et al. 2002; Marins-Sá 2005; Moreno et al. 2006; Miotto et al. 2007; Ruiz-Garcia et al. 2009). Southern Brazil is no exception, and little information about mountain lions is available for this region (Mazzolli 1993, 2006; Mazzolli et al. 2002; Marins-Sá 2005; Castilho et al., submitted for publication). Since jaguars (*Panthera onca*) were eradicated from this region, lions have played a key role in maintaining ecosystem processes and biodiversity as the top predator. Also, only recently has information about population densities become available in Central (Kelly et al. 2008) and South America (Trolle et al. 2007; Kelly et al. 2008; Paviolo et al. 2009).

Knowledge of species densities is extremely important for conservation planning. Paviolo et al. (2009) observed that densities of mountain lions are affected by the intensity of poaching pressure, with lower densities in higher-pressure areas. In addition to affecting density, hunting can also influence territory establishment, sex ratios, and immigration/emigration (Robinson et al. 2008).

Conflict between farmers and mountain lions in southern Brazil has been documented since the 1990s, and this conflict appears to be the major cause of predator deaths (Mazzolli et al. 2002; Marins-Sá 2005). Because illegal hunting appears to be an important threat to the mountain lion population in southern Brazil, understanding parentage relationships may clarify the impact of illegal hunting on population dynamics.

Areas with high poaching pressure that also have available prey and high-quality vacant territories, as seems to be the case for southern Brazil, may attract more migrants from source areas. This migration will decrease mountain lion densities over a larger area and jeopardize the population of source areas by hunting pressure (Robinson et al. 2008). In southern Brazil, protected areas may act as a source of migrants for this population. Prediction and conservation of source areas and connectivity between areas is one of the most important goals in conservation genetics, because structured populations become inbred and lose their genetic variation, fitness, and evolutionary potential (Frankham et al. 2005).

In this study, we correlated landscape connectivity and patterns of gene flow to identify landscape permeability and possible sources of migrants for the population of mountain lions in southern Brazil. We also analyzed the population structure with Bayesian methods, and estimated the effective population size (density estimates) and parentage relationships to evaluate the population genetic profile.

The results from this study will contribute to understand mountain lion movements in southern Brazil, and to optimize conservation efforts for this threatened species, suggesting the principal threats and the priority actions for conservation.

Material and methods

Study area, samples, and molecular analysis

Our study area covered 142,118.70 km² in southern Brazil (Fig. 1). The vegetation is Atlantic Forest, mostly the Mixed Araucaria Forest physiognomy. In Brazil, hunting and removing animals from the wild are illegal. Therefore, in order to obtain samples, we searched extensively to find and persuade illegal hunters who had kept animal parts as trophies to cooperate with the study.

In total, 37 mountain lions were used in this study, obtained from poachers (n = 25), road kills (n = 1), animals in captivity (n = 2), and museums (n = 09). The samples were collected during the years

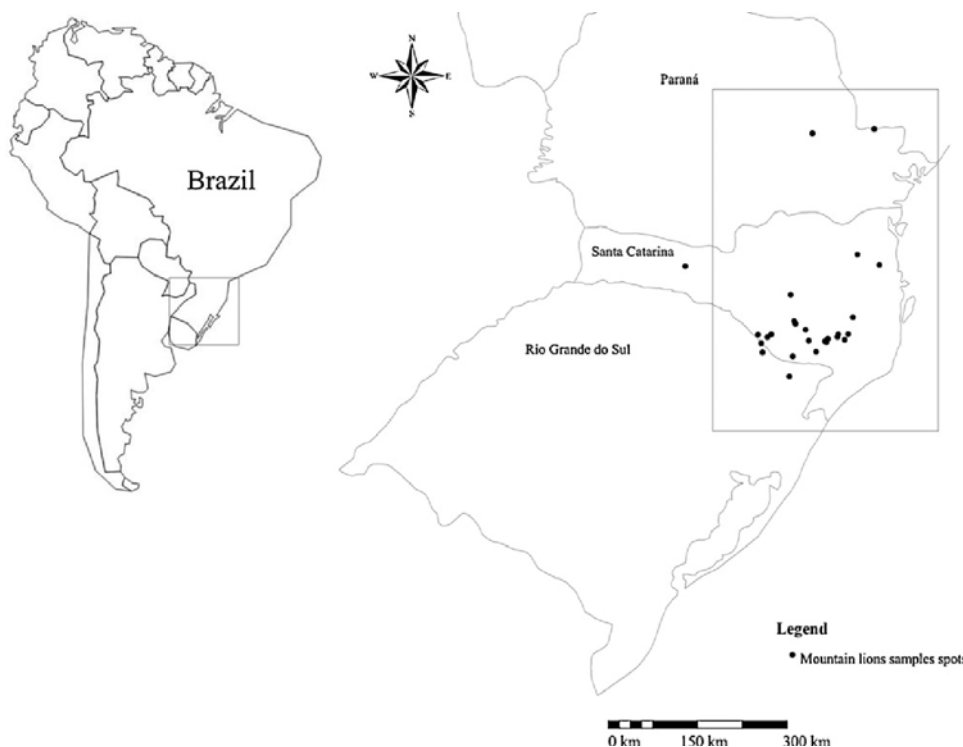


Fig. 1. Sample locations for all individuals collected. The region delimited with a rectangle represented the area analyzed and shown in land cover (Fig. 2) and current maps (Fig. 3).

2005–2008, and originated from 1983 through 2007, although they did not show a temporal structure ($F_{st} = -0.0113$; $P > 0.05$) (Castilho et al., submitted for publication). The poached individuals were killed on private land. Location, year, and cause of death/capture were recorded through interviews with poachers. All sample positions were recorded with a GPS and mapped using TrackMaker (Fig. 1). For the museum samples we perform several different PCR reactions for each loci, using negative controls, we also perform different DNA extractions for some individuals to test for replicability of results. We do not observe any indications of contamination.

Genomic DNA was extracted using the CTAB protocol (Doyle and Doyle 1987) for tissue samples, and phenol–chloroform (Sambrook et al. 1989) for blood samples. The PCR reactions were carried out in a 15 μ L volume containing 1.5–3.0 mM $MgCl_2$, 0.2 mM dNTPs, 0.5 U of Taq DNA polymerase, and 0.1 μ M each of the forward and reverse primers. The thermal profile was a touchdown with 94 °C for 3 min, annealing temperature decreasing from 60 °C to 51 °C in 10 cycles, followed by 29–34 cycles in which the temperature was kept constant at 50 °C, and 1 min at 72 °C, followed by 10 min of final extension. A total of 18 loci designed for *Felis catus* (Menotti-Raymond et al. 1999) and *Puma concolor* (Kurushima et al. 2006; Rodzen et al. 2007) (Table 1S) were amplified individually to analyze the existence of structure and parentage, and to estimate the effective population size of the wild mountain lion population in southern Brazil. Each allele size was determined by separating the amplification products on a 6% polyacrylamide gel using a 25 bp marker. Ten individuals were always used in runs, to allow comparative scores between gels. Samples were genotyped at least twice to validate the scores, and negative controls were always run at the PCR step to control for contamination. All microsatellite loci analyzed were polymorphic, a total of 106 alleles were identified, and the number of alleles/locus ranged from 2 to 11. The mean observed heterozygosity, mean number of alleles, allelic richness, and polymorphism information content were 0.61, 5.89, 5.65, and 0.62, respectively (Castilho et al., submitted for publication). No loci were in linkage disequilibrium, and Hardy–Weinberg equilibrium tests revealed that three loci (Fca391, Fca 424, Pco 210) deviated from the expected after Bonferroni correction (Castilho et al., submitted for publication). No loci showed evidence of allele dropout using MicroChecker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004).

We amplified the DBY-7 intron (Luo et al. 2007) under the same PCR conditions as the microsatellites. Sequence chromatograms were visually inspected and edited using CHRO-MAS 1.45 (<http://www.thecnelysium.com.au/chromas.html>), and aligned using the CLUSTALW algorithm implemented in MEGA 3.0 (Kumar et al. 2004).

Population structure

To assess the existence of population structure, we used a Bayesian model based clustering method as implemented in STRUCTURE 2.2 (Pritchard et al. 2000), using all mountain lion samples and 18 microsatellite loci. We conducted five independent runs for each number of clusters (k) between 1 and 10, using the admixture model, no prior population information, 500,000 burn-in, and 10^6 replication. We used a Mantel Test as implemented by Alleles in Space (Miller 2005) to test for correlation between genetic and geographic distance.

Parentage analysis

We used microsatellite data to calculate direct parentage between individuals, using CERVUS (Marshall et al. 1998). Relatedness between pairs of individuals was predicted using the maximum-likelihood approach as implemented in KINSHIP 1.3.1

(Goodnight et al. 1998). Three hypotheses were tested; parent-offspring vs unrelated individuals (null hypothesis), full sibling vs unrelated individuals (null hypothesis), and half sibling vs unrelated individuals (null hypothesis). The significance level was calculated by simulating 10,000 pairs of individuals using the primary hypothesis settings and the observed allele frequencies, and determining $P = 0.05$, 0.01, and 0.001 as needed to reject the null hypothesis.

We also used the parentage analysis (results from KINSHIP and CERVUS), chromosome Y intron data, year of death and sex of the individuals, and geographical coordinates to determine if vacant territories became occupied by related individuals.

Density analysis

Mountain lion densities were obtained using the effective population size (N_e), estimated using genotype data obtained with microsatellites. We used the program LDNe 1.31 (Waples 2006) to calculate from samples collected in Santa Catarina and Rio Grande do Sul. We excluded extreme sample sites, in order to use the largest concentration of samples per area.

Although diverse N_e/N ratios have been reported in wildlife populations (Mace and Lande 1991; Nunney 1993; Nunney and Campbell 1993; Eizirik et al. 2002), we chose to use $N_e/N = 0.11$ tested for different species (Frankham 1995), and $N_e/N = 0.4$ used by Eizirik et al. (2002) for jaguars (*Panthera onca*).

Habitat use data and Isolation-by-Resistance model

Landscape permeability to gene flow was tested within mountain lion sample sites and between sample sites and protected areas, to investigate if there are barriers to gene flow and to evaluate if these areas may be acting as source areas.

We used CIRCUITSCAPE 3.4.2 (McRae 2006) to model landscape conductance to gene flow. The algorithm evaluates total landscape resistance/conductance between sampling sites, based on multiple paths (McRae 2006). It produces a matrix of resistance/conductance among sample pairs, using raster habitat data as the input (McRae 2006). Land cover and human density were the most important factors influencing mountain lion movements and land use (LaRue and Nielsen 2008). We used land cover, because this was the information available for the study area. Each cell of the raster was assigned a conductance value corresponding to the relative probability of the mountain lions moving through the habitat type (land cover) encoded by the cell. Current values were log-transformed as suggested by McRae and Shah (2009) and McRae et al. (2008).

We used the Brazilian Land Cover Dataset from 2007, available for download at <http://www.mma.gov.br/sitio/>. All geospatial data were processed using ArcGIS 9.2 (Environmental Systems Research Institute, Inc.). Land cover shapes were converted to raster format, and within a GIS, each cell in a raster dataset was assigned a value for the cost of movement of *Puma concolor*.

The dataset used for our study area contained 46 classes, but similar types were grouped together into seven different categories listed above. In this analysis, the conductance values calculated from LaRue and Nielsen (2008) for mountain lions in midwestern North America were adapted to southern Brazil land cover and species use based on animal occurrence, literature review, and personal communications based on field experience, as suggested by Beier et al. (2008). The categories and conductance values used were: barren/developed and open water (10), natural forest (100), exotic planted forest (83), grasslands (32), agricultural (15), areas with water influence (35), and shrublands (58) (Fig. 2).

The software CIRCUITSCAPE uses graphing and circuit theory to calculate conductance between points, given a GIS raster layer

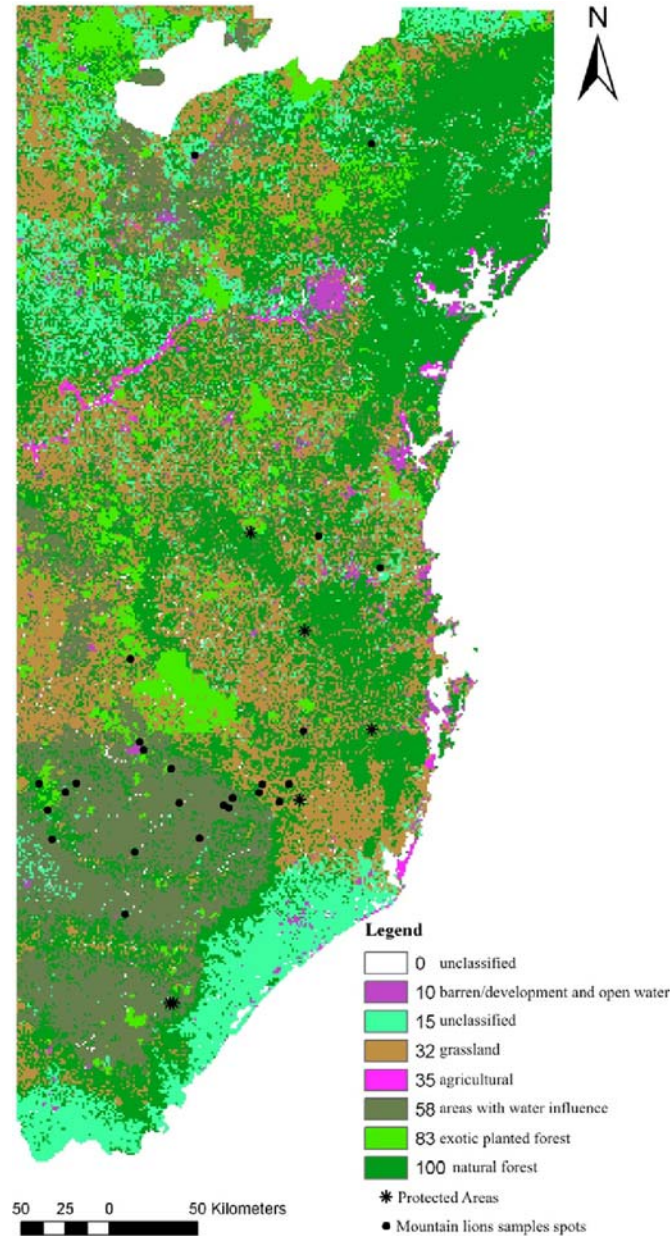


Fig. 2. Map of land cover types in the study area, with conductance values assigned to each type.

defining landscape conductance. We used a connection scheme where gene flow was allowed between the nearest eight cells, and conductance between any two cells was based on the average of the conductance assigned to both cells. CIRCUITSCAPE uses random walk theory to predict movement between pixels, and proposes possible paths to gene flow between sample spots. We included six protected areas as possible source areas in the landscape analysis (Table 1 and Fig. 3).

Table 1
Bayesian clustering analyses through software STRUCTURE, values of Ln Pr (X/K) corresponding to each K tested.

Protected area		Area (km ²)	Reference site (access date)
Serra do Itajaí National Park	SC	1,149.50	http://www.ibama.gov.br/siucweb/listaUc.php (09.14.2009)
Serra Geral National Park	RS	173.33	http://www.ibama.gov.br/siucweb/listaUc.php (09.14.2009)
Aparados da Serra National Park	RS	261.64	http://www.ibama.gov.br/siucweb/listaUc.php (09.14.2009)
São Joaquim National Park	SC	428.37	http://www.ibama.gov.br/siucweb/listaUc.php (09.14.2009)
Serra do Tabuleiro State Park	SC	874.05	http://fatma.sc.gov.br/ (09.14.2009)
Sassafrás State Biological Reservation	SC	12.61	http://fatma.sc.gov.br/ (09.14.2009)

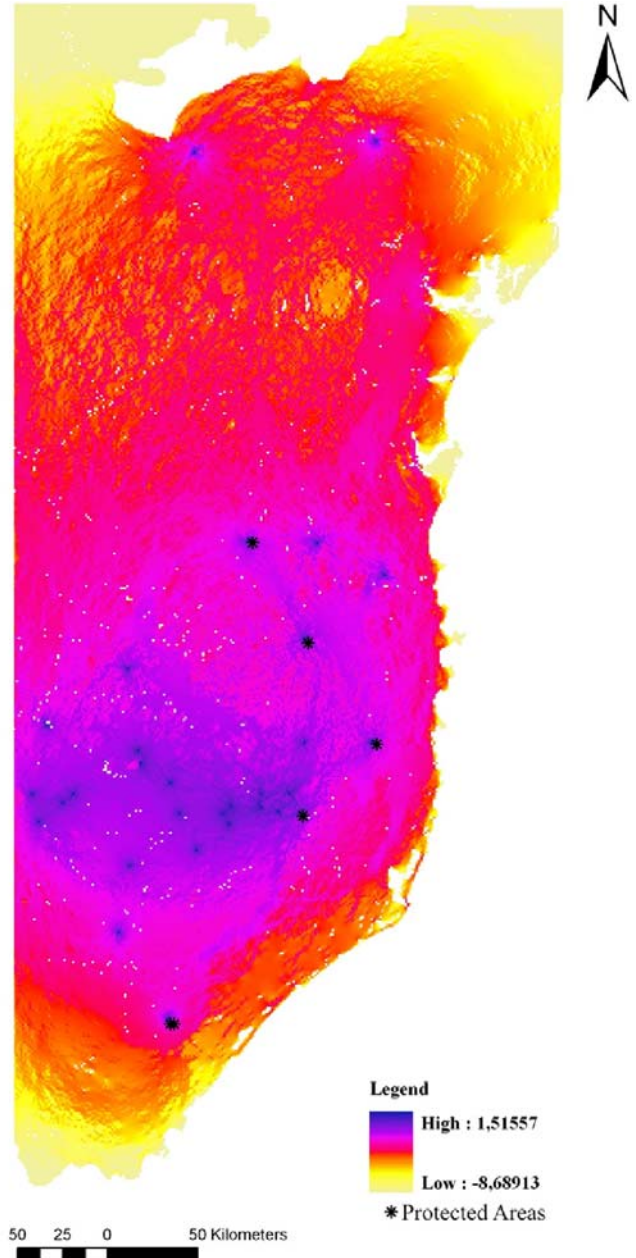


Fig. 3. The Isolation-by-Resistance with the highest conductance in purple, and low conductance in light yellow. Purple spots correspond to mountain lion samples, and black stars to protected areas. (For interpretation of the references to color in this figure caption, the reader is referred to the web version of the article.)

Results

Population structure

Bayesian clustering analyses through the software STRUCTURE did not detect a population genetic structure or suggest any barriers

Table 2

Protected areas analyzed as possible source areas. Name of the Protected Area, state in Brazil, area (km²), and reference site with access date.

K	Ln Pr (X/K)
1	-1614.78
2	-1605.08
3	-1579.38
4	-1545.16
5	-1529.36
6	-1518.02
7	-1531.30
8	-1525.38
9	-1547.64
10	-1535.10

to gene flow in these mountain lion samples. Although the small Ln Pr (X/K) indicates that the best k = 6 (Table 2), it did not appear to have structure, as no individual was assigned to a specific population, the proportion of the sample assigned to each population was roughly symmetrical (~1/K in each population), and most individuals were fairly well mixed. We also observed a wide variation in the value of ϵ during the course of the run ($\epsilon = 0.09-4.75$).

We do not observe genetic structure, but we did observe a low ($r = 0.23$; $P = 0.03$) correlation between genetic distance and geographical distance (Fig. 4). However, two individuals from extreme sample spots (one from Paraná and the other from Rio Grande do Sul) were considered as half siblings because of their shared genetic similarities.

DBY-7 intron, parentage, and genetic structure

We sequenced 295 base pairs (bp) of the DBY-7 intron in the Y-chromosome. The final data set comprised 16 males. Two different haplotypes were identified, with four nucleotide substitutions (three transitions and one transversion) and one indel (insertion or deletion) (Table 2S). Fourteen males had haplotype H1, and two had H2 (Table 2S). H2 was only found in individuals from Santa Catarina killed in 2005 and 2006. Haplotype H1 was found in all southern Brazil, and in samples taken from 1983 to 2007.

The parentage analysis using CERVUS and KINSHIP indicated that no pair of individuals was parent/offspring. The other analysis obtained by KINSHIP indicated that 93.40% were unrelated (not first- or second-order relatives) ($P < 0.05$), 4.65% were half siblings (sharing alleles from father or mother) ($P < 0.05$), and 1.95% were full siblings ($P < 0.05$) (Table 3).

Territory use

In 2006 we observed that three different mountain lions occupied the same area (all three were poached on the same farm): a male poached in April with the H2 Y-haplotype; a female poached in May, reported by the hunter to have been pregnant; and a second male poached in June, with the H1 Y-haplotype. None of the individuals were related, according to CERVUS and KINSHIP. Previously on this same farm, two other females had been poached, in 2001 and 2004. They were unrelated to each other or to the individ-

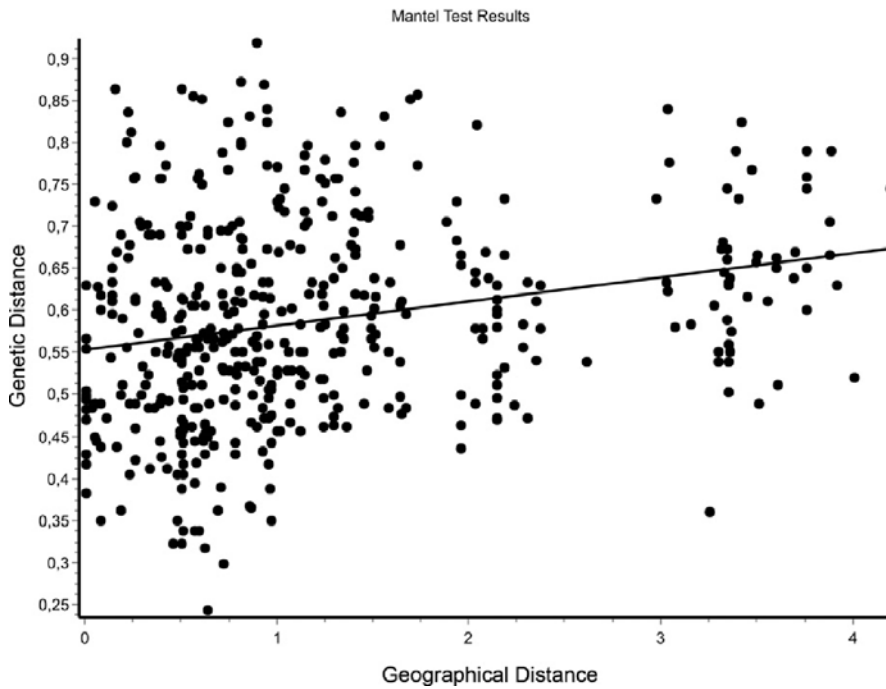


Fig. 4. Correlation between genetic and geographic distance, estimated using the Mantel test.

Table 3

List of relationship hypotheses and the associated r values used by KINSHIP, r_m allele by direct descent from the mother, r_p allele by direct descent from the father. % percentage of individuals that had the kind of relationship indicated, and the program used to determine the relationship.

Relationship hypothesis	%	Program	r_m	r_p
Mother	0.0	CERVUS	-	-
(father)-offspring		KINSHIP	1.0 (0.0)	0.0 (1.0)
Full siblings	1.95	KINSHIP	0.5	0.5
Half siblings Father (mother)	4.65	KINSHIP	0.0 (0.5)	0.5 (0.0)
Unrelated	93.4	KINSHIP	0.0	0.0
Total	100	-	-	-

uals killed in 2006. In another area sampled, two males had been poached, the first in 2002 and the second in 2006. Both had the H1 Y-haplotype, but were unrelated.

Density of mountain lions

Using LDN_e for calculated N_e for the samples from Rio Grande do Sul and Santa Catarina, i.e., excluding the individuals from western-most Santa Catarina and Paraná, we obtained an estimated value of $N_e = 16.60$ ($P_{crit} = 0.05$) in an area of $46,342.20 \text{ km}^2$ and calculated a mountain lion density of $0.32/100 \text{ km}^2$ ($N_e/N = 0.11$) and 0.09 mountain lions/ 100 km^2 ($N_e/N = 0.4$).

Habitat use data and Isolation-by-Resistance model

Current maps generated by CIRCUITSCAPE show several paths of high conductance (purple color) that represent possible routes of gene flow between sample spots (Fig. 3). The highest conductance is shown in purple, and the lowest in pale yellow. Other colors represent different degrees of gene flow, as shown in the legend. Purple spots indicate mountain lion sample sites, and black stars indicate protected areas with a confirmed presence of mountain lions (e.g., camera traps, remains, predation events). We observed that all sample spots and all protected areas are connected by landscape permeable to mountain lions, allowing gene flow as shown by the current map (Fig. 3), and indicating that all the protected areas may act as source areas of migrants to the study region.

Discussion

The use of land cover by mountain lions is well described (Mazzolli 1993, 2006; Beier 1995; Riley and Malecki 2001; Silveira 2004; Marins-Sá 2005; LaRue and Nielsen 2008; Lyra-Jorge et al. 2008). Mountain lions prefer areas with forest cover and low human density (LaRue and Nielsen 2008), although they can also use other types of land covers (Mazzolli 1993, 2006; Beier 1995; Silveira 2004; Marins-Sá 2005; LaRue and Nielsen 2008; Lyra-Jorge et al. 2008). Lions are also able to disperse over long distances (Ruth et al. 1998; Logan and Sweaner 2001; Thompson and Jenks 2005; Stoner et al. 2008) and may tolerate landscapes with some level of human-modifications. These capabilities enable individuals to move among areas and occupy vacant territories, providing gene flow between distant areas.

Although we found a low correlation between genetic and geographical distance, the population structure analysis and the current maps suggested that there are no landscape barriers isolating one or more sample spots from the others in southern Brazil. All individuals are considered to belong to the same populations, and all sample spots are connected by permeable landscape.

The parentage analysis indicated that the great majority of individuals in this population were unrelated (93.40%), and only a few pairs of individuals were full or half siblings. Also, none of the mountain lions that used the same area was related to the others, whether or not it was a male or a female that had previously been killed. This may indicate that mountain lions in this population have been able to disperse through the landscape even though it is fragmented, because several unrelated individuals may use the same area. Logan et al. (1986) also studying a hunted mountain lion population, observed that vacant home ranges were not occupied by kittens from the same area, and that dispersal was independent of mountain lion densities.

All the protected areas analyzed are connected to sample sites, and may be acting as sources of migrants for the study area. This is important information, because areas with high hunting pressure may reduce densities in the source areas, by attracting migrants that will be hunted (Robinson et al. 2008).

We calculated densities of 0.09 and 0.32 mountain lions/ 100 km^2 . Paviolo et al. (2009), studying populations in the Atlantic Forest, observed that mountain lion density was related to the intensity of poaching pressure, and found that the area with the highest poaching pressure had the lowest mountain lion density, with 0.30 – 0.74 mountain lions/ 100 km^2 . Kelly et al. (2008) estimated 0.67 mountain lions/ 100 km^2 for the same site in Argentina. Densities in areas with lower and intermediate pressure ranged from 1.55 to 2.89 and from 0.66 to 2.19 mountain lions/ 100 km^2 , respectively (Paviolo et al. 2009). Although we must consider that our population is open, so the estimated area may not be exact, and field estimates are needed for the study area, we believe that this estimate may indicate that this area is under high hunting pressure, as we find values similar to that reported by Paviolo et al. (2009) for the area of highest logging and hunting pressure. This concurs with previous studies for this area that suggested a high poaching pressure due to conflict between farmers and predators, which continually leads to the death of the mountain lions (Mazzolli et al. 2002).

Mountain lion conservation

Our data suggest that poaching and not lack of landscape connectivity is a major threat for this population in southern Brazil, although, since mountain lions are under illegal hunting pressure and show evidence of loss of genetic variability, it is even more important to preserve this connectivity and allow the individuals to travel through the matrix, preventing inbreeding and the consequent increase in extinction risk.

Robinson et al. (2008) observed that a mountain lion population hunted in small areas with high habitat quality and good prey availability did not decrease in density, due to immigration from other source populations. Logan et al. (1986) also observed that immigrants compensate for the loss of residents. The larger number of recruits increases the number of young males in the population, masking the decreased densities of females. This may be occurring in the southern Brazil population: Mazzolli et al. (2002) found a $1:1.2$ (female:male) sex ratio, whereas for non-hunted populations in North America this ratio is $2:1$ (Lindzey et al. 1994). This larger number of young male migrants may also exacerbate the mountain lion–human conflict by increasing the rate of livestock depredation. Furthermore, it creates a common but erroneous impression that the mountain lion population is growing, thus greatly increasing the pressure from local residents and ranchers for more hunting and removal of individuals.

Although immigration may mask local reductions in densities for some time, areas with high hunting pressure that have good prey availability and vacant high-quality habitat may attract more migrants from source areas, and this may result in decreasing the density in an entire area (including source areas), as immigrants arrive and are killed more quickly (Robinson et al. 2008).

Because the landscape in southern Brazil still allows mountain lions to disperse, priority conservation efforts should include mitigating actions to prevent illegal hunting in this region, in order to allow the population to recover and to reduce possible threats to migrants and source areas. Such mitigating actions should be included in a management plan to reduce financial losses due to predation, the primary cause of mountain lion persecution in southern Brazil. Mountain lions use both private land and public protected areas, and therefore only combined action by governmental environmental agencies, researchers, and farmers will make it possible to conserve this population.

Long-term genetic monitoring in these areas may help us to better understand the dynamics of source areas and the dispersal patterns of the species, the demographic processes involved in the genetic variation, and finally to be able to conserve this species that

has such a important rule in maintenance of ecosystem processes and biodiversity.

Acknowledgements

This research was financially supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS). The authors thank the LAMAQ/UFSC and Capão da Imbuia museums, M. Mazzolli, P.W.V. Castilho, P.C. Simões-Lopes, M. Graipel, S. Althoff, A. Fillippini, M.M. Mendoc, a, I. Croda, W. Veronezi, C. Silveira, T.C. Margarido, R. Von Hohendorf, M.E. Saito, landowners, and partners of the project for help in sample collection. We also thank H. Hasenack for assistance with the Land Cover Dataset, and the staffs of the São Joaquim National Park/ICMBio and the Instituto Serrano de Conservação da Natureza-ISCN for technical and logistical support. We are grateful to M.T.B. Wallauer and J.P. Wallauer for technical assistance. Also to G.L. Gonçalves (UFRGS), C.M. Lopes (UFRGS), and G.P. Fernandez-Stolz (UFRGS) for reading early versions of this manuscript.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at [doi:10.1016/j.mambio.2010.08.002](https://doi.org/10.1016/j.mambio.2010.08.002).

References

- Anderson, A. 1983. A critical review of literature on puma (*Felis concolor*). Colorado Division of Wildlife. Wildlife Research Section. Special Report Number 54, 91.
- Anderson, C.R., Lindzey, F.G., McDonald, D.B., 2004. Genetic structure of cougar populations across the Wyoming Basin: metapopulation or megapopulation. *J. Mammal.* 85, 1207–1214.
- Balkenhol, N., Gugerli, F., Cushman, S.A., Waits, L.P., Coulon, A., Arntzen, J.W., Holderegger, Wagner, H.H., 2009. Identifying future research needs in landscape genetics: here to from here? *Landscape Ecol.* 24, 455–463.
- Beier, P., 1993. Determining minimum habitat areas and habitat corridors for cougars. *Cons. Biol.* 7, 94–108.
- Beier, P., 1995. Dispersal of juvenile cougars in fragmented habitat. *J. Wildl. Manag.* 59, 228–237.
- Beier, P., Choate, D., Barret, R.H., 1995. Movement patterns of mountain lions during different behaviors. *J. Mammal.* 76, 1056–1070.
- Beier, P., Majka, D.R., Spencer, W.D., 2008. Forks in the road: choices in procedures for designing wildland linkages. *Cons. Biol.* 22, 836–851.
- Castilho, C.S., Marins-Sá, L.G., Benedet, R.C., Freitas T.R.O., 2010. submitted for publication. Habitat loss and evidence of a bottleneck in mountain lions in southern Brazil.
- Culver, M., Johnson, W.E., Pecon-Slatery, J., O'Brien, S.J., 2000. Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). *J. Hered.* 91, 186–197.
- Culver, M., Hedrick, P.W., Murphy, K., O'Brien, S., Hornocker, M.G., 2008. Estimation of the bottleneck size in Florida panthers. *Anim. Cons.* 11, 104–110.
- DeSalle, R., Amato, G., 2004. The expansion of conservation genetics. *Nat. Rev. Genet.* 5, 702–712.
- Doyle, J.J., Doyle, J.L., 1987. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 9, 11–15.
- Eizirik, E., Indrusiak, C.B., Jonson, W.E., 2002. Análisis de la viabilidad de las poblaciones de Jaguar: evaluación de parámetros y estudios de caso en tres poblaciones remanentes del sur de Sudamérica. In: Medellín, R.A., Equihua, C., Chetkiewicz, Ch.L., Crawshaw, P.G., Rabinowitz, A., Redford, K.H.ET-AL (Eds.), *El Jaguar en el Nuevo Milenio*. Editorial Ediciones Científicas Universitarias, México, DF, Mexico, pp. 501–518.
- Ernest, H.B., Boyce, W.M., Bleich, V.C., May, B.P., Stiver, S.J., Torres, S.G., 2003. Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Cons. Gen.* 4, 353–366.
- Frankham, R., 1995. *Effective Population Size/Adult Population Size Ratios in Wildlife: A Review*, vol. 66. Genetic Research Cambridge, pp. 95–107.
- Frankham, R., Balloux, J.D., Briscoe, D., 2005. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, 617 pp.
- Goodnight, K.F., Queller, D.C., Poznansky, T., 1998. KINSHIP 1.2. Goodnight Software. Rice University, Houston, TX.
- Haag, T., 2009. Genética da conservação, do ecologia molecular de onças-pintadas (*Panthera onca*, Felidae). PhD Thesis. UFRGS, Brazil. 150 pp.
- IUCN, 2008. IUCN Red List of Threatened Species. www.iucnredlist.org, downloaded in April 2009.
- Kelly, M.J., et al., 2008. Estimating puma densities from camera trapping across three study sites: Bolivia, Argentina, Belize. *J. Mammal.* 89, 408–418.
- Kumar, S., Tamura, K., Nei, M., 2004. Mega3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief. Bioinform.* 5, 2.
- Kurushima, J.D., Collins, J.A., Well, J.A., Ernest, H.B., 2006. Development of 21 microsatellite loci for puma (*Puma concolor*) ecology and forensics. *Mol. Ecol. Notes* 6, 1260–1262.
- LaRue, M.A., Nielsen, C.K., 2008. Modelling potential dispersal corridors for cougars in Midwestern North America using least-cost path methods. *Ecol. Model.* 212, 372–381.
- Lindzey, F.G., Van Sickle, W.D., Ackerman, B.B., Barnhus, D., Hemker, T.P., Laing, S.P., 1994. Cougar population dynamics in southern Utah. *J. Wildl. Manag.* 58, 619–624.
- Logan, K.A., Irwin, L.L., Skinner, R.L., 1986. Characteristics of a hunted mountain lion population in Wyoming. *J. Wildl. Manag.* 50, 648–654.
- Logan, K.A., Sweaner, L.L., 2001. *Desert Puma: Evolutionary Ecology and Conservation of an Enduring Carnivore*. Island Press, Washington, DC.
- Luo, S.J., Johnson, W.E., David, V.A., Menotti-Raymond, M., Stanyon, R., Cai, Q.X., Beck, T., Yuhki, N., Pecon-Slatery, J., Smith, J.L.D., O'Brien, S.J., 2007. Development of Y chromosome intraspecific polymorphic markers in the Felidae. *J. Hered.* 98, 400–413.
- Lyra-Jorge, M.C., Ciochetti, G., Pivello, V.R., 2008. Carnivore mammals in a fragmented landscape in northeast of São Paulo State, Brazil. *Biodivers. Cons.* 17, 1573–1580.
- Mace, O.M., Lande, R., 1991. Assessing extinction threats: towards a reevaluation of IUCN threatened species categories. *Cons. Biol.* 5, 148–157.
- Manel, S., Schwartz, M.K., Luikart, G., Taberlet, P., 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *TREE* 18, 189–197.
- Marins-Sá, L.G., 2005. Análise de predacão de Puma concolor em rebanhos domésticos na região do Parque Nacional de São Joaquim e entorno, SC, Brasil. M.Sc. Thesis. Curso de Pós-Graduação em Ecologia UFRGS: Porto Alegre 52 pp.
- Marshall, T.C., Slate, J., Kruuk, L.E.B., Pemberton, J.M., 1998. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Mol. Ecol.* 7, 639–655.
- Mazzolli, M., 1993. Ocorrência de *Puma concolor* (Linnaeus) (Felidae, Carnívora) em áreas de vegetação remanescente de Santa Catarina, Brasil. *Rev. Bras. Zool.* 10, 581–587.
- Mazzolli, M. 2006. Persistência e riqueza de mamíferos focais em sistemas agropecuários no planalto meridiano brasileiro. Ph.D. Thesis. UFRGS, Brazil 105 pp.
- Mazzolli, M., Graipel, M.E., Dunstone, N., 2002. Mountain lion depredation in southern Brazil. *Biol. Cons.* 105, 43–51.
- McRae, B.H., 2006. Isolation by resistance. *Evolution* 60, 1551–1561.
- McRae, B.H., Beier, P., 2007. Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19885–19890.
- McRae, B.H., Beier, P., Dewald, L.E., Huynh, Y., Keim, P., 2005. Habitat barriers limit gene flow and illuminate historical events in a wide-ranging carnivore, the American puma. *Mol. Ecol.* 14, 1965–1977.
- McRae, B.H., Dickson, B.G., Keitt, T.H., Shah, V.B., 2008. Using circuit theory to model connectivity in ecology, evolution, and conservation. *Ecology* 89, 2712–2724.
- McRae, B.H., Shah, V.B., 2009. *Circuitscape User Guide*. ONLINE. The University of California, Santa Barbara, Available at: <http://www.circuitscape.org>.
- Menotti-Raymond, M., David, V.A., Lyons, L.A., Schaffer, 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, M.P., 2005. Alleles in Space: computer software for the joint analysis of interindividual spatial and genetic information. *J. Hered.* 96, 722–724.
- Miotto, R.A., Rodrigues, F.P., Ciochetti, G., Galetti, P.M., 2007. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected Cerrado areas in the Brazilian Southeast. *Biotropica* 39, 647–654.
- MMA & Fundação Biodiversitas 2008. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. Ed. Machado, A.B.M., Drummond, G.M., Paglia, A.P. Brasília, DF, Belo Horizonte.
- Moreno, V.R., Grisolia, A.B., Campagnari, F., Milazzotto, M., Adania, C.H., Garcia, J.F., Souza, E.B., 2006. Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. *Genet. Mol. Biol.* 29, 290–293.
- Nowell, K., Jackson, P., 1996. *Wild Cats: Status, Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland.
- Nunney, L., 1993. The influence of mating system and overlapping generations on effective population size. *Evolution* 47, 1329–1341.
- Nunney, L., Campbell, K.A., 1993. Assessing minimum viable population size: demography meets population genetics. *TREE* 8, 234–239.
- Paviolo, A., Di Blanco, Y.E., De Angelo, C.D., Di Bitetti, 2009. Protection affects the abundance and activity patterns of pumas in the Atlantic Forest. *J. Mammal.* 90, 926–934.
- Pierce, B.M., Bleich, V.C., Jenkins, R.T., 2000. Social organization of mountain lions: does a land tenure system regulate population size? *Ecology* 81, 1533–1543.
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155, 945–959.
- Riley, S.J., Malecki, R.A., 2001. A landscape analysis of cougar distribution and abundance in Montana, USA. *Environ. Manag.* 28, 317–323.
- Robinson, H.S., Wielgus, R.B., Cooley, H.S., Cooley, S.W., 2008. Sink populations in carnivore management: cougar demography and immigration in a hunted population. *Ecol. Appl.* 18, 1028–1037.
- Rodzen, J.A., Banks, J.D., Meredith, E.P., Jones, K.C., 2007. Characterization of 37 microsatellite loci in mountain lions (*Puma concolor*) for use in forensic and population applications. *Cons. Gen.* 8, 1239–1241.

- Ross, P.I., Jalkotzy, M.G., 1992. Characteristics of a hunted population of cougars in southwestern Alberta. *J. Wildl. Manag.* 56, 417–426.
- Ruiz-García, M., Pacheco, L.F., Alvarez, D., 2009. Caracterización genética del puma andino boliviano (**Puma concolor**) en el Parque Nacional Sajama (PNS) y relaciones con otras poblaciones de puma del noroccidente de Sudamérica. *Rev. Chil. Hist. Nat.* 82, 97–117.
- Ruth, T., Logan, K.A., Sweanor, L., Hornocker, M.G., Temple, L.J., 1998. Evaluating cougar translocation in New Mexico. *J. Wildl. Manag.* 62, 1264–1275.
- Sambrook, J.E., Fritsch, F., Maniatis, T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Press, New York, NY.
- Shaw, H.G., Beier, P., Culver, M., Grigiore, M., 2007. *Puma Field Guide. The Cougar Network*.
- Silveira, L., 2004. Ecologia comparada e conservação do onça-pintado (**Panthera onca**) e onça-parda (*Puma concolor*), no Cerrado e Pantanal. Ph.D. Thesis, Universidade de Brasília, Brasília, Brazil.
- Stoner, D.C., Rieth, W.R., Wolfe, M.L., Mecham, M.B., Neville, A., 2008. Long-distance dispersal of a female cougar in basin and range landscape. *J. Wildl. Manag.* 72, 933–939.
- Storfer, A., Murphy, M.A., Evans, J.S., Goldberg, C.S., Robinson, S., Spear, S.F., Dezzani, R., Delmelle, E., Vierlin, L., Waits, L.P., 2007. Putting the 'landscape' in landscape genetics. *Heredity* 98, 128–142.
- Sweanor, L.L., Logan, K.A., Hornocker, M.G., 2000. Cougar dispersal patterns, metapopulation dynamics and conservation. *Cons. Biol.* 14, 798–808.
- Thompson, D.J., Jenks, J.A., 2005. Long-distance dispersal by a subadult male cougar from the Black Hills, South Dakota. *J. Wildl. Manag.* 69, 818–820.
- Trolle, M., Noss, A.J., Lima, E.S., Dalponte, J.C., 2007. Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil. *Biodivers. Cons.* 16, 1197–1204.
- Van Oosterhout, C., Hutchinson, W.F., Wills, D.P.M., Shipley, P., 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4, 535–538.
- Walker, C.W., Harveson, L.A., Pittman, M.T., Tewes, M.E., Honeycutt, R.L., 2000. Microsatellite variation in two populations of mountain lions (**Puma concolor**) in Texas. *Southw. Nat.* 45, 196–203.
- Waples, R.S., 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Cons. Gen.* 7, 167–184.

Appendix A. Supplementary data

Table 1S

Primer identification	Designed for	Reference
Fca391, Fca424, Fca441, Fca453	<i>Felis catus</i>	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
PcoB203w, PcoB210w, PcoD103w, PcoD217w	<i>Puma concolor</i>	Kurushima <i>et al.</i> 2006
PcoD8, PcoB105, PcoD329, PcoD301, PcoA2, PcoD303, PcoD310, PcoB323, PcoD323, PcoB115	<i>Puma concolor</i>	Rodzen <i>et al.</i> 2007

Table 1S: List of primers used, species for which the primer was designed, and reference.

Table 2S

N	Nucleotide positions								Haplotype	
							1	1		
	3	5	5	6	6	6	9	1	8	
	3	8	9	0	1	2	5	3	0	
02	C	T	T	T	T	A	G	G	G	H2
14	G	-	-	-	-	-	A	A	A	H1

Table 2S: Y-Chromosome DBY-7 intron haplotypes identified for mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. Numbers in vertical row refer to the aligned site for the 295 bp analyzed. N = number of individuals observed to have each kind of haplotype.

DISCUSSÃO

O leão-baio (*Puma concolor*) é a segunda maior espécie de felino das Américas e, na ausência da onça-pintada (*Panthera onca*), assume o papel de predador de topo. Embora exista um considerável conhecimento sobre aspectos ecológicos e genéticos quanto às populações da América do Norte (Anderson 1983, Ross e Jalkotzy 1992, Beier 1993, Lindzey e cols. 1994, Beier 1995, Beier e cols. 1995, Pierce e cols. 1999, Culver e cols. 2000, Ernest e cols. 2000, Pierce e cols. 2000, Sweanor e cols. 2000, Walker e cols. 2000, Logan e Sweanor 2001, Riley e Malecki 2001, Ernest e cols. 2002, 2003, Anderson e cols. 2004, McRae e cols. 2005, Shaw e cols. 2007, Culver e cols. 2008, LaRue e Nielsen 2008, Stoner e cols. 2008), pouco se sabe sobre as populações da América Central e do Sul (Mazzolli 1993, Culver e cols. 2000, Mazzolli e cols. 2002, Silveira 2004, Marins-Sá 2005, Moreno e cols. 2006, Miotto e cols. 2007, Trolle e cols. 2007, Kelly e cols. 2008, Paviolo e cols. 2009, Ruiz-Garcia e cols. 2009).

O presente trabalho é o primeiro estudo populacional de leões-baios no sul do Brasil utilizando marcadores moleculares. É também o primeiro a estimar a densidade populacional, utilizando dados genéticos, para essa região. O uso de *íntrons* do cromossomo Y polimórficos ao nível populacional, também é inéditos em estudos dessa espécie.

Os resultados obtidos nesta tese iniciam estudos moleculares que, em conjunto com estudos ecológicos, visam obter informações importantes de populações naturais de *Puma concolor* no sul do Brasil, buscando a conservação a longo prazo da espécie nesta região.

O objetivo desse trabalho foi o de determinar a variabilidade genética, a estrutura populacional e as ameaças enfrentadas gerando, desta forma, subsídios para o planejamento de ações prioritárias para a conservação do leão-baio no sul do Brasil.

Os resultados indicam que os leões-baios do sul do Brasil parecem estar sofrendo pela perda de variabilidade genética recente, com evidências de gargalo de garrafa, eminente perda de alelos, pequeno tamanho efetivo (Capítulo 1) e baixa densidade (Capítulo 2). O gargalo de garrafa e a consequente perda de variabilidade genética parecem ter sido causados pela massiva perda de habitat consequente da derrubada da Mata Atlântica, em especial da fitofisionomia Floresta com Araucária, o ecossistema dominante na área de maior amostragem. Além da grande perda de ambiente que ocorreu em pouco mais de 100 anos (hoje restam apenas 11,26% da área original da mata Atlântica e 12,6% da Floresta com Araucária – Ribeiro e cols. 2009), houve também a redução e extinção local de espécies de presas e a perseguição direta por humanos que resulta na caça ilegal da espécie e redução de seu tamanho populacional.

A perda da variabilidade genética desta população se evidencia na comparação entre estudos com marcadores moleculares em outras populações da espécie. Culver e cols. (2000) observaram que os leões-baios norte-americanos formam uma população única e panmítica, compartilhando o mesmo haplótipo de mtDNA e mostrando heterozigidade e número de alelos/loco menor do que o observado para indivíduos da América do Sul e Central.

Os mesmos autores observaram que as amostras do leste da América do Sul, referente a sub-espécie *P. c. capricornensis*, tem a maior variação genética, com a maior heterozigidade, maior número de alelos/loco e maior variação de haplótipos de mtDNA, sendo estes os mais ancestrais em relação a toda a distribuição da espécie. Isto sugere que no sul do Brasil, onde temos a subespécie *P. c. capricornensis*, deveríamos encontrar uma grande variação genética. No entanto, a variabilidade observada neste estudo é menor do que a encontrada para indivíduos norte-americanos quando

utilizamos *primers* espécie-específicos. Também, quando comparamos a variabilidade genética dos indivíduos do sul do Brasil com outras populações da América do Sul a riqueza de alelos é menor na população brasileira. Tal aspecto é ainda mais preocupante, pois se utilizou *primers* descritos para *P. concolor* no presente estudo, enquanto os demais empregaram *primers* descritos para *Felis catus* (i.e. heterólogos). Considera-se que *primers* espécie-específicos detectam maior heterozigosidade e número médio de alelos/loco do que *primers* heterólogos (Garner e cols. 2005).

Outro fator de ameaça importante para grandes carnívoros em todo o mundo é a fragmentação e perda de habitat (Nowell e Jackson 1996, Cullen e cols. 2005, Haag 2009).

O *Puma concolor* tem capacidade de dispersar longas distâncias (Ruth e cols. 1998, Sweanor e cols. 2000, Stoner e cols. 2008) e utilizar áreas abertas (Logan e Sweanor 2001), embora prefiram áreas com maior cobertura vegetal e menor densidade humana (LaRue e cols. 2009, LaRue 2007). Estas características facilitam o fluxo gênico mesmo em paisagens modificadas. Ruiz-Garcia e cols. (2009) encontraram grande similaridade genética entre populações na América do Sul, também na América do Norte foi observada similaridade genética (Culver e cols. 2000) e ausência de estruturação (Sinclair e cols. 2001, Anderson e cols. 2004). Outros estudos na América do Norte encontraram estruturação provavelmente relacionada à distância e a barreiras como desertos abertos, áreas de pastagem e agricultura (Walker e cols. 2000 Ernest e cols. 2003, McRae e cols. 2005).

Embora esta população esteja perdendo variação genética não foi encontrada estruturação entre os diferentes pontos amostrais, sugerindo que todos os indivíduos coletados fazem parte de uma mesma população panmítica. As análises da paisagem e de uso de territórios parecem corroborar este resultado. Apesar de estar extremamente

fragmentada e ser um ecossistema muito ameaçado por desmatamento, com apenas 11,26% de sua área original remanescente (Ribeiro e cols. 2009) a Mata Atlântica e sua paisagem no sul do Brasil ainda parecem ser permeáveis ao trânsito de leões-baios e permitem a existência de fluxo gênico.

Outro fator indicando conectividade na paisagem é a substituição de territórios por morte do leão-baio por indivíduos não aparentados sugerindo que os indivíduos conseguem dispersar, não estando restritos aos territórios próximos de sua localidade natal, essa situação pode aumentar o grau de endogamia de uma população (Maehr e cols. 2002).

Apesar da caça recreativa e profissional ser proibida pela legislação Brasileira e considerada crime desde 1977 pela Lei 5.197, ainda é muito praticada ilegalmente em diversos estados e regiões do país (Cullen e cols. 2000, Mazzolli e cols. 2002, Paviolo e cols. 2009). Atualmente, o principal motivo de caça de leões-baios é a retaliação devido a perdas financeiras causadas por predação de criações domésticas, conflito bastante intenso no sul do Brasil (Mazzolli e cols. 2002, Marins-Sá 2005), o qual é apontado como a principal causa de mortalidade dos indivíduos amostrados nessa região (Capítulo 1) e um importante fator de impacto para a população de leões-baios.

O conflito entre leões-baios e fazendeiros é documentado no sul do Brasil desde a década de 1990 até os dias de hoje (Mazzolli e cols. 2002, Marins-Sá 2005). Os diferentes rebanhos domésticos são predados, o prejuízo econômico e a proporção da perda de animais é diferente para cada tipo rebanho, idade do animal doméstico e tipos de manejo aplicados pelo proprietário (Marins-Sá 2005, Mazzolli e cols. 2002, Palmeira e cols. 2008, Michalski e cols. 2006). Embora muitos produtores mostrem-se dispostos a implantar medidas de manejo preventivo (Michalski e cols. 2006) à perseguição, a

morte do predador ainda é a medida de controle mais utilizada pelos fazendeiros (Quigley e Crawshaw 1992, Mazzolli e cols. 2002, este estudo).

O efeito negativo da caça em população de leões-baios é consenso entre pesquisadores (Logan e Sweanor 2001, Robinson e cols. 2008, McKinney e cols. 2009, Paviolo e cols. 2009) e pode contribuir para o declínio de uma população local, abundância e densidade da espécie (Lindzey e cols. 1992, Cullen e cols. 2000, Anderson and Lindzey 2005, Lambert e cols. 2006, Stoner e cols. 2006, Robinson e cols. 2008, Galetti e cols. 2009, Paviolo e cols. 2009) e número de fêmeas adultas (Robinson e cols. 2008, McKinney e cols. 2009). A caça intensiva, especialmente em fêmeas adultas pode reduzir a abundancia relativa e taxas de sobrevivência (Cunningham e cols. 2001, Logan and Sweanor 2001, Anderson e Lindzey 2005, Lambert e cols. 2006, Stoner e cols. 2006, Laundre e cols. 2007).

Áreas com alta intensidade de caça com abundância de espécies de presas e boa qualidade ambiental tornam-se atraentes para jovens dispersores podendo aumentar a imigração de jovens machos para uma dada área (Logan e cols. 1986, Robinson e cols. 2008). Além de camuflar a perda de indivíduos por caça e manter a densidade da população inalterada por um período de tempo, este aumento na imigração torna a população mais jovem e diminui a densidade de fêmeas (Logan e cols. 1986, Robinson e cols. 2008). Outra possível consequência é o aumento no conflito entre leões-baios e fazendeiros, na maioria das vezes causado por indivíduos com as características dos jovens imigrantes (Beier 1991). Essa intensificação do conflito pode causar a falsa impressão de um aumento na população de leões-baios, provocando como resposta um aumento na pressão de caça (Lambert e cols. 2005).

Os leões-baios do sul do Brasil sofreram gargalo de garrafa recente e o pequeno tamanho efetivo estimado para a população ($N_e=16,5$) chama a atenção para a

possibilidade de perda de 50% da variabilidade genética em 23,1 ($1,4 N_e$) gerações. Este tamanho efetivo populacional menor do que 50 indivíduos também sugere uma baixa possibilidade de manutenção a longo prazo desta população e de seu potencial evolutivo. Isso aumenta a possibilidade de ocorrência de depressão endogâmica, diminui a capacidade de responder a mudanças ambientais e aumenta o risco de extinção desta população.

As densidades estimadas de 0,09 e 0,32 leões-baio/100 km² ($N_e/N=0,11$ e 0,4 respectivamente) são ainda mais baixas do que a estimada por Paviolo e cols. (2009) para uma população da Mata Atlântica sofrendo alto impacto de caça (Tabela 1, Introdução). Esse fato corrobora os resultados que indicam a caça como um importante fator de impacto para a região estudada.

Perspectivas futuras

Será de grande importância estender as análises moleculares para áreas de ocorrência desta espécie indicadas como possíveis fontes de migrantes pelo mapa de conectividade gerado no Capítulo 2, visando identificar fluxo gênico entre populações, indivíduos migrantes e suas populações-fonte.

O aumento no número de amostras desta população e o monitoramento de sua situação genética ao longo do tempo são de extrema importância para a permanência a longo prazo desta população natural, visto que sofreu um gargalo de garrafa recente com perda de variabilidade genética e tem seu tamanho efetivo populacional diminuído.

Estratégias visando diminuir a pressão de caça sobre esta população precisam ser determinadas e colocadas em prática, pois essa parece ser a maior ameaça enfrentada atualmente pela espécie no sul do Brasil. Além disso, a caça severa e constante em um

local com abundância de presas e ambiente de boa qualidade pode diminuir a densidade de leões-baios de uma grande área, já que constantemente migrantes saem de áreas fonte adjacentes e são caçados (Robinson e cols. 2008). Desta forma, mesmo que áreas próximas tenham uma pressão de caça menor, esta área pode estar diminuindo a população de leões-baios do sul do Brasil como um todo.

Apenas iniciativas práticas que visem à diminuição das perdas financeiras bem como o envolvimento de produtores rurais e da comunidade local serão efetivas para a conservação da espécie. Apesar da intensidade desse conflito no Brasil, estudos indicam que a perda financeira e de animais domésticos de grande porte para predadores em propriedades com manejo preventivo é menor do que as perdas para outras causas (Mazzolli e cols. 2002, Palmeira e cols. 2008). A maioria dos fazendeiros entrevistados (53.2%) mostrou-se interessada em utilizar métodos não-letais para controlar os níveis de predação em suas propriedades (Michalski e cols. 2006). Estes resultados sugerem que é possível sensibilizar e contar com a participação de fazendeiros e da população local em programas de conservação para a espécie.

Apesar de fragmentada, a paisagem permanece permeável à movimentação da espécie. No entanto, é necessário manter a conectividade, visto que esta população já mostra indicativos de perda de variabilidade genética embora não esteja estruturada ou isolada.

As unidades de conservação de proteção integral, federais e estaduais, dos estados do sul do Brasil têm área menor do que os 2.200km² (www.mma.gov.br) indicados para evitar a extinção (sem levar em consideração efeitos de endocruzamento) causada por estocasticidade demográfica e ambiental por um período de 100 anos (Beier 1993). Isto reforça a idéia de que a conservação de grandes felinos depende de áreas

particulares tanto quanto de áreas públicas protegidas, aumentando a necessidade de envolvimento da população humana em planos de ação para a espécie.

A conservação de grandes carnívoros, de maneira geral, depende da conectividade da paisagem entre áreas protegidas e da mitigação do conflito com a população humana. No caso particular da população de leões-baios do sul do Brasil, sugerimos como ações prioritárias o desenvolvimento de estratégias que reduzam o conflito com fazendeiros, o principal impacto observado para esta população, e a manutenção da permeabilidade e da conectividade da paisagem de forma que áreas protegidas estejam conectadas entre si e também entre regiões sem proteção legal utilizadas pela espécie. Estas ações devem estar vinculadas a programas de educação ambiental, de forma que a população humana que convive com a espécie entenda seu papel nos ecossistemas, sua importância para a saúde e qualidade de vida humana, o real impacto econômico e as formas de minimizar e/ou evitar o conflito.

O sucesso das iniciativas de conservação de espécies de predadores depende da redução do impacto financeiro dos carnívoros na vida das pessoas (de maneira geral, impacto nas criações domésticas) e da valorização e reconhecimento da importância da manutenção dos mesmos na natureza. 🐾

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allendorf FW (1986) Genetic drift and the loss of alleles versus heterozygosity. *Zoo Biology* 5: 181–190
- Allendorf FW, England PR, Luikart G, Ritchie PA, Ryman N (2008) Genetic effects of harvest on wild animal populations. *Trends in Biology and Evolution* 23: 327–337.
- Anderson A (1983) A critical review of literature on puma (*Felis concolor*). Colorado Division of Wildlife. Wildlife research Section. Special Report Number 54: 91.
- Anderson CR, Lindzey FG, McDonald DB (2004) Genetic structure of cougar populations across the Wyoming Basin: metapopulation or megapopulation. *Journal of Mammalogy* 85: 1207–1214.
- Anderson CR, Lindzey FG (2005) Experimental evaluation of population trend and harvest composition in a Wyoming cougar population. *Wildlife Society Bulletin* 33: 179–188.
- Azevedo FCC (2008) Food habits and livestock depredation of sympatric jaguars and pumas in the Iguaçú National Park area, south Brazil. *Biotropica* 40: 494–500.
- Bacha CJC, Barros ALMB, (2004) Reflorestamento no Brasil: evolução recente e perspectivas para o futuro. *Scientia Forestalis* 66: 191–203.
- Balkenhol N, Gugerli F, Cushman SA, Waits LP, Coulon A, Arntzen JW, Holderegger, Wagner HH (2009) Identifying future research needs in landscape genetics: here to from here? *Landscape Ecology* 24: 455–463
- Baptista SR, Rudel TK (2006) A re-emerging Atlantic Forest? Urbanization, industrialization and the forest transition in Santa Catarina, southern Brazil. *Environmental Conservation* 33: 195–202.
- Beaumont M, Barratt EM, Gattelli D, Kitchener AC, Daniels MJ, Pritchards JK, Bruford MW (2001) Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology* 10: 319–336.
- Beier P (1991) Cougar attacks on humans in the United States and Canada. *Wildlife Society Bulletin* 19: 403–412.
- Beier P (1993) Determining minimum habitat areas and habitat corridors for cougars. *Conservation Biology* 7: 94–108.
- Beier P (1995) Dispersal of juvenile cougars in fragmented habitat. *Journal of Wildlife Management* 59: 228–237.
- Beier P (1996) Metapopulation models, tenacious tracking, and cougar conservation. Pp. 293–323 em: *Metapopulations and Wildlife Conservation* (ed. McCullough DR), Island Press, Washington, D.C.
- Beier P, Choate D, Barret RH (1995) Movement patterns of mountain lions during different behaviors. *Journal of Mammalogy* 76: 1056–1070.
- Bellemain E, Swenson JE, Tallmon D, Brunberg S, Taberlet P (2005) Estimating population size of elusive animals with DNA for hunter-collected feces: four methods for brown bears. *Conservation Biology* 19: 150–161.
- Bishop JM, Leslie AJ, Bourquin SL, O’Ryan C (2009) Reduced effective population size in an overexploited population of the Nile crocodile (*Crocodylus niloticus*). *Biological Conservation* 142: 2335–2341.
- Blouin MS, Parson M, Lacaille V, Lotz S (1996) Use of microsatellite loci to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology* 5: 393–401.
- Bonnell ML, Selander RK (1974) Elephant Seals: genetic variation and near extinction. *Science* 184: 908–909.
- Brito BFA (2000) Ecologia alimentar da onça-parda, *Puma concolor*, na Mata Atlântica de Linhares, Espírito Santo, Brasil. Dissertação de Mestrado apresentada ao Departamento de Pós-graduação em Ecologia da Universidade de Brasília, Brasília.

- Castilho CS (2004) Análise cromossômica e de microssatélites em uma zona de hibridação intra-específica de *Ctenomys minutus* (Rodentia-Ctenomyidae). Dissertação de Mestrado, Curso de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular UFRGS, Porto Alegre 75p.
- Castilho CS, Marins-Sá LG, Benedet RC, Freitas TRO (*in press*) Landscape genetics of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. *Mammalian Biology*. doi:10.1016/j.mambio.2010.08.002
- Chetkiewicz CLB, Clair CCS, Boyce MS (2006) Corridors for conservation: integrating pattern and process. *Annual Review of Ecology Evolution and Systematics* 37: 317–342.
- Ciofi C, Bruford MW (1999) Genetic structure and gene flow among Komodo Dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. *Molecular Ecology* 8: S17-S30.
- CITES – Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. *CITES species database* (2009) Disponível em <http://www.cites.org/> acesso em: 03 set. 2009.
- Cornuet JM, Luikart G (1997) Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144: 2001-2014
- Cullen L, Bodmer RE, Valladares-Padua C (2000) Effects of hunting in habitat fragments of the Atlantic forests, Brazil. *Biological Conservation* 95: 49–56.
- Culver M, Johnson WE, Pecon-Slattery J, O'Brien SJ (2000) Genomic ancestry of the American puma (*Puma concolor*). *Journal of Heredity* 91: 186–197.
- Culver M, Menotti-Raymond MA, O'Brien SJ (2001) Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in Pumas (*Puma concolor*). *Molecular Biology and Evolution* 18: 1151-1156.
- Culver M, Hedrick PW, Murphy K, O'Brien S, Hornocker MG (2008) Estimation of the bottleneck size in Florida panthers. *Animal Conservation* 11: 104-110.
- Cunningham SC, Ballard WD, Whitlaw HA (2001) Age structure, survival, and mortality of mountain lions in southeastern Arizona. *Southwestern Naturalist* 46: 76–80.
- Currier MJ (1983) *Felis concolor*. *Mammalian Species* 200: 1-7.
- Dalén L, Kvaløy K, Linnell JDC, Elmhagen B, Strand O, Tannerfeldt M, Henttonen H, Fuglei E, Landa A and Ngerbjörn A (2006) Population structure in a critically endangered arctic fox population: does genetics matter? *Molecular Ecology* 15: 2809–2819.
- DeSalle R and Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nat Rev Genet* 5: 702-712.
- Di Rienzo A, Peterosn AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple sequence repeat loci n human populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 3166- 170.
- Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Crawshan PR, O'Brien SJ, Johnson WE (2001) Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* 10: 65-79.
- Eizirik E, Indrusiak CB, Jonhson WE (2002) Análisis de la viabilidad de las poblaciones de Jaguar: evaluación de parámetros y estudios de caso en tres poblaciones remanentes del sur de Sudamérica. In *El Jaguar en el Nuevo Milenio* (eds RA Medellín, C Equihua, ChL Chetkiewicz, PG Crawshaw, A Rabinowitz, KH Redford e cols.), pp. 501–518. Editorial Ediciones Científicas Universitarias, México DF, Mexico.
- Eizirik E, Haag T, Santos AS e cols. (2008) Jaguar Conservation Genetics. *Cat News Special Issue: The Jaguar in Brazil* 4: 31-34.

- Ernest HB, Penedo MCT, May BP, Syvanen M, Boyce WM (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.
- Ernest HB, Rubin ES, Boyce WM (2002) Fecal DNA analysis and risk assessment of mountain lion predation of bighorn sheep. *Journal of Wildlife Management* 66: 75-85.
- Ernest HB, Boyce WM, Bleich VC, May BP, Stiver SJ, Torres SG (2003) Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conservation Genetics* 4: 353-366.
- Estes JA (1996) Carnivores and ecosystem management. *Wildlife Society Bulletin* 24: 390-396.
- Fonseca GAB (1985) The vanishing Brazilian Atlantic forest. *Biological Conservation* 34: 17-34.
- Frankel OH, Soulé ME (1981) *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press.
- Frankham R (1995) Effective Population Size/Adult Population Size Ratios in Wildlife: a Review. *Genetic Research Cambridge* 66: 95-107.
- Frankham R, Lees K, Montgomery ME, England PR, Lowe EH, Briscoe DA (1999) Do population size bottlenecks reduce evolutionary potential? *Animal Conservation* 2: 255-260.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe D (2005) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press 617pp.
- Franklin IR (1980) Evolutionary change in small populations. In Soulé ME, Wilcox BA eds *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Franklin WL, Johnson WE, Sarno RJ, Iriarte JA (1999) Ecology of the Patagonia puma *Felis concolor patagonica* in southern Chile. *Biological Conservation* 90: 33-40.
- Frantz AC, Schaul M, Pope LC, Fack F, Schley L, Muller CP, Roper TJ (2004) Estimating population size by genotyping remotely plucked hair: the Eurasian badger. *Journal of Applied Ecology* 41: 985-995.
- Galetti M, Giacomini HC, Bueno RS, Bernardo CSS, Marques RM, Bovendorp RS, Steffler CE, Rubim P, Gobbo SK, Donatti CI, Begotti RA, Meirelles F, Nobre RA, Chiarello AG, Peres CA (2009) Priority areas for the conservation of Atlantic forest large mammals. *Biological Conservation* 142: 1229-1241.
- García D, Carleos C, Parra D, Cañón J (2002) Sib-parentage testing using molecular markers when parents are unknown. *Animal Genetics* 33: 364-371.
- Garner A, Rachlow JL, Hicks JF (2005) Patterns of genetic diversity and its loss in mammalian populations. *Conservation Biology* 19: 1215-1221.
- Gava, A. & Freitas, T. R. O. 2004. Microsatellite analysis of a hybrid zone between chromosomally divergent populations of *Ctenomys Minutus* from southeastern Brazil (Rodentia: Ctenomyidae). *Journal of Mammalogy* 85:1201-1206.
- Graipel M, Cherem JJ (1997) Preliminary analysis of food items of mountain lions in southern Brazil. 5^a Reunião Especial da SBPC (Anais): 348-349.
- Grigione MM, Beier P, Hopkins RA, Neal D, Padley WD, Schonewald CM, Johnson ML (2002) Ecological and allometric determinants of home-range size for mountain lions (*Puma concolor*). *Animal Conservation* 5: 317-324.
- Grisolia AB, Moreno VR, Campagnari F, Milazzotto MP, Garcia JF, Adania CH, Souza EB (2007) Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*, *Genetics Molecular Resources* 6: 382-389.

- Haag T (2009) Genética da conservação e ecologia molecular de onças-pintadas (*Panthera onca*, Felidae). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. 150pp.
- Haag T, Santos AS, Sana DA, Morato RG, Cullen Jr L, Crawshaw Jr PG, De Angelo C, Di Bitetti MS, Salzano FM, Eizirik E (2010) The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology* 19(22): 4906-4921
- Hájková P, Pertoldi C, Zemanová B, Roche K, Hájek B, Bryja J and Zima J (2007) Genetic structure and evidence for recent population decline in Eurasian otter populations in the Czech and Slovak Republics: implications for conservation. *Journal of Zoology* 272: 1-9.
- Hansen K (1992) Cougar: the American Lion. Mountain Lion Foundation and Northland Press, Flagstaff, Arizona.
- Hemker TP, Lindzey FG, Ackerman BB (1984) Population characteristics and movements patterns of cougars in southern Utah. *Journal of Wildlife Management* 48: 1275-1284.
- Henke SE, Bryant FC (1999) Effects of coyote removal on the faunal community in western Texas. *Journal of Wildlife Management* 63: 1066-1081.
- Holderegger R, Wagner HH (2006) A brief guide to landscape genetics. *Landscape Ecology* 21: 793-796.
- Holderegger R, Wagner HH (2008) Landscape genetics. *Bioscience* 58: 199-207.
- Indrusiak C, Eizirik E (2003) Carnívoros. Em: Fontana CS, Bencke GA, Reis RE (Eds) Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre, EDIPUCRS: 507-533.
- Iriarte JA, Franklin WL, Johnson WE, Redford KH (1990) Biogeographic variation of food habitats and body size of the American puma. *Oecologia* 85: 185-190.
- Iriarte JA, Johnson WE, Franklin WL (1991) Feeding ecology of the Patagonia puma in southernmost Chile. *Revista Chilena de História Natural* 64: 145-156.
- IUCN (2008) IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>. Downloaded in April, 2009.
- Johnson W, O'Brien SJ (1997) Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Journal of Molecular Evolution* 44: S98-S116.
- Johnson WE, Pecon-Slattery J, Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Bonacic C, Cambre R, Crawshaw P, Nunes A, Seuánez HN, Moreira MAM, Seymour KL, Simon F, Swanson W, O'Brien SJ (1999) Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology* 8: S79-S92.
- Johnson WE, Eizirik E, Waits L, O'Brien SJ (2006) Molecular ecology and carnivore conservation: the application of molecular techniques for inferring identity, kinship, and social structure in the neotropics. Em: Morato e cols. (Eds) Manejo e conservação de carnívoros neotropicais. MMA/IBAMA: 69-84.
- Kashi Y, King D, Soller M (1997) Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *TIG* 13: 74-77.
- Kelly MJ et al (2008) Estimating puma densities from camera trapping across three study sites: Bolivia, Argentina, Belize. *Journal of Mammalogy* 89: 408-418.
- Kimura M, Crow JF (1964) The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics* 49: 725-738.

- Kohn MH, York EC, Denise AK, Haught G, Sauvajot RM, Wayne RK (1998) Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society, London* 266: 637-663.
- Kuo CH, Janzen FJ (2004) Genetic effects of a persistent bottleneck on a natural population of ornate box turtles *Terrapene ornata*. *Conservation Genetics* 5: 425–437.
- Lambert CMS, Wielgus RB, Robinson HS, Katnik DD, Cruickshank HS, Clarke R, Almack J (2006) Cougar population dynamics and viability in the Pacific Northwest. *Journal of Wildlife Management* 70: 246-254.
- Larson S e cols. (2002) Microsatellite DNA and mitochondrial DNA variation in remnant and translocated sea otter (*Enhydra lutris*) populations. *Journal of Mammalogy* 83: 893–906
- LaRue MA, (2007). Predicting potential habitat and dispersal corridors for cougars in midwestern North America. Thesis. Southern Illinois University, Carbondale, IL, USA.
- LaRue MA, Nielsen CK (2008) Modelling potential dispersal corridors for cougars in Midwestern North America using least-cost path methods. *Ecological Modelling* 212: 372-381.
- Laundre JW, Hernández L, Clark SG (2007) Numerical and demographic responses of pumas to changes in prey abundance: testing current predictions. *Journal of Wildlife Management* 71: 345–355.
- Lee-Yaw JA, Davidson A, McRae BH, Greens DM (2009) Do landscape processes predict phylogeographic patterns in the wood frog? *Molecular Ecology* 18: 1863-1874.
- Lindzey FG, Van Sickle WD, Laing SP, Mecham CS (1992) Cougar Population Response to Manipulation in Southern Utah. *Wildlife Society Bulletin* 20: 224-227.
- Lindzey FG, Van Sickle WD, Ackerman BB, Barnhust D, Hemker TP, Laing SP (1994) Cougar population dynamics in southern Utah. *Journal of Wildlife Management* 58: 619-624.
- Logan KA, Irwin LL, Skinner RL (1986) Characteristics of a hunted mountain lion population in Wyoming. *Journal of Wildlife Management* 50: 648-654.
- Logan KA and Sweanor LL (2001) *Desert Puma: Evolutionary ecology and conservation of an enduring carnivore*. Island Press. Washington, DC.
- Luo SJ, Johnson WE, David VA, Menotti-Raymond M, Stanyon R, Cai QX, Beck T, Yuhki N, Pecon-Slattery J, Smith JLD, O'Brien SJ (2007). Development of Y chromosome intraspecific polymorphic markers in the Felidae. *Journal of Heredity* 98(5):400-413.
- McKinney T, Smith TW, Waddell RB (2009) Rates of survival and sources of mortality of cougars in hunted populations in north-central Arizona. *The Southwestern Naturalist* 54: 151–155
- McNab BK (1971) On the ecological significance of Bergmann's rule. *Ecology* 52: 845-854.
- McRae BH, Beier P, Dewald LE, Huynh 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.
- McRae BH (2006) Isolation by resistance. *Evolution* 60: 1551–1561.
- McRae BH, Beier P (2007) Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 19885–19890.

- McRae BH, Dickon BG, Keitt TH, Shah VB (2008) Using circuit theory to model connectivity in ecology, evolution and conservation. *Ecology* 89: 2712-2724.
- Maehr DS, Land ED, Shindle DB, Bass OL, Hoctor TS (2002) Florida panther dispersal and conservation. *Biological Conservation* 106: 187-197.
- Manel S, Schwartz MK, Luikart G, Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189-197.
- Margarido TCM, Braga FG (2004) Mamíferos. Em: Mikich SB, Bérnils RS (Eds) Livro Vermelho da Fauna Ameaçada no Estado do Paraná. Curitiba: Secretaria Estadual de Meio Ambiente, Instituto Ambiental do Paraná: 25-142.
- Marins-Sá LG (2005) Análise de predação de *Puma concolor* em rebanhos domésticos na região do Parque Nacional de São Joaquim e entorno, SC, Brasil. Dissertação de Mestrado. Curso de Pós-Graduação em Ecologia UFRGS: Porto Alegre 52p.
- Marsden SJ, Whiffin M, Galetti M, Fielding AH (2005) How well will Brazil's system of Atlantic Forest reserves maintain viable bird populations? *Biodiversity and Conservation* 14: 2835-2853.
- Marshall LG, Webb SD, Sepkoski JJ, Raup DM (1982) Mammalian evolution and the great interchange. *Science* 215:1351-1357.
- Marshall TC, Slate J, Kruuk LEB, Pemberton JM (1998) Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. *Molecular Ecology* 7: 639-655.
- Mattern MY, McLennan DA (2000) Phylogeny and Speciation of Felids *Cladistics* 16: 232 - 253
- Mazzolli M (1993) Ocorrência de *Puma concolor* (Linnaeus) (Felidae, Carnívora) em áreas de vegetação remanescente de Santa Catarina, Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 10: 581-587.
- Mazzolli M, Graipel ME, Dunstone N (2002) Mountain lion depredation in southern Brazil. *Biological Conservation* 105: 43-51.
- Menotti-Raymond M, David VA, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O'Brien SJ (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57: 9-23.
- Menotti-Raymond M, O'Brien SJ (1995) Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. *The Journal of Heredity* 86: 319-322.
- Menotti-Raymond MM, David VA, Wachter LL, Butler JM, O'Brien SJ (2005) An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *Journal Forensic Science Society* 50: 1061-1070.
- Michalski F, Boulhosa RLP, Faria A, Peres CA (2006) Human-wildlife conflicts in a fragmented Amazonian forest landscape: determinants of large felid depredation on livestock. *Animal Conservation* 9: 179-188.
- Miller B, Dugelby B, Foreman D, Del Rio CM, Noss R, Phillips M, Reading R, Soulé ME, Terborgh J, Willicox L (2001) The importance of large carnivores to healthy ecosystems. *Endangered Species Update* 18: 202-210
- Miotto RA, Rodrigues FP, Ciocheti G, Galetti PM (2007) Determination of the Minimum Population Size of Pumas (*Puma concolor*) Through Fecal DNA Analysis in Two Protected Cerrado Areas in the Brazilian Southeast. *Biotropica* 39(5): 647-654.
- MMA/ Fundação Biodiversitas (2008) Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. ed. Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP. Brasília, DF, Belo Horizonte, MG.

- Montgomery ME, Woodworth LM, Nurthen RK, Gilligan DM, Briscoe DA, Frankham R (2000) Relationships between population size and loss of genetic diversity: comparisons of experimental result with theoretical predictions. *Conservation Genetics* 1: 33-43.
- Moreno VR, Grisolia AB, Campagnari F, Milazzotto M, Adania CH, Garcia JF, Souza EB (2006) Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. *Genetics and Molecular Biology* 29: 290-293.
- Morrison AS, Boyle WM (2009) Conserving Connectivity: Some lessons from mountain lions in southern California. *Conservation Biology* 23: 275-285.
- Morin PA, Moore JJ, Chakraborty R, Jin L, Goodall J, Woodruff DS (1994) Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. *Science* 265: 1193-1201.
- Moulin NL, Wyttenbach A, Brunner H, Goudet J, Hausser J (1996) Study of gene flow through a hybrid zone in the common shrew (*Sorex araneus*) using microsatellites. *Hereditas* 125: 159-168.
- Murray BW (1996) The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. <http://helix.biology.mcmaster.ca/brent>.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Negrões N, Sarmiento P, Cruz J e cols (2010). Use of Câmera-Trapping to estimate puma density and influencing factors in central Brazil. *Journal of Wildlife Management* 74: 1195- 1203.
- Nesje M, Roed KH, Lifjeld JT, Lindberg P, Steens OF (2000) Genetic relationships in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology* 9: 53-60.
- Noss RF, Quigley HB, Hornocker MG, Merrill T, Paquet PC (1996) Conservation biology and carnivore conservation in the Rocky Mountains. *Conservation Biology* 10: 949-964.
- Nowell K, Jackson P (1996) Wild Cats: Status, Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland.
- O'Brien SJ (1994) A role for molecular genetics in biological conservation. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 91: 5748-5755.
- O'Brien SJ, Evermann JF (1988) Interactive influence of infectious disease and genetic diversity in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 3: 254-259.
- O'Grady JJ, Reed DH, Brook BW, Frankham R (2008) Extinction risk scales better to generations than to years. *Animal conservation* 11: 442-451.
- Ohnishi N, Saitoh T, Ishibashi Y, Oi T (2007) Low genetic diversities in isolated populations of the Asian black bear (*Ursus thibetanus*) in Japan, in comparison with large stable populations. *Conserv Genet* 8: 1331-1337
- Ohta T, Kimura M (1973) A model of mutation appropriate to estimate the number of electrophoretically detectable alleles in a finite population. *Genetics Research* 22: 201 -204.
- Oliveira TG (1994) Neotropical Cats: Ecology and Evolution. EDUFMA, São Luiz, MA.244p.
- Paetkau D, Amstrup SC, Born EW, Calvert W, Derocher AE, Garner GW, Messier F, Stirling I, Taylor MK, Wiig O, Strobeck C (1999) Genetic structure of the world's polar bear populations. *Molecular Ecology* 8: 1571-1584.

- Palmeira FBL, Crawshaw Jr. PG, Haddad CM, Ferraz KMPMB, Verdade LM (2008) Cattle depredation by puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) in central-western Brazil. *Biological Conservation* 141: 118–125.
- Patterson BD, Kasiki SM, Selempo E, Kays RW (2004) Livestock predation by lions (*Panthera leo*) and other carnivores on ranches neighboring Tsavo National Parks, Kenya. *Biological Conservation* 119: 507–516.
- Paviolo A, De Angelo CD, Di Blanco YE, Di Bitetti (2008) Jaguar population decline in the Upper Parana Atlantic Forest of Argentina and Brazil. *Oryx* 42: 554–561.
- Paviolo A, Di Blanco YE, De Angelo CD, Di Bitetti (2009) Protection affects the abundance and activity patterns of pumas in the Atlantic Forest. *Journal of Mammalogy* 90: 926–934.
- Pease K, Freedman AH, Pollinger JP, McCormack JE, Buermann W, Rodzen J, Banks J, Meredith E, Bleich VC, Schaefer RJ, Jones K, Wayne RK (2009) Landscape genetics of California mule deer (*Odocoileus hemionus*): the roles of ecological and historical factors in generating differentiation. *Molecular Ecology* 18: 1848–1862
- Pecon-Slattery J, O'Brien SJ (1998) Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 148: 1245–1255.
- Pecon Slattery J, Sanner-Wachter L, O'Brien SJ (2000) Novel gene conversion between X-Y homologues located in the nonrecombining region of the Y chromosome in Felidae (Mammalia). *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97: 5307–5312.
- Pecon-Slattery J, Wilkerson AJP, Murphy WJ, O'Brien SJ (2004) Phylogenetic assessment of introns and SINEs within the Y chromosome using the cat family Felidae as a species tree. *Molecular Biology Evolution* 21: 2299–2309.
- Pierce BM, Bleich VC, Wehausen JD, Bowyer RT (1999) Migratory patterns of mountain lions: implications for social regulation and conservation. *Journal of Mammalogy* 80: 986–992.
- Pierce BM, Bleich VC, Jenkins RT (2000) Social organization of mountain lions: does a land tenure system regulate population size? *Ecology* 81: 1533–1543.
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: A program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. *Journal of Heredity* 90: 502–503.
- Quigley HB and Crawshaw PG Jr (1992) The conservation plans for the jaguar *Panthera onca* in the Pantanal region of Brazil. *Biological Conservation* 61: 149–157.
- Rabinowitz AR (1986) Jaguar predation on domestic livestock in Belize. *Wildlife Society Bulletin* 14: 170–174.
- Ray JC, Redford KH, Steneck RS, Berger J (2005) *Large Carnivores and the conservation of biodiversity*. Island Press. 526pp.
- Redford KH, Eisenberg JF (1992) *Mammals of the Neotropics. Vol.2 The Southern Cone*. University of Chicago Press. Chicago.
- Reed DH and Frankham R (2003) Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* 17: 230–237.
- Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FG, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. *Biological Conservation* 142: 1141–1153.
- Riley SJ, Malecki RA (2001) A landscape analysis of cougar distribution and abundance in Montana, USA. *Environmental Management* 28: 317–323.

- Robinson HS, Wielgus RB, Cooley HS, Cooley SW (2008) Sink populations in carnivore management: cougar demography and immigration in a hunted population. *Ecological Applications* 18: 1028-1037.
- Roelke ME, Martenson JS, O'Brien SJ (1993) The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered Florida panther. *Current Biology* 3: 340-350.
- Ross PI, Jalkotzy MG (1992) Characteristics of a hunted population of cougars in southwestern Alberta. *Journal of Wildlife Management* 56: 417-426.
- Ruiz-Garcia M, Pacheco LF, Alvarez D (2009) Caracterización genética del puma andino boliviano (*Puma concolor*) en el Parque Nacional Sajama (PNS) y relaciones con otras poblaciones de puma del noroccidente de Sudamérica. *Revista Chilena de Historia Natural* 82: 97-117.
- Russel KR (1980) Mountain Lion. In: Schmidt, J. L. e Gilbert, D. L. *Big Game of North América, Ecology and Management*. Wildlife Management Institute, Stackpole Books, USA. 207-225.
- Ruth T, Logan KA, Sweanor L, Hornocker MG, Temple LJ (1998) Evaluating cougar translocation in New Mexico. *Journal of Wildlife Management* 62: 1264–1275.
- Shaw HG, Beier P, Culver M, Grigiore M (2007) *Puma Field Guide*. The Cougar Network
- Sherman GB, Kachman SD, Hungerford LL, Rupp GP, Fox CP, Brown MD, Feuz BM, Holm TR (2004) Impact of candidate sire number and size relatedness on DNA polymorphism-based measures of exclusion probability and probability of unambiguous parentage. *Animal Genetics* 35: 220-226.
- Silva JMC, Casteleti CHM (2003) Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. In: Galindo-Leal C, Câmara IG (Eds.), *The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook*. CABS and Island Press, Washington, pp. 43–59.
- Silveira L (2004) *Ecologia comparada e conservação da onça-pintada (Panthera onca) e onça-parda (Puma concolor), no Cerrado e Pantanal*. Tese de doutorado. Universidade de Brasília, Brasil.
- Sinclair EA, Swenson EL, Wolfe ML, Choate DC, Bates B, Crandall KA (2001) Gene flow estimates in Utah's cougars imply management beyond Utah. *Animal Conservation* 4: 257-264.
- SOS Mata Atlântica/ Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (2009) *Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica Período de 2005-2008*. Relatório Parcial. São Paulo 156pp.
- Soulé ME (1980) Thresholds for survival: maintaining fitness and evolutionary potential. In Soulé ME, Wilcox BA eds *Conservation Biology: An evolutionary-ecological perspective*. Sunderland, Massachusetts: Sinauer.
- Spencer CC, Neigel JE, Leberg PL (2000) Experimental evaluation of the usefulness of microsatellite DNA for detecting demographic bottlenecks. *Molecular Ecology* 9: 1517-1528.
- Spielman D, Brook BW, Frankham R (2004) Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 101: 15261–15264.
- Stoner DC, Rieth WR, Wolfe ML, Mecham MB, Neville A (2008) Long-distance dispersal of a female cougar in basin and range landscape. *Journal of Wildlife Management* 72: 933-939.
- Storfer A, Murphy MA, Evans JS et al (2007) Putting the “landscape” in landscape genetics. *Heredity* 98: 128–142.

- Sweanor LL, Logan KA, Hornocker MG (2000) Cougar dispersal patterns, metapopulation dynamics and conservation. *Conservation Biology* 14: 798-808.
- Tautz D (1993) Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences. Pp. 21-28 em: DNA fingerprinting: state of the science. (Pena SDJ, Chakraborty R, Epplen JT & Jefreys AJ eds.) Birkhauser Verlag, Berlin.
- Tchaicka L, Eizirik E, Oliveira TG, Cândido Jr JF, Freitas TRO (2007) Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology* 16: 819-838.
- Terborgh J, Lopez L, Nuñez P, Rao M, Shahabudin G, Orihuela G, Riveros M, Ascanio R, Adler GH, Lambert TD, Balbas L (2001) Ecological meltdown in predator-free forest fragments. *Science* 294: 1923.
- Terborgh J, Feeley K, Silman M, Nuñez P, Balukjian B (2006) Vegetation dynamics of predator-free land-bridge islands. *Journal of Ecology* 94: 253–263.
- Trigo TC (2008) Hibridação e introgressão entre espécies de felídeos neotropicais (Mammalia, Carnivora). Tese de doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. 171pp.
- Trigo TC, Freitas TRO, Kunzler G, Cardoso L, Silva JCR, Johnson WE, O'Brien SJ, Bonatto SL and Eizirik E (2008) Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology* 17: 4317–4333.
- Trolle M, Noss AJ, Lima ES, Dalponte JC (2007) Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil. *Biodiversity and Conservation* 16: 1197–1204.
- Vernesi C, Bruford MW, Bertorelle G, Pecchioli E, Rizzoli A, Hauffe HC (2008) Where's the conservation in conservation genetics? *Conservation Biology* 22: 802-804.
- Waits L, Taberlet P, Swenson JE, Sandegren F, Franzen R (2000) Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctus*). *Molecular Ecology* 9: 421-431.
- Walker CW, Harveson LA, Pittman MT, Tewes ME, Honeycutt RL (2000) Microsatellite variation in two populations of mountain lions (*Puma concolor*) in Texas. *Southwestern Naturalist* 45: 196–203.
- Walker CW, Vilà C, Landa A, Lindén M, Ellegren H (2001) Genetic variation and population structure in Scandinavian wolverine (*Gulo gulo*) population. *Molecular Ecology* 10: 53-63.
- Wallauer JP, Becker M, Marins-Sá LG, Liermann LM, Perretto SH, Schermack V (2000) Levantamento dos mamíferos da Floresta Nacional de Três Barras - Santa Catarina. *Biotemas* 13: 103 – 127.
- Wang SW, McDonald DW (2006) Livestock predation by carnivores in Jigme Singye Wangchuck National Park, Bhutan. *Biological Conservation* 129: 558–565.
- Weaver JL, Paquet PC, Ruggiero LF (1996) Resilience and conservation of large carnivores in the Rocky Mountains. *Conservation Biology* 10: 964-976.
- Woodroffe R, Lindsey P, Romañach S, Stein A, Ranah SMK (2005) Livestock predation by endangered African wild dogs (*Lycaon pictus*) in northern Kenya. *Biological Conservation* 124: 225–234.
- Woods JG, Paetkau D, Lewis D, McLellan BN, Proctor M, Strobeck C (1999) Genetic tagging of free-ranging black and brown bears. *Wildlife Society Bulletin* 27: 616-627.

ANEXOS



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS (DIFAP)
COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA (CGFAU)
LICENÇA PARA CAPTURA/COLETA /TRANSPORTE

NÚMERO DA LICENÇA 051/2006 – COFAN	Nº DE REGISTRO NO IBAMA *****	PERÍODO DE VALIDADE 09/3/2006 a 09/3/2007	PROCESSO IBAMA 02001.007257/2005
---------------------------------------	----------------------------------	--	-------------------------------------

OBJETO:

- CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- TRANSPORTE DE MATERIAL ZOOLOGICO
- COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)
- TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA
- EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES
- MANUTENÇÃO DE ANIMAIS EM CATIVEIRO
- OUTROS:

FAVORECIDO:

- ZOOLOGICO
- INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
- PESQUISADOR
- EXPOSITOR/CONCURSO
- CRIADOURO COMERCIAL
- CRIADOURO CIENTÍFICO
- OUTROS:

FAVORECIDOS

NOME(S): Camila Schlieper de Castilho, Thales Renato Ochotorena de Freitas e Luiz Guilherme Marins de Sá.

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Biociências.

ENDEREÇO: Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, 91501-970.

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO: Camila Schlieper de Castilho.

TRANSPORTADOR: Pesquisadores favorecidos.

MEIO DE TRANSPORTE: Terrestre / Aéreo.

PROCEDÊNCIA/LOCAL DA CAPTURA/LOCAL DA PESQUISA: Entorno do Par. Nacional de São Joaquim e municípios de Urubici, Grão Pará, Orleans, Bom Jardim da Serra, São Joaquim, Lages, Rio Rufino, Paineal e Urupema, SC.

DESTINO DO MATERIAL: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
Coleta de 60 (sessenta) amostras de pele e tecidos	<i>Puma concolor</i>	Leão-baio

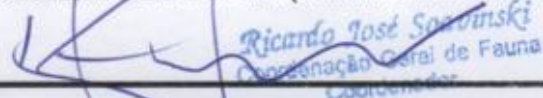
OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES:

- Esta licença não permite a captura de animais para a obtenção das amostras de material biológico, uma vez que a coleta dar-se-á apenas das amostras encontradas em propriedades particulares ou através de animais mortos por atropelamento.
- O responsável pela expedição deverá apresentar relatório de atividades ao término da validade desta licença.
- O responsável pela expedição deverá encaminhar ao Ibama cópia dos frontispícios das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes objeto desta licença.
- Esta licença não exime o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01 que dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético. No caso de acesso ao componente do patrimônio genético, este somente se dará mediante a autorização do Ibama, nos termos da Medida Provisória nº 2.186-16/2001 e Decretos nº 3.945/2001 e nº 4.946/2003.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO

Brasília (DF), 09 de março de 2006.

AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO)


Ricardo José Szewinski
Coordenação Geral de Fauna
Licenciamento

• ESTA LICENÇA NÃO AUTORIZA:

- CAPTURA DE ESPÉCIES QUE CONSTEM NAS LISTAS OFICIAIS (FEDERAIS, ESTADUAIS E MUNICIPAIS) DA FAUNA E FLORA BRASILEIRA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, ESPÉCIES ENDÊMICAS OU RARAS, OU QUE CONSTEM NOS ANEXOS I DA CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DE ESPÉCIES DA FAUNA E DA FLORA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO (CITES), SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
 - CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES DA FAUNA NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
 - CAPTURA DOS ESPÉCIMES DA FAUNA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO, ARRENDATÁRIO, POSSEIRO OU MORADOR DA ÁREA;
 - CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES FAUNA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
 - EXPORTAÇÃO DE MATERIAL ZOOLOGICO OU REMESSA (PARA O EXTERIOR) DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO.
- VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.



INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS
DIRETORIA DE FAUNA E RECURSOS PESQUEIROS (DIFAP)
COORDENAÇÃO GERAL DE FAUNA (CGFAU)
AUTORIZAÇÃO PARA CAPTURA/COLETA /TRANSPORTE

NÚMERO DA AUTORIZAÇÃO 073/2007 – CGFAU	Nº DE REGISTRO NO IBAMA *****	PERÍODO DE VALIDADE 30/03/2007 a 30/03/2008	PROCESSO IBAMA 02001.007257/2005
---	----------------------------------	--	-------------------------------------

OBJETO:

- CAPTURA E/OU COLETA DE ANIMAIS SILVESTRES/MATERIAL ZOOLOGICO
- TRANSPORTE DE MATERIAL ZOOLOGICO
- COLETA E TRANSPORTE DE MATERIAL BOTÂNICO (PESQUISA CIENTÍFICA)
- TRANSPORTE DE PRODUTOS E SUBPRODUTOS DA FAUNA
- EXPOSIÇÃO E/OU CONCURSO DE ANIMAIS SILVESTRES
- MANUTENÇÃO TEMPORÁRIA DE ANIMAIS EM CATIVEIRO
- OUTROS:

FAVORECIDO:

- ZOOLOGICO
- INSTITUIÇÃO CIENTÍFICA
- PESQUISADOR
- EXPOSITOR/CONCURSO
- CRIADOURO COMERCIAL
- CRIADOURO CIENTÍFICO
- OUTROS:

FAVORECIDOS

NOME(S): Camila Schlieper de Castilho, Luiz Guilherme Marins de Sá e Thales Renato Ochotorena de Freitas.

INSTITUIÇÃO: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

ENDEREÇO: Av. Bento Gonçalves, 9500, Prédio 43323, Bairro Agronomia, Porto Alegre, RS, 91501-970.

RESPONSÁVEL PELA EXPEDIÇÃO: Camila Schlieper de Castilho.

TRANSPORTADOR: Pesquisadores favorecidos.

MEIO DE TRANSPORTE: Terrestre / Aéreo / Fluvial.

PROCEDÊNCIA/LOCAL DA CAPTURA/LOCAL DA PESQUISA: Entorno do Parque Nacional de São Joaquim e os estados de Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Paraná.

DESTINO DO MATERIAL: Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

LISTA DAS ESPÉCIES QUANTIDADE / TIPO	NOME CIENTÍFICO	NOME COMUM
Coleta de amostras de pele e tecidos / Nº Indeterminado	<i>Puma concolor</i>	Suçuarana
Coleta de amostras de material biológico de espécimes que estejam em Zoológicos, Criadouros e Cetas / Nº Indeterminado	<i>Puma concolor</i>	Suçuarana

OBSERVAÇÕES E CONDICIONANTES:

- O responsável pela expedição deverá apresentar relatório de atividades ao término da validade desta autorização e encaminhar ao Ibama cópia dos frontispícios das publicações resultantes dos trabalhos decorrentes do uso dos espécimes objeto desta autorização.
- Esta autorização não exige o pesquisador de cumprir o disposto na Medida Provisória Nº 2186-16/01, Decreto nº 3.945/2001 e Decreto nº 4.946/2003 que dispõem sobre o acesso de componente do patrimônio genético.
- Esta autorização não permite a captura de animais na natureza para a obtenção das amostras de material biológico, uma vez que a coleta dar-se-á apenas das amostras encontradas em propriedades particulares ou através de animais mortos por atropelamento.

LOCAL E DATA DE EMISSÃO

Brasília (DF), 30 de março de 2007.

AUTORIDADE EXPEDIDORA (ASSINATURA E CARIMBO)


Ricardo José Santana
Coordenação Geral de Fauna
Chefe

• ESTA AUTORIZAÇÃO NÃO PERMITE:

- CAPTURA DE ESPÉCIES QUE CONSTEM NAS LISTAS OFICIAIS (FEDERAIS, ESTADUAIS E MUNICIPAIS) DA FAUNA E FLORA BRASILEIRA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO, ESPÉCIES ENDÊMICAS OU RARAS, OU QUE CONSTEM NOS ANEXOS I DA CONVENÇÃO SOBRE O COMÉRCIO INTERNACIONAL DE ESPÉCIES DA FAUNA E DA FLORA AMEAÇADAS DE EXTINÇÃO (CITES), SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
 - CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES DA FAUNA NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DE EMPREENDIMENTOS SUJEITOS AO LICENCIAMENTO AMBIENTAL, CONFORME RESOLUÇÃO DO CONAMA DE Nº 237 DE 19/12/97, SALVO QUANDO ESPECIFICADO;
 - CAPTURA DOS ESPÉCIMES DA FAUNA EM ÁREAS DE DOMÍNIO PRIVADO, SEM O CONSENTIMENTO DO PROPRIETÁRIO, ARRENDATÁRIO, POSSEIROU OU MORADOR DA ÁREA;
 - CAPTURA, COLETA E OU TRANSPORTE DE ESPÉCIMES FAUNA EM UNIDADES DE CONSERVAÇÃO FEDERAIS, ESTADUAIS, DISTRITAIS OU MUNICIPAIS, SALVO QUANDO ACOMPANHADAS DO CONSENTIMENTO DO ÓRGÃO ADMINISTRADOR COMPETENTE;
 - EXPORTAÇÃO DE MATERIAL ZOOLOGICO OU REMESSA (PARA O EXTERIOR) DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO.
- VÁLIDA SOMENTE SEM EMENDAS OU RASURAS.



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS

AUTORIZAÇÃO DE ACESSO E DE REMESSA DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO
Nº 038/2006

O INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAIS RENOVÁVEIS, credenciado pelo Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN/MMA), por meio da Deliberação CGEN n.º 40, de 24 de setembro de 2003, para autorizar instituições nacionais, públicas ou privadas, que exerçam atividades de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético para fins de pesquisa científica sem potencial de uso econômico, autoriza:

A UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL (UFRGS), CNPJ n.º 92.969.856/0001-98, representada pelo Diretor do Instituto de Biociências, Jorge Ernesto de Araújo Mariath, RG n.º 7015672798, SSP-RS, CPF n.º 173.120.270-91, a acessar e remeter amostras de componente do patrimônio genético no âmbito do projeto de pesquisa "Estrutura genética e parentesco em populações de leão-baio (*Puma concolor*) no Parque Nacional de São Joaquim e Serra Catarinense", sob a coordenação da pesquisadora Camila Schlieper de Castilho.

Descrição da(s) amostra(s)

Espécie(s): leão-baio (*Puma concolor*).

Tipo(s) de material(ais): Pele.

Quantidade da amostra (unidade de medida): 60 amostras.

Uso pretendido: Levantar os padrões de distribuição de *Puma concolor* na região do Parque Nacional de São Joaquim e municípios vizinhos e contribuir na elaboração de programas de manejo e conservação em campo e em cativeiro.

Destino do material: Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética da UFRGS.

Local de depósito de subamostra: Centro Nacional de Pesquisa para a Conservação de Predadores Naturais - CENAP/IBAMA (Deliberação CGEN n.º 22/2003).

Validade da Autorização: 26 de junho de 2006 a 26 de junho de 2008. A UFRGS deverá enviar ao Ibama relatório anual sobre o andamento do projeto de pesquisa, nos termos do Decreto n.º 4.946/2003. Endereço para envio do(s) relatório(s): IBAMA/ DIFAP/GTPG, SCEN L4 Norte, Bloco B, Brasília, DF, 70.818-900.

Esta autorização está vinculada às informações e termos assinados pelo requerente, constantes do Processo n.º 02001.007257/2005. Atividades de acesso aos conhecimentos tradicionais associados, de acesso e de remessa de componente do patrimônio genético com finalidade comercial, aplicação industrial, bioprospecção ou desenvolvimento tecnológico **não** estão autorizadas.

Caso seja identificado uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado das amostras de componente do patrimônio genético acessado no âmbito desta autorização, obriga a instituição beneficiada por esta autorização a adotar as providências cabíveis, nos termos da legislação vigente, junto ao CGEN/MMA.

A remessa de amostra de componente do patrimônio genético deverá ser precedida da assinatura do Termo de Transferência de Material ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético. Para a remessa de componente do patrimônio genético para instituição sediada no exterior, deverá ser solicitada ao Ibama, por meio de formulário específico e mediante a apresentação do Termo de Transferência de Material ou do Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético, licença de exportação complementar a autorização de remessa, mormente quando se tratar de remessa de espécies constantes nos Anexos da Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies da Flora e Fauna Selvagens em Perigo de Extinção (Cites).

Marcus Luiz Bartoso Barros
Presidente

Brasília, 26 de junho de 2006.



MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE
INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE
INSTITUTO CHICO MENDES
DIRETORIA DE UNIDADES DE CONSERVAÇÃO DE PROTEÇÃO INTEGRAL-DIPI
SCEN Trecho 2, Ed.Sede do IBAMA - Cep:70818-900
Telefones: (61) 3316.1179 FAX.: (61) 3226.6371

Memo Nº *109* /2007/DIPI

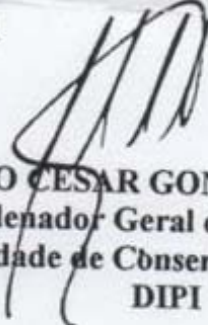
Brasília, 10 de setembro de 2007.



Ao Parque Nacional São Joaquim.


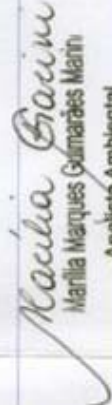
Assunto: Licença de acesso a recursos genéticos.

1. Em resposta ao memo 41/2007-SJOAQUIM, Informamos que de acordo com a Resolução-MMA/CGEN nº 21, de 31 de agosto de 2006 a pesquisa "Estrutura genética e parentesco em populações de Leão-Baio (Puna concolor) no Parque Nacional de São Joaquim e Serra Catarinense" em nome de **Camila Schlieper de Castilho** está dispensada da obtenção de autorização de acesso a componente do patrimônio genético.
2. Ressaltamos que os dados das análises laboratoriais, quando disponíveis, deverão compor os relatórios anuais, juntamente com as informações sobre as atividades de campo, quando das solicitações de renovações de licença de coleta.
3. Informamos ainda que foi renovada a licença de coleta sob o nº 074/2007, cuja cópia foi encaminhada a essa UC por meio do memo 130/2007/PROG./DIREC/IBAMA, em 12/04/07, portanto a pesquisadora encontra-se em situação regular nesta instituição quanto ao projeto acima mencionado.
4. Quaisquer esclarecimentos adicionais poderão ser obtidos por meio do telefone (0XX61)3316-1068.

Atenciosamente,


JÚLIO CESAR GONCHOROSKY
Coordenador Geral de Visitação da
Diretoria de Unidade de Conservação e Proteção Integral
DIPI

 LICENÇA PARA PESQUISA EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	Unidade de Conservação: Parque Nacional de São Joaquim	Processo Nº: 02001,007257/05-21	Licença Nº 064/2006
	Unidade de Conservação: Parque Nacional de São Joaquim	Pesquisador Estrangeiro Não Coleta: Sim	Validade: 21/03/2007
Pesquisador Titular: Camila Schlieper de Castilho			
Endereço: Rua Olívia Costa Baldessar, 129 - Esquina	Telefone: (493) 278-5351	Caixa Postal:	
	Cidade: Urubici	CEP: 88650-000	UF: SC
Instituição de Pesquisa: Universidade Federal do Rio Grande do Sul	Telefone: (513) 316-7000	Fax	Caixa Post
Endereço da Instituição: Av. Paulo Gama. 110	Cidade: Porto Alegre	Cep: 90040-060	Estado RS
Título do Projeto: Estrutura genética e parentesco em populações de Leão-Baio (Puma concolor) no Parque Nacional de São Joaquim e Serra Catarinense			
Datas de Permanência na Unidade: Deverá ser combinado entre o Chefe da Unidade de Conservação e o (a) Pesquisador (a).			
Observações: - A renovação da licença ficará sujeita ao envio do relatório a Coord. de Est. De Repre. Ecol./Setor de Pesquisa/CGECO e ao chefe da UC envolvida. O relatório deverá ser enviado em cópia impressa e digital. Esta licença não autoriza o acesso à informação genética e nem a remessa para instituição no exterior e ao conhecimento tradicional associado, ficando o titular da pesq. Responsável pelo atendimento da medida prov. nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e dec. nº 3.945 de 28 de setembro de 2001, no que diz respeito aos acessos mencionados, em qualquer momento da referida pesquisa. Todo pesquisador estrangeiro deverá estar acompanhado de representante da instituição contraparte brasileira, durante as atividades de campo. - Haverá coleta de 60 amostras de pele de animais encontrados mortos por atropelamento. - Haverá participantes: Thales R. O. Freitas e Luiz G. M. Sá.			
Local e Data: Brasília, 21 de Março de 2006.	Assinatura do Coordenador de Estudos de Representatividade Ecológica  BERNARDO FERREIRA ALVES DE BRITO		

 LICENÇA PARA PESQUISA EM UNIDADE DE CONSERVAÇÃO	Unidade de Conservação: Parque Nacional de São Joaquim	Processo N°: 02001,007257/05-21	Licença N°: 074/2007
		Pesquisador Estrangeiro Não Coleta: Sim	Validade: 12/04/2008
Pesquisador Titular: Camila Schlieper de Castilho			
Endereço: Rua Olivia Costa Baldessar, 129 - Bairro: Esquina		Telefone: (493) 278-5351	Caixa Postal:
Instituição de Pesquisa: Universidade Federal do Rio Grande do Sul		Cidade: Urubici	CEP: 88650-000
Endereço da Instituição: Av. Paulo Gama, 110		Telefone: (513) 316-7000	UF: SC
Título do Projeto: Estrutura genética e parentesco em populações de Leão-Baio (Puma concolor) no Parque Nacional de São Joaquim e Serra Catarinense.		Fax:	Caixa Postal:
Datas de Permanência na Unidade: Deverão ser combinadas entre o chefe da unidade de conservação e o pesquisador.			
Observações: A renovação da licença ou encerramento do projeto ficará sujeita ao envio do relatório ao Chefe do Programa Gestão do Conhecimento e ao chefe da UC envolvida. O relatório deverá ser enviado em cópia impressa e digital. Esta licença não autoriza o acesso à informação genética e nem a remessa para instituição no exterior e ao conhecimento tradicional associado, ficando o titular da pesq. responsável pelo atendimento da medida prov. N° 2.186-16, de 23 de agosto de 2001 e dec. N° 3.945 de 28 de setembro de 2001, no que diz respeito aos acessos mencionados, em qualquer momento da refenda pesquisa. Esta licença não autoriza coleta de espécies ameaçadas de extinção. Todo pesquisador estrangeiro deverá estar acompanhado de representante da instituição contraparte brasileira, durante as atividades de campo nas unidades de conservação contempladas na licença. - Haverá coleta de 60 amostras de peles de animais encontrados mortos por atropelamento. - Participante: Thales Renato O. Freitas e Luiz Guilherme M. Sá.			
Local e Data: Brasília, 12 de abril de 2007.		 Marília Marques Guimarães Marth Analista Ambiental IBAMA	

