

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**FERNANDA DO PASSO RAMALHO**

**TAMANHO POPULACIONAL DE LOBOS-GUARÁ (*Chrysocyon  
brachyurus*) EM UMA ÁREA PROTEGIDA DE CERRADO NO  
SUDESTE DO BRASIL**

**SÃO CARLOS**

**2011**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE**

**FERNANDA DO PASSO RAMALHO**

**TAMANHO POPULACIONAL DE LOBOS-GUARÁ (*Chrysocyon  
brachyurus*) EM UMA ÁREA PROTEGIDA DE CERRADO NO  
SUDESTE DO BRASIL**

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

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

**SÃO CARLOS**

**2011**

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

R165tp

Ramalho, Fernanda do Passo.

Tamanho populacional de lobos-guará (*Chrysocyon  
brachyurus*) em uma área protegida de cerrado no sudeste  
do Brasil / Fernanda do Passo Ramalho. -- São Carlos :  
UFSCar, 2011.

61 f.

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

1. Genética de populações. 2. Genética da conservação.  
3. Lobo guará. 4. Cerrados. I. Título.

CDD: 575.15 (20ª)

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

**TAMANHO POPULACIONAL DE LOBOS-GUARÁ  
(CHRYSOCYON BRACHYURUS) EM UMA ÁREA  
PROTEGIDA DE CERRADO NO SUDESTE DO BRASIL**

Dissertação de Mestrado de Fernanda do Passo Ramalho

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

Prof. Dr. Mercival Roberto Francisco

Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte



.....  
.....  
.....

Dedico este trabalho àquela que me ensinou  
mais do que qualquer ser humano foi capaz:  
Pietra (*in memorian*), meu anjinho de  
quatro patas.

"O destino dos animais é muito mais importante para mim do que o medo de parecer ridículo." (Émile Zola). - "O ridículo não existe; os que ousaram desafiá-lo de frente conquistaram o mundo." (Octave Mirbeau).

## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar, muito obrigada aos animais que direta ou indiretamente me ensinam, desde sempre, as principais lições da minha vida;

Aos meus pais pelo apoio e amor incondicionais. Pai, obrigada por estar sempre presente e não medir esforços para me ajudar a realizar meus sonhos. Mãe, obrigada por acreditar em mim sempre, até mesmo nos momentos em que eu mesma desacreditei;

As minhas irmãs e melhores amigas Luiza e Julia. Perto ou longe o apoio e amor de ambas são fundamentais em todos os passos que dou na minha vida;

Ao Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior por me receber em seu laboratório, pela orientação e os conselhos durante a realização deste trabalho;

A co-orientadora e amiga Dra. Renata Alonso Miotto, por toda a ajuda, os ensinamentos, as sugestões, o apoio, a paciência (infinita) e acima de tudo pela amizade durante todo o período deste mestrado;

Aos docentes, funcionários e colegas do Departamento de Genética e Evolução pelas discussões e conhecimentos divididos, as secretárias Greissi e Heloísa por me ajudarem a resolver todas as burocracias sempre com muita paciência e boa vontade e aos colegas do laboratório por toda a ajuda prática e teórica desde o início;

Um agradecimento especial a Niara Martins, que foi além de uma grande colega de laboratório e mestrado, uma verdadeira amiga e confidente. Ni, obrigada por todos os ensinamentos, pela enorme paciência, pelas gargalhadas, pelos momentos de descontração, pela ajuda na bancada, nos estudos, nos trabalhos (que muitas vezes vararam madrugadas) e principalmente por ter me aceitado como eu sou, sem pré-julgamentos, mesmo nós sendo pessoas tão diferentes. Esse trabalho é nosso!!

Ao CENAP/ICMBIO por me cederem amostra de sangue;

Ao Parque Ecológico Municipal de Americana – SP, em especial à Médica Veterinária Michelle pela amostra de sangue cedida;

À CAPES pela bolsa concedida;

Aos colegas e amigos da equipe do Projeto de Rádio-Telemetria Digital na Estação Ecológica do Jataí que me ajudaram nas coletas de amostras.

Aos amigos que participaram desta história desde o início me apoiando, incentivando e ajudando nas coletas: Adriana Nepomuceno, Talita Ariela Sampaio, Celso Parruco e Lyani Klink e ao colega Giordano Ciocheti por me incentivar a fazer o mestrado.

Ao amigo e treinador Ramon Beirão pela paciência e as importantes conversas em meio a corridas, pedaladas e braçadas;

A todos os meus amigos que perto ou longe são tão importantes e essenciais na minha vida!!

Ao meu amigo Cleber Rocco pelo apoio e conselhos no final do meu mestrado e principalmente pelos bons momentos juntos;

Aos maiores presentes que a vida me deu e que sem eles meus dias seriam muito menos divertidos: Felfys e Watson, os amores da minha vida!!!!



## RESUMO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) está listado entre as espécies ameaçadas de extinção no Brasil devido à perda de seu hábitat natural para agropecuária e aos freqüentes atropelamentos. Com o objetivo de determinar o número populacional mínimo de *C. brachyurus* em uma Unidade de Conservação na região nordeste do estado de São Paulo (Estação Ecológica do Jataí – EEJ), um método não invasivo de estudo – a análise genética de fezes – foi utilizado, procurando-se confirmar os achados da espécie que originalmente depositou as fezes de acordo com as características morfológicas e odores característicos e distintivos para a espécie *C. brachyurus*. Por meio de um painel de 5 locos de microssatélites, foi possível individualizar cada uma das amostras coletadas em campo. Dentre as 41 fezes coletadas, diagnosticamos 13 indivíduos de *C. brachyurus* na EEJ. A probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ) foi de  $0,8 \times 10^{-6}$  e a probabilidade de não detecção alélica (*allelic dropout*) de 16,2%. Observou-se ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados. Foram encontrados valores baixos de heterozigosidade para *C. brachyurus*. A heterozigosidade observada ( $H_o$ ) média foi de 0,52 e a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) média foi de 0,72. A média de alelos por loco encontrada foi de 5,4. Nas análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontrados três locos que apresentaram desvios, após a correção de Bonferroni: locos 2018, 2054 e 2140. Os valores de  $F_{is}$  foram significativos para todos os locos na população. Com relação ao grau de parentesco dos indivíduos, o  $r$  variou de 0,000 (não parente) até 0,5253 (pai e filho), indicando que há animais relacionados na área. Foram realizados testes para a determinação do sexo das amostras de *C. brachyurus*, que não demonstraram resultados satisfatórios, uma vez que os fragmentos esperados não foram amplificados em nenhum dos testes realizados e para nenhuma das amostras. A determinação da estimativa do tamanho populacional de *C. brachyurus* na área da EEJ pode ser utilizada para implantação de planos de manejo e conservação da espécie.

Palavras-chave: genética da conservação. lobo-guará. análise não-invasiva.

## ABSTRACT

*The Maned Wolf (Chrysocyon brachyurus) is listed among the threatened extinction species in Brazil due to loss of its natural habitat to agriculture and frequent roadkill. Aiming to determinate the population size of C. brachyurus into a Ecological Station in the northeast of Sao Paulo State (Estação Ecológica do Jataí – EEJ), a non invasive method – genetic analysis of feces – was employed to confirm the specie findings which deposit the feces, in accordance of morphological characteristics and specific scent of the C. brachyurus specie. Through a panel of five loci microsatellite was possible to identify each collected sample. Among the 41 stool samples, we identified 13 specimens of C. brachyurus in the EEJ. The probability of identity (PID) was  $0.8 \times 10^{-6}$  and the probability of not detecting allelic (allelic dropout) was 16.2%. There was no imbalance linkage between the analyzed loci. Values for C. brachyurus internal heterozygosity were rated low. The observed heterozygosity ( $H_o$ ) average was 0.52 and expected heterozygosity ( $H_e$ ) average was 0.72. The number of alleles per locus was found to be 5.4. In the analysis of Hardy-Weinberg were found three loci that showed some deviations, after Bonferroni correction: loci 2018, 2054 and 2140.  $F_{is}$  values were highly significant for all into the situ population. The degree of relatedness of individuals, or varied of 0.000 (not relative) to 0.5253 (father and son), indicating that there are related animals in the area. Tests conducted to determine the gender of the samples of C. brachyurus were not found satisfactory results, once the expected fragments were not amplified in any of the tests and in none of the samples. The estimation of the population size of the C. brachyurus in the area of EEJ may be used as reference of management action plans of species conservation.*

*Keywords: conservation genetics. Maned Wolf, non invasive analysis.*

## Lista de Figuras

Figura 1. Lobo-guará ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) – Foto: Rogério Cunha. ....	17
Figura 2. Fruto da “lobeira” ( <i>Solanum lycocarpum</i> ), principal porção vegetal da dieta dos lobos-guará. ....	18
Figura 3. Distribuição da espécie <i>Crysocyon brachyurus</i> na América do Sul (IUCN, 2008). ....	19
Figura 4. Foto aérea da área da EEJ (Imagem: Rogério Toppa). ....	23
Figura 5. Localização regional do município de Luiz Antônio no estado de São Paulo. ....	25
Figura 6. Coleta das amostras de fezes em estradas na Unidade de Conservação. ....	29
Figura 7. Pegadas de lobo-guará. ....	30
Figura 8. Fezes de lobo-guará com frutos da “lobeira” ....	30
Figura 9. Esquema de uma reação de amplificação com <i>primers</i> modificados pela adição de uma seqüência M13 marcada com fluorescência. Figura modificada de Schuelke (2000). ....	37
Figura 10. Localização dos <i>primers</i> de <i>introns</i> específicos para sexagem de canídeos descritos por Seddon (2005). Os <i>primers</i> DBX6 e DBY7 são exibidos em negrito. ....	40
Figura 11. Localização das amostras fecais de <i>C. brachyurus</i> coletadas na EEJ individualizadas. ....	46

## Lista de Tabelas

Tabela 1. Informações sobre as amostras de fezes coletadas em campo.....	30
Tabela 2. Informações sobre as amostras de sangue cedidas. ....	32
Tabela 3. Sequências <i>foward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de microssatélites desenvolvidos para o cão doméstico ( <i>Canis familiaris</i> ) por Francisco et al. (1996). ....	36
Tabela 4. Sequências <i>foward</i> e <i>reverse</i> dos <i>primers</i> de íntrons específicos para sexagem de canídeos descritos por Seddon (2005). ....	39
Tabela 5. Frequência alélicas observadas para cada loco.....	43
Tabela 6. Variação dos alelos (em pares de bases – pb) para <i>Chrysocyon brachyurus</i> na região do estudo para os cinco locos de microssatélites. (PID) unbias e sibs levando em consideração o tamanho amostral por loco e total e taxa de <i>allelic dropout</i> por loco e total. ....	44
Tabela 7. Análise da ocorrência de desequilíbrio de ligação para cada par de locos e os respectivos valores de P.....	44
Tabela 8. Amostras dos 13 indivíduos os alelos amplificados para cada um dos cinco locos estudados. ....	44
Tabela 9. Diversidade genética para a população amostrada. ....	45
Tabela 10. Caracterização dos locos analisados com relação aos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o coeficiente de endogamia. ....	45

# Sumário

<b>RESUMO</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	<b>IV</b>
<b>SUMÁRIO</b> .....	<b>5</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>12</b>
<b>1.1 Considerações iniciais</b> .....	<b>12</b>
<b>1.2 Marcadores moleculares aplicados em estudos conservacionistas</b> .....	<b>14</b>
1.2.1 Microsatélites.....	15
<b>1.3 A espécie <i>Chrysocyon brachyurus</i> (Illiger, 1815)</b> .....	<b>16</b>
<b>1.4 Conservação de <i>Chrysocyon brachyurus</i></b> .....	<b>21</b>
<b>1.5 A Estação Ecológica do Jataí</b> .....	<b>22</b>
<b>1.6 Análises genéticas não invasivas</b> .....	<b>26</b>
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	<b>27</b>
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	<b>27</b>
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	<b>27</b>
<b>3 JUSTIFICATIVAS</b> .....	<b>27</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	<b>29</b>
<b>4.1 Obtenção das amostras</b> .....	<b>29</b>
<b>4.2 Extração de DNA</b> .....	<b>32</b>
4.2.1 Amostras fecais.....	32
4.2.2 Amostras de sangue.....	33
<b>4.3 Confirmação da espécie de origem das amostras</b> .....	<b>35</b>

<b>4.4</b>	<b>Individualização das amostras .....</b>	<b>35</b>
<b>4.5</b>	<b>Determinação do sexo.....</b>	<b>39</b>
<b>4.6</b>	<b>Estimativa da diversidade genética.....</b>	<b>40</b>
<b>4.7</b>	<b>Análise de parentesco .....</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>47</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>53</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Considerações iniciais

A diversidade global está mudando rapidamente como uma resposta complexa às diversas mudanças ambientais causadas pelo homem (VITOUSEK et al., 1997). Globalmente, ecossistemas intactos estão sendo degradados a uma taxa média de 1,2% ao ano, sendo que a maior ameaça à diversidade biológica é a perda de habitat natural das espécies. (PRIMACK; RODRIGUES, 2001; BALMFORD et al., 2002).

O Cerrado é um dos Biomas com maior biodiversidade do mundo, contendo um grande número de espécies de flora e fauna endêmicas, sendo o segundo ecossistema brasileiro em extensão, atrás apenas da Amazônia (FIORI; FIORAVANTI, 2008; MMA, 2009). Além disso, o cerrado abrange as três maiores bacias hidrográficas da América do Sul, tendo grande importância no regime hídrico do Brasil (SOUSA-SILVA; SCARIOT, 2005). Por esses motivos, foi considerado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (*International Union for Conservation of Nature – IUCN*, 2005) um “hotspot” da biodiversidade, ou seja, um ecossistema extremamente rico e ameaçado, que precisa ser preservado.

Porém, nas últimas décadas o Cerrado brasileiro vem sofrendo com altas taxas de perda de biodiversidade pela ocupação humana e expansão da agricultura (KLINK; MOREIRA, 2002). Essa pressão causada pelo homem gerou a fragmentação das áreas e a perda dos hábitat, assim como o isolamento dos fragmentos, modificando a estrutura e os processos naturais nas paisagens, gerando extinções locais e/ou alterando a composição e abundância de certas espécies mais sensíveis, o que leva à perda de biodiversidade e/ou a fragmentação de populações (MMA, 2009). Diante do quadro da

crescente descaracterização dos ecossistemas originais do Cerrado, torna-se importante avaliar a capacidade de adaptação das espécies ao ambiente antropizado, visando traçar estratégias de conservação.

Apesar das espécies de carnívoros ocuparem uma grande diversidade de habitat e terem uma ampla distribuição em todo o mundo, é notável a carência de informações sobre grande parte delas. No Cerrado brasileiro, os mamíferos contabilizam aproximadamente 199 espécies, sendo 19 endêmicas (MMA, 2009). Pesquisas com esse grupo se fazem prementes, pois os grandes mamíferos representam espécies-chave para os ecossistemas, sendo importantes reguladores de populações de presas animais ou importantes dispersores de sementes, mantendo o equilíbrio tanto das comunidades animais como vegetais (SILVEIRA, 1999).

O desenvolvimento de novos métodos de estimativa populacional, principalmente para espécies ainda pouco estudadas, deve ser prioritário, devido às inúmeras ameaças sofridas por esses animais (WEBER; GONZALEZ, 2003; GONZALEZ et al., 2009). Wilson et al. (1996) ressaltam que sem dados confiáveis do tamanho das populações, os esforços de manejo conservacionista seriam ineficientes.

Atualmente, uma das maiores dificuldades para a realização de estudos populacionais de grandes mamíferos na natureza, especialmente em áreas florestais, é a obtenção das amostras. As expedições de captura são extremamente dispendiosas e nem sempre resultam na obtenção de amostras suficientes (DUARTE et al., 2010). Além disso, métodos com base no senso direto dos animais podem ser imprecisos devido à dificuldade de detecção dos indivíduos (KOHN et al., 1999).

Uma alternativa à captura de animais para as pesquisas são os métodos não invasivos, como as armadilhas fotográficas e a observação de rastros, como das pegadas e das fezes (WAYNE; MORIN, 2004). A coleta e a análise das fezes têm sido uma



importante fonte de dados sobre animais selvagens, fornecendo informações desde a genética até a endocrinologia, servindo como base para vários estudos ecológicos (KOHN; WAYNE, 1997).

## **1.2 Marcadores moleculares aplicados em estudos conservacionistas**

Por marcador molecular define-se todo e qualquer fenótipo molecular oriundo de um gene expresso, como no caso de isoenzimas, ou de um segmento específico do DNA, correspondente a regiões expressas ou não. Com os avanços na biologia molecular, surgiram diversas técnicas para a detecção de variabilidade genética que acessam diretamente à seqüência de DNA. Essas técnicas permitem a obtenção de um número virtualmente ilimitado de marcadores moleculares que podem abordar todo o genoma do organismo (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1995).

O conhecimento da variabilidade genética permite a comparação entre indivíduos, populações ou espécies diferentes (SOLÉ-CAVA, 2001). Diversas técnicas têm sido utilizadas para verificar a variabilidade genética diretamente do DNA, destacando-se a: RLFP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphism DNA*), AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*), STS (*Sequence Tagged Sites*) e microssatélites (BUSO et al., 2003).

Os marcadores genéticos podem diferir em características importantes como, abundância genômica, nível de polimorfismo detectado e informação genética, especificidade dos locos, reprodutibilidade, requerimentos técnicos e investimento financeiro (BUSO et al., 2003), apresentando características próprias que os tornam

mais adequado à resolução de questionamentos específicos (PEREZ-SWEENEY et al., 2003).

Entre os marcadores moleculares mais adequados para os estudos populacionais, encontram-se os tipo microssatélites, que se tornaram uma das ferramentas mais úteis na identificação individual de espécies e no estabelecimento de relações de parentesco (GOLDSTEIN; POLLOCK, 1997), além de serem também indicadores de mudanças na diversidade genética em curtos períodos de tempo (HAIG, 1998).

### **1.2.1 Microssatélites**

Microssatélites (SSR – *Simple Sequence Repeats*) formam uma classe de DNA caracterizada por seqüências de 1 a 6 nucleotídeos, repetidas lado a lado e que apresentam alta taxa de mutação, variando em valores de  $10^{-6}$  a  $10^{-2}$  por geração (EISEN, 1999). As mutações são causadas por alterações no número das unidades de repetição, sendo que, a maioria dessas alterações é resultado de mudanças no número integral de cópias das unidades de repetição (EISEN, 1999).

Essas seqüências que são abundantes no genoma nuclear de eucariotos são locos genéticos altamente polimórficos e constituem a classe mais polimórfica de marcadores moleculares capazes de uma identificação individual (WEBER; WONG, 1993; FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Os genótipos nos locos de microssatélites são identificados por meio da técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), utilizando-se de um par de iniciadores (*primers*) específicos (de 20 a 30 bases) complementares a seqüências únicas que flanqueiam as repetições. Fragmentos amplificados a partir desses sítios apresentam tamanhos diferentes explicados pelos números de repetições. Assim, cada loco microssatélite

constitui-se um marcador molecular altamente variável, multialélico e de grande conteúdo informativo. Cada segmento amplificado de tamanho diferente representa um alelo do mesmo loco (FERREIRA; GRATTAPAGLIA, 1996).

Segundo Eisen (1999), devido à distribuição preferencial nas regiões não codificadoras, os microssatélites podem não sofrer ação da seleção natural, o que os torna seletivamente neutros e muito úteis para estudos da genética de populações naturais (OLIVEIRA et al., 2006).

Para a família Canidae, alguns marcadores microssatélites já foram caracterizados (FRANCISCO et al., 1996; GRIFFIN et al., 2001; ICHIKAWA et al., 2002; PARRA et al., 2003) e utilizados em estudos mais específicos, como os de fluxo gênico, diversidade e estruturação genética (GIRMAN et al., 2001; IYENGAR et al., 2005; KLUKOWSKA et al., 2003; KOSKINEN; BREDBACKA, 2000; LEONARD et al., 2005; PRUGH et al., 2005; SMITH et al., 2006) e de identificação de espécie/indivíduos (BANKS et al., 2003).

### **1.3 A espécie *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815)**

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) está listado entre as espécies ameaçadas de extinção no Brasil, na categoria vulnerável (MMA, 2003), e próxima de tornar-se ameaçada, pela classificação da IUCN (2008), devido à perda de seu habitat para as atividades agropecuárias e freqüentes atropelamentos por veículos em estradas que cruzam áreas de conservação fragmentadas (BERNARDES et al., 1990). O lobo-guará é o maior canídeo sul-americano, medindo entre 95 e 115 centímetros de comprimento (mais 38 a 50 cm de cauda) e peso variando entre 20 e 30 quilos (RODDEN et al., 2004) (Figura 1).



Figura 1. Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) – Foto: Rogério Cunha.

Os lobos-guará são onívoros, como oportunistas, se alimentam de uma variedade de presas disponíveis (RODRIGUES, 2002). Mudanças sazonais nos itens alimentares resultam em mudanças nos componentes da dieta (JÁCOMO et al., 2004) A porção animal consumida inclui pequenos mamíferos, répteis, gastrópodes e ovos de aves (SILVEIRA, 1999), além de anfíbios e insetos (BESTELMEYER, 2000).

No Brasil, a porção vegetal da dieta do lobo-guará é constituída principalmente pela planta *Solanum lycocarpum*, comumente conhecida por “Lobeira” (em inglês: *Fruit of the Wolf*) (Figura 2). Essa fruta tem produção durante o ano inteiro e representa grande porção da dieta desse canídeo. (DIETZ, 1984; CARVALHO; VASCONCELLOS, 1995; MOTTA-JÚNIOR et al., 1996; AZEVEDO; GASTAL, 1997; MOTTA-JÚNIOR, 1997; SANTOS, 1999; ARAGONA; SETZ, 2001; RODRIGUES, 2002; JÁCOMO et al., 2004).



Figura 2. Fruto da “lobeira” (*Solanum lycocarpum*), principal porção vegetal da dieta dos lobos-guará.

Os lobos-guará habitam campos e cerrados da América do Sul, do centro-sul do estado do Maranhão até o Uruguai, e, do extremo leste do Peru até o estado do Espírito Santo (DIETZ, 1984; RODDEN et al., 2004).

Originalmente a espécie se distribuía amplamente pelas províncias de vegetação aberta do Cerrado, Chaco e Pampas. Atualmente, a distribuição sofreu grandes reduções, em especial na porção sul da distribuição (DIETZ, 1984; MONES; OLAZARRI, 1990; RODDEN et al., 2004) (Figura 3).

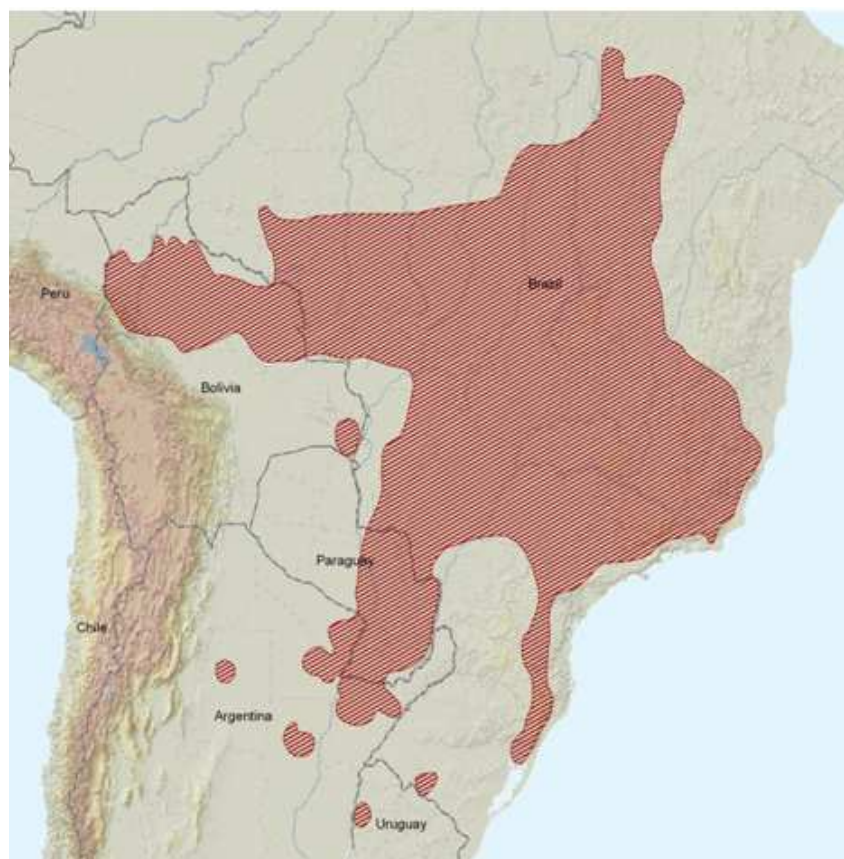


Figura 3. Distribuição da espécie *Crysocyon brachyurus* na América do Sul (IUCN, 2008).

Os lobos-guará são canídeos solitários que se juntam aos casais apenas na época reprodutiva (RODDEN et al., 2004). São territoriais, com o casal partilhando a mesma área de vida, sendo essas áreas exclusivas, com nenhuma ou pouca sobreposição entre áreas de casais vizinhos (DIETZ, 1984).

O tamanho da área ocupada por casais foi estimado por Dietz (1984) entre 22 e 30 Km<sup>2</sup>, mas outros autores estimaram valores superiores, variando entre 50 e 115 Km<sup>2</sup> (CARVALHO; VASCONCELLOS, 1995; SILVEIRA, 1999).

Apesar dessas estimativas, pouco se conhece com precisão sobre o tamanho de área utilizada e padrões de movimentação de lobos-guará (DIETZ, 1984; CARVALHO; VASCONCELLOS, 1995; SILVEIRA, 1999).

Os trabalhos de radiotelemetria realizados com a espécie descrevem áreas de vida com amplas variações: de 21,7 a 30 Km<sup>2</sup>, média de 25,2 ± 4,4 Km<sup>2</sup>, com n = 3 pares na Serra da Canastra, no estado de Minas Gerais (DIETZ, 1984) e de 31 a 132 Km<sup>2</sup>, n = 6 e média de 63,7 ± 37,4 Km<sup>2</sup> na Estação Ecológica do Jataí, estado de São Paulo (MANTOVANI, 2001); e de 15,6 a 104,9 Km<sup>2</sup>, média de 57,0 ± 34,3 Km<sup>2</sup>, com n = 5 na Estação Ecológica de Águas Emendadas, no Distrito Federal (RODRIGUES, 2002); e de 4,7 a 79,5 Km<sup>2</sup>, média de 49,0 ± 31,8 Km<sup>2</sup>, com n = 5 no Parque Nacional de Emas, no estado de Goiás (SILVEIRA, 1999); e de 50,1 a 69,1 Km<sup>2</sup>, média de 59,6 ± 13,44 Km<sup>2</sup>, com n = 2 na Reserva Particular do Patrimônio Natural Estação Ambiental de Galheiro, estado de Minas Gerais (MELO et al., 2007).

A espécie foi originalmente incluída no gênero *Canis*, pois apresenta número de cromossomos diplóide (2n = 76) bastante próximo ao deste gênero (2n = 78) (RODDEN et al., 2004). Porém, atualmente é reconhecido como gênero distinto, *Chrysocyon* (RODDEN et al., 2004). Dentre os canídeos, estudos filogenéticos classificaram o cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) como a espécie mais próxima de *Chrysocyon* (WAYNE et al., 1997; ZRZAVÝ; RICÁNKOVÁ, 2004).

Apesar das diferenças morfológicas e comportamentais, essa hipótese foi confirmada por análises filogenéticas que incluíram caracteres morfológicos, comportamentais e genéticos combinados (ZRZAVÝ; RICÁNKOVÁ, 2004).

Alguns estudos trataram da investigação genética de canídeos, porém são poucos os que abordam tais assuntos para o lobo-guará (MOREIRA et al., 1998; RODRIGUES, 2002; SALIM, 2005; BRUZZI, 2007; FONTOURA-RODRIGUES, 2009).

Moreira e colaboradores (1998) utilizaram a análise de polimorfismo protéico no esclarecimento da variabilidade encontrada em populações distribuídas no Brasil. Salim (2005) investigou a variabilidade de marcadores microssatélites nas mesmas

amostras. Rodrigues (2002) utilizou microssatélites para avaliar a diversidade de uma população natural da espécie, na Estação Ecológica de Águas Emendadas – DF. Bruzzi (2007) avaliou a diversidade genética da população de lobos-guará no Distrito Federal. Fontoura-Rodrigues (2009) realizou um estudo de diversidade genética e estruturação populacional utilizando amostras coletadas de populações em cativeiro e de vida livre de várias regiões do Brasil.

#### **1.4 Conservação de *Chrysocyon brachyurus***

A espécie *C. brachyurus* apresenta baixas densidades em suas áreas de distribuição devido ao seu hábito primariamente solitário e grandes áreas de vida (DIETZ, 1984; RODRIGUES, 2002). Em algumas áreas do Brasil central, ela parece ser mais comum; no entanto, a drástica redução e fragmentação dos seus habitats naturais, devido principalmente à conversão de áreas naturais em lavouras (FONSECA et al., 1994) podem vir a comprometer a viabilidade de suas populações (RODDEN et al., 2004; RODRIGUES; OLIVEIRA, 2006). Essa condição é preocupante quando se considera que o Bioma Cerrado já teve 55% da sua área desmatada ou transformada para o uso humano (MACHADO et al., 2004).

O Estado de São Paulo, originalmente com 14% do seu território coberto por formações de Cerrado, hoje conta com menos de 4% nas proximidades dos municípios de Campinas, Ribeirão Preto, Franca, Altinópolis e divisa com o sul de Minas Gerais (BRITO, 1997). Apesar da flexibilidade em ocupar ambientes alterados, o lobo-guará tem desaparecido de várias áreas onde a vegetação nativa se tornou muito escassa ou inexistente (RODDEN et al., 2004).



Outras ameaças significativas à espécie são os atropelamentos, a caça, e a interação com cães domésticos, esses que podem perseguir e matar lobos-guará, competir por recursos alimentares, além de constituir uma importante fonte de doenças (RODDEN et al., 2004). Os atropelamentos são a principal causa de mortalidade do lobo-guará em muitas áreas, sobretudo de indivíduos jovens e sub-adultos (SILVEIRA, 1999; RODRIGUES, 2002; RODRIGUES et al., 2002).

O monitoramento de locais com criações de galinhas revelam a baixa frequência de predação pelo lobo-guará, mas ainda assim, a espécie é caçada por fazendeiros e proprietários de terras (HURTADO, 2007).

### **1.5 A Estação Ecológica do Jataí**

A Estação Ecológica do Jataí (EEJ) é uma Unidade de Conservação no nordeste do estado de São Paulo, localizada no município de Luiz Antônio (21° 35'S, 47° 48'W), sob o gerenciamento do Instituto Florestal/SP (Figura 4). A EEJ é atualmente a maior unidade de conservação do Estado de São Paulo em área contínua de cerrado, com aproximadamente 9.000 hectares (TOPPA, 2004).



Figura 4. Foto aérea da área da EEJ (Imagem: Rogério Toppa).

A EEJ limita-se a sul e sudoeste com o rio Mogi Guaçu, abrangendo uma planície de inundação, onde existem quinze lagoas. As altitudes variam de 520 a 642 metros (Figura 5). A reserva é percorrida por quatro córregos permanentes e as formações vegetais são bastante diversificadas. São encontradas florestas semi-decídua, matas ciliares e Cerrado em diversas fisionomias, desde campo sujo ao cerradão (TOPPA, 2004).

Segundo Pires (1995), o uso da terra no entorno é constituído, principalmente, pelo cultivo de cana-de-açúcar, citros e florestas de eucaliptos. O clima é do tipo tropical savânico e a temperatura nos meses de inverno (estação seca) variam de 15 a 31° C, e nos meses mais quentes (estação úmida), de 20 a 36° C (NIMER, 1977). A pluviosidade anual é geralmente superior a 1.400 milímetros, com o período de precipitação mais intenso de outubro a março (PIRES, 1995).

Em um estudo de levantamento de mamíferos realizado na EEJ por Talamoni *et al.* (2000), foram listadas 69 espécies, das quais 14 foram registradas por Gargaglioni *et al.* (1998). Dentre elas, destacam-se alguns importantes carnívoros como: a onça-parda

(*Puma concolor*), a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) (TALAMONI et al., 2000; GARGAGLIONI et al., 1998).

Em Miotto (2006) é encontrado um estudo demográfico de *Puma concolor* na EEJ, no qual, no mínimo três indivíduos foram encontrados na área. Na literatura consultada, não foram encontrados estudos que abordassem especificamente a estimativa do tamanho populacional do lobo-guará na EEJ.

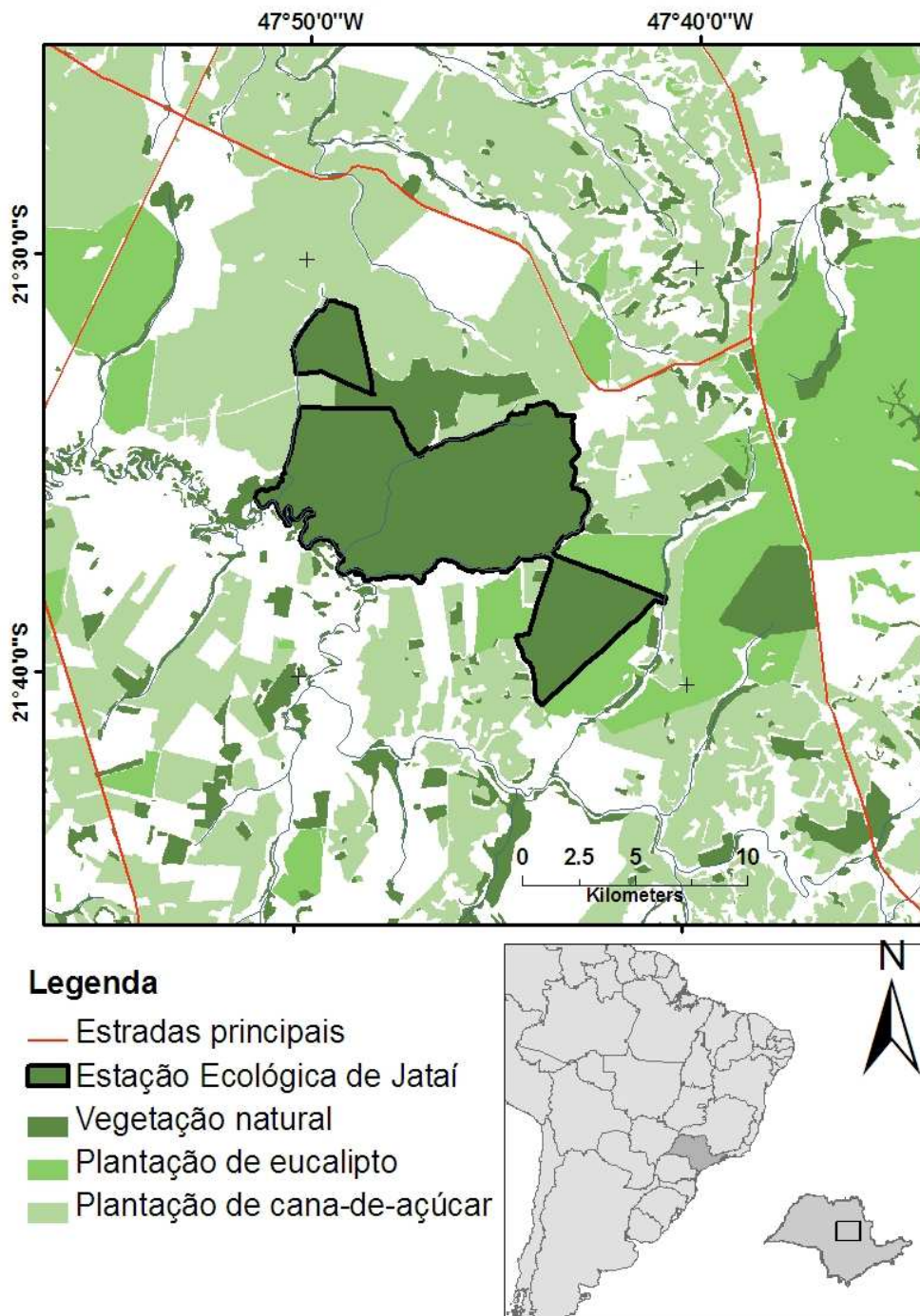


Figura 5. Localização regional do município de Luiz Antônio no estado de São Paulo.

## 1.6 Análises genéticas não invasivas

A obtenção de amostras de grandes mamíferos, particularmente de grandes predadores, por meio de captura dos animais é difícil e demorada, podendo provocar estresse nos indivíduos. Em virtude dessas desvantagens, os métodos alternativos não invasivos têm surgido para tornar a obtenção das amostras um processo menos desgastante, tanto para o pesquisador quanto para os animais, permitindo o estudo populacional através de marcadores moleculares e, ao mesmo tempo, minimizando o impacto desses estudos nas populações (MORIN; WOODRUFF, 1996; KOHN; WAYNE, 1997; MIOTTO et al., 2007a).

Extrações de DNA realizadas a partir de penas, pêlos, fezes, entre outros materiais têm sido bastante utilizadas e seus resultados se mostraram muito promissores (MIOTTO et al., 2007b; RIBEIRO et al., 2008). Para um estudo populacional detalhado, através do DNA contido nas fezes, é necessário determinar com precisão informações como: espécie do animal, sexo, identificação individual, local e data de coleta, entre outros. Para isso, são utilizados dados de campo e marcadores moleculares específicos (PALOMARES et al., 2002).

Essa abordagem amostral não invasiva, utilizando fezes como uma alternativa, para a obtenção de informações genéticas foi uma estratégia utilizada em animais como o texugo-europeu (*Meles meles*) (FRANTZ et al., 2003), em raposas (*Vulpes vulpes*) (DALÉN et al., 2004), o leopardo-asiáticos (*Panthera pardus*) (PEREZ et al., 2006), a onça-parda (*Puma concolor*) (MIOTTO et al., 2007a), o leopardo-das-neves (*Panthera uncia*) (JANEČKA et al., 2008) e o lobo-vermelho (*Canis rufus*) (KNAPP et al., 2009).

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo geral**

O objetivo geral deste trabalho foi determinar o tamanho populacional mínimo de lobos-guará (*C. brachyurus*) que habitam em uma Unidade de Conservação na região nordeste do estado de São Paulo e seu entorno, especificamente na Estação Ecológica do Jataí, no município de Luiz Antônio.

### **2.2 Objetivos específicos**

A partir da análise do DNA fecal, os objetivos específicos do trabalho foram:

- Individualizar cada amostra fecal coletada;
- Estimar o tamanho populacional mínimo da área;
- Determinar o sexo dos animais que originaram as amostras;
- Estimar a diversidade genética das amostras;
- Estimar as relações de parentesco.

## **3 JUSTIFICATIVAS**

Uma vez que não existem estudos demográficos para o lobo-guará na Estação Ecológica do Jataí, um estudo dessa natureza pode fornecer informações para criação de estratégias de manejo e conservação da espécie na área.

O lobo-guará, além de ser um animal símbolo do Cerrado, é um predador de grande porte que precisa de grandes áreas para manter suas populações viáveis com um

número mínimo de indivíduos, permitindo o fluxo gênico entre não-aparentados (HANSKI, 1994; NOSS, et al., 1996; WIKRAMANAYAKE, et al., 2004).

A Estação Ecológica do Jataí (EEJ) é a maior unidade de conservação do Estado de São Paulo com área contínua de cerrado localizada no município de Luiz Antônio. A área é cercada pela silvicultura intensiva e plantações de cana-de-açúcar, mas ainda mantém uma composição faunística elevada e grande diversidade de flora que precisam ser conservadas (TALAMONI et al., 2003; TOPPA et al., 2002). Portanto, é uma área que garante algumas características importantes para suportar diferentes populações animais, incluindo de lobo-guará.

Nos últimos anos foram realizados diversos estudos de genética da conservação no Laboratório de Genética Molecular da Universidade Federal de São Carlos - UFSCar, e também têm sido realizadas, com sucesso, experiências com análises de DNA fecal. Todos os métodos de laboratório já foram protocolados em estudos semelhantes, incluindo um estudo demográfico com onça-parda (*Puma concolor*) na mesma área de estudo (MIOTTO et al., 2007a).

O presente estudo baseia-se na necessidade da determinação da ocorrência e abundância da espécie *C. brachyurus* na EEJ com o propósito de fornecer dados que auxiliam no manejo e na conservação dessa espécie. A partir desse contexto, algumas questões de pesquisa foram formuladas:

1. Seria a EEJ uma área suficiente para manter populações de lobo-guará?
2. É possível a realização de um estudo demográfico da espécie utilizando-se de uma técnica de análise não invasivas?
3. Há evidências de redução da variação genética devido a um efeito de gargalo populacional nos animais?

## 4 MATERIAL E MÉTODO

### 4.1 Obtenção das amostras

As atividades de coleta das amostras de fezes foram realizadas percorrendo-se as trilhas e estradas previamente abertas na Unidade de Conservação (Figura 6). Dados de data, localização das fezes registradas por meio de unidade de GPS (*Global Position System*) e condição estrutural das amostras foram devidamente anotadas (Tabela 1). Vestígios do animal, tais como: pegadas, pêlos e frutos nas fezes, e também, o tamanho e a forma das fezes foram levados em consideração na indicação da espécie que originou as amostras (Figura 7 e Figura 8). Dessa forma, entre os anos de 2008 e 2009, foram coletadas de maneira não sistemática 41 amostras de fezes.



Figura 6. Coleta das amostras de fezes em estradas na Unidade de Conservação.





Figura 7. Pegadas de lobo-guará



Figura 8. Fezes de lobo-guará com frutos da “lobeira”

Como controle para as reações de amplificação e sexagem, com o objetivo de comparar o tamanho e o número de alelos que obtivemos a partir do DNA fecal, utilizamos também duas amostras de sangue de *C. brachyurus* (Tabela 2). As amostras de sangue foram cedidas pelo Centro Nacional de Predadores (CENAP/ICMBIO) e pelo Parque Ecológico Municipal de Americana - SP (Zoológico). As amostras foram mantidas sob temperatura controlada (22°C) e observaram-se os protocolos estabelecidos para a adequada preservação do material.

Tabela 1. Informações sobre as amostras de fezes coletadas em campo.

<b>Amostra</b>	<b>Data da coleta</b>	<b>Ponto de coleta (UTM)</b>
M1	01/07/2008	217927 – 7604757
M2	30/07/2008	213590 – 7610529
M3	02/07/2008	213840 – 7610600
M4	19/07/2008	214517 – 7609927
M5	18/07/2008	213633 – 7610569
M6	27/07/2008	216581 – 7611721
M7	24/07/2008	213868 – 7610599
M8	08/07/2008	212635 – 7606781
M9	09/07/2008	216798 – 7609109

Continuação (Tabela 1)

M10	18/09/2008	216646 – 7610093
M11	15/06/2008	213868 – 7610599
M12	13/06/2008	216622 – 7611407
M13	19/09/2008	209304 – 7609129
M14	11/10/2008	213407 – 7613447
M15	04/10/2008	216020 – 7610054
M16	16/09/2008	209310 – 7607522
M17	11/09/2008	214443 – 7610571
M18	06/10/2008	211821 – 7609464
M19	03/10/2008	213704 – 7610541
M20	02/07/2008	213580 – 7610570
M21	15/09/2008	212513 – 7607415
M22	09/10/2008	207894 – 7608144
M23	07/06/2008	216861 – 7609257
M24	15/07/2008	213547 – 7610561
M25	15/07/2008	212009 – 7608526
M26	14/07/2008	209150 – 7606813
M27	14/07/2008	210347 – 7610159
M28	14/07/2008	209163 – 7606787
M29	15/07/2008	212635 – 7606781
M30	07/10/2008	211078 – 7608380
M31	18/10/2008	216890 – 7609325
M32	17/10/2008	209178 – 7607420
M33	01/07/2008	217773 – 7604972
M34	20/06/2009	210330 – 7610158
M35	20/06/2009	215251 – 7608921
M36	21/06/2009	210430 – 7610153
M37	21/06/2009	212010 – 7608533
M38	21/06/2009	211278 – 7609209
M39	10/08/2009	216660 – 7609049
M40	10/08/2009	208564 – 7607101
M41	10/08/2009	214394 - 7609801

Tabela 2. Informações sobre as amostras de sangue cedidas.

Amostra	Origem	Sexo do animal de origem
S1	CENAP/ICMBIO	Macho
S2	Zoológico de Americana/SP	Fêmea

## 4.2 Extração de DNA

### 4.2.1 Amostras fecais

Para a extração de DNA das amostras de fezes foi utilizado o *kit* de extração “PSP Spin Stool DNA Kit” (Invitek). Esse é um *kit* especialmente desenvolvido para esse tipo de material. O processo de extração de DNA, segundo o protocolo fornecido pelo fabricante, seguiu-se os seguintes passos:

1. Colocar 200-400  $\mu$ l da amostra armazenada\* em 2,0 ml *Safe-Lock-Tube*. Adicionar 1,2 ml de *Lysis Buffer P* em cada amostra armazenada. Vortexar por 1 minuto. Incubar a amostra por 15 minutos a temperatura de 95° C, agitando-se constantemente. Centrifugar a amostra a 13.200 rpm por 2 minutos. Na amostra líquida obtida adicionar etanol 70% às amostras sólidas e vortexar para se obter um líquido homogêneo, que deve ser transferido para um novo tubo de 1,5 ml. Repetir o procedimento até obter o volume necessário (500-1000 $\mu$ l).
2. Transferir o sobrenadante para o *InviAdsorb-Tube* e vortexar por 15 segundos. Incubar a suspensão por 1 minuto à temperatura ambiente. Centrifugar a amostra a 13200 rpm por 6 minutos.
3. Transferir o sobrenadante para um tubo de 1,5 ml e descartar o *pellet*. Centrifugar a amostra a 13200 rpm por 6 minutos.

4. Pipetar 25  $\mu$ l de Proteinase K em um novo tubo de 1,5 ml e transferir 400  $\mu$ l do sobrenadante do passo 3 para o tubo de 1,5 ml contendo a Proteinase K, vortexar rapidamente e incubar a amostra por 15 minutos a temperatura de 70°C agitando-se constantemente.
5. Adicionar 400  $\mu$ l de *Binding Buffer P* na mistura do passo 4 e vortexar rapidamente, ou pipetar para cima e para baixo várias vezes. Colocar o *Spin Filter* no 2,0 ml *Receiver Tube* e transferir toda a mistura para o *Spin Filter*. Incubar por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugar a 12000 rpm por 1,5 minutos. Descartar o filtrado.
6. Adicionar 500  $\mu$ l do *Wash Buffer I* para o *Spin Filter* e centrifugar a 12000 rpm por 1,5 minutos. Descartar o filtrado.
7. Adicionar 800  $\mu$ l do *Wash Buffer II* para o *Spin Filter* e centrifugar a 12000 rpm por 1,5 min. Descartar o filtrado.
8. Remover o etanol e centrifugar a 13200 rpm por 3 minutos.
9. Colocar o *Spin Filter* em um novo 1,5 ml *Receiver Tube* e adicione 100-200  $\mu$ l pré aquecido (70°C) do *Elution Buffer D*. Incubar por 3 minutos. Centrifugar a 8000 rpm por 2 minutos para eluir o DNA. Finalmente descartar o *Spin Filter*.
10. Armazenar as amostras em freezer a - 22 °Celsius.

#### **4.2.2 Amostras de sangue**

Para a extração de DNA das amostras de sangue seguiu-se o protocolo proposto por Sambrook *et al.* (1989) com algumas adaptações, de acordo com a descrição abaixo:

1. Em um tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL contendo 50  $\mu$ L de sangue, adicionar 500  $\mu$ L de solução de digestão com 25  $\mu$ L de SDS 10%, 5  $\mu$ L RNase 0,1 mg/mL, 100  $\mu$ L de EDTA 0,1 M, 2,5  $\mu$ L Tris-HCl 0,01 M, 322,5  $\mu$ L de água MilliQ;
2. Incubar por 1 hora a temperatura de 37° C;
3. Adicionar 5  $\mu$ L de Proteinase K 0,1 mg/mL;
4. Incubar por 2 horas a temperatura de 42° C;
5. Adicionar o mesmo volume da mistura fenol/clorofórmio/álcool isoamílico e verter o tubo suavemente durante 10 minutos;
6. Centrifugar a 10000 rpm por 15 minutos e recuperar o sobrenadante;
7. Acrescentar NaCl 5 Molar de modo que a concentração final da solução seja de 1 Molar;
8. Adicionar 500  $\mu$ L de álcool 100% gelado e verter delicadamente o tubo para a precipitação do DNA;
9. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante, invertendo-se o tubo;
10. Adicionar 500  $\mu$ L de álcool 70% gelado;
11. Centrifugar a 10000 rpm por 10 minutos e descartar o sobrenadante;
12. Secar o material em estufa a temperatura de 37° C por 24 horas;
13. Ressuspender o DNA em 200  $\mu$ L de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8).

A quantificação de 1  $\mu$ L do DNA resultante de cada uma das amostras de sangue em gel de agarose 1%, corado com brometo de etídeo, utilizando-se como parâmetro o marcador de peso molecular 35 – *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen). Após o procedimento, efetuou-se o armazenamento das amostras a - 22° Celsius.

### 4.3 Confirmação da espécie de origem das amostras

A confirmação da espécie de origem das amostras foi inicialmente realizada através de análises do DNA mitocondrial (mtDNA). Foram realizados dois testes com 20 amostras (18 de fezes e 2 de sangue), amplificando-se um fragmento específico de 146 pb do gene citocromo *b* do genoma mitocondrial por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR). Utilizou-se um par de *primers* descritos por Farrel et al. (2000). (5'–AAA CTG CAG CCC CTC AG AAT GAT ATT TGT CCT CA–3', 5'–ATT CTT TAT CTG CCT ATA CAT RCA CG – 3').

Alternativamente, as fezes foram identificadas de acordo com suas características morfológicas. A espécie apresenta fezes características e facilmente diferenciáveis das demais (DALPONTE 1997; CHAME, 2003).

Apresentam diâmetro maior que a dos outros canídeos, com aproximadamente 2,5 centímetros, e possuem odor e textura próprios. Além disso, suas fezes contêm restos de frutas que são distintivos dessa espécie (MOTTA-JÚNIOR et al., 1999, ARAGONA; SETZ, 2001, CHAME, 2003).

### 4.4 Individualização das amostras

Para individualização das amostras de fezes testaram-se sete pares de *primers* de microssatélites tetranucleotídeos desenvolvidos inicialmente para o cão doméstico (*Canis familiaris*) por Francisco et al. (1996), mas que apresentam alta transferibilidade para a espécie *C. brachyurus* (FONTOURA-RODRIGUES et al., 2008) (Tabela 3).

Tabela 3. Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* de microssatélites desenvolvidos para o cão doméstico (*Canis familiaris*) por Francisco et al. (1996).

<i>Primer</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Sequências	
		<i>Forward</i>	<i>Reverse</i>
2001	152 – 160	TCCTCCTCTTCTTTCCATTGG	TGAACAGAGTTAAGGATAGACACG
2018	169 – 197	TTGCTTTACCGCTTCATTTATT	GAGCCTGCTTCTCCCTCTG
2054	158 – 174	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC
2088	112 – 120	CCCTCTGCCTACATCTCTGC	TAGGGCATGCATATAACCAGC
2132	160 – 188	CACTGGGAGTGGAGACTGCT	TGCACAGCCAACTAGAGGTG
2137	218 – 272	GCAGTCCCTTATTCCAACATG	CCCCAAGTTTTGCATCTGTT
2140	138 – 190	GGGGAAGCCATTTTTAAAGC	TGACCCTCTGGCATCTAGGA

Para as reações de amplificação (PCR), marcação e análise no seqüenciador automático, foi utilizado o procedimento proposto por Schuelke (2000), em que na seqüência *forward* dos *primers* é adicionada, na posição 5'-3', uma “cauda” universal de 18 pares de bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) (Figura 9). Durante os ciclos iniciais de PCR, essa seqüência *forward* é incorporada ao produto de amplificação. Complementar a essa cauda, e marcada com fluorescência, é adicionada a reação um *primer* universal M13 (ACA TTT TGC TGC CGG TCA), incorporada ao produto de PCR nos ciclos subseqüentes da reação.

A incorporação do *primer* M13 à “cauda” é a que permite que o fragmento amplificado seja detectado pelo sistema de laser do seqüenciador automático. Esse método torna-se mais econômico porque possibilita que todos os *primers forward*, para todos os locos, sejam adicionados com a mesma cauda e assim somente uma seqüência M13 seja marcada.

Na Figura 9, A, B e C são os três *primers* utilizados durante a PCR para a amplificação do fragmento de interesse. O *primer* universal M13 é complementar à cauda adicionada ao *primer forward*. Em D, mostra os primeiros ciclos da reação de

PCR, o *primer forward* adicionado da “cauda” é incorporado ao produto de PCR. Em E, os ciclos subsequentes à temperatura de anelamento de 53° Celsius promovem a incorporação da sequência fluorescente M13. Em F, o produto final pode ser analisado sob o sistema de detecção a laser.

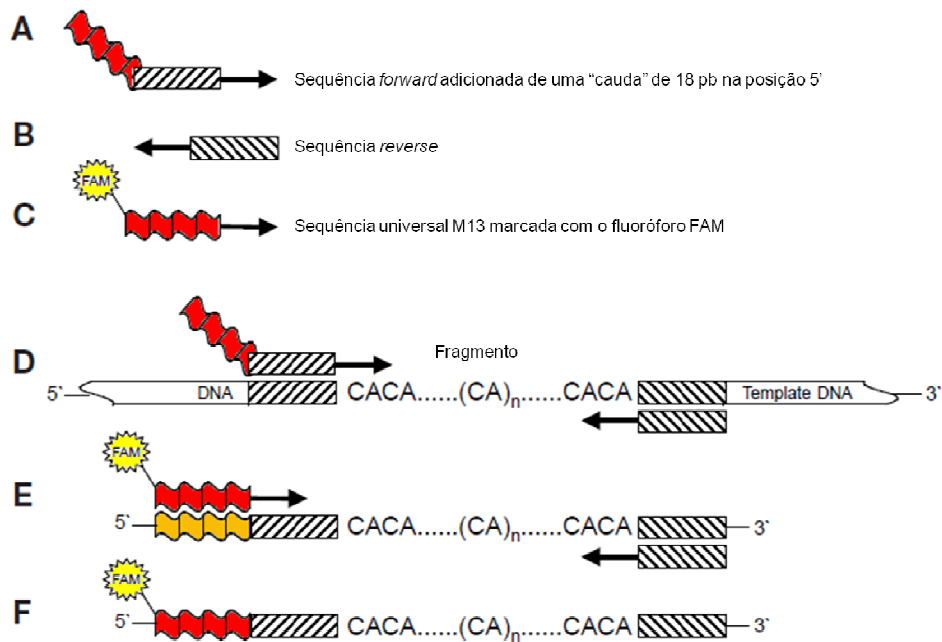


Figura 9. Esquema de uma reação de amplificação com *primers* modificados pela adição de uma sequência M13 marcada com fluorescência. Figura modificada de Schuelke (2000).

Nas análises, cada 15 µL da PCR continha: 7,5 µL de *GoTaq* (Promega) - tampão *Buffer* 1x, 1,25mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 1 unidade de *Taq polimerase* - 2 pmol do *primer forward*, 8 pmol do *primer reverse*, 8 pmol da sequência M13 (SCHUELKE, 2000) marcada com o fluoróforo 6-FAM (Applied Biosystems), 150 µg/mL de BSA e 4,5 µL de DNA.

As amplificações foram realizadas em termociclador com a seguinte programação: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94°C por 3 minutos; 40 ciclos de 92°C por 1 minuto, 47°C por 1 minuto, 72°C por 1 minuto; 12 ciclos para acrescentar a cauda



M13 de 92°C por 30 segundos, 52°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; extensão final de 15 minutos a 72°C.

Foram observadas as ampliações dos fragmentos de DNA em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo. Em uma cuba de eletroforese (110 Volts por 45 minutos), utilizaram-se 2,0 µL do produto de PCR corado com de azul de bromofenol. Com o auxílio de um marcador de peso molecular de 1kb (Invitrogen), sob luz ultravioleta (UV), foi confirmada a presença do fragmento de DNA amplificado de acordo com o tamanho previsto.

Os fragmentos amplificados com a fluorescência foram genotipados em um seqüenciador automático MegaBace ET-550R pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil) e analisados com o programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Science).

Os genótipos multilocus distintos foram identificados com o auxílio do programa *Gimlet* (VALIERE, 2002). Os genótipos foram classificados como heterozigotos, quando dois fragmentos foram observados e como homozigotos, quando um único fragmento foi observado.

Com o propósito de quantificar o poder de discriminação dos indivíduos por meio dos locos de microssatélites utilizados, estimaram-se as probabilidades de identidade ( $P_{ID}$ ), isto é, a probabilidade de dois indivíduos em uma população, aleatoriamente, compartilharem genótipos idênticos para todos os locos analisados (PAETKAU et al., 1998; WAITS et al., 2001; PRUGH et al., 2005).

A probabilidade de identidade foi determinada com o programa *Gimlet*. Calcularam-se os valores para cada loco e então os multiplicamos entre os locos para obter:  $P_{ID \text{ unbias total}}$  (parâmetro que leva em conta o tamanho populacional) e  $P_{ID \text{ sibs}}$

total (parâmetro que leva em conta o tamanho populacional e a presença de relacionados) (PAETKAU et al., 1998).

Foram estimadas as taxas de erro de genotipagem totais devido a não amplificação alélica (*allelic dropout*), dividindo-se o número de erros detectados para cada loco pelo número de casos em que algum erro poderia ser detectado. Considerou-se um indivíduo como homozigoto para um dado loco, quando esse genótipo pôde ser confirmado em três replicações, reduzindo-se a possibilidade de erro de genotipagem ocasionado pela ocorrência do fenômeno de *allelic dropout*, em que um dos dois alelos do indivíduo poderia não ser detectado (TABERLET et al., 1996; PRUGH et al., 2005).

#### 4.5 Determinação do sexo

Foram utilizados os *primers* de *íntrons* específicos para sexagem de canídeos descritos por Seddon (2005) nos testes para a determinação do sexo das amostras de *C. brachyurus* (Tabela 4). Os parâmetros do PCR (ciclos, quantidades de DNA, de MgCl<sub>2</sub> e diferentes marcas de Taq) foram testados e ajustados para as amostras de fezes e de sangue.

Tabela 4. Sequências *forward* e *reverse* dos *primers* de *íntrons* específicos para sexagem de canídeos descritos por Seddon (2005).

Sequências			
Primer	Tamanho do fragmento (pb)	Forward	Reverse
DBX6	246	ATGCTGCAGTTTTTCCAGA	AACTAAGACCCAGCGTA
DBY7	118	GGTCCAGGAGAGGCTTTGAA	CTTCCTTTTAAACAATGGCA

Na sexagem de indivíduos fêmeas é esperado uma banda de 249 pb referente ao *intron* do cromossomo X. Já para os machos são esperados duas bandas: a mesma de 249 pb encontrada nas fêmeas e outra de 118 pb referente ao *intron* do cromossomo Y (Figura 10).

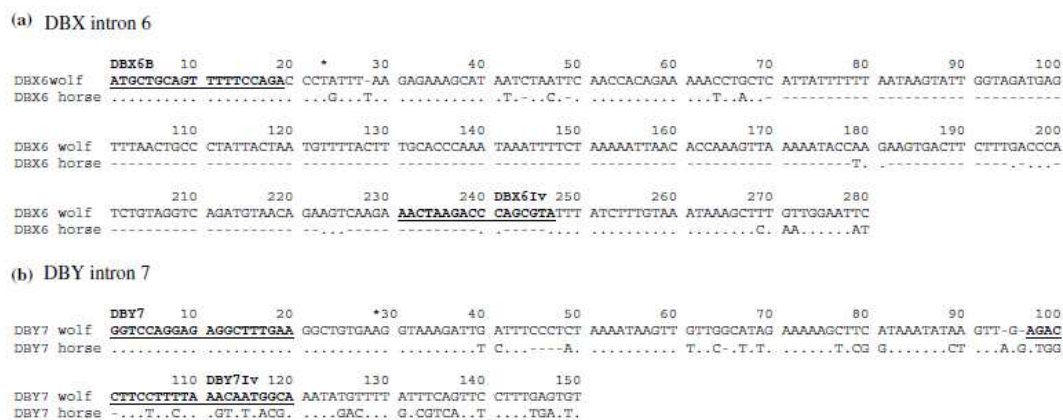


Figura 10. Localização dos *primers* de *introns* específicos para sexagem de canídeos descritos por Seddon (2005). Os *primers* DBX6 e DBY7 são exibidos em negrito.

#### 4.6 Estimativa da diversidade genética

Para as análises de equilíbrio de Hardy-Weinberg, diversidade e frequência alélica, heterozigosidades esperada e observada, foi utilizado o programa GENEPOP versão 4.0 (ROUSSET, 2007). O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg foi realizado utilizando o “exact test”, no qual a hipótese nula é de união aleatória dos gametas. O algoritmo da Cadeia de Markov é utilizado pelo programa e a simulação pelo método de Monte Carlo. Para análises múltiplas foi utilizada a correção de Bonferroni (RICE, 1989).

O desequilíbrio de ligação entre os locos também foi calculado utilizando o programa GENEPOP versão 4.0. Nesse teste é criada uma tabela de contingência para todos os pares de locos e é então realizado um teste de probabilidade para cada par de locos. O programa FSTAT (GOUDET, 1995) foi utilizado para a obtenção da diversidade gênica, riqueza alélica e do coeficiente de endocruzamento ( $F_{is}$ ) (WEIR; COCKERHAM, 1984).

Para a verificação da existência de eventos demográficos recentes, como gargalo populacional, foi utilizado o programa Bottleneck (PIRY et al., 1999). Para as análises, foi escolhido o teste de *Wilcoxon*, o qual é possível de ser utilizado para menos de 20 locos e possui alto poder estatístico. Foi utilizado o modelo de mutação *two phase* (TP) estabelecido de acordo com o recomendado por Piry et al. (1999).

#### **4.7 Análise de parentesco**

Para estimar o grau de parentesco e as relações ( $r$ ) entre os indivíduos de loboguará foi utilizado o programa ML-Relate (KALINOWSKI et al., 2006). O programa fornece quatro tipos de relações: (i) não relacionados (U), (ii) meio-irmãos (HS), (iii) irmãos completos (FS) e (iv) pais e filhos (PO), sendo que os valores mais próximos de zero são indicativos de não relacionados e quanto mais próximos os valores eram de 0,5, maior o grau de parentesco (pais e filhos ou irmãos completos).

Considerando-se que não existia um grupo de animais com relacionamentos conhecidos para servir de modelo para calibrar o programa, o objetivo desta análise foi verificar a existência de animais relacionados na área de estudo, ao invés de definir categorias exatas de parentescos.

## 5 RESULTADOS

A extração do DNA das 41 amostras de fezes analisadas foi realizada com êxito. Dentre o painel utilizado de sete pares de *primers* de microssatélites não houve amplificação dos locos 2132 e 2137, sendo, portanto, descartados das análises.

As melhores amplificações obtidas foram para os outros cinco locos: 2088, 2001, 2018, 2054 e 2140 e todos estes se mostraram polimórficos.

O tamanho e o número de alelos encontrados foram similares aos encontrados na literatura (FONTOURA-RODRIGUES et al., 2008) (Tabela 5). A frequência de erro por não amplificação alélica (*allelic dropout*) no total de replicações das genotipagens foi igual a 16,2%. A probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ) total foi de:  $P_{ID\ sibs} = 0,8 \times 10^{-6}$  e  $P_{ID\ unbias} = 0,159 \times 10^{-19}$  (Tabela 6).

Foi avaliada a existência do desequilíbrio de ligação para cada par de locos (Tabela 7). Nenhum valor de probabilidade mostrou-se significativo após a correção de Bonferroni, e todos os locos podem, então, ser considerados independentes.

Dentre as 41 amostras de fezes analisadas foram identificados 13 indivíduos distintos de *Chrysocyon brachyurus* na Estação Ecológica do Jataí (Tabela 8) (Figura 11); foi encontrada uma média de riqueza alélica de valor 5,4. As heterozigosidades médias esperadas e observadas foram:  $He = 0,72$  e  $Ho = 0,52$  (Tabela 9).

Nas análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram encontrados três locos que apresentaram desvios após a correção de Bonferroni: locos: 2018, 2054 e 2140 (Tabela 10). As análises realizadas no programa Bottleneck mostraram ausência de gargalo populacional na população estudada.

Com relação ao grau de parentesco dos indivíduos, o valor  $r$  variou de 0,000 (não parente) até 0,5253 (pai e filho / irmãos completos), indicando que existem animais relacionados na área.

Nas tentativas de análises de seqüenciamento não houve amplificação dos fragmentos de DNA mitocondrial (mtDNA). Os testes para a determinação do sexo nas amostras de *C. brachyurus* não demonstraram resultados satisfatórios, uma vez que os fragmentos esperados não foram amplificados em nenhum dos testes realizados e para nenhuma das amostras utilizadas.

Tabela 5. Frequência alélicas observadas para cada loco.

População de lobos-guará na EEJ (n=13)		
Locos	Alelos	Frequência
<b>2088</b>	112	0,154
	116	0,5
	132	0,346
<b>2001</b>	150	0,077
	154	0,346
	162	0,192
	170	0,192
	174	0,192
<b>2018</b>	161	0,077
	169	0,077
	173	0,231
	177	0,538
	181	0,077
<b>2054</b>	150	0,077
	154	0,269
	166	0,231
	170	0,077
	174	0,115
	178	0,231
<b>2140</b>	138	0,231
	142	0,192
	150	0,038
	154	0,077
	158	0,038
	160	0,077
	172	0,038
176	0,308	

Tabela 6. Variação dos alelos (em pares de bases – pb) para *Chrysocyon brachyurus* na região do estudo para os cinco locos de microssatélites. (PID) unbias e sibs levando em consideração o tamanho amostral por loco e total e taxa de *allelic dropout* por loco e total.

Loco	Varição no tamanho dos alelo (pb)	Número de alelos	P <sub>(ID)</sub> unbias	P <sub>(ID)</sub> sibs	Allelic dropout
2088	112 – 132	3	0,00000124	0,01275	28%
2001	150 – 174	5	0,00006013	0,05328	16%
2018	161 – 181	5	0,000006476	0,02525	14%
2054	150 – 178	6	0,001105	0,1360	12%
2140	138 – 176	8	0,02994	0,3675	11%
Total	-	5,4	0,159 x 10 <sup>-19</sup>	0,8 x 10 <sup>-6</sup>	16,2%

Tabela 7. Análise da ocorrência de desequilíbrio de ligação para cada par de locos e os respectivos valores de P.

Pares de locos	Valores de P
2088 x 2001	0,743872
2088 x 2018	0,181548
2001 x 2018	1,000000
2088 x 2054	0,946444
2001 x 2054	0,479117
2018 x 2054	0,895462
2088 x 2140	1,000000
2001 x 2140	1,000000
2018 x 2140	0,721552
2054 x 2140	0,019141

Tabela 8. Amostras dos 13 indivíduos os alelos amplificados para cada um dos cinco locos estudados.

Indivíduos	Amostras	Alelo(s) por loco				
		2088	2001	2018	2054	2140
1	M1, M15, M30, M31, M39	116	162 - 170	177	178	176

Continuação (Tabela 8)

<b>2</b>	M2, M3, M4, M5, M6, M9, M10, M17, M18, M19, M22, M24, M29, M32, M34, M36, M40	116 - 132	154 - 162	177	174	142
<b>3</b>	M7, M12, M21	112 - 132	162 - 174	177	154 - 166	158 - 172
<b>4</b>	M8	132	174	169 - 177	178	176
<b>5</b>	M11, M28	116	154 - 174	169 - 173	166 - 170	138
<b>6</b>	M13, M33	112	170	177 - 181	154	154 - 176
<b>7</b>	M14, M16	116 - 132	150 - 154	173	178	176
<b>8</b>	M20, M27	116	154 - 162	161 - 181	154 - 166	138 - 160
<b>9</b>	M23	116 - 132	154	173	154 - 170	150 - 176
<b>10</b>	M25, M26	116 - 132	154 - 162	161 - 173	154 - 166	138
<b>11</b>	M35, M37	116 - 132	150 - 174	177	150 - 166	154 - 160
<b>12</b>	M38	112 - 132	170	177	154 - 166	138 - 142
<b>13</b>	M41	116	154	177	150 - 174	142

Tabela 9. Diversidade genética para a população amostrada.

<b>Locos</b>	<b>Número de indivíduos</b>	<b>Número de alelos</b>	<b>Riqueza Alélica (RA)</b>	<b>Heterozigosidade esperada (<math>H_e</math>)</b>	<b>Heterozigosidade observada (<math>H_o</math>)</b>
2088	13	3	3,000	0,61	0,54
2001	13	5	5,000	0,76	0,62
2018	13	5	5,000	0,64	0,38
2054	13	6	6,000	0,80	0,62
2140	13	8	8,000	0,80	0,46
<b>Média</b>	13	5,4	5,4	0,72	0,52

Tabela 10. Caracterização dos locos analisados com relação aos desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e o coeficiente de endogamia.

<b>Locos</b>	<b>Desvios do equilíbrio (PHW)</b>	<b>Desvio-padrão (SE)</b>	<b>Coefficiente de endogamia (<math>F_{is}</math>)</b>
2088	0,1537	0,0003	0,152
2001	0,1731	0,0006	0,232
2018	0,0096	0,0002	0,431
2054	0,0017	0,0001	0,264
2140	0,0015	0,0001	0,455
<b>Média</b>	-	-	0,311



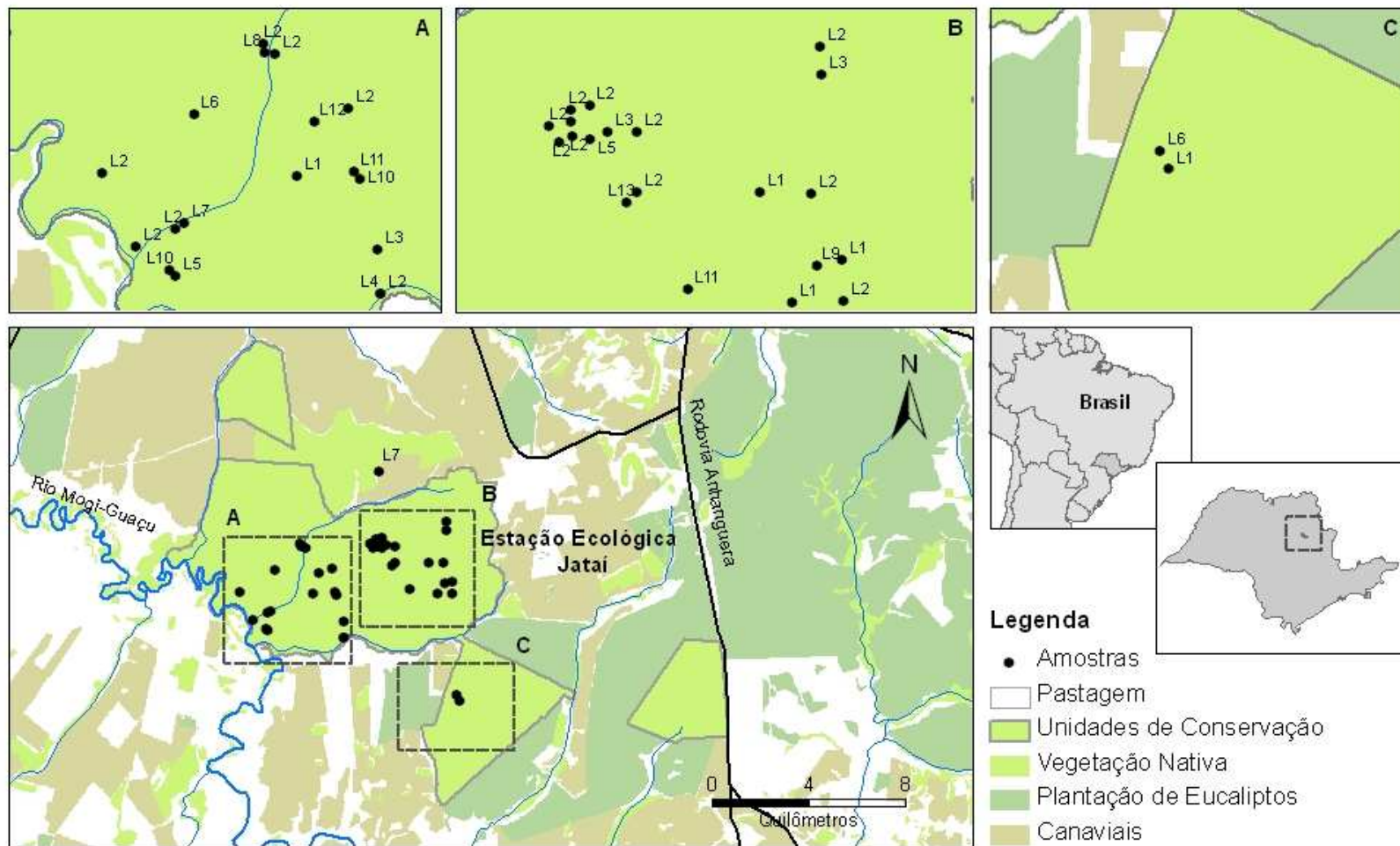


Figura 11. Localização das amostras fecais de *C. brachyurus* coletadas na EEJ individualizadas.

## 6 DISCUSSÃO

As extrações de DNA das amostras de fezes analisadas foram realizadas com sucesso, reiterando a eficiência das análises genéticas não invasivas, na qual com poucos gramas de material é possível encontrar quantidades suficientes de DNA para análises provenientes de milhares de células da mucosa intestinal do animal (ALBAUGH et al., 1992).

São evidentes as vantagens dos métodos alternativos não invasivos, por exemplo: tornar a obtenção das amostras um processo menos desgastante, tanto para o pesquisador quanto para os animais, além de permitir estudos populacionais de grandes carnívoros por meio de marcadores moleculares e, ao mesmo tempo, minimizar o impacto desses estudos nas populações (MORIN; WOODRUFF, 1996; KOHN; WAYNE, 1997; MIOTTO et al., 2007a).

Além do número reduzido de sucesso na amplificação do DNA mitocondrial (mtDNA) das amostras testadas, ainda foi observada baixa eficiência, já que os fragmentos de mtDNA que foram amplificados eram de baixa qualidade e pouco confiáveis, o que não permitiu realizar o diagnóstico genético da espécie de origem.

As amostras fecais coletadas foram devidamente identificadas de acordo com as características morfológicas e odores característicos e distintivos para a espécie e foi decidido pela não insistência nas tentativas de diagnóstico genético da espécie, já que a realização de mais análises acarretaria em aumentos consideráveis nos custos e tempo da pesquisa.

Dentre o painel de sete pares de *primers* de microssatélites utilizados na pesquisa, e desenvolvidos inicialmente para o cão doméstico (*Canis familiaris*) por Francisco *et al.* (1996), mas que apresentam alta especificidade a *C. brachyurus*

(FONTOURA-RODRIGUES et al., 2008), não houve amplificação dos locos 2132 e 2137, sendo, portanto, descartados das análises.

Na pesquisa de Bruzzi (2007), avaliou-se a diversidade genética do lobo-guará no Distrito Federal, afirmou-se que o loco 2132 está sujeito a apresentar maiores erros de genotipagem, corroborando com o resultado encontrado no presente trabalho. Os bons resultados foram obtidos na amplificação dos locos: 2088, 2001, 2018, 2054 e 2140, e, todos esses se mostraram polimórficos. Possivelmente resultados melhores poderiam ser alcançados com o desenvolvimento de *primers* específicos para *C. brachyurus*, mas esse procedimento demanda trabalhos específicos de pesquisa, além de possuir elevado custo financeiro.

Alguns erros de genotipagem são mais comuns em análises que utilizam amostras não invasivas devido à baixa quantidade e qualidade do DNA das amostras, como: a amplificação de alelos falsos que são picos (alelos) que aparecem no eletroferograma, que não correspondem na realidade a um alelo verdadeiro. O pesquisador pode assim confundir-se e inferir que um alelo que não existe é verdadeiro.

Outro fenômeno que pode ocorrer é o chamado de *allelic dropout*, em que ocorre a falha na amplificação de um dos dois alelos de um indivíduo (TABERLET et al., 1996; GAGNEUX et al., 1997; GOOSSENS et al., 1998; MORIN et al., 2001; PRUGH et al., 2005). Tais falhas podem levar a uma individualização errônea das amostras e prejudicar a confiabilidade dos resultados encontrados para o tamanho populacional estimado (MORIN et al., 2001; MIOTTO, 2007a).

Para contornar o problema de *allelic dropout* foram realizadas, ao menos duas, réplicas para cada genotipagem de heterozigotos e, ao menos três réplicas, para os homozigotos. No presente trabalho foi revelada uma taxa média de não detecção alélica de 16,2 %.

A estimativa da probabilidade de identidade ( $P_{ID}$ ) é útil para o planejamento de estudos que necessitam de individualização. Através da  $P_{ID}$  é verificado se o número de locos analisados foi eficiente e suficiente para a identificação de indivíduos, sendo que os valores menores que 0,001 são considerados satisfatórios (PAETKAU et al., 1998, WAITS et al., 2001).

No presente estudo foi verificado que os cinco locos analisados foram satisfatoriamente suficientes para a individualização das amostras fecais de *C. brachyurus*. Dessa forma, foi possível estimar um número populacional mínimo de 13 lobos-guará na Estação Ecológica do Jataí.

Observaram-se a ausência de desequilíbrio de ligação entre os locos analisados, isto é, os locos são herdados independentemente não enviesando os resultados encontrados nas análises.

Foram encontrados valores relativamente baixos de heterozigosidade para *C. brachyurus*. A heterozigosidade média observada ( $H_o$ ) de 0,52 é diferente da encontrada por Bruzzi (2007) ( $H_o = 0,74$ ) em um estudo com população desta mesma espécie no Distrito Federal, e por Fontoura-Rodrigues (2009) ( $H_o = 0,72$ ) em estudo com diferentes populações de *C. brachyurus* no Brasil. Possivelmente esta diferença nos valores deve-se a diferenças no tamanho amostral, uma vez que o número de amostras utilizada no presente estudo foi menor do que os utilizados nos dois trabalhos citados anteriormente.

No caso da heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), os valores encontrados no presente trabalho foram próximos aos valores encontrados pelos demais autores. O valor da heterozigose média ( $H_e$ ) encontrado de 0,72 é similar àqueles encontrados por Bruzzi (2007) ( $H_e = 0,71$ ) e por Fontoura-Rodrigues (2009) ( $H_e = 0,75$ ).

A média de alelos por loco encontrada de 5,4 é próximo do valor observado por Bruzzi (2007) (5,8 alelos por loco), que também utilizou cinco locos em seu trabalho, sendo três desses também testados no presente trabalho (2132, 2054 e 2088). Fontoura-Rodrigues (2009) utilizou um número maior de locos (14), sendo sete deles os mesmos locos testados neste trabalho, encontrando para esses uma média de 9,71 alelos por loco. Esses foram os únicos trabalhos que foram encontrados na literatura consultada em que é investigada a diversidade genética da espécie.

Nas análises do equilíbrio de Hardy-Weinberg, três locos apresentaram desvios, uma hipótese que deve ser levada em consideração é que esses desvios possam ter sido causados pelo número amostral reduzido ou ainda, em menor grau, pela presença de alelos nulos ou endogamia.

Os valores de  $F_{is}$  foram significativos para todos os locos na população. É possível que esses valores sejam indicativos de número amostral baixo ou ainda algum grau de endogamia. Segundo Rodden et al. (2004), os lobos-guará são canídeos solitários, que se juntam aos casais apenas na época reprodutiva. São territoriais, com o casal partilhando a mesma área de vida, sendo essas áreas exclusivas, com nenhuma ou pouca sobreposição entre áreas de casais vizinhos (DIETZ, 1984). Portanto, esse resultado sugere que a fragmentação e o isolamento da área de conservação estudada podem influenciar no comportamento natural de dispersão dos animais adultos e isso pode gerar problemas na população, como a endogamia. Contudo, as análises realizadas no programa Bottleneck não mostraram nenhum efeito de gargalo populacional, o que pode indicar a influência no resultado devido ao número relativamente baixo de amostras utilizadas para essa análise.

Os testes para a determinação do sexo das amostras de *C. brachyurus* não demonstraram resultados satisfatórios, uma vez que os fragmentos esperados não foram

amplificados em nenhum dos testes realizados e para nenhuma das amostras utilizadas. Esse resultado é importante para demonstrar a necessidade e a importância do desenvolvimento de *primers* específicos para a sexagem de amostras genéticas de *C. brachyurus*. Na literatura pesquisada, não foram encontrados trabalhos de determinação de sexo para a espécie *C. brachyurus*.

A determinação do tamanho populacional mínimo de *C. brachyurus* na área da EEJ fornece dados para novas pesquisas e podem ser utilizados para implantação de planos de manejo e conservação da espécie, bem como da sua área de ocorrência e entorno, com o propósito da manutenção das populações desses animais e da funcionalidade de suas áreas de vida.

## 7 CONCLUSÕES

- O método de genotipagem de microssatélites de amostras não invasivas foi aplicado com sucesso em amostras de fezes de lobo-guará;
- Mesmo inserida em uma paisagem altamente fragmentada, a área da Estação Ecológica do Jataí ainda mantém uma população de lobos-guará;
- A pesquisa determinou que a Estação Ecológica de Jataí abriga, ao menos, 13 (treze) indivíduos distintos de *C. brachyurus*;
- Dois dos cinco *primers* de microssatélites isolados inicialmente para o cão doméstico (*primers* heterólogos) e utilizados na pesquisa, esses não foram capazes de amplificar com sucesso o DNA fecal de *C. brachyurus*;
- Os *primers* de *íntrons* específicos para determinação do sexo em canídeos não amplificaram os fragmentos de tamanho esperados para a espécie *C. brachyurus*, demonstrando a necessidade e a importância na pesquisa de *primers* para a sexagem de

amostras genéticas de *C. brachyurus*, uma vez que até o momento não existem na literatura pesquisada qualquer estudo com sucesso na sexagem de amostras da espécie;

- A variação genética encontrada foi relativamente baixa, com três locos desviando do equilíbrio de Hardy-Weinberg. Nenhum dos locos estava ligado, e os valores de  $F_{is}$  foram significativos para todos os locos na população;
- Foi observada ausência de gargalo populacional nas análises realizadas através do programa Bottleneck. É provável que os valores encontrados sejam indicativos de um número pequeno de amostras utilizadas;
- O grau de parentesco dos indivíduos indicou que há animais relacionados na área.

## 8 REFERÊNCIAS

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

ARAGONA M.; SETZ E.Z.F. Diet of the maned wolf *Chrysocyon brachyurus* (Mammalia: Canidae), during wet and dry. Seasons at Ibitipoca State Park, Brazil. **J. Zool.** v. 254, p.131-136, 2001.

AZEVEDO F.C.C.; GASTAL M.L.A. Hábito alimentar do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) na APA Gama/Cabeça do Veado – DF. In: Leite LL, Saito CH. (eds.) Contribuição do Conhecimento Ecológico do Cerrado, Universidade de Brasília, Brasília, DF, p.238-240, 1997.

BALMFORD A.; et al. Economic reasons for conserving wild nature. **Science**, v.297, n.5583, p.950-953, 2002.

BANKS S.C.; et al. Genetic marker investigation of the source and impact of predation on a highly endangered species. **Molecular Ecology**, v.12, p.1663-1667, 2003.

BERNARDES A.T.; MACHADO A.B.M.; RYLANDS A.B. Fauna brasileira ameaçada de extinção. **Fundação Biodiversitas**, Belo Horizonte, Brasil, 1990.

BESTELMEYER S.V. Solitary, reproductive, and parental behavior of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). **Tese (Doutorado)**. Colorado State University, 2000.

BRITO M.C.W.; (Coord.). **Cerrado**: bases para conservação e uso sustentável das áreas de cerrado do Estado de São Paulo. São Paulo: SMA, 184p. 1997.

BRUZZI M.L. Diversidade genética e conservação do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, em áreas protegidas do Distrito Federal. **Dissertação de mestrado**, Universidade de Brasília, Brasília, DF, 2007.

BUSO G.S.C.; et al. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microssatélites. **Circular técnica**, v.20, p.1-11, 2003.

CARVALHO C.T.; VASCONCELLOS L.E.M. Disease, food and reproduction of the maned wolf - *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Carnivora Canidae) in southeast Brazil. **Rev.Bras. Zoo.** v.12, n.3, p.627-640, 1995.



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

DALÉN L.; GOTHERSTROM A.; ANGERBJORN A. Identifying species from pieces of faeces. **Conservation Genetics**, v.5, p.109-111, 2004.

DALPONTE J.C. Diet of the hoary fox, *Lycolopex vetulus*, in Mato Grosso, Central Brazil. **Mammalia**, v.61, p.537-547, 1997.

DIETZ J.M. Ecology and social organization of the maned wolf. *Smithsonian Cintrib. Zool.*, v.392, p.1-51, 1984.

DUARTE J.M.B.; UHART M.M.; GALVEZ C.E.S. Capture and physical restraint. In: Duarte, JMB, González S. **Neotropical Cervidology**. Jaboticabal: FUNEP. p.218-227, 2010.

EISEN J.A. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Goldstein DB, Schotterer C. *Microsatellites – evolution and applications*. p.34-48. Oxford **University Press, Oxford**, UK, 1999.

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

FERREIRA M.E.; GRATTAPAGLIA D. Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 2ªed. Brasília, **EMBRAPA/CENARGEN**, p.220, 1995.

FERREIRA M.E.; GRATTAPAGLIA D. Introdução ao uso de marcadores moleculares RAPD e RFLP em análises genéticas, 2ªed. Brasília: **EMBRAPA, CENARGEM**. p.220, 1996.

FIORI A.M.; FIORAVANTI C. Os caminhos para salvar o Cerrado paulista. **Pesquisa Fapesp Online**. Disponível em: <<http://revistapesquisa.fapesp.br/?art=1247&bd=1&pg=1&lg=>> Acesso em: 12 de dezembro de 2008.

FONSECA G.A.B.; et al. Livro Vermelho dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção. **Fundação Biodiversitas**, Belo Horizonte, 1994.

FONTOURA-RODRIGUES M.L.; et al. Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. **Molecular Ecology Resources**, v.8, p.898–900, 2008.

FONTOURA-RODRIGUES M.L. Diversidade genética e estrutura populacional do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). **Dissertação de mestrado**, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, RS, Brasil, 2009.

Francisco L.V.; et al. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. **Mammalian Genome**, v.7, p.359–362, 1996.

FRANTZ A.C. Reliable microsatellite genotyping of the eurasian badger (*Meles meles*) using faecal DNA. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 12, p. 1649 – 1661, 2003.

GARGAGLIONI LH.; et al. Mamíferos da Estação Ecológica do Jataí, Luís Antônio, São Paulo. **Papéis avulsos de Zool.**, v.40 n.17, p.267-287, 1998.

GIRMAN D.J.; et al. Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Molecular Ecolog.**, v.10, p.1703-1723, 2001.

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

GOOSSENS B.; WAITS L.P.; TABERLET P. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. **Molecular Ecology**, v.7, p.1237-1241, 1998.

GOUDET J. FSTAT, a computer program to calculate F-statistics. **J. Hered.** V.86, p.485-486, 1995.

GRIFFIN A.S.; NURNBERGER B.; PEMBERTON JM. A panel of microsatellites developed for meerkats (*Suricata suricatta*) by cross-species amplification and species-specific cloning. **Molecular Ecology Notes**, v.1, p.83-85, 2001.

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

HURTADO L.C. Avaliação da predação de criações domésticas por lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no entorno do Parque Nacional da Serra da Canastra, MG, Brasil. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Minas Gerais, 2007.

ICHIKAWA Y.; et al. Identification and characterization of 40 dinucleotide microsatellites in the dog genome. **Animal Genetics**. v.33, p.400-401, 2002.

IYENGAR A.; et al. Phylogeography, genetic structure, and diversity in the dhole (*Cuon alpinus*). **Molecular Ecology**. v.14, p.2281-2297, 2005.

IUCN – The World Conservation Union. **Biodiversity Hotspots**, 2005.

IUCN – The World Conservation Union. 2008 IUCN Red List of Threatened Species. **IUCN**, New York, 2008.

JÁCOMO A.T.A.; SILVEIRA L.; DINIZ-FILHO J.A.F. Niche separation between the maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*), Crab-Eating Fox (*Dusicyon thous*) and the Hoary-Fox (*Dusicyon vetulus*) in the Cerrado of the central Brazil. **J. Zool.** v. 262, p.99-106, 2004.

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

KNAPP S.M.; CRAIG B.A.; WAITS L.P. Incorporating genotyping error into noninvasive DNA based mark-recapture population estimatives. **The journal of wildlife Management**, Bethesda, v.73, p. 598-604, 2009.

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

KOHN M.H.; et al. Estimating population size by genotyping faeces. **Proceedings of Royal Society of London B**, v.266, p.657-663, 1999.

KLINK C.A.; MOREIRA A.G. Past and current human occupation, and Land Use. *In*: Oliveira S, Marquis RJ. (eds.). The Cerrado of Brazil, New York; **Columbia University Press**, p. 69-88, 2002.

KLUKOWSKA J.; et al. Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. **Journal of Breeding Genetics**. v.120, p.88-94, 2003.

KOSKINEN M.T.; BREDBACKA P. Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. **Animal Genetics**. v.31, p.310-317, 2000.

LEONARD J.A.; VILA C.; WAYNE R.K.. Legacy lost: genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). **Molecular Ecology**, v.14, p.9-17, 2005.

MMA. – Ministério do Meio Ambiente. Instrução normativa número 3, de 27 de maio de 2003. **Diário Oficial da União** – seção 1, v.101, p.88-97, 2003.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. Cerrado e Pantanal. Disponível em:<<http://www.mma.gov.br/sitio/index.php?ido=conteudo.monta&idEstrutura=201>> Acesso em: 02 de maio de 2009.

MACHADO R.B.; et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Conservação Internacional do Brasil**, Brasília, 2004.

MANTOVANI J.E. Radio and GPS telemetry tracking to determine the home range of three carnivore species in the northeast area of São Paulo State. **Tese (Doutorado)**, São Carlos, Brasil, 2001.

MELO L.F.B.; et al. Secret lives of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*): as revealed by GPS tracking collars. **Journal of Zoology**, v.271, p.27-36, 2007.

MIOTTO R.A. Análise do DNA fecal para a determinação da presença e do número populacional mínimo de onças-pardas (*Puma concolor*, Felidae) em duas Unidades de Conservação do Estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica de Jataí. **Dissertação de mestrado**, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, Brasil, 2006.

MIOTTO R.A.; et al. Determination of the Minimum Population Size of Pumas (*Puma concolor*) Through Fecal DNA Analysis in Two Protected Cerrado Areas in the Brazilian Southeast. **Biotropica**, v.39, n.5, p.647-654, 2007a.

MIOTTO R.A.; et al. Identification of pumas (*Puma concolor* (Linnaeus, 1771)) through faeces: a comparison between morphological and molecular methods. **Braz. J. Biol.**, v.67 (special number), p.631-637, 2007b.

MONES A.; OLAZARRI J. Confirmacion de La existencia de *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) em El Uruguay (Mammalia: Carnivora: Canidae). **Comunicaciones Zoológicas Del Museo de Historia Natural de Montevideo**, v.12: 1-5, 1990.

MORIN P.A.; WOODRUFF D.S. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. Molecular Genetics Approaches in Conservation. **Oxford University**, New York, p. 298-313, 1996.

MOREIRA JR; et al. Estudo preliminar da variabilidade genética do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). **EMBRAPA/CENARGEN**, Brasília, p.1-10, 1998.

MORIN P.A.; et al. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). **Molecular Ecology**, v.10, p.1835-1844, 2001.

MORIN P.A.; WOODRUFF D.S. Noninvasive genotyping for vertebrate conservation. *In* Molecular Genetics Approaches in Conservation, pp. 298-313. **Oxford University**, New York, 2005.

MOTTA-JÚNIOR J.C.; et al. Diet of the maned Wolf, *Chrysocyon brachyurus*, in central Brazil. **J. Zool. Lond.** v.240, p.277-284, 1996.

MOTTA-JÚNIOR J.C. Ecologia alimentar do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, (Mammalia: Canidae). *In*: Ades C. (Ed.). **Anais de XV Encontro Anual de Etologia**. p.197-209, 1997.

NIMER E. Climatologia do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 1977.

OLIVEIRA T.G.; et al. Origin, evolution and genome distribution of microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, p.294-307, 2006.

PARRA D.; DOLF G.; DUNNER S. Contribution of a new set of canine microsatellite to the knowledge of the canine genetic map. **Animal Genetics**, v.34, p.69-70, 2003.

PALOMARES F.; et al. Fecal genetic analysis to determinate the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. **Molecular Ecology**, v.11, p. 2171-2182, 2002.

PAETKAU D.; et al. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. **Conservation Biology**, v.12, n.2, p.418-429, 1998.

PEREZ I.; GEFFEN E.; MOKADY O. Critically endangered Arabian leopards *Panthera pardus nimr* in Israel: estimating population parameters using molecular scatology. **Oryx**, v.40, n.3, p.295-301, 2006.

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

PIRES, J.S.R.; SANTOS, J.E. Bacias Hidrográficas – Integração entre meio ambiente e desenvolvimento. **Ciência Hoje**, v.40, n.110, p.40-45, 1995.

PIRY S.; LUIKART G.; CORNUET J.M. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. **The Journal of Heredity**, v.90, n.4, p.502-503, 1999.

PRIMACK R.B.; RODRIGUES E. *Biologia da Conservação*. Efraim Rodrigues (ed.), Londrina, 2001.

PRUGH LR.; et al. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology*, v.1, p.1585-1596, 2005.

RIBEIRO J.M.; et al. Métodos não-invasivos na obtenção de DNA de búfalos. *Acta Scientiarum Animal Science*. Maringá v.30, n.4, p. 479-483, 2008.

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

RODDEN M.; RODRIGUES F.; BESTELMEYER S. Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). 38-44 In: Sillero-Zubiri C, Hoffmann M, MacDonald DW. (eds). 2004. Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. Gland, Switzerland and Cambridge, UK. 430p, 2000.

RODRIGUES F.H.G. *Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF. Tese (Doutorado)*, Universidade Estadual de Campinas, 2002.

RODRIGUES F.H.G.; OLIVEIRA T.G. Unidades de conservação e seu papel na conservação de carnívoros brasileiros. In: Morato RG, Rodrigues FHG, Eizirik E, Mangini PR, Azevedo FCC, Marinho-Filho JS. Manejo e conservação de carnívoros neotropicais: **I Workshop de pesquisa para a conservação**. São Paulo: IBAMA. p.97-110, 2006.

ROUSSET F. Inferences from spatial population genetics. In: Handbook of statistical genetics (D. J. Balding, M. Bishop & C. Cannings, eds.), p. 945-979. Wiley, Chichester, UK, 3rd ed., 2007.

SAMBROOK J.; FRITSCH E.F.; MANIATIS T. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, New York, 1989.

SALIM D.C. Estudo da variabilidade genética do lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, no Brasil. *Biologia Animal*. Universidade de Brasília, Brasília, DF, p.71, 2005.

SANTOS J.E.; et al. Utilização da abordagem sistêmica para o manejo de áreas naturais. Caso de Estudo: Estação Ecológica do Jataí, Luís Antônio, SP. *Oecologia Brasiliensis*, p.487-582, 1999.

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

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

SEDDON J.M. Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. **Conservation Genetics**, v.6, p.147-149, 2005.

SILVEIRA L. Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional de Emas, Goiás. **Dissertação (Mestrado)**. Universidade Federal de Goiás, 1999.

SMITH D.A.; et al. Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. **Molecular Ecology**. v.15; p.387-406, 2006.

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

SOUSA-SILVA J.C.; SCARIOT A. Biodiversidade, ecologia e conservação do Cerrado: avanços no conhecimento. In: **CERRADO: Ecologia, Biodiversidade e Conservação**/Aldicir Scariot, José Carlos Sousa-Silva, Jeanine M. Felfili (Org.). **Brasília: Ministério do Meio Ambiente**, 2005.

TABERLET P.; et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, v.24 (16), p.3189-3194, 1996.

TALAMONI S.A.; MOTTA-JUNIOR J.C.; DIAS M.M. Fauna de mamíferos da Estação Ecológica de Jataí e da Estação Experimental de Luís Antônio. **Estação Ecológica do Jataí. Vol. I**. São Carlos: RIMA Editora, 346p, 2000.

TALOMANI J.L.B.; SAMPAIO A.C. (org.). Educação Ambiental: da prática pedagógica à cidadania. São Paulo: **Escrituras**, 2003.

TOPPA R.H.; et al. Fitofisionomias da Estação Ecológica do Jataí, Luís Antônio, SP. Em: **III Congresso Brasileiro de Unidades de Conservação**. Fortaleza, Ceará, p.611-620, 2002.

TOPPA R.H. Estruturas e diversidade florística das diferentes fisionomias de Cerrado e suas correlações com o solo na Estação Ecológica de Jataí, Luiz Antônio, SP **Tese. (Doutorado)**. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, SP, 2004.

VITOUSEK P.M.; et al. Human domination of Earth's ecosystems. **Science**, v.277, p.494-499, 1997.

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

WAYNE R.K.; et al. Molecular systematic of the canidae systematic biology, v.46, p.622-653, 1997.

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

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

WEBER M.; GONZALEZ S. Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience**, Québec, v.10, p.443-454, 2003.

WEIR, B.S.; COCKERHAM, C.C. Estimating  $F$ -statistics for the analysis of population structure. **Evolution** v.38, p.1358-1370, 1984.

WILSON D.E.; et al. Introduction. In: Wilson DE, Cole Fr, Nichols JD, Rudran R, Foster MS. Measuring and monitoring biological diversity: standard methods for mammals. Washington; London: **Smithsonian Institution Press**, p.1-7, 1996.

ZRZAVÝ J.; RICANKOVÁ V. Phylogeny of recent canidae (Mammalia, Carnivora): relative reliability and utility of morphological and molecular datasets, 2004.