

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Karen Giselle Rodríguez-Castro

**DISTRIBUIÇÃO DA VARIAÇÃO GENÉTICA NOS CANÍDEOS *Cerdocyon thous*
E *Chrysocyon brachyurus* DE PAISAGENS ANTROPIZADAS DA REGIÃO
CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL**

São Carlos
2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CAMPUS SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA E BIOLOGIA
MOLECULAR

Karen Giselle Rodríguez-Castro

**DISTRIBUIÇÃO DA VARIAÇÃO GENÉTICA NOS CANÍDEOS *Cerdocyon thous*
E *Chrysocyon brachyurus* DE PAISAGENS ANTROPIZADAS DA REGIÃO
CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, para obtenção do título de doutor em Ciências, Área de concentração em Genética e Evolução.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Jr.

São Carlos

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

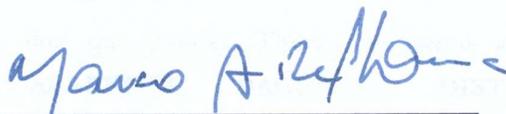
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Folha de Aprovação

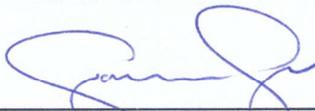
Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado da candidata Karen Giselle Rodriguez Castro, realizada em 24/08/2017:



Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior
UFSCar



Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama
UFSCar



Prof. Dr. Evandro Marsola de Moraes
UFSCar



Prof. Dra. Marina Corrêa Côrtes
UNESP



Prof. Dr. Flávio Henrique Guimarães Rodrigues
UFMG

A mis papás,

Por el amor incondicional, por creer en mí, por ser el mejor ejemplo y por despertar mi curiosidad y el cariño por la biología...los amo.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Dr. Pedro Manoel Galetti Jr. pela confiança e a oportunidade de pertencer ao laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, por todo o aprendizado e pela oportunidade de trabalhar com assuntos e animais extraordinários;

Ao CNPq pela bolsa de doutorado concedida para o desenvolvimento deste estudo;

À Fapesp, ao CNPq e ao projeto Sisbiota – Predadores Topo de Cadeia pelo auxílio financeiro que fez possível o desenvolvimento desta e outras pesquisas no laboratório;

À ONG IDEA WILD que forneceu recursos que contribuíram para a realização desta pesquisa;

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular e ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Federal de São Carlos;

Aos professores doutores Marco Antonio Del Lama, Evandro Marsola de Moraes, Marina Corrêa Côrtes e Flávio Henrique Guimarães Rodrigues por aceitarem participar da banca examinadora e por todas as contribuições realizadas;

Às unidades de conservação e seus funcionários por sempre estar dispostos a colaborar e pelo apoio em cada visita de campo. À COTEC pela licença para trabalhar dentro das unidades de conservação;

Ao Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, e a todos os que fazem parte desse grande projeto, principalmente, ao Fred e à Fernanda por me receberem, me fazerem sentir parte do programa. Nunca esquecerei a oportunidade de ver, conhecer, aprender sobre a biologia e ecologia do cachorro-do-mato e do lobo-guará;

Ao Programa Anta Pantanal e ao Projeto Tatu Canastra, principalmente ao Dr. Arnaud L. J. Desbiez e a Dra. Patrícia Medici;

A todos os colegas e amigos do laboratório pela disposição, as discussões, as contribuições, pelo companheirismo e por tornar o dia a dia mais feliz. Principalmente, ao Bruno Saranholi pelo tempo, as contribuições nas discussões dos dados e pelas correções a este trabalho. À Luana aluna “extraoficial” de iniciação científica;

À Karla Chavez, Carla Gestich, Bruno Saranholi, Jhavana Gomes, Aristene N. Ferreira, Pedro Gallo, Ueslei Lopes, Raphael Oliveira, Samara Muller, José Ariel Rodríguez, Eliana Fisher, ao Parque Ecológico de São Carlos (PESC). Cada amostra que vocês ofereceram contribuiu, de maneira significativa, ao entendimento da estrutura genético populacional das espécies. Sem sua ajuda não teria sido possível este estudo;

Ao Laboratório de Genética de Populações e Evolução da UFSCar, e em especial ao Dr. Felipe Torres pelos ensinamentos para as análises de Melting de Alta-Resolução;

A minha família por confiar em mim, por me apoiar sempre e por entender a distância e, principalmente, pelo amor e carinho. A meus pais e meu irmão, sem seu apoio e confiança este trabalho não seria possível;

A meus amigos de perto e de longe que tornaram cada dia mais especial e feliz. À Dani por ser colega, companheira e por ser mais que amiga. Pelo Arthurzinho que alegrou cada momento da minha vida desde que chegou e pelas correções e contribuições a este trabalho;

Ao Rafael, por estar do meu lado durante todo esse período, por me apoiar, me entender e me ajudar e, pelo amor;

Enfim, a todos cujas ideias me serviram de exemplo e inspiração, a todos obrigada!

*“Eis o meu segredo. Ele é muito simples:
somente vemos bem com o coração.
O essencial é invisível aos olhos”.*

Antoine Saint Exupery

RESUMO

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) são parte fundamental dos habitats onde ocorrem, devido às funções ecossistêmicas que ambos desempenham como dispersores de sementes e controladores dos tamanhos populacionais das suas presas. Para proteger essas espécies é necessário conhecer sua estrutura genética no cenário atual de paisagens antropizadas e altamente alteradas. Dentro deste contexto, este trabalho pretendeu reunir informações genéticas, biológicas e ecológicas das duas espécies a partir de uma abordagem genético-molecular. Assim, foram comparadas as densidades e os tamanhos populacionais, foi avaliada a distribuição da variação genética e a estrutura populacional, assim como possíveis limitações de dispersão ligadas ao sexo e, finalmente foram analisadas as relações de parentesco entre e dentro das áreas amostradas das duas espécies de canídeos. Para isso, foram coletadas amostras de tecido, sangue e fezes das duas espécies em três áreas antropizadas de três estados das regiões centro-oeste e sudeste do Brasil: Mato Grosso do Sul, Goiás e São Paulo. O DNA total das amostras foi extraído e amplificado para identificação das espécies (utilizando mtDNA), para sexagem (empregando genes nucleares) e para análises genético-populacionais (usando microssatélites). Todos os 122 indivíduos de cachorro-do-mato pertencem a três populações, que correspondem às áreas de estudo. Os valores de relação de parentesco entre os cachorros-do-mato são altos e existem indivíduos migrantes entre as áreas estudadas. Para o lobo-guará (N=93) foram encontradas duas populações: uma em São Paulo e outra em Mato Grosso do Sul e Goiás. As duas populações identificadas não mostraram sinais de isolamento populacional. Podemos afirmar que existe uma correlação positiva entre as distâncias geográfica e genética, que resulta em isolamento por distância para ambas as espécies. O tamanho dos fragmentos não foi tão importante, porém o estado de conservação da paisagem e o nível de permeabilidade causaram fortes impactos na diversidade genética de ambas espécies. Assim, paisagens mais alteradas, antropizadas e menos permeáveis, como as das áreas do estado de São Paulo, mostraram reduções na diversidade genética, principalmente em lobo-guará, espécie solitária, mais sensível e com densidades populacionais menores. Nenhuma das espécies apresentou sinais de filopatria ou dispersão preferencial para os sexos.

Palavras-chave: Amostras não invasivas. Densidade populacional. Estruturação populacional. Isolamento por distância. Microssatélites. mtDNA.

ABSTRACT

The Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and the Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*) are a fundamental part from the habitats where they occur, due to the ecosystemic functions they play, as seed dispersers and controlling the population size of their preys. In order to protect these species is necessary to know about its genetic population structure in the current scenario of anthropized and highly transformed landscape. In this context, this work aimed to gather genetic, biological and ecological information for both species from molecular-genetic approach. Thus, we assessed and compared population sizes and densities, we evaluated genetic variation distribution and population structure, besides we evaluated possible sex-biased dispersion, and finally relatedness between and within sampled areas for both canids species. For that propose, we collected tissue, blood and scat samples of both species in three anthropic areas of three states in the central-west and southeastern regions of Brazil: Mato Grosso do Sul, Goiás and São Paulo. We extract the total DNA and amplify it for species identification (using mtDNA), for sexing (using nuclear genes) and for population genetic analyses (using microsatellites). A total of 122 Crab-eating foxes belonging to the three different sampled populations were studied. The relatedness values to Crab-eating foxes were high and migrant individuals are present among the studied areas. We found two populations for the Maned Wolves (N=93): one including the São Paulo state individuals and the other one including Mato Grosso do Sul and Goiás individuals. The two identified populations showed no population isolation. We found a positive correlation between the geographic and genetic distances, resulting in isolation by distance in both species. Fragment size was not so important, while landscape conservation status and permeability level cause strong impacts on the genetic diversity of both species. Thus, more altered, anthropized and less permeable landscapes, such as the São Paulo state, showed genetic diversity reduction, mainly in the Maned Wolf, a solitary, more sensitive and a lower population density species. None of the species showed philopatry evidence or preferential dispersion for neither sex.

Keywords: Isolation by distance. Microsatellites. mtDNA. Non-invasive samples. Population density. Population structure.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1. Cachorro-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>).	25
Figura 2.2. Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>).	27
Figura 4.1. Locais de coleta de amostras de fezes no estado de São Paulo (Brasil).	35
Figura 4.2. Número de amostras de fezes coletadas para <i>Cerdocyon thous</i> e <i>Chrysocyon brachyurus</i> e efetivamente analisadas para as áreas estudadas no estado de São Paulo. .	44
Figura 4.3. Probabilidade de identidade P_{ID} e $P_{ID(sibs)}$ para as amostras de fezes coletadas no estado de São Paulo para (a) <i>Cerdocyon thous</i> e (b) <i>Chrysocyon brachyurus</i>	47
Figura 4.4. Áreas do estado de São Paulo com os <i>buffers</i> amostrados efetivamente para <i>Chrysocyon brachyurus</i>	50
Figura 4.5. Sequências gene ZF para as duas espécies. Destaca-se em vermelho o único sítio de ação da enzima de restrição, que reconhece a sequência 5'-...TCGA...- 3' presente nos machos das duas espécies.	53
Figura 4.6. Mapa de calor das relações de parentesco entre os indivíduos de <i>Cerdocyon thous</i> . As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados, e as claras menores relações. Os quadros vermelhos destacam as relações dos indivíduos das mesmas áreas, sendo essas EEI, FLONA – CB e Pirassununga, de baixo para cima.	54
Figura 4.7. Mapa de calor das relações de parentesco entre os indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> . As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados e as claras, menores. Os quadros vermelhos destacam as relações entre os indivíduos das mesmas áreas, incluindo somente, de baixo para cima, a EEI, a EEJ e a área de Pirassununga por apresentarem um maior número de indivíduos.	55
Figura 4.8. Regressão linear entre a correlação genética (r) em função da distância geográfica para <i>Cerdocyon thous</i>	56
Figura 4.9. Regressão linear entre a correlação genética (r) em função da distância geográfica (km) para <i>Chrysocyon brachyurus</i>	57
Figura 4.10. Regressão linear entre a correlação genética (r) em função da distância geográfica (km) para <i>Chrysocyon brachyurus</i> , somente com as relações de parentesco entre os machos e entre as fêmeas.	57
Figura 4.11. Mapa de calor mostrando as relações de parentesco entre os indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> . As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados e as cores claras, menores relações de parentesco entre os	

indivíduos. Nos quadrados se destacam as relações entre os indivíduos machos (preto) e entre as fêmeas (vermelho).....	58
Figura 5.1. Áreas de estudo onde foram coletadas amostras de tecido de animais atropelados, sangue de animais capturados ou amostras não invasivas (fezes) de <i>Cerdocyon thous</i> e <i>Chrysocyon brachyurus</i>	64
Figura 5.2. Locais de coleta das amostras de <i>Cerdocyon thous</i>	77
Figura 5.3. Padrão das curvas de <i>Melting</i> obtidas para <i>Cerdocyon thous</i> . As curvas dos machos (verde) mostraram dois picos, enquanto que as fêmeas (rosa) mostraram um único pico.....	78
Figura 5.4. Árvore Neighbor-Joining para <i>Cerdocyon thous</i> mostrando que as amostras estudadas pertencem ao clado sul (destacado em roxo). O lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) foi utilizado como grupo externo para enraizar a árvore. As sequências descarregadas da base de dados são as identificadas com os números EF106998 - EF107031.	80
Figura 5.5. Atribuição dos indivíduos de <i>Cerdocyon thous</i> a três <i>clusters</i> no <i>software</i> BAPS.....	81
Figura 5.6. <i>Clustering</i> bayesiano para <i>Cerdocyon thous</i> amostrados quando analisados sem informação da área de coleta, produzido pelo STRUCTURE. Cada indivíduo está representado por uma barra vertical dividida em K populações.	82
Figura 5.7. Análise Fatorial de Correspondência (AFC) para <i>Cerdocyon thous</i> considerando as três áreas de amostragem.	83
Figura 5.8. Caracterização da diversidade genética de <i>Cerdocyon thous</i> nas áreas estudadas.	89
Figura 5.9. Caracterização da riqueza alélica comparando as áreas estudadas utilizando até 15 indivíduos de <i>Cerdocyon thous</i>	90
Figura 5.10. Autocorrelação espacial (SAA) para todos os indivíduos de <i>Cerdocyon thous</i> com classes de distância de 200 km. Os valores com intervalo de confiança de 95%, para a hipótese nula de que não existe estrutura espacial, estão representados pelas linhas vermelhas ponteadas.	91
Figura 5.11. Estruturação populacional entre os indivíduos de <i>Cerdocyon thous</i> das áreas estudadas (a) através de análises de componentes principais (PCA) (b). O mapa mostra a probabilidade posterior dos indivíduos para os três clusters significativos (Cluster 1 GO, Cluster 2 MS, Cluster 3 SP).	92

Figura 5.12. Padrão das curvas de <i>Melting</i> para <i>Chrysocyon brachyurus</i> . As curvas dos machos (verde) mostraram dois picos, enquanto que as fêmeas (rosa) mostraram um único pico.....	98
Figura 5.13. Gráfico de barras obtido pelo (a) BAPS e pelo (b) STRUCTURE com K = 2, representado a estruturação populacional dos indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> . .	100
Figura 5.14. Análises de componentes principais (PCA) entre os indivíduos estudados de <i>Chrysocyon brachyurus</i> (a). O mapa mostra a probabilidade posterior dos indivíduos para os dois clusters significativos (Cluster 1 MS e GO, Cluster 2 SP).....	103
Figura 5.15. Riqueza alélica entre as populações de <i>Chrysocyon brachyurus</i>	106
Figura 5.16. Correlação entre a distância genética e a distância geográfica dos indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> amostrados. A linha vermelha mostra a tendência da regressão.	107
Figura 5.17. Correlação entre a distância genética e a distância geográfica dos indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> da população de MG-SP. A linha vermelha mostra a tendência da regressão.	108
Figura 5.18. Autocorrelação espacial (SAA) para todos os indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> com classes de distância de 200 km. Os valores com intervalo de confiança de 95%, para a hipótese nula de que não existe estrutura espacial, estão representados pelas linhas vermelhas ponteadas.	109
Figura 6.1. (a) <i>Cerdocyon thous</i> capturado em armadilha <i>Tomahawk</i> TM . (b) <i>Chrysocyon brachyurus</i> em armadilha desenhada para coleta da espécie. Os dois indivíduos aguardam a liberação após coleta de material de sangue.	118
Figura 6.2. Pontos de coleta das amostras no estado de Goiás (Brasil) para <i>Cerdocyon thous</i> e <i>Chrysocyon brachyurus</i>	122
Figura 6.3. Número de subpopulações encontradas na área de Goiás para <i>Cerdocyon thous</i> . O gráfico representa (a) o método de Pritchard <i>et al.</i> (2000) e (b) o método de Evanno <i>et al.</i> (2005).....	123
Figura 6.4. Gráfico de barras obtido pelo (a) STRUCTURE com K=4, representado a subestruturação populacional de <i>Cerdocyon thous</i> . (b) Análises de componentes principais (PCA) das subpopulações encontradas.	124
Figura 6.5. Gráfico de barras obtido pelo STRUCTURE com (a) K=2, (b) K=3 e (c) K=4 para <i>Chrysocyon brachyurus</i>	125
Figura 6.6. Distância genética em função da distância geográfica para todos os indivíduos de (a) <i>Cerdocyon thous</i> e (b) <i>Chrysocyon brachyurus</i> amostrados em Goiás.	128

Figura 6.7. Distância genética em função da distância geográfica para os indivíduos de *Cerdocyon thous* (a) machos e (b) fêmeas amostrados em Goiás com distâncias geográficas menores a 15 km. 129

Figura 6.8. Relações de parentesco entre todos os indivíduos de *Cerdocyon thous* da área de Goiás. As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados, e as claras menores relações. As cores dos quadrados correspondem às utilizadas para representar as subpopulações encontradas nas análises populacionais. . 131

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1. Características dos <i>loci</i> microssatélites utilizados para as análises das amostras de <i>Cerdocyon thous</i> e <i>Chrysocyon brachyurus</i>	46
Tabela 4.2. Número de amostras e indivíduos coletados em cada uma das sete áreas amostradas.....	47
Tabela 4.3. Frequência dos alelos nulos para as espécies <i>Cerdocyon thous</i> e <i>Chrysocyon brachyurus</i> utilizando os métodos de Ooterhout e Brookfield.....	48
Tabela 4.4. Áreas efetivamente amostradas para <i>Chrysocyon brachyurus</i> utilizando três <i>buffers</i> diferentes. Valores apresentados em quilômetros quadrados.....	50
Tabela 4.5. Densidades de <i>Chrysocyon brachyurus</i> , em indivíduos/km ² , nas áreas estudadas utilizando três <i>buffers</i> diferentes.....	51
Tabela 4.6. Número de amostras de machos e fêmeas coletados para cada uma das espécies nas áreas estudadas.....	54
Tabela 4.7. Números efetivos populacionais para <i>Cerdocyon thous</i> e <i>Chrysocyon brachyurus</i> usando o programa NeEstimator.....	59
Tabela 5.1. Número de cachorros-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>) coletados nas áreas estudadas.....	76
Tabela 5.2. Número de <i>Cerdocyon thous</i> coletados nas áreas estudadas e considerados para análises da estrutura genético-populacional da espécie.....	78
Tabela 5.3. Diferenciação populacional par a par para <i>Cerdocyon thous</i> nas áreas amostradas. Acima da diagonal estão apresentados os valores de R _{ST} e abaixo os valores de Dest.....	84
Tabela 5.4. Caracterização da diversidade genética de <i>Cerdocyon thous</i> nas três áreas amostradas.....	86
Tabela 5.5. Caracterização da diversidade genética de <i>Cerdocyon thous</i> nos grupos familiares encontradas na área de GO.....	87
Tabela 5.6. Números efetivos populacionais para <i>Cerdocyon thous</i> nas três áreas estudadas usando o método de desequilíbrio de ligação no programa NeEstimator.....	93
Tabela 5.7. Número de lobos-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i>) coletados nas áreas estudadas.....	96
Tabela 5.8. Número de <i>Chrysocyon brachyurus</i> coletados nas áreas estudadas e considerados para análises da estrutura genético-populacional da espécie.....	99

Tabela 5.9. Diferenciação populacional par a par para <i>Chrysocyon brachyurus</i> nas áreas amostradas. A diagonal superior apresenta os valores de R_{ST} e na inferior os valores de D_{ST}	101
Tabela 5.10. Caracterização da diversidade genética de <i>Chrysocyon brachyurus</i> nas duas populações encontradas.....	105
Tabela 5.11. Verificação dos gargalos populacionais nas populações encontradas para os indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> estudados.....	110
Tabela 6.1. Caracterização dos <i>loci</i> microssatélites das subpopulações de <i>Cerdocyon thous</i> da área de GO.	126
Tabela 6.2. Caracterização dos <i>loci</i> microssatélites dos indivíduos de <i>Chrysocyon brachyurus</i> da área de GO.....	126
Tabela 6.3. Valores da probabilidade de exclusão (PE) por <i>locus</i> nas duas espécies....	127
Tabela 6.4. F_{IS} por sexo para avaliar indícios de endogamia o exogamia na população.	129

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ae – Alelos efetivos

AMOVA - Análises de Variância Molecular

ARTESP - Agência Reguladora de Serviços Públicos Delegados de Transporte do Estado de São Paulo

ATP6 - ATP sintetase F0 subunidade 6

BAPS - Bayesian Analysis of Population Structure

BSA - Bovine Serum Albumin

CENAP - Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros

CEUA/UFSCAR - Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos

cm - Centímetro

CONCEA - Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal

CR - região controle

EEC - Estação Ecológica dos Caetetus

EEI - Estação Ecológica de Itirapina

EEJ - Estação Ecológica do Jataí

F. RC Duratex - Fazenda Rio Claro da Duratex

FLONA-CB - Floresta Nacional de Capão Bonito

GPS – Global Positioning System

ha - Hectares

HRM - Análises de Melting de alta-resolução

HWE – Equilíbrio Hardy-Weinberg

IA – Alelos infinitos

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

km - Quilômetros

m - Metros

mL - mililitros

mM - milimolar

mtDNA - DNA mitocondrial

Na – Número de alélos

NCBI - National Center of Biotechnology Information

Ne – Tamanho efetivo populacional

ng – nanogramas
Nm – número de migrantes
PAN - Plano de Ação Nacional
pb - pares de bases
PCA - análise de componentes principais
PCR - reação em cadeia da polimerase
PE - probabilidade de exclusão
PESC - Parque Ecológico de São Carlos
PEV - Parque Estadual Vassununga
PIC - Conteúdo de informação polimórfica
PID - probabilidade de identidade
pL - p larger
pS - P smaller
q.s.p – quantidade suficiente para
SAA - análises de correlação espacial
SISBIO - Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SM – Stepwise mutation
SP - São Paulo
SRY - sex-determining region Y
TPM - two phase mutation
ZF - Zink Finger
12S - rRNA12S
 μ M – micromol
 μ l - microlitro

SUMÁRIO

1	APRESENTAÇÃO	20
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	OS BIOMAS	21
2.1.1	Cerrado	21
2.1.2	Mata Atlântica	22
2.2	ESPÉCIES ESTUDADAS	23
2.2.1	Cachorro-do-mato (<i>Cedocyon thous</i> (Linnaeus 1977))	24
2.2.2	Lobo-guará (<i>Chrysocyon brachyurus</i> (Illiger 1815))	26
2.3	GENÉTICA DA CONSERVAÇÃO	29
2.3.1	Marcadores moleculares	29
3	OBJETIVOS.....	31
3.1	OBJETIVO GERAL	31
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	CAPÍTULO 1: DINÂMICAS POPULACIONAIS DOS CANÍDEOS CACHORRO-DO-MATO E LOBO-GUARÁ UTILIZANDO AMOSTRAS NÃO INVASIVAS	32
4.1	INTRODUÇÃO	32
4.2	HIPÓTESES	33
4.3	MATERIAL E MÉTODOS	34
4.3.1	Área de estudo	34
4.3.2	Obtenção das amostras	36
4.3.3	Extração de DNA.....	37
4.3.4	Identificação molecular das espécies	38
4.3.5	Identificação individual das amostras	38
4.3.6	Análises demográficas	40
4.3.7	Sexagem	41
4.3.8	Erros de genotipagem	42
4.3.9	Análises de correlação espacial	43
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.4.1	Confirmação molecular das espécies	44
4.4.2	Caracterização dos indivíduos	45
4.4.3	Densidades populacionais.....	49
4.4.4	Sexagem	52
4.4.5	Distribuição espacial dos indivíduos	54
4.4.6	Números efetivos populacionais.....	59
4.5	CONCLUSÕES	60
5	CAPÍTULO 2: ANÁLISES GENÉTICO POPULACIONAIS DE CACHORRO-DO-MATO E DE LOBO-GUARÁ	61
5.1	INTRODUÇÃO	61
5.2	HIPÓTESES	62
5.3	MATERIAL E MÉTODOS	63
5.3.1	Área de estudo	63
5.3.2	Obtenção das amostras	65
5.3.3	Extração de DNA.....	66
5.3.4	Confirmação molecular da espécie	66
5.3.5	Caracterização genética das populações	68
5.3.6	Sexagem	69
5.3.7	Estrutura genético-populacional	71
5.3.8	Diversidade genética das populações	73
5.3.9	Distribuição espacial dos indivíduos e populações.....	74
5.3.10	Análises demográficas	74
SEÇÃO 1.	ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DO CACHORRO-DO-MATO EM PAISAGENS ANTROPIZADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL.....	76
5.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	76
5.4.1	<i>Confirmação molecular das espécies</i>	77
5.4.2	<i>Atropelamentos</i>	77

5.4.3	<i>Subespécies de Cerdocyon thous</i>	79
5.4.4	<i>Estruturação populacional</i>	80
5.4.5	<i>Diversidade genética dos cachorros-do-mato</i>	85
5.4.6	<i>Distribuição da variação genética dos cachorros-do-mato</i>	90
5.5	CONCLUSÕES.....	95
SEÇÃO 2. ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DO LOBO-GUARÁ EM PAISAGENS ANTROPIZADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL		96
5.6	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	96
5.6.1	<i>Impacto dos atropelamentos</i>	97
5.6.2	<i>Sexagem</i>	98
5.6.3	<i>Estrutura populacional do lobo-guará</i>	99
5.6.4	<i>Diversidade genética das populações de lobo-guará</i>	103
5.6.5	<i>Distribuição da variação genética</i>	107
5.6.6	<i>Número de indivíduos migrantes</i>	112
5.7	CONCLUSÕES.....	114
6 CAPÍTULO 3: RELAÇÕES DE PARENTESCO EM CACHORRO-DO-MATO E LOBO-GUARÁ		116
6.1	INTRODUÇÃO.....	116
6.2	HIPÓTESES.....	117
6.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	117
6.3.1	<i>Área de estudo</i>	117
6.3.2	<i>Obtenção das amostras</i>	117
6.3.3	<i>Extração de DNA e ampliações</i>	119
6.3.4	<i>Caracterização das populações</i>	120
6.3.5	<i>Caracterização dos loci microssatélites</i>	120
6.3.6	<i>Análises de parentesco</i>	121
6.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	122
6.4.1	<i>Estrutura populacional</i>	123
6.4.2	<i>Diversidade populacional</i>	125
6.4.3	<i>Distribuição espacial das relações de parentesco</i>	127
6.4.4	<i>Relações de parentesco dentro das subpopulações de Cerdocyon thous</i>	130
6.4.5	<i>Relações de parentesco dos indivíduos de Chrysocyon brachyurus</i>	132
6.5	CONCLUSÕES.....	133
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS		134
REFERÊNCIAS		136

1 APRESENTAÇÃO

A presente tese é uma contribuição para o entendimento de aspectos biológicos dos canídeos cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) a partir de uma abordagem genético-molecular. Para isso, a tese será apresentada em três capítulos utilizando-se uma abordagem em ecologia molecular (Capítulo 1), outra em genética populacional (Capítulo 2) e a última baseada nas relações de parentesco dos indivíduos destas espécies (Capítulo 3). As hipóteses testadas estão apresentadas, separadamente, em cada capítulo, os quais resultarão em diferentes artigos científicos.

Na primeira abordagem foram utilizadas amostras de fezes para obter material genético das espécies estudadas. Com o DNA obtido destas amostras, primeiramente, confirmamos a espécie que depositou as fezes, realizamos a individualização dessas amostras e avaliamos as dinâmicas populacionais das espécies, utilizando os tamanhos populacionais e suas densidades em diferentes remanescentes de vegetação natural do estado de São Paulo (Brasil). Além disso, identificamos a distribuição dos indivíduos na paisagem e suas relações de parentesco.

No segundo capítulo, foram utilizados diferentes tipos de amostras, a saber: sangue de animais capturados, tecido de animais atropelados e fezes por amostragem não invasiva. O material genético extraído a partir deste tipo de amostras foi utilizado para entender melhor a estrutura genético-populacional de cada uma das espécies em paisagens antropizadas dos estados de Goiás, Mato Grosso do Sul e São Paulo. O capítulo foi organizado em duas seções, correspondentes a cada uma das espécies, para que as mesmas fossem analisadas detalhadamente.

Para finalizar, no capítulo 3 buscamos entender os padrões de distribuição, avaliamos a estrutura genético-espacial e limitações de dispersão ligados ao sexo nas duas espécies de canídeos, numa área antropizada do estado de Goiás, a partir das relações de parentesco entre os indivíduos.

Em síntese, nosso estudo mostrou que as informações genético-moleculares, interpretadas à luz dos aspectos biológicos e ecológicos, considerando a paisagem na qual as espécies estão inseridas, nos permitem entender melhor a biologia dessas espécies e inferir sobre as consequências genéticas em ambientes altamente fragmentados e antropizados como nos que elas ocorrem.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Os biomas

O Brasil é considerado um dos 17 países megadiversos do mundo. Abriga uma grande porção da biodiversidade do planeta, entre 15 a 20%. Essa porcentagem é estimada como alta, principalmente, se consideramos que é possível que grande parte da biodiversidade brasileira seja desconhecida para a ciência (MMA, 2002).

Apesar do título de país megadiverso e da quantidade de biodiversidade abrigada nos biomas, a maior parte deles está fortemente afetado. Dois biomas que têm sofrido fortemente com as ações do homem e a transformação da paisagem são o Cerrado e a Mata Atlântica, chegando a uma redução da sua área original de 80% e 92,5%, respectivamente (KLINK E MACHADO, 2005; RIBEIRO et al., 2009).

Tanto o Cerrado como a Mata Atlântica são ecossistemas classificados como *hotspots* para conservação (MITTERMEIER *et al.*, 1999), devido à riqueza e alto número de endemismos que apresentam e ameaça em que se encontram. Segundo Myers *et al.* (2000), o Cerrado abriga 1,5% do total de plantas endêmicas e 0,4% dos endemismos globais de vertebrados, enquanto que a Mata Atlântica contém 2,7% do total global de plantas endêmicas e 2,1% do total de endemismos de vertebrados.

2.1.1 Cerrado

Depois da Amazônia, o Cerrado é o maior bioma em superfície da América do Sul e um dos mais ameaçados do continente. As fitofisionomias vegetais presentes na área são compostas de campo limpo, campo sujo, cerrado *sensu stricto*, cerradão, florestas semidescídua e matas ciliares apenas próximas a rios ou isoladas em pequenos fragmentos (CARDOSO DA SILVA E BATES, 2002).

O Cerrado ocupa uma área um pouco maior que dois milhões de quilômetros quadrados, quase 21% do território brasileiro (BORLAUG, 2002). Ocorre nos estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul e ocupa porções dos estados de Piauí, Maranhão, Bahia, Minas Gerais, Tocantins, São Paulo e Paraná.

Apresenta duas estações bem marcadas, inverno seco (abril-setembro) e verão chuvoso (outubro-março), suas temperaturas variam entre 22 e 27°C e a precipitação média anual é de 1500 mm (KLINK E MACHADO, 2005).

Os solos são geralmente profundos e de baixa fertilidade (MANTOVANI E PEREIRA, 1998). Apesar disso, é considerada a savana tropical com maior riqueza de espécies no mundo, possuindo aproximadamente 7000 espécies de plantas e 199 espécies de mamíferos (KLINK E MACHADO, 2005).

Apesar de sua importância, mais da metade da área do Cerrado tem sido transformada para pastagem, atividades agrícolas e outros usos nos últimos anos (KLINK E MOREIRA, 2002; MACHADO *et al.*, 2004; KLINK E MACHADO, 2005), enquanto que as áreas remanescentes permanecem sob a forma de numerosos fragmentos e a maioria deles encontra-se isolado. Além da transformação da paisagem, uma prática comum antes de começar a lavoura é a queima das áreas de cultivo para preparo do solo (KLINK E MOREIRA, 2002). Mesmo que o fogo possa originar-se de maneira natural no Cerrado e que este estimule a germinação de algumas sementes (EITEN, 1972), a escala e a intensidade das queimadas provocadas pelo homem afetam a fauna e flora do Cerrado. A prática resulta em perda de solo por erosão, poluição hídrica e atmosférica, assim como queima de plantas e animais nativos, afetando diretamente a biodiversidade (MANTOVANI E PEREIRA, 1998; KLINK E MOREIRA, 2002).

2.1.2 Mata Atlântica

A Mata Atlântica é o terceiro bioma em superfície. Originalmente ocupava, aproximadamente, 150 milhões de hectares (RIBEIRO *et al.*, 2009), 17% do país. Ocorre nos estados de Espírito Santo, São Paulo, Santa Catarina, Paraná, Rio de Janeiro, e parcialmente os estados de Rio Grande do Norte, Ceará, Paraíba, Piauí, Alagoas, Sergipe, Bahia, Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Assim como o cerrado, apresenta diferentes fitofisionomias vegetais compostas por Floresta Ombrófila Densa (Mata Atlântica *sensu stricto*), Floresta Ombrófila Mista (Mata de Araucária) e Floresta Estacional Semidecidual e Decidual (Mata Seca, Mata Atlântica do Interior, ou Mata de Planalto), além dos campos sulinos e as áreas de influência flúvio-marinha (manguezais e restingas) (MMA, 2002).

O clima predominante é o tropical úmido, mas existem outros microclimas dependentes das fitofisionomias da mata. Apresenta temperaturas médias elevadas durante o ano todo, assim como também a média de umidade relativa do ar é elevada. A precipitação anual muda dependendo da localização das florestas, as áreas do litoral apresentam uma maior precipitação recebendo mais de 4000 mm de chuva ao ano, enquanto que as florestas

localizadas no interior do continente recebem aproximadamente 1000 mm ao ano (CÂMARA, 2003).

A fauna e flora da Mata Atlântica incluem de 1 a 8% do total de espécies do mundo (SILVA E CASTELETI, 2003). Estima-se que na Mata Atlântica existam 20000 espécies de plantas, 261 espécies de mamíferos, 688 espécies de aves, 200 espécies de répteis, 280 espécies de anfíbios e que ainda faltam muitas mais por serem descritas (MITTERMEIER *et al.*, 1999; SILVA E CASTELETI, 2003). Considerando o número de espécies endêmicas a importância deste bioma cresce, pois se estima que oito mil espécies vegetais, 39% dos mamíferos, 160 espécies de aves e 183 de anfíbios são endêmicas da Mata Atlântica (MITTERMEIER *et al.*, 1999; SILVA E CASTELETI, 2003).

Atualmente, estimativas apontam que 70% da população brasileira mora na área de domínio da Mata Atlântica, fazendo com que este bioma seja um dos tipos de floresta tropical mais ameaçados, principalmente pelo desmatamento a qual está sujeito. Somente 11 a 16 % da área original da Mata Atlântica permanece como remanescentes, a maioria desses fragmentos apresentam áreas menores a 100 hectares (RANTA *et al.*, 1998), estão dispersos e, na maioria dos casos, isolados (TABARELLI *et al.*, 2005).

Tanto o Cerrado como a Mata Atlântica abrigam diferentes espécies que podem ser indispensáveis para a conservação, principalmente devido a que algumas delas são carismáticas e despertam o interesse da população. Ações de conservação com as espécies que habitam nesses biomas, como com espécies de mamíferos que usualmente são mais carismáticas, podem levar à conservação geral dos ambientes.

2.2 Espécies estudadas

Os mamíferos são parte fundamental dos ecossistemas, pois modificam a paisagem devido à dispersão e predação de sementes, consumo de folhagem e frutos, por servirem como fonte de alimento para predadores, assim como, quando predadores, por serem controladores dos tamanhos populacionais de outros animais (ESTES *et al.*, 2011; RIPPLE E BESCHTA, 2012; RIPPLE *et al.*, 2013). Além da importância dos serviços ecossistêmicos, algumas espécies do grupo podem ser consideradas como espécies-bandeira e/ou espécies guarda-chuva (ROBERGE E ANGELSTAM, 2004), aumentando seu valor para conservação de biomas altamente afetados, como são o Cerrado e a Mata Atlântica.

Dentre os mamíferos, os carnívoros são mais vulneráveis à extinção devido a maioria deles apresentar baixas densidades e pequenas populações pelo nível trófico que ocupam, assim

como necessidade de grandes áreas de vida (NOSS *et al.*, 1996; WOODROFFE E GINSBERG, 1998). A ordem é composta por espécies que apresentam grande diferença quanto ao tamanho, forma, hábitos de vida e dieta, podendo esta última ser estritamente carnívora, onívoro-frugívora ou onívora-insetívora (REIS *et al.*, 2011).

A família Canidae, representante da ordem Carnívora, está distribuída ao longo do mundo com 36 espécies. Os canídeos sul-americanos têm sido caracterizados por apresentarem monofilia (WAYNE *et al.*, 1997; LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005), assim como alto endemismo. Sendo que 11 das 12 espécies ocorrem unicamente na América do sul e apenas uma, a raposa cinza (*Urocyon cinereoargenteus*), estende sua distribuição até a América do Norte. A origem e diversificação da família deram-se na América do Norte há aproximadamente seis milhões de anos (WAYNE *et al.*, 1997). Inicialmente, separaram-se o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*) dos outros canídeos (WAYNE *et al.*, 1997; LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005), seguido por eventos de separação de um antecessor do cachorro-de-mato-de-orelha-curta (*Atelocynus microtis*), do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e do resto dos canídeos sul-americanos, entre 0,9 a 3 milhões de anos (WAYNE *et al.*, 1997; LINDBLAD-TOH *et al.*, 2005; TCHAICKA, 2006). A alta diversidade e sucesso de adaptação atual dos canídeos sul-americanos resultam, pelo menos em parte, de seus hábitos oportunistas e sua capacidade de colonização (BERTA, 1982; BIBEN, 1983).

2.2.1 Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous* (Linnaeus 1777))

O cachorro-do-mato é um canídeo sul-americano de tamanho médio que alcança um peso máximo de 7 kg (Figura 3.1). Mostra uma ampla distribuição na América do Sul, ocorrendo desde a parte central da Colômbia e Venezuela até o Norte da Argentina, Paraguai e Uruguai, exceto na bacia amazônica ou regiões com alturas superiores a 2000 metros de altitude (BERTA, 1982; COURTENAY E MAFFEI, 2004; REIS *et al.*, 2011).

O cachorro-do-mato habita uma grande variedade de habitats, desde áreas de florestas abertas e savanas, como o cerrado, até aqueles mais fechados incluindo bosques tropicais e subtropicais, como a Mata Atlântica. É considerada uma espécie tolerante a mudanças ambientais permanentes, e inclusive, ocupa áreas que apresentam atividade humana intensa (JUAREZ E MARINHO-FILHO, 2002; JÁCOMO *et al.*, 2009).

Figura 2.1. Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*).



Fonte: www.arkive.com

Ao longo da sua distribuição, cinco subespécies têm sido reconhecidas morfologicamente (*C. t. entrerianus*; *C. t. azarae*; *C. t. thous*; *C. t. aquilus*; *C. t. germanus*) (CABRERA, 1931; BERTA, 1982) sendo três delas reconhecidas para o Brasil (*C. t. entrerianus*; *C. t. azarae*; *C. t. thous*). Entretanto, Tchaicka *et al.* (2007) reconhecem, no país, a existência de dois clados utilizando marcadores moleculares: um que ocorre ao norte, incluindo ecorregiões como a Caatinga e a porção norte da Mata Atlântica; e o outro ao sul no Cerrado, Pantanal e no sul da Mata Atlântica. A porção leste da Amazônia inclui indivíduos da espécie dos dois clados.

Reis *et al.* (2011) afirmam que é uma espécie social monogâmica, territorial e gregária. Usualmente, nas savanas, os cachorros-do-mato vivem em grupos familiares que incluem uma fêmea, um macho adulto e sua prole (MONTGOMERY E LUBIN, 1978). Enquanto que na Amazônia, adultos que já dispersaram podem manter contato próximo com seus pais (MACDONALD E COURTENAY, 1996). Os adultos compartilham a defesa territorial, o cuidado dos filhotes e se higienizam mutuamente (BIBEN, 1983). Os casais forrageiam juntos, algumas vezes com a prole, embora não de forma cooperativa. Frequentemente, a espécie apresenta uma proporção sexual de 1:1 (MONTGOMERY E LUBIN, 1978).

Podem ter mais de uma cria ao ano, com uma ninhada de 3 a 6 filhotes, que são amamentados durante noventa dias (RUIZ-GARCIA E SHOSTELL, 2013). Depois de cinco ou seis meses alcançam a independência e os adultos jovens procuram locais para se estabelecer. As áreas de vida dos machos adultos podem dobrar o tamanho das áreas da de

vida das fêmeas, sendo que usualmente os primeiros apresentam áreas de até 11,11 km², comparado com as áreas das fêmeas que alcançam 4,56 km² (REIS *et al.*, 2011). Pelo método de captura-recaptura em uma unidade de conservação no sudeste do Brasil (Parque Estadual de Itapuã, Rio Grande do Sul) foi calculada uma densidade de 0,78 indivíduos/km² (FARIA-CORRÊA *et al.*, 2009), enquanto que no Cerrado foi calculada uma densidade menor, de 0,55 indivíduos/km² (DESBIEZ *et al.*, 2010).

Os cachorros-do-mato apresentam uma dieta onívora generalista. Tipicamente se alimentam de artrópodes, frutos e mamíferos pequenos, principalmente roedores, pássaros e anuros, assim como de carcaças de animais (MONTGOMERY E LUBIN, 1978; BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004). Pela grande quantidade de frutas e sementes que os indivíduos consomem são considerados dispersores de sementes (BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004; REIS *et al.*, 2011). Bueno e Motta-Junior (2004) mostraram que a dieta da espécie varia sazonalmente, consumindo uma maior quantidade de frutas na temporada de chuva e maior quantidade de insetos na seca. Entretanto, Massara *et al.* (2016) reportaram que as estações influenciam pouco na mudança de ocupação das áreas e na detecção da espécie.

Embora a espécie esteja classificada como pouco preocupante (LC) pela IUCN e pelo Ministério do Meio Ambiente (MMA) (GINSBERG E MACDONALD, 1990; IUCN, 2016), é importante destacar que os indivíduos estão expostos a diferentes ameaças como, por exemplo, a perseguição por fazendeiros, transmissão de doenças por animais domésticos e uma alta taxa de atropelamentos (BERTA, 1982; GINSBERG E MACDONALD, 1990; VIEIRA, 1996) e inclusive podem ser mortos por ataques de cachorros domésticos (FERREIRA A. N. PERS. COMM. 2015). Além disso, é importante destacar que estes problemas são mais evidentes em ambientes altamente antropizados, como os que atualmente eles ocupam.

2.2.2 Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus* (Illiger 1815))

O lobo-guará é considerado o maior canídeo nativo da América do Sul, tem em média uma altura de 80 cm e alcança um peso entre 20 e 33 kg (REIS *et al.*, 2011; GAMBARINI E PAULA, 2013) (Figura 3.2). A espécie ocorre em grande parte do território brasileiro e em algumas regiões de países adjacentes como no sudeste peruano, norte e leste da Bolívia, no leste do Paraguai e, norte e nordeste da Argentina (REIS *et al.*, 2011). Embora a sua presença fosse documentada para o Uruguai, a ausência de visualizações atuais parece indicar que ele está extinto nesse país (IUCN, 2016).

Figura 2.2. Lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).



Fonte: www.arkive.com

O lobo-guará apresenta uma menor distribuição em relação ao cachorro-do-mato, pois o mesmo é considerado típico de savanas abertas, encontrando-se principalmente no Cerrado brasileiro (CARVALHO, 1976; REIS *et al.*, 2011). No entanto, o desmatamento tem permitido a colonização de outros biomas como Campos do sul, Caatinga e Mata Atlântica (GAMBARINI E PAULA, 2013).

Possui áreas de vida que podem variar de 6,0 a 115 km², com uma média de 50 a 70 km² (REIS *et al.*, 2011), tanto para machos como para fêmeas (GAMBARINI E PAULA, 2013). Durante os primeiros meses com os filhotes as áreas de vidas das fêmeas diminuem, chegando algumas vezes à metade. Nesse mesmo período, as áreas dos machos também apresentam variações no tamanho, mas essa diminuição não é tão acentuada (GAMBARINI E PAULA, 2013). Alguns estudos calcularam valores de densidade para a espécie em diferentes áreas protegidas; Rodrigues (2002) estimou uma densidade de 0,1 indivíduos/km² na Estação Ecológica Águas Emendadas (Distrito Federal), e Ramalho *et al.* (2014) encontrou a mesma densidade (0,1 indivíduos/km²) na Estação Ecológica do Jataí (SP), Silveira (1999) calculou 0,05 indivíduos/km² no Parque Nacional das Emas (Goiás), enquanto que Trolle *et al.* (2007) numa área particular de Cerrado em Minas Gerais reportou 0,03 indivíduos/km². A proporção sexual reportada para a espécie é de 1:1 (MOEHLMAN, 1986).

Dentro da família dos canídeos, é considerada uma das espécies menos sociais (BIBEN, 1983), sendo que os machos e fêmeas apresentam uma forte associação somente durante a

temporada reprodutiva e por algum tempo após o nascimento dos filhotes (BIBEN, 1983). Embora solitários, machos e fêmeas compartilham o território que, em alguns casos, se sobrepõem totalmente (GAMBARINI E PAULA, 2013). Em geral, os casais são formados para toda a vida, porém, quando um morre o outro animal pode formar um novo par em outro território, às vezes, longe do seu território original (GAMBARINI E PAULA, 2013). Todavia, Rodden *et al.* (2004) definem o sistema de acasalamento da espécie como monogâmico facultativo. Os grupos familiares são raramente observados e o cuidado dos filhotes é realizado, usualmente, por somente um dos pais.

Rodrigues (2002) e De Mattos (2003) reportaram que indivíduos de lobo-guará trasladados, não permanecem no novo local por mais de três dias mostrando que são fortemente territorialistas. Os filhotes que nascem por ninhada (de 1 - 3) permanecem na área de vida dos pais, até atingirem entre um ano e meio e dois anos. Depois desse período, eles dispersam para um novo território que pode estar localizado em áreas próximas ou distantes às dos pais (GAMBARINI E PAULA, 2013).

É de grande importância para os biomas que habita, pois sua dieta omnívora oportunista (SANTOS *et al.*, 2003; BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004) ajuda no equilíbrio do ecossistema por meio do controle do tamanho populacional de suas presas (insetos e pequenos vertebrados, como aves e roedores) e da dispersão de sementes (JUAREZ E MARINHO-FILHO, 2002; REIS *et al.*, 2011). Uma parte importante da sua dieta (aproximadamente 60%) se compõe de material vegetal e é complementada com pequenos mamíferos, outros vertebrados e insetos (BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004). A dieta está fortemente influenciada pela sazonalidade, principalmente no cerrado, aumentando a quantidade de frutos da lobeira (*Solanum lycocarpum*) e pequenos mamíferos na temporada seca para frutos e sementes de várias espécies na temporada de chuva (BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004).

Por ser uma espécie tolerante a ambientes antropizados, os conflitos com os humanos são comuns e levam a perda de um número grande de animais. Em algumas regiões ainda se acredita que o lobo-guará pode atacar pessoas. Outras crenças dão poderes curativos a partes do corpo do lobo-guará. No entanto, os conflitos com fazendeiros por ataques a animais de criação, como galinhas, e os atropelamentos são as maiores ameaças para a espécie.

Apesar das ameaças, o *status* de conservação mundial da espécie tem melhorado nos últimos 20 anos, passando de vulnerável para quase ameaçado (IUCN, 2016). Entretanto, isso é resultado, unicamente, de ações de conservação executadas ao longo da distribuição da espécie. No Brasil, o Plano de Ação Nacional para o lobo-guará (PAN Lobo-Guará) destaca

a importância de focar na conservação do habitat, resolução de conflitos com humanos e nos atropelamentos para preservar a espécie.

O número pequeno de populações, o isolamento entre elas e os números populacionais reduzidos aumentam consideravelmente o risco de extinção das espécies. As ações de conservação para as espécies, em sua maioria, contemplam na conservação do habitat ajudando assim na conservação dos biomas onde as espécies ocorrem. Entretanto, para realizar ações de conservação que efetivamente ajudem às espécies é necessário conhecer a situação na qual elas se encontram.

2.3 Genética da conservação

O objetivo da genética da conservação é conhecer as consequências que surgem da redução dos tamanhos populacionais para pequenas unidades onde fatores estocásticos e os efeitos da endogamia são extremamente importantes (FRANKHAM *et al.*, 2008). Fundamenta-se na genética evolutiva e genética quantitativa desenvolvida por Wright, Fisher, Haldane, Kimura e Dobzhansky. Baseados na teoria busca reduzir o risco de extinção das espécies, preservando-as como entidades dinâmicas capazes de se adaptarem às mudanças ambientais.

2.3.1 Marcadores moleculares

Para contribuir na preservação das espécies é necessário avaliar tanto as similaridades como as diferenças genéticas entre os indivíduos, para isso os marcadores moleculares têm sido amplamente utilizados. Um marcador molecular é qualquer característica herdável presente nos organismos, de tipo bioquímico ou de DNA (GRIFFITHS *et al.*, 1995).

Os marcadores de DNA são independentes do estado de desenvolvimento e não estão sujeitos à regulação, característica que lhes dá vantagem sobre os de tipo bioquímico. São altamente utilizados, pois permitem a comparação de diferentes sítios polimórficos simultaneamente, sendo possível identificar mudanças simples ao longo da sequência de DNA. Em geral, a maioria dos marcadores é neutra, ou seja, são igualmente afetados pelas forças evolutivas das populações (FRANKHAM *et al.*, 2008). Entre os marcadores de DNA mais utilizados para estudos de populações naturais, encontramos os marcadores mitocondriais.

A ausência de recombinação, alta taxa de evolução e o grande número de cópias na célula são as principais vantagens do uso de DNA mitocondrial (mtDNA) como marcador molecular

(AVISE, 2009). Assim mesmo, o alto número de polimorfismo de algumas de suas regiões permite a diferenciação entre espécies intimamente relacionadas (FRANKHAM, 2010). Do mesmo modo, ao utilizar-se regiões mais polimórficas é possível avaliar a diferenciação entre subespécies e inclusive populações (STONEKING, 2000).

Outros marcadores de DNA amplamente utilizados são os nucleares, mas diferentemente dos marcadores mitocondriais, estes são diplóides, sendo que cada molécula de DNA possui duas cópias (uma materna e uma paterna). Dentre os marcadores nucleares destacam-se os marcadores microssatélites porque muitas regiões não ligadas do genoma podem ser amostradas simultaneamente. São hipervariáveis, codominantes e possuem elevado conteúdo de informação de polimorfismo (JARNE E LAGODA, 1996; SPRINGER *et al.*, 2001). Estão compostos por pequenas sequências de nucleotídeos em *tandem*, com repetições de dois, três ou quatro bases, que aparentemente ocorrem devido ao deslizamento (*slippage*) da polimerase durante a replicação do DNA (SCHLÖTTERER E TAUTZ, 1992). Devido à sua alta taxa mutacional, e conseqüentemente, seu alto polimorfismo, estes permitem estudar eventos genético populacionais recentes como: estrutura genética de populações (PAETKAU *et al.*, 1995; Pritchard *et al.*, 2000), a identificação de indivíduos (MIOTTO *et al.*, 2014; RAMALHO *et al.*, 2014), grau de parentesco (QUELLER E GOODNIGHT, 1989) e inclusive análises de paternidade (BLOUIN, 2003). Algumas vezes os sítios de amplificação dos *loci* microssatélites são conservados entre espécies, permitindo o uso dos mesmos *primers* entre espécies próximas filogeneticamente.

Outros marcadores nucleares utilizados usualmente são aqueles empregados para a determinação molecular do sexo. Os genes protéicos do *Zinc Finger* (ZF) são encontrados tanto no cromossomo X como no Y e têm sido amplamente utilizados para determinação molecular do sexo (AASEN E MEDRANO, 1990; ORTEGA *et al.*, 2004; GONZÁLEZ *et al.*, 2015a; DECANDIA *et al.*, 2016). Uma região própria do cromossomo Y, que igualmente tem sido utilizado para a determinação molecular do sexo é o SRY (*sex-determining region Y*) (WASSER *et al.*, 1997; BICKHAM *et al.*, 2013; MUKESH *et al.*, 2015), um gene de determinação sexual em mamíferos marsupiais e placentários. Esses marcadores, ao permitir a identificação do sexo das amostras, permite também gerar outras informações como proporção sexual nas áreas estudadas, dispersão preferencial nos sexos, uso de habitat de cada sexo, entre outras.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

O objetivo geral do trabalho foi avaliar a distribuição da variação genética nos canídeos *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* de paisagens antropizadas da região centro-oeste e sudeste do Brasil.

3.2 Objetivos específicos

Capítulo 1

- Conhecer as dinâmicas populacionais dos canídeos em reservas do estado de São Paulo;

Capítulo 2

- Analisar a estrutura populacional de *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* em paisagens antropizadas da região centro-oeste e sudeste do Brasil;
- Estimar a conectividade entre as populações definidas geneticamente das duas espécies de canídeos;

Capítulo 3;

- Reconhecer a estrutura genético-espacial das duas espécies e possíveis limitações de dispersão ligadas ao sexo;
- Confirmar a existência de grupos familiares utilizando informações moleculares.

4 CAPÍTULO 1: DINÂMICAS POPULACIONAIS DOS CANÍDEOS CACHORRO-DO-MATO E LOBO-GUARÁ UTILIZANDO AMOSTRAS NÃO INVASIVAS

4.1 Introdução

Populações de carnívoros são as mais vulneráveis à extinção em áreas fragmentadas devido, principalmente, à sua baixa densidade e à necessidade de grandes áreas de vida para atender suas necessidades fisiológicas (NOSS *et al.*, 1996; WOODROFFE E GINSBERG, 1998). As alterações nas populações de carnívoros provocam mudanças na biodiversidade local, devido à função no controle populacional das presas que eles desenvolvem (PRIMACK E RODRIGUES, 2001).

Apesar da plasticidade e da capacidade de adaptação do cachorro-do-mato e do lobo-guará, essas espécies se veem fortemente afetadas pela perda de habitat e o alto grau de fragmentação. Além do papel no controle no tamanho populacional das presas, ambas as espécies, também desempenham um papel importante como dispersoras de sementes (JUAREZ E MARINHO-FILHO, 2002; BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004; REIS *et al.*, 2011), aumentando assim suas funções ecológicas.

No estado de São Paulo, as duas espécies ocorrem em remanescentes de habitat natural de Cerrado e Mata Atlântica. Os remanescentes dos biomas do estado, que incluem unidades de conservação, encontram-se fortemente fragmentados e isolados por áreas altamente antropizadas e com pouca ou nenhuma conectividade estrutural entre eles (KLINK E MACHADO, 2005; TABARELLI *et al.*, 2005).

A falta de conectividade entre essas unidades pode obrigar os animais a sair dos remanescentes em busca de recursos, atravessando grandes extensões desprotegidas, altamente urbanizadas e rodovias altamente transitadas. Crooks (2002) demonstrou que quanto menor e mais isolado um fragmento, menor será a probabilidade de ocorrência de carnívoros na área, porém aumentam as chances de ocorrência de animais domésticos. Quando a falta de conectividade não é unicamente estrutural, mas também funcional, as populações ficam isoladas, resultando em um aumento da susceptibilidade das espécies aos efeitos negativos dos fenômenos ambientais, demográficos e genéticos (FAHRIG, 2003; FRANKHAM *et al.*, 2008), aumentando assim a probabilidade de extinção local.

Conhecer as dinâmicas populacionais do cachorro-do-mato e do lobo-guará presentes em alguns remanescentes do estado nos permitirá entender as diferenças entre duas espécies de

hábitos generalistas e que se adaptam facilmente às mudanças da paisagem, mas que apresentam estruturas sociais diferentes. Entretanto, trabalhar com carnívoros é difícil, pois as espécies desta ordem apresentam hábitos noturnos e evasivos que dificultam a coleta das amostras. As amostras não invasivas são uma solução para este problema, pois não dependem da captura dos animais para sua obtenção.

As amostras não invasivas são vestígios que os animais deixam nos locais onde ocorrem, entre elas podemos destacar os pelos e penas soltas, fezes, ossos e regurgitos (TABERLET *et al.*, 1999; MORIN *et al.*, 2001). As amostras não invasivas oferecem uma grande quantidade de dados ecológicos e biológicos das espécies, especialmente quando utilizadas junto às análises moleculares. Entre as informações obtidas destacam-se a confirmação molecular da espécie, dieta, tamanho populacional, diversidade genética, parentesco e relações populacionais (MORIN *et al.*, 1993; TABERLET *et al.*, 1999; RODGERS E JANEČKA, 2013; MIOTTO *et al.*, 2014; MESTRE *et al.*, 2015).

Dentro desse contexto, neste capítulo foi proposto utilizar amostras não invasivas para: a) avaliar a presença do cachorro-do-mato e do lobo-guará em alguns remanescentes de habitat natural no estado de São Paulo, sendo áreas de conservação integral ou reservas particulares; b) comparar as densidades e os tamanhos populacionais de cada espécie em cada área considerando aspectos biológicos e ecológicos próprios de cada uma delas; c) analisar a estrutura sexual em paisagens alteradas; e d) avaliar os padrões de distribuição dos indivíduos de cada espécie, entre e dentro das áreas amostradas.

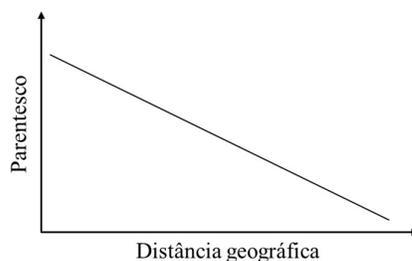
4.2 Hipóteses

Considerando que, segundo Reis *et al.* (2011), a média das áreas de vida do cachorro-do-mato são menores (4,56 – 11,11 km²) que a média para os lobos-guará (50-70 km²), e que os cachorros-do-mato são indivíduos sociais (MONTGOMERY E LUBIN, 1978), enquanto que os lobos-guará são solitários (BIBEN, 1983), a densidade e os tamanhos populacionais dos cachorros-do-mato serão maiores que os valores para os lobos-guará.

A proporção sexual das populações das duas espécies, amostradas nas áreas de conservação integral e nas reservas particulares, não diferem da proporção sexual de 1:1 reportada para ambas as espécies (MONTGOMERY E LUBIN, 1978; MOEHLMAN, 1986).

Alguns autores já reportaram indícios de isolamento por distância para cachorro-do-mato (TCHAICKA *et al.*, 2007) e para lobo-guará (PRATES, 2008). Assim, acreditamos que à

medida que a distância geográfica aumenta, a relação de parentesco dos indivíduos diminui seguindo o comportamento do gráfico para as duas espécies.



Fonte: Elaborado pela autora

4.3 Material e métodos

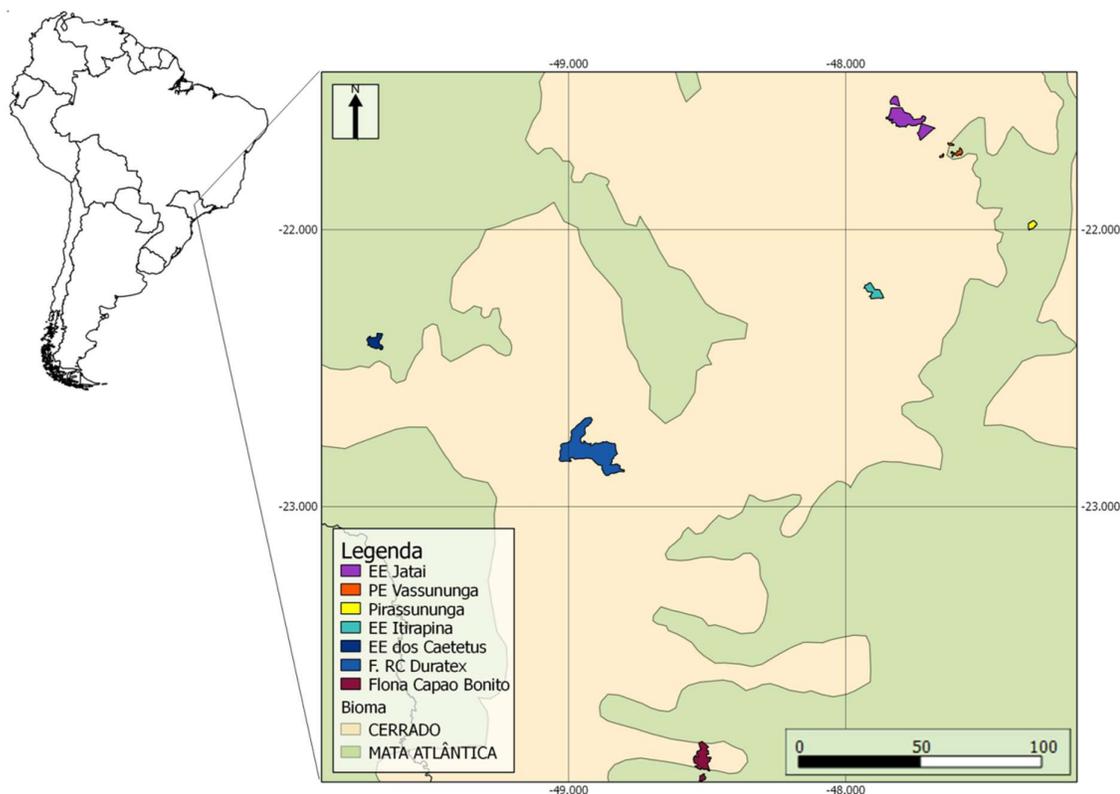
4.3.1 Área de estudo

As coletas das amostras de fezes de cachorro-do-mato e de lobo-guará foram realizadas em sete áreas localizadas no estado de São Paulo (SP) (Figura 4.1). A maior parte delas foi coletada dentro de unidades de conservação do estado: na Estação Ecológica do Jataí (EEJ), no Parque Estadual Vassununga (PEV), na Estação Ecológica de Itirapina (EEI), na Estação Ecológica dos Caetetus (EEC), na Floresta Nacional de Capão Bonito (FLONA-CB), e em remanescentes dentro do estado: um localizado na Academia da Força Aérea (AFA) (Pirassununga-SP) e a Fazenda Rio Claro da Duratex® (Lençóis Paulista-SP). Estas coletas foram realizadas durante os meses de junho de 2012 a novembro de 2015.

A EEJ está localizada próxima ao município de São Luiz Antônio (SP) entre as coordenadas -21.504/-21.667 e -47.6080/-47.6648. É a segunda maior área ambiental do estado de São Paulo com uma extensão total de 9010 hectares (ha) (PIRES, 1999) na qual se preserva um dos maiores remanescentes de cerrado do estado. Nesta área foram realizadas visitas para as coletas com duração de um dia em junho, julho e novembro de 2013, junho e agosto de 2014, e em março e abril de 2015.

O PEV no município de Santa Rita do Passo Quatro (SP) localizado entre as coordenadas -21.4108/-21.722 e -47.469/-47.6094 apresenta uma área total de 2071 ha de cerrado e Mata Atlântica. O parque está caracterizado por manter a vegetação mais antiga do estado (RIBEIRO, 2009). As visitas para as coletas foram realizadas em agosto e outubro de 2014, e em janeiro e março de 2015, sendo cada de dois dias.

Figura 4.1. Locais de coleta de amostras de fezes no estado de São Paulo (Brasil).



Fonte: Elaborado pela autora

Outra unidade de conservação que mantém remanescentes de cerrado é a EEI. Encontrase localizada entre os municípios de Itirapina e Brotas no nordeste do estado de São Paulo, delimitada pelas coordenadas $-22.193/-22.257$ e $-47.860/-47.931$. Possui uma área aproximada de 2300 ha, dos quais 94% são áreas abertas de cerrado (ZANCHETTA *et al.*, 2006). As visitas à esta unidade foram frequentes, as primeiras visitas à unidade foram realizadas em 2012, nos meses de junho e agosto, em 2013 as visitas foram realizadas nos meses de abril, julho e agosto, em 2104 foi realizada uma única visita em maio e, em 2015 foram realizadas duas visitas, em fevereiro e em setembro. Uma visita foi realizada cada mês e todas elas tiveram duração de um dia.

Outra estação do estado é a EEC, localizada entre os municípios de Gália e Alvilândia, entre as coordenadas $-22.371/-22.433$ e $-49.669/-49.726$. Possui uma área de 2178 ha dentro da qual a vegetação é típica do bioma Mata Atlântica, sendo um dos poucos e mais representativos remanescentes de Mata Atlântica no interior do estado de São Paulo (TABANEZ *et al.*, 2005). As visitas a esta área foram realizadas com duração de dois dias,

sendo realizada uma visita durante o mês de maio e o de junho de 2013 e, mais uma durante maio e julho de 2014.

Mais ao sul do estado está a Flona de Capão Bonito (SP), apresenta uma área total de 4344,33 ha de Cerrado e Mata Atlântica, em duas glebas não contínuas. Nossas coletas foram concentradas somente na maior delas, a Gleba I, conhecida como “Presidente Aristedes Largura”, com aproximadamente 3961,73 ha localizada entre as coordenadas -23.843/-23.967 e -48.495/-48.539. As visitas à gleba foram realizadas em agosto de 2013, março, outubro e novembro de 2014, e março de 2015. Todas as visitas tiveram duração de dois dias.

No estado também existem remanescentes de Cerrado e Mata Atlântica mantidos por iniciativas particulares. Um desses remanescentes está caracterizado por floresta ribeirinha, uma área de cerradão e áreas agricultáveis, constituindo a AFA, Academia da Força Aérea localizada próxima da cidade de Pirassununga, entre as coordenadas -21.952/-22.009 e -47.314/-47.353 com um total de 1500 ha de fragmentos de área natural. As coletas na área foram realizadas em saídas de três dias realizadas durante os meses de outubro e novembro de 2014, e março, abril, maio, junho, julho de 2015.

A última área estudada é uma reserva particular que compreende um total de 11900 ha de transição entre floresta atlântica semidecídua e cerrado. A Fazenda Rio Claro da Duratex® está localizada nas proximidades de Lençóis Paulista (SP), entre as coordenadas -22.347/-22.530 e -48.8434/-48.989. As coletas na área tiveram duração de dois dias e foram realizadas durante os meses de junho, julho, agosto e setembro de 2014.

Das áreas estudadas, as áreas mais próximas são a EEJ e a EEV que se encontram a uma distância de 13 km. Estas duas áreas também se encontram próximas à área de Pirassununga e a EEI, as quatro áreas estão num raio de, aproximadamente, 60 km. A uma distância de, aproximadamente, 200 km das quatro áreas enunciadas se encontra a EEC e Duratex, distanciadas entre si por 81 km. A área mais afastada é a Flona de Capão Bonito que se encontra localizada a distâncias que variam entre 112 a 238 km das outras áreas de estudo (Figura 4.1).

4.3.2 Obtenção das amostras

Amostras de fezes foram coletadas de maneira oportunista em todos os remanescentes enumerados. Inicialmente, as amostras coletadas foram identificadas morfológicamente como pertencentes a uma das espécies, seguindo as recomendações feitas por Chame (2003). As coletas foram realizadas percorrendo trilhas previamente abertas nas áreas estudadas, além de

trechos no entorno das unidades de conservação, onde era permitida a passagem pelos fazendeiros. Visando à padronização da amostragem foram percorridas sempre as mesmas trilhas.

As amostras foram armazenadas em tubos do tipo falcon de 30 mL contendo etanol absoluto. O DNA de amostras de fezes é obtido a partir das células epiteliais do intestino (KOHN E WAYNE, 1997) e a exposição das amostras às condições ambientais diminui a quantidade e qualidade de DNA extraído deste tipo de amostras (TABERLET *et al.*, 1999; FARRELL *et al.*, 2000). Portanto, foram descartadas das análises fezes muito antigas, atacadas por insetos e aquelas que foram dissolvidas pela chuva, pois o DNA da espécie que depositou as fezes pode estar comprometido nesses casos.

Todas as amostras coletadas durante este estudo estão armazenadas a -20°C no banco de tecidos do laboratório de Biodiversidade e Conservação e o local de amostragem de cada amostra foi georreferenciado utilizando um sistema GPS (*Global Positioning System*).

É necessário destacar que as coletas se encontram de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR), segundo o nº UFSCAR CEUA 1165130815. O projeto também foi autorizado para ser desenvolvido dentro das unidades de conservação pelo Instituto Federal no PROCESSO SMA Nº: 260108 – 011.611/2012. Além disso, Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO autorizou o transporte de amostras das duas espécies sob o número 38613-3.

4.3.3 Extração de DNA

As extrações do DNA total das amostras de fezes foram realizadas utilizando o Kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Esse Kit é especialmente desenvolvido para amostras que podem apresentar inibidores da PCR (reação em cadeia da polimerase), como é o caso das amostras de fezes. Para a extração, foi retirada uma camada externa das fezes de aproximadamente 1 cm, maximizando assim, a quantidade de DNA da espécie que depositou a amostra.

4.3.4 Identificação molecular das espécies

A confirmação da espécie foi realizada utilizando três regiões mitocondriais diferentes; o gene *ATP sintetase F0 subunidade 6* (ATP6), a região controle e o rRNA12S (12S), aumentando assim a confiabilidade dos dados, pois as amostras de fezes apresentam degradação do material e a presença de DNA das presas. Para a amplificação das regiões foi utilizado o par de *primers*: ATP6-DF3 (5'- AAC GAA AAT CTA TTC GCC TCT - 3') (HAAG *et al.*, 2009) e ATP6-DR2 (5' - TGG ATG GAC AGT ATT TGT TTT GAT - 3') (CHAVES *et al.*, 2012) para amplificar o ATP6; os *primers* CanCR-F (5' - CCTATGTACGTCGTGCATTA - 3') e CanCR-R (5' - GATGGTTTCTCGAGGCATGG - 3') (RODRIGUEZ-CASTRO *et al.* submitted) para amplificação da região controle e os pares Car12Ss1-F (5' - GCTTAAAACTCAAAGGACTT - 3') e o Car12Ss1-R (5' - TACACCTTGACCTAACTTTT - 3') para a amplificação do rRNA 12S (RODRIGUEZ-CASTRO *et al.* submitted).

A amplificação dos fragmentos de DNA foi conduzida em Termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) seguindo-se os protocolos propostos pelos autores. Todas as amplificações, incluindo controles positivos e negativos, foram corridas em gel de agarose 1% para confirmação da amplificação. Os produtos da PCR foram purificados utilizando as enzimas ExoSAP-IT (Affymetrix) e sequenciados automaticamente em sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências obtidas foram editadas utilizando o programa Geneious 8.0.2 (KEARSE *et al.*, 2012) e comparadas com sequências depositadas na base de dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) por meio da ferramenta BLAST (algoritmo para comparar informações de sequências); disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Foram utilizados valores de 100% de *query coverage* e pelo menos 95% de *maximum identity* para considerar uma amostra como pertencente a uma das espécies, pois trabalhamos com sequências pequenas e precisávamos uma alta especificidade.

4.3.5 Identificação individual das amostras

Após a confirmação da espécie, as amostras foram individualizadas. Para isso, foram utilizados 11 *loci* microssatélites tetranucleotídeos (2001, 2004, 2006, 2010, 2018, 2054, 2088, 2132, 2137, 2140 e 2159) desenvolvidos originalmente para cachorro doméstico (*Canis familiaris*) por Francisco *et al.* (1996), testados com sucesso em espécies de canídeos sul-americanos por Fontoura-Rodrigues *et al.* (2008) e utilizados, previamente, em cachorro-do-

mato (TCHAIKA, 2006) e em lobo-guará (SALIM *et al.*, 2007; LION *et al.*, 2011; MANNISE *et al.*, 2012; RAMALHO *et al.*, 2014). Adicionalmente, os *primers* foram validados por sequenciamento, confirmando a especificidade e a amplificação correta do *motif*.

O material genético presente nas amostras não invasivas apresenta elevada ocorrência de erros na leitura dos alelos, devido à degradação (TABERLET *et al.*, 1996), que podem levar à determinação errônea do genótipo. Um destes erros se dá pela não amplificação devido a mutações na sequência adjacente às sequências dos *primers*, que resultam em falsos homozigotos, conhecido como alelos nulos (GRIFFITHS *et al.*, 2008). Os outros erros são o resultado de erros da Taq polimerase que resultam na falta de amplificação de um alelo (alelo *drop-out*) (TABERLET *et al.*, 1996). Deste modo, para evitar os erros de genotipagem e aumentar o sucesso de amplificação foram escolhidos para amplificação fragmentos pequenos, de menos de 200 pares de bases (pb). Ainda, todos os *loci* microsatélites de cada amostra foram amplificados independentemente, no mínimo, duas vezes quando heterozigoto e três quando homozigoto, para confirmação do genótipo. Além disso, a amplificação dos alelos foi realizada em reações de PCR diferentes e, escolhendo os *primers* e indivíduos aleatoriamente, ajudando assim a diminuir as taxas de erro. Os erros de genotipagem foram avaliados pelo *software* Micro-Checker 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

Para a genotipagem de todos os *loci*, a região 5' do *primer forward* foi marcada com uma cauda universal de 18 pares de bases (cauda M13) acrescida de um fluoróforo, como descrito por Schuelke (2000). Os produtos amplificados foram avaliados em eletroforese em gel de agarose 1% e genotipados no sequenciador automático ABI 3130 da Applied Biosystems e analisados utilizando o *software* Geneious R8 (KEARSE *et al.*, 2012).

As PCRs foram realizadas em volume final de 10 µL, incluindo: 0,2 µM de dNTPs; 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 2,5 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,2 pmol do *primer Forward* e 0,8 pmol do *primer reverse* e da fluorescência para marcar a cauda M13; 1 unidade de Taq Polymerase Platinum (Invitrogen); 0,25 mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumin), esse último aumenta a eficiência da PCR captando íons que podem ser inibidores da Taq polimerase; 50 ng do DNA molde e água ultrapura (q.s.p). As PCRs foram conduzidas em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems) com uma desnaturação inicial a 94°C durante 1 minuto; 27 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 58°C (59°C para o *locus* 2010 ou 60°C para o *locus* 2132) por 45 segundos, 74°C por 1 minuto; seguidos de 8 ciclos para incorporação do fluoróforo à cauda M13 de 94°C durante

30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C a 45°C; e uma extensão final de 15 minutos a 72°C.

Para ter maior confiança nos resultados foram mantidas nas análises aquelas amostras que apresentaram mais de 70% dos *loci* amplificados, como recomendado por Beja-Pereira *et al.* (2009).

Um número de *loci* microssatélites cria um perfil único para cada indivíduo que permite a individualização das amostras. Entretanto, esse número muda conforme o conteúdo de informação polimórfica (PIC) de cada *locus*. Para conhecer o PIC dos *loci* estudados foi utilizado o programa Cervus 3.0.7 (MARSHALL *et al.*, 1998; KALINOWSKI *et al.*, 2007). Com o conteúdo de informação polimórfica os *loci* foram organizados do mais informativo ao menos informativo. Após a organização, utilizando o *software* GenAID 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006), foram calculadas a probabilidade de identidade (P_{ID}), a qual computa a probabilidade de dois indivíduos aleatoriamente apresentarem o mesmo genótipo *multiloci* (PAETKAU E STROBECK, 1994; WAITS *et al.*, 2001), e a $P_{ID (sibs)}$ mais adequada para pesquisas com animais aparentados, utilizando nos dois casos um valor de confiança de 95%. Os valores totais tanto para o P_{ID} como para o $P_{ID (sibs)}$ foram calculados multiplicando os valores de cada *locus*.

A individualização das amostras foi realizada no programa GIMLET (VALIÈRE, 2002) mediante a opção de reagrupamento de genótipos, no qual cada genótipo é considerado um genótipo potencial e comparado contra todos os outros. Para fazer as comparações assumimos que os valores ausentes (*missing alleles*) poderiam ser qualquer alelo para ter uma maior certeza e aumentar assim, a confiança de nossos dados. Com o mesmo fim, realizamos as comparações utilizando o número mínimo de *loci* necessários para a individualização (considerando o valor de $P_{ID (sibs)} + 1$) e aumentando, gradativamente, até chegar ao número total de *loci* utilizados.

Foi testado o desequilíbrio de ligação entre os *loci* no programa Genepop 4.6 (RAYMOND E ROUSSET, 1995) para saber se os alelos encontrados segregam independente para serem considerados informativos.

4.3.6 Análises demográficas

Após a individualização das amostras foi possível calcular o tamanho populacional mínimo e a densidade da espécie em cada área amostrada. Inicialmente, foram construídos e analisados mapas no programa Quantum GIS 1.8.0 (QGIS DT, 2012) utilizando camadas do

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Nos mapas, foi calculada a distância máxima percorrida (maior distância entre dois pontos de coleta) pelos animais capturados e recapturados (após a individualização) utilizando a ferramenta de régua incorporada no programa. As médias dos valores encontrados foram utilizados como raios para traçar círculos ao redor de cada ponto de coleta. Após o desenho de todos os círculos todos aqueles que se sobrepunham foram somados em um único polígono para a criação de *buffers*, seguindo o método $\frac{1}{2}$ MMDM (*mean maximum distance moved*) proposto por Wilson e Anderson (1985), que é recomendado para calcular a área de vida das espécies quando não é possível obter esses dados utilizando outras técnicas, como por exemplo a rádio telemetria (BALME *et al.*, 2009).

Do mesmo modo, utilizamos as áreas de vida média reportada para as espécies (4,5 a 11,1 km² para cachorro-do-mato e 50 a 70 km² para lobo-guará REIS *et al.*, 2011) para criar *buffers* adicionais sobre os pontos amostrados, e ter mais uma aproximação às densidades das espécies.

No programa Quantum GIS 1.8.0 (QGIS DT, 2012) os novos polígonos foram localizados sobre o mapa criado inicialmente e as áreas destes novos polígonos foram medidas para estabelecer as áreas efetivamente amostradas. Os valores calculados foram utilizados para estimar as densidades populacionais para cada uma das espécies.

Também foram calculados os valores de tamanho efetivo populacional com o método de desequilíbrio de ligação, mais adequado para amostras não invasivas, no programa NeEstimator (DO *et al.*, 2014) usando um valor de probabilidade de 5% ($p \leq 0,05$). Este método mede a força da deriva numa característica da população (TEMPLETON, 2006). O programa permite realizar as análises escolhendo o sistema de acasalamento da espécie, entre as opções de acasalamento ao acaso ou monogamia. Os valores de confiança foram calculados utilizando análises paramétricas e o método de *Jackknife*, incluído no programa.

4.3.7 Sexagem

Para calcular a quantidade de machos e fêmeas amostrados em cada área e estimar a proporção sexual, o sexo dos indivíduos coletados das duas espécies foi identificado molecularmente. Para isso, foram utilizadas, independentemente duas regiões diferentes: o ZF e o SRY. Foram determinados como de um sexo os indivíduos que mostrassem correspondência nas duas análises.

A amplificação do ZF foi realizada utilizando os *primers* ZFKF (5'-CAAAGGTGGCGATTCAATAA-3') e ZFKR (5'-ATGGAGAGCCACAAGCTRAC-3')

(ORTEGA *et al.*, 2004) seguindo-se o protocolo proposto pelos autores. Os *primers* amplificam um fragmento de 195 pb das proteínas do ZFx e do ZFy. O fragmento contém um único sítio para a enzima de restrição *TaqI* no gene ZFy (ORTEGA *et al.*, 2004), que resulta em duas bandas para os machos e uma única banda para as fêmeas pela ausência do sítio de restrição.

Para a ativação da enzima *TaqI* (Thermo Scientific) se utilizaram as mesmas concentrações propostas pelos autores, porém o tempo de incubação foi reduzido à metade, utilizando assim 1 hora e 30 minutos. A inativação da enzima foi feita com EDTA 0,5M como recomendado pelo fabricante. Todos os produtos de PCR submetidos à restrição, incluindo os controles positivos e negativos, foram corridos a 70 v durante duas horas em gel de agarose 3%.

A amplificação do gene SRY foi realizada utilizando os *primers* LUT-SRY F (5'-GAATCCCCAAATGCAAACTC-3') e LUT-SRY R (5'-GGCTTCTGTAAGCATTTTCCAC-3') originalmente descritos para sexagem da lontra-europeia (*Lutra lutra*), por Dallas *et al.* (2000). Adicionalmente, como controle positivo foi incluído o *primer* ZF numa reação *multiplex*.

As PCRs foram realizadas em volume final de 12 µL, incluindo: 0,2 µM de dNTPs; 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 3,5 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,3 pmol de cada *primer*; 0,25 mg/mL de BSA; 1 unidade de *Taq* Polymerase Platinum (Invitrogen); 50 ng do DNA molde e água ultrapura (q.s.p). As PCRs foram conduzidas em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems) com uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos; 30 ciclos de amplificação a 94°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; e uma extensão final de 20 minutos a 72°C. Esperam-se duas bandas para os machos, uma maior de 195 pb do ZF e outra de 70 pb própria para o cromossomo Y, e amplificação de uma única banda (do ZF) nas fêmeas. Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de agarose 3% depois de 1 hora e meia de corrida a 90V.

4.3.8 Erros de genotipagem

A determinação de alelos nulos foi realizada no programa Micro-checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004), utilizando-se os estimadores Brookfield Estimator 1 e Van Oosterhout por serem os estimadores mais recomendados para nosso tipo de amostras. Esses estimadores assumem que o déficit de heterozigotos é devido ao DNA degradado (usualmente encontrado em amostras não-invasivas como fezes), a erros humanos durante a PCR ou a outros erros durante a genotipagem. A porcentagem de alelos *dropout* foi calculada utilizando

o número de erros encontrados (quando não foi amplificado um alelo) sobre o total de vezes que poderia acontecer.

4.3.9 Análises de correlação espacial

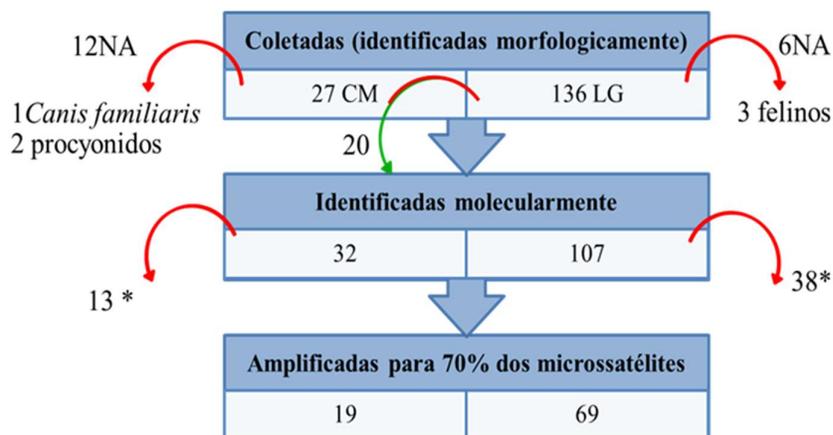
O valor de parentesco dos indivíduos em cada uma das áreas foi calculado utilizando estimadores de máxima verossimilhança (WAGNER *et al.* 2006) no *software* ML-relate (KALINOWSKI *et al.*, 2006) e comparado os valores obtidos entre as áreas. O valor de parentesco (r) é uma medida que utiliza o número de alelos compartilhados sobre o valor total dos alelos, considerando a identidade por descendência entre os indivíduos (BLOUIN, 2003).

Foram comparados os valores de parentesco dos indivíduos par a par e a distância geográfica à que eles se encontram num teste de mantel pareado no programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006), para determinar se os indivíduos mais relacionados estão localizados mais próximos que os não relacionados. Com a mesma finalidade foram realizadas regressões lineares no programa R (R CORE TEAM, 2013) utilizando as distâncias genéticas par a par em função das distâncias geográficas.

4.4 Resultados e Discussão

Nas sete áreas estudadas foram coletadas 27 amostras caracterizadas morfológicamente como de cachorro-do-mato e 136 amostras de lobo-guará (Figura 4.2). O DNA de todas as 163 amostras foi extraído e a confirmação da espécie foi possível para 145 amostras (aproximadamente 89%). Apesar dos cuidados adotados durante as coletas, descartando amostras antigas e dissolvidas pela chuva, as condições climáticas podem ter afetado o DNA das outras 18 amostras, impossibilitando assim a amplificação das regiões de interesse.

Figura 4.2. Número de amostras de fezes coletadas para *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* e efetivamente analisadas para as áreas estudadas no estado de São Paulo.



As setas vermelhas indicam amostras que são excluídas da contagem, enquanto que as setas verdes são amostras que entram na contagem. CM: cachorro-do-mato. LG: lobo-guará. NA: não amplificaram os genes mitocondriais para identificação molecular. *Indivíduos que foram excluídos por falta de amplificação de no mínimo 70% (6 locus) dos microsstatélites.

4.4.1 Confirmação molecular das espécies

Considerando as 27 amostras coletadas morfologicamente como de cachorro-do-mato, somente 12 (44,44%) efetivamente pertenciam a esta espécie (Figura 4.2). Uma explicação neste caso é que essas amostras não amplificadas pertencem a outras espécies que não são da família dos canídeos. Assim, a amplificação dos *primers* não ocorre, pois são desenhados para espécies da família, evitando assim amplificação de espécies filogeneticamente mais afastadas, como as presas. Este fato mostra que a identificação morfológica das amostras de fezes do cachorro-do-mato está sujeita a altas probabilidades de erro.

Embora as coletas fossem direcionadas para amostras com restos de insetos, para aquelas potencialmente depositadas por cachorro-do-mato, foram coletadas erroneamente duas amostras de Procyonidae, uma de cachorro-doméstico (*Canis familiaris*) como se fossem da espécie. No caso do lobo-guará, foram utilizados restos da lobeira como característicos das fezes da espécie, entretanto, três amostras de felinos foram coletadas equivocadamente (Figura 4.2).

Esse fato é uma evidência clara da importância de realizar a confirmação da espécie molecularmente, assim como demonstrado por Morin *et al.* (2016). O uso de três marcadores moleculares diferentes para a identificação das espécies permite ter uma confiança maior nos resultados e confirmar que existem erros na identificação morfológica das amostras coletadas, mesmo quando a coleta é feita por pessoal com ampla experiência.

A necessidade da confirmação molecular da espécie torna-se mais evidente quando comparamos a taxa de erro na identificação entre as duas espécies. Vinte amostras identificadas inicialmente como de lobo-guará (22,45%) foram confirmadas como de cachorro-do-mato (Figura 4.2). Juárez e Marinho-Filho (2002) reportaram sementes de lobeira na dieta do cachorro-do-mato, mesmo que em uma frequência menor à esperada para lobo-guará, assim como também restos de coleópteros nas fezes do lobo-guará. Acreditamos também, que as mudanças sazonais da dieta, com num consumo maior de diversas frutas na estação chuvosa por parte das duas espécies (BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004), conduz a mudanças na composição das fezes descaracterizando a morfologia das mesmas.

Além disso, as dietas dos carnívoros podem mudar em ambientes fortemente alterados como as áreas mais antropizadas, pois os indivíduos se veem obrigados a consumir o alimento disponível no local. A área de Pirassununga é um exemplo claro desse fato, pois das 27 amostras identificadas morfologicamente como sendo de lobo-guará, 10 foram confirmadas molecularmente como de cachorro-do-mato, ao considerar somente esta área, a percentagem de erro aumenta para 37%.

Os valores de erro na identificação morfológica mostram a importância da confirmação molecular para desenvolver pesquisas não somente quando se pretende avaliar geneticamente as populações, mas também esta abordagem é necessária para estudos em que são utilizadas as fezes para compreender melhor a dieta, a variação hormonal, assim como quando se pretende realizar inferências sobre as interações das espécies e a estrutura das comunidades, pois um erro na identificação desencadearia interpretações ecológicas e biológicas erradas para as espécies.

4.4.2 Caracterização dos indivíduos

Dos onze microssatélites escolhidos, os *loci* 2006 e 2159 apresentaram problemas para amplificação e por isso foram excluídos das análises posteriores. Os nove *loci* microssatélites restantes mostraram amplificação do *motif* tetranucleotídico em ambas as espécies quando sequenciados, demonstrando assim que o *locus* de interesse amplifica com sucesso.

Considerando que foram analisadas somente as amostras que amplificaram mais de 70% (mínimo 6) dos *loci* microssatélites, somente 19 (aproximadamente 60%) amostras de cachorro-do-mato e 69 (aproximadamente 64%) de lobo-guará foram consideradas para as análises subsequentes (Figura 4.2). Do total de amostras coletadas inicialmente (163), foram analisadas para os nove *loci* microssatélites 88 amostras, que representa 54% das amostras. Apesar das vantagens enumeradas das amostras não invasivas o estado das amostras e a

exposição destas às condições ambientais tem uma repercussão evidente sobre o estado de conservação e, conseqüentemente, sobre o sucesso de amplificação das amostras e sobre a confiabilidade de resultados.

Seguindo a classificação proposta por Botstein *et al.* (1980), os nove *loci* utilizados foram classificados como altamente informativos para as duas espécies, exceto os *loci* 2001 e 2088 para cachorro-do-mato e o *locus* 2004 para lobo-guará, classificados como razoavelmente informativos (Tabela 4.1). Quando calculada a média do PIC, o valor é considerado altamente informativo para ambas as espécies.

Com os valores de conteúdo de informação polimórfica (PIC) calculados, a individualização das amostras foi possível utilizando-se os valores de probabilidade de identidade. Estes valores mostraram que se combinando apenas os dois *loci* mais informativos seria possível a individualização das amostras de qualquer uma das espécies se elas fossem de animais não relacionados (Figuras 4.3 a e b). Entretanto, esse valor aumenta para quatro *loci* (valores menores a 0,01) quando considerado o valor de $P_{ID(sibs)}$ que é adequado para individualizar indivíduos relacionados, como é o nosso caso.

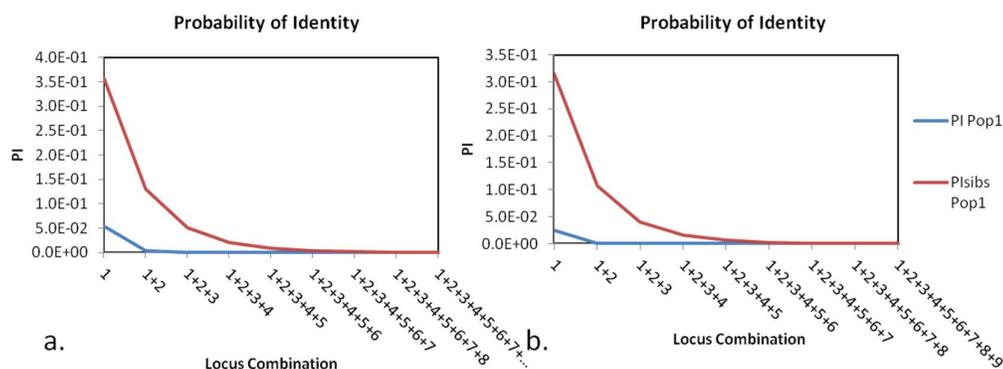
Tabela 4.1. Características dos *loci* microssatélites utilizados para as análises das amostras de *Cercopithecus thous* e *Chrysocyon brachyurus*.

	<i>Locus</i>	Pb	PIC	P_{ID}	$P_{ID(sibs)}$	Alelos dropout (%)
Cachorro-do-mato	2001	123-135	0,307	0,47	0,71	12,5
	2004	253-265	0,626	0,16	0,45	20,00
	2010	229-253	0,668	0,12	0,43	13,33
	2018	149-169	0,724	0,094	0,39	11,11
	2054	132-156	0,655	0,13	0,44	8,69
	2088	90-106	0,383	0,37	0,64	16,00
	2132	144-168	0,715	0,099	0,40	19,35
	2137	151-243	0,792	0,054	0,36	8,00
	2140	90-166	0,783	0,061	0,36	15,38
		Média	-	0,6281	-	-
	Total	-	-	$1,3 \times 10^{-8}$	$7,8 \times 10^{-4}$	
Lobo-guará	2001	128-140	0,557	0,21	0,49	17,71
	2004	258-270	0,485	0,27	0,54	18,82
	2010	235-255	0,718	0,098	0,40	22,35
	2018	149-169	0,718	0,095	0,40	20,66
	2054	134-150	0,713	0,10	0,40	8,97
	2088	92-104	0,555	0,21	0,49	12,82
	2132	140-168	0,822	0,045	0,34	21,24
	2137	212-252	0,871	0,025	0,32	5,88
	2140	118-166	0,748	0,081	0,38	25,71
		Média	-	0,687	-	-
	Total	-	-	$1,0 \times 10^{-9}$	$3,3 \times 10^{-4}$	

Tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb); probabilidade de identidade (P_{ID} e $P_{ID(sibs)}$); conteúdo de informação polimórfica (PIC).

Os valores de probabilidade de identidade para cachorros-do-mato (P_{ID} de $1,3 \times 10^{-8}$ e $P_{ID(sibs)}$ de $7,8 \times 10^{-4}$) e para lobo-guará (P_{ID} de $1,0 \times 10^{-9}$ e $P_{ID(sibs)}$ de $3,3 \times 10^{-4}$) são considerados satisfatórios para a individualização de indivíduos em populações naturais (WAITS *et al.*, 2001).

Figura 4.3. Probabilidade de identidade P_{ID} e $P_{ID(sibs)}$ para as amostras de fezes coletadas no estado de São Paulo para (a) *Cerdocyon thous* e (b) *Chrysocyon brachyurus*.



Ao individualizar as amostras não foi possível detectar a recaptura de nenhum animal de cachorro-do-mato durante o nosso estudo, sendo que cada uma das 19 amostras coletadas pertence a um indivíduo diferente. Isto evidencia que o número de animais coletados é muito inferior ao número de animais existentes, mostra uma baixa detectabilidade da espécie quando coletadas amostras de fezes em trilhas e reflete a necessidade de trabalhos com maior esforço amostral, utilizando técnicas para amostragem com por exemplo, cachorros domésticos para forragear as amostras, para assim poder fazer inferências sobre a biologia e ecologia da espécie (Tabela 4.2).

Tabela 4.2. Número de amostras e indivíduos coletados em cada uma das sete áreas amostradas.

	Cachorro-do-mato	Lobo-guará	Total amostras	Total indivíduos
EEJ	-	11	11	11
PEV	-	2	2	2
EEI	3	25	34	28
EEC	-	-	0	0
FLONA -CB	6	2	8	8
Pirassununga	10	17	29	27
F RC. Duratex	-	3	3	3
Outras	-	1	1	1
Total	19	61	88	80

Por outra parte, dentro das 69 amostras de lobo-guará coletadas, seis foram identificadas como recapturas na estação ecológica de Itirapina e duas na área de Pirassununga, resultando em 61 indivíduos (Tabela 4.2).

Apesar de não coletar nenhuma amostra de fezes na estação ecológica dos Caetetus existem registros de ambas as espécies para a área. Para o cachorro-do-mato existem evidências de ocorrência no plano de ação da estação (TABANEZ *et al.*, 2005), assim como para o lobo-guará, que também é reportado no livro de fauna ameaçada do estado de São Paulo (BRESSAN *et al.*, 2009).

A porcentagem de alelos *dropout* foi superior nos lobos-guará que nos cachorros-do-mato, mostrando que existe uma maior probabilidade de erros de genotipagem devido à qualidade do DNA nesta espécie. Entretanto, as médias encontradas para ambas as espécies se encontram entre os valores esperados e reportados anteriormente para estudos com amostras não invasivas (Por exemplo, MIOTTO *et al.*, 2011; RAMALHO *et al.*, 2014).

As análises revelaram que existe desequilíbrio de ligação entre os *loci* 2001 e 2132 ($p=0,0329$) e os *loci* 2137 e 2054 ($p=0,0200$) para os cachorros-do-mato. Por essa razão, para as análises subsequentes com esta espécie foram excluídos os *loci* 2001 e 2054, pois eles apresentam os menores valores de PIC (Tabela 4.1). Para os lobos-guará não encontramos nenhum *locus* em desequilíbrio de ligação, nem alelos nulos para a espécie (Tabela 4.3).

Tabela 4.3. Frequência dos alelos nulos para as espécies *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* utilizando os métodos de Oosterhout e Brookfield.

	<i>Locus</i>	Alelos nulos	Oosterhout	Brookfield 1
<i>Cerdocyon thous</i>	2004	não	0,0323	0,0242
	2010	sim	0,1809	0,1522
	2137	sim	0,1171	0,11
	2140	não	-0,0522	-0,0483
	2132	não	-0,0562	-0,0514
	2088	não	-0,0288	-0,023
	2018	não	0,0389	0,0314
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	2001	não	-0,0858	-0,0566
	2010	não	0,0722	0,0624
	2140	não	-0,1039	-0,0852
	2132	não	0,0213	0,0189
	2054	não	0,0639	0,0617
	2088	não	-0,1478	-0,1038
	2018	não	0,0295	0,0317

Acreditamos que a presença de alelos nulos não se deva à baixa eficiência no anelamento do *primer* devido a pontos de mutação nos sítios de hibridização (DAKIN E AVISE, 2004), nem à amplificação preferencial de alelos de tamanhos menores (DAKIN E AVISE, 2004), por isso mantivemos os alelos para as análises subsequentes.

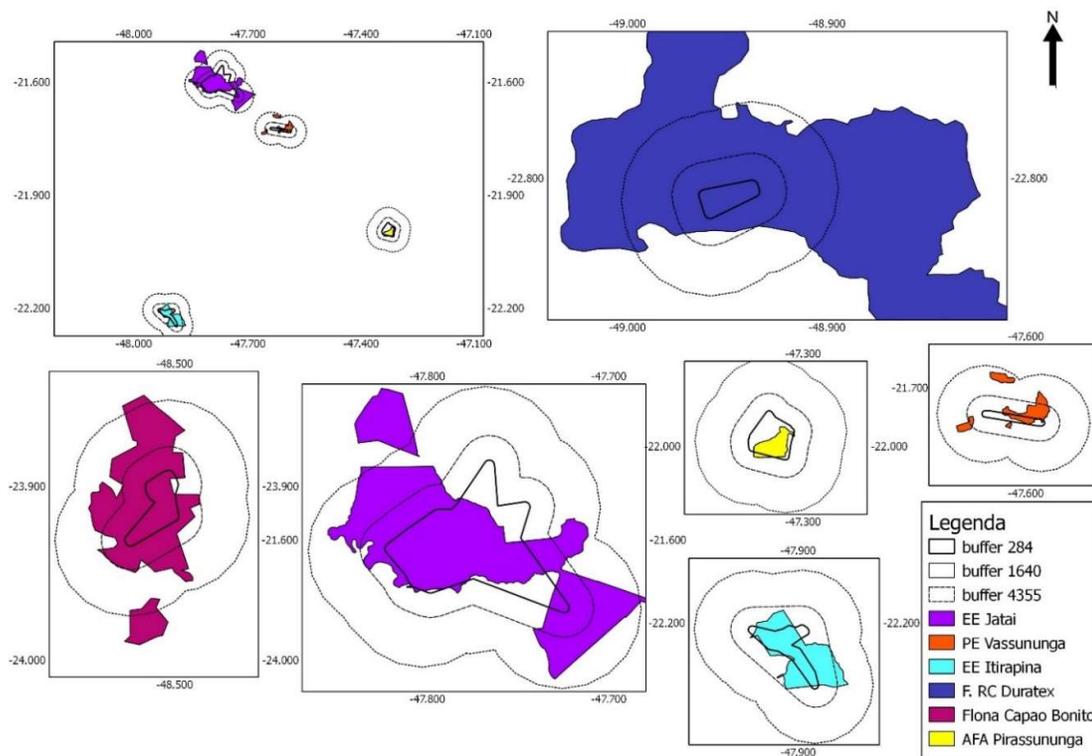
4.4.3 Densidades populacionais

O número amostral baixo e a falta de recapturas para os indivíduos de cachorro-do-mato não permitiram calcular a área efetivamente amostrada para a espécie. Utilizar os valores encontrados para o lobo-guará para realizar os cálculos de densidade populacional dos cachorros-do-mato levaria a conclusões equivocadas, pois a biologia e ecologia de ambas as espécies são diferentes.

As amostras dos animais de lobos-guará recapturados na estação ecológica de Itirapina e em Pirassununga encontraram-se distanciadas entre 257 m a 5,839 km, mostrando a capacidade da espécie de percorrer grandes extensões.

Dois valores médios destas distâncias foram utilizados para calcular as áreas efetivamente amostradas: o primeiro de 284 m, calculado utilizando somente os animais que foram recapturados, mas amostrados com intervalos de tempo de mais de três meses (considerados como residentes das áreas); o segundo de 1,639 km, incluindo os valores de todos os animais recapturados. Adicionalmente, foi utilizado um terceiro valor (4,355 km), calculado utilizando o raio médio das áreas de vida média para a espécie (50 a 70 km², REIS *et al.*, 2011) (Figura 4.4).

Figura 4.4. Áreas do estado de São Paulo com os *buffers* amostrados efetivamente para *Chrysocyon brachyurus*.



Fonte: Elaborado pela autora

As áreas efetivamente amostradas para o lobo-guará nos locais estudados variaram de 3,9 km² na F. RC Duratex a 236,6 km² na EEJ (Tabela 4.4). A área da EEC não foi considerada nas análises devido à falta de amostras no local.

Tabela 4.4. Áreas efetivamente amostradas para *Chrysocyon brachyurus* utilizando três *buffers* diferentes. Valores apresentados em quilômetros quadrados.

Áreas	Buffer		
	284m	1640m	4355m
EEJ	43,0224	96,8161	236,6434
PEV	3,9046	29,0238	114,2077
EEI	9,7887	45,7420	144,4062
FLONA -CB	7,4397	32,4256	119,1822
Pirassununga	10,0764	34,2442	120,6769
F RC. Duratex	3,9575	22,5605	91,6792

É importante considerar que os valores de densidades são calculados a partir das amostras de fezes coletadas, e que apesar da técnica permitir maior número de capturas (LION *et al.*,

2011), alguns indivíduos podem não ser amostrados, resultando assim em valores de densidades subestimados, por isso consideradas densidades mínimas.

Para calcular os valores de densidade mínima foi considerado o número de indivíduos amostrados (Tabela 4.2), exceto para o *buffer* de 284 onde foram considerados somente os indivíduos recapturados, pois ele foi calculado utilizando unicamente esses indivíduos. Por essa razão, os valores foram calculados apenas para a EEI e a área de Pirassununga (Tabela 4.5). Na EEI três indivíduos foram capturados com no mínimo um mês de diferença entre cada campanha. Considerando estes indivíduos, e o *buffer* dos animais residentes, a densidades de animais na EEI é de 0,31 indivíduos/ km².

As maiores densidades encontradas na EEI e na área de Pirassununga podem ser reflexo de uma amostragem mais intensiva nessas áreas. Isto pode ser confirmado se consideramos que nestas áreas foram encontradas recapturas. Entretanto é importante destacar que nem todos os animais que foram amostrados devem ser residentes das áreas e que a maioria dos indivíduos pode estar utilizando as áreas para obter algum recurso, como comida ou abrigo ou simplesmente utilizam as áreas como locais de passagem para chegar a outros lugares (*stepping-stone*), pois elas apresentam matrizes mais permeáveis por se tratar de áreas com remanescentes de vegetação natural, o que explicaria os valores maiores de densidade encontrados. Corredores e locais de passagem têm sido propostos como estratégias, em nível de paisagem, para aumentar a conectividade em populações fragmentadas e isoladas (BAUM *et al.*, 2004).

Tabela 4.5. Densidades de *Chrysocyon brachyurus*, em indivíduos/km², nas áreas estudadas utilizando três buffers diferentes.

Áreas	<i>Buffer</i>		
	284m	1640m	4355m
EEJ	-	0,11	0,05
PEV	-	0,07	0,02
EEI	0,61	0,55	0,17
FLONA -CB	-	0,06	0,02
Pirassununga	0,19	0,49	0,14
F RC. Duratex	-	0,13	0,03

As densidades mínimas calculadas nas áreas utilizando o *buffer* 4355 encontram-se entre os valores reportados na literatura para a espécie: 0,1 indivíduos/km² na Estação Ecológica Águas Emendadas (RODRIGUES, 2002), e na EEJ (RAMALHO *et al.* 2014), 0,05

indivíduos/km² no Parque Nacional das Emas (SILVEIRA, 1999), 0,03 indivíduos/km² numa área particular de Cerrado em Minas Gerais (TROLLE *et al.*, 2007).

É importante destacar que as densidades menores de 0,1 indivíduo/km² reportadas para os lobos-guará foram calculadas em áreas de conservação grandes e localizadas nos estados de Goiás e Minas Gerais onde o número de habitantes por metro quadrado é menor que no estado de São Paulo. O valor reportado por Rodrigues (2012) na Estação Ecológica Águas Emendadas, é igual ao encontrado em nosso estudo, e ao reportado por Ramalho *et al.* (2014), mostrando que em unidades de conservação inseridas em áreas fortemente alteradas as densidades dos indivíduos aumentam.

Acreditamos que o valores de 0,1 indivíduos/km² representa a realidade da espécie, pois esta é considerada generalista, oportunista e tolerante a ambientes urbanos, bem como não distingue os limites das áreas. No entanto, é um valor alto, quando considerado que alcança mais do dobro do valor reportado em outras áreas. Assim, as áreas com remanescentes de vegetação nativa, sejam estes protegidos ou não, terminam se tornando fontes importantes de recursos para as espécies mostrando a sua importância na conservação da biodiversidade e na manutenção do equilíbrio dos ecossistemas, principalmente quando fornecem refúgio e recursos para grandes mamíferos e para espécies com papéis ecológicos importantes como é o lobo-guará.

Considerando que os valores de densidade podem ser subestimados, é importante destacar que a pode existir superpopulação de lobos-guará em áreas com remanescentes de vegetação natural inseridas em paisagens altamente fragmentados e intervindos. Este fenômeno pode se repetir em todo o estado de São Paulo, assim como em áreas que apresentem maiores densidades humanas. Do mesmo modo acreditamos, que não deve ser um fenômeno que ocorre somente para a espécie, mas também para todas as espécies de animais que precisam de áreas deste tipo na região.

4.4.4 Sexagem

Tanto o gene ZF como o SRY mostraram resultados positivos para a identificação do sexo dos indivíduos em ambas as espécies. Para o ZF, como esperado, no gel foi visualizada uma única banda para as fêmeas e duas bandas para os machos após a ação da enzima de restrição *TaqI*. Ao sequenciar os produtos da PCR encontramos o polimorfismo nos indivíduos machos de ambas as espécies, que serve como sítio de reconhecimento para a enzima de restrição (Figura 4.5).

Em alguns casos, os resultados foram contraditórios quando comparadas as duas técnicas para sexagem (a enzima no gene ZF e a amplificação do SRY). Os indivíduos que apresentaram esta situação foram amplificados mais uma vez com os dois genes para confirmação do sexo.

Figura 4.5. Sequências gene ZF para as duas espécies. Destaca-se em vermelho o único sitio de ação da enzima de restrição, que reconhece a sequência 5'...TCGA...- 3' presente nos machos das duas espécies.

	1	10	20	30	40	50
ZFy Chrysocyon brach...	AGAATTTACACTTGTGCATTTTGTGGTTCCTTTTCCCTTATGCACCAATTTT					
ZFy Cerdocyon thous	AGAATTTACACTTGTGCATTTTGTGGTTCCTTTTCCCTTATGCACCAATTTT					
ZFx Chrysocyon brach...	AGAATTTACACTTGTGCATTTTGTGGTTCCTTTTCCCTTATGCACCAATTTT					
ZFx Cerdocyon thous	AGAATTTACACTTGTGCATTTTGTGGTTCCTTTTCCCTTATGCACCAATTTT					
	60	70	80	90	100	
ZFy Chrysocyon brach...	GTGTGTAAACAAAGCCCCAGAAATGAGAGAAATGCTTCCCACACTCCTCGCAT					
ZFy Cerdocyon thous	GTGTGTAAACAAAGCCCCAGAGTGAGAGAAATGCTTCCCACACTCCTCGCAT					
ZFx Chrysocyon brach...	GTGCGTAAACAAAGCCCCAGCATGAGAGAAATGCTTCCCACACTCGTTCGCAT					
ZFx Cerdocyon thous	GTGCGTAAACAAAGCCCCAGCATGAGAGAAATGCTTCCCACACTCGTTCGCAT					
	110	120	130	140	150	162
ZFy Chrysocyon brach...	TCGATAGACTTTTCTGCCTTGCTGGTTAGCTTGTGGCTCTCCAATGAA					
ZFy Cerdocyon thous	TCGATAGACTTTTCTGCCTTGCTGGTTAGCTTGTGGCTCTCCAATGTA					
ZFx Chrysocyon brach...	TCAATGGCCTTCTCTGCCTTGCTGGTCAGCTTGTGGCTCTCCAATGAA					
ZFx Cerdocyon thous	TCAATGGCCTTCTCTGCCTTGCTGGTCAGCTTGTGGCTCTCCATGTGA					

O uso do gene SRY para a sexagem das amostras é criticado por alguns pesquisadores, pois a ausência da banda pode se dar por erro na amplificação e não necessariamente devido ao sexo do indivíduo, resultando em uma superestimação no número de fêmeas. No entanto, nós acreditamos que neste estudo não há desvio para o número de fêmeas uma vez que: i) que o SRY foi amplificado em reações *multiplex* utilizando o gene ZF como controle positivo de amplificação, ii) os resultados do gene foram utilizados em conjunto com os resultados do gene ZF e, iii) além disso, as amostras que foram sexadas foram aquelas que mostraram resultados positivos para amplificação dos marcadores mitocondriais e de mais do 70% dos *loci* microssatélites, permitindo concluir que o DNA extraído da amostra estava em ótimas condições para amplificação.

O número de fêmeas de cachorro-do-mato coletadas foi maior que o número de machos (Tabela 4.6), entretanto o número amostral baixo e a falta de recapturas para a espécie não permite realizar inferências sobre a razão sexual para da espécie.

Por outro lado, quando avaliados os valores encontrados para o lobo-guará, a razão sexual encontrada não se mostrou diferente à esperada para a espécie, a qual é de 1:1 (MOEHLMAN, 1986).

É importante destacar que, dos oito indivíduos recapturados, seis são machos e somente duas são fêmeas (quatro machos e duas fêmeas na EEI e dois machos em Pirassununga), indicando que apesar de machos e fêmeas terem áreas de vida com tamanhos iguais (GAMBARINI E PAULA, 2013) e os dois serem territorialistas, os machos podem marcar

mais vezes o território ou podem realizar a marcação em áreas mais abertas como são as trilhas. O anterior permite inferir que a detectabilidade das amostras de fezes varia segundo o sexo dos indivíduos, sendo mais fácil encontrar amostras de machos que de fêmeas.

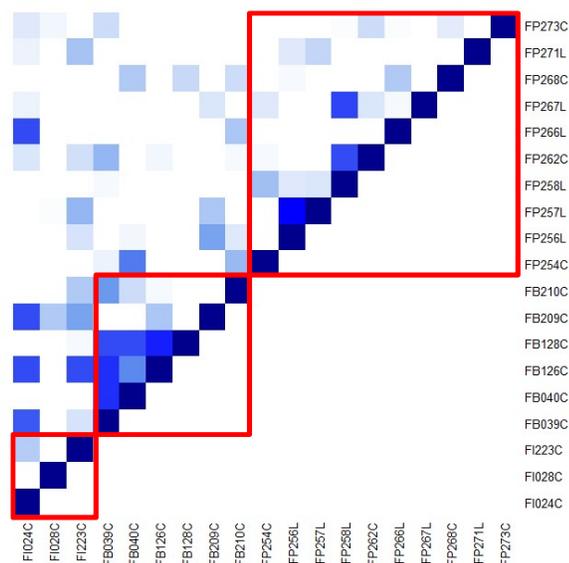
Tabela 4.6. Número de amostras de machos e fêmeas coletados para cada uma das espécies nas áreas estudadas.

	Cachorro-do-mato		Lobo-guará	
	♂	♀	♂	♀
EEJ	-	-	4	7
PEV	-	-	1	1
EEI	2	1	14	11
FLONA - CB	1	5	1	1
Pirassununga	4	6	11	6
F RC. Duratex	-	-	1	2
Outras	-	-	1	-
Total	7	12	33	28

4.4.5 Distribuição espacial dos indivíduos

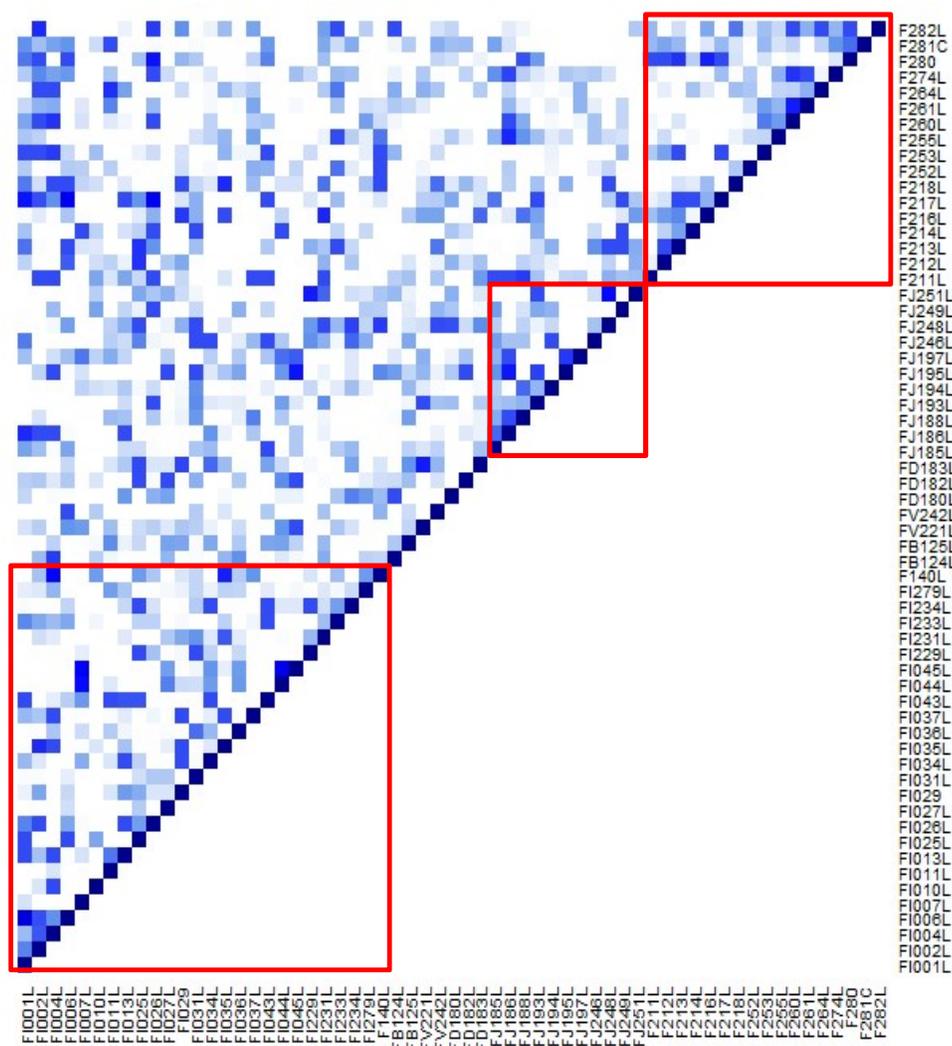
As relações de parentesco entre os indivíduos mostraram valores altos dentro e entre as áreas estudadas para as duas espécies, sugerindo que os indivíduos de todas as áreas estão relacionados e que se movimentam entre as áreas estudadas (Figuras 4.6 e 4.7).

Figura 4.6. Mapa de calor das relações de parentesco entre os indivíduos de *Cerdocyon thous*. As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados, e as claras menores relações. Os quadros vermelhos destacam as relações dos indivíduos das mesmas áreas, sendo essas EEI, FLONA – CB e Pirassununga, de baixo para cima.



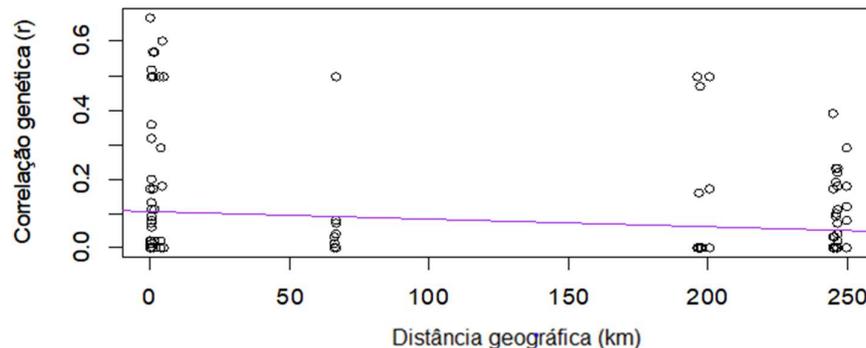
Do mesmo modo, foram encontrados animais com valores baixos nas relações de parentesco, sendo que estes valores baixos não se restringem aos indivíduos encontrados entre as áreas, mas também dentro delas (Figura 4.6 e 4.7). Indica-se que as populações, tanto de cachorro-do-mato como de lobo-guará, não são populações fechadas. Os indivíduos com relações de parentesco baixas são os responsáveis por aumentar a variabilidade na espécie e ajudam a evitar endogamia nas duas espécies.

Figura 4.7. Mapa de calor das relações de parentesco entre os indivíduos de *Chrysocyon brachyurus*. As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados e as claras, menores. Os quadros vermelhos destacam as relações entre os indivíduos das mesmas áreas, incluindo somente, de baixo para cima, a EEI, a EEJ e a área de Pirassununga por apresentarem um maior número de indivíduos.



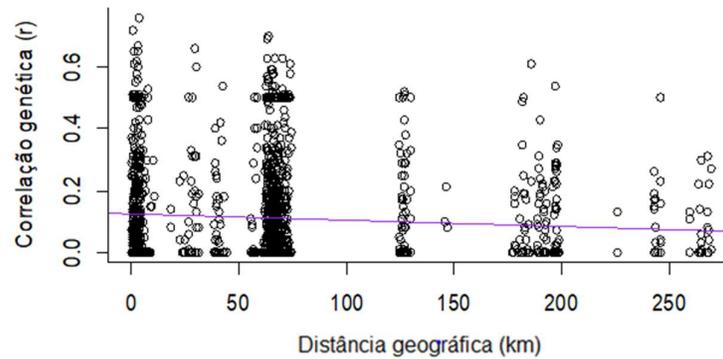
Ao plotar os gráficos das relações de parentesco em função das distâncias geográficas para saber se as relações de parentesco diminuem quando as distâncias geográficas aumentam, foram encontrados valores de coeficiente de correlação de Pearson (r^2) baixos, porém significativos para o cachorro-do-mato. O fato de encontrar valores baixos pode ser explicado devido à existência de valores baixos de relacionamento, inclusive de zero, em todas as distâncias avaliadas (Figura 4.8). O valor encontrado foi de $r^2 = 0,024$ ($p = 0,024$), indicando que existe relação entre a correlação genética e a distância geográfica. Entretanto, os valores de correlação altos são muito mais frequentes em distâncias curtas e, praticamente, inexistentes nas maiores distâncias (Figura 4.8). Nos resultados encontramos uma tendência que corrobora a hipótese de que à medida que a distância aumenta, as relações de parentesco diminuem, é verdadeira. A mesma análise foi realizada considerando, somente, as relações entre os machos ($r^2 = -0,04$, $p = 0,66$) e entre as fêmeas ($r^2 = 0,005844$, $p = 0,2441$) sendo que para nenhum dos sexos os valores foram significativos.

Figura 4.8. Regressão linear entre a correlação genética (r) em função da distância geográfica para *Cerdocyon thous*.



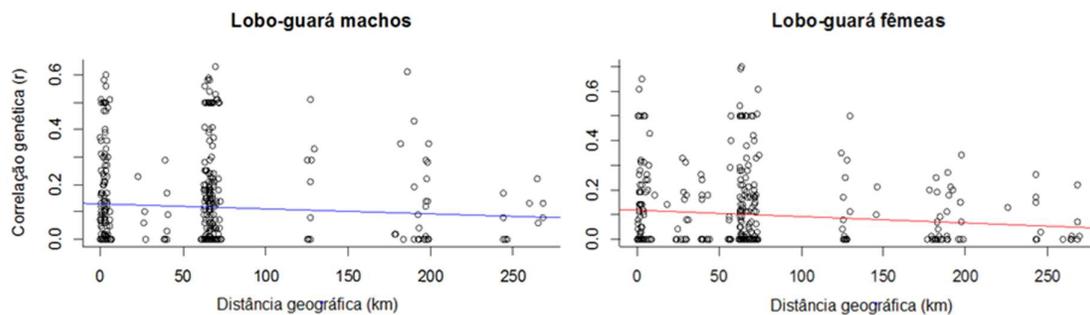
Para o lobo-guará, o comportamento dos dados não foi diferente, pois também foram encontrados valores baixos de r^2 , mas significativos ao analisar a correlação entre os valores de parentesco e as distâncias genéticas ($r^2 = 0,005$, $p = 0,001$) (Figura 4.9). Isto confirma, mais uma vez, nossa hipótese e mostra o comportamento da diminuição ou ausência de valores de parentesco altos em distâncias geográficas maiores.

Figura 4.9. Regressão linear entre a correlação genética (r) em função da distância geográfica (km) para *Chrysocyon brachyurus*.



Quando analisadas separadamente as relações de parentesco existentes entre os machos e entre as fêmeas encontramos valores significativos para as fêmeas ($r^2 = 0,0084$, $p = 0,035$), porém não para os machos ($r^2 = 0,0021$, $p = 0,1513$). No gráfico das relações entre fêmeas (Figura 4.10), é possível visualizar como a ausência de valores de relação altos nas maiores distâncias é mais evidente que no gráfico dos machos. Por isso, foi avaliado se este fenômeno seria explicado pelo comportamento filopátrico, que comumente é encontrado nas fêmeas em inúmeras espécies de mamíferos (REIS *et al.*, 2011).

Figura 4.10. Regressão linear entre a correlação genética (r) em função da distância geográfica (km) para *Chrysocyon brachyurus*, somente com as relações de parentesco entre os machos e entre as fêmeas.

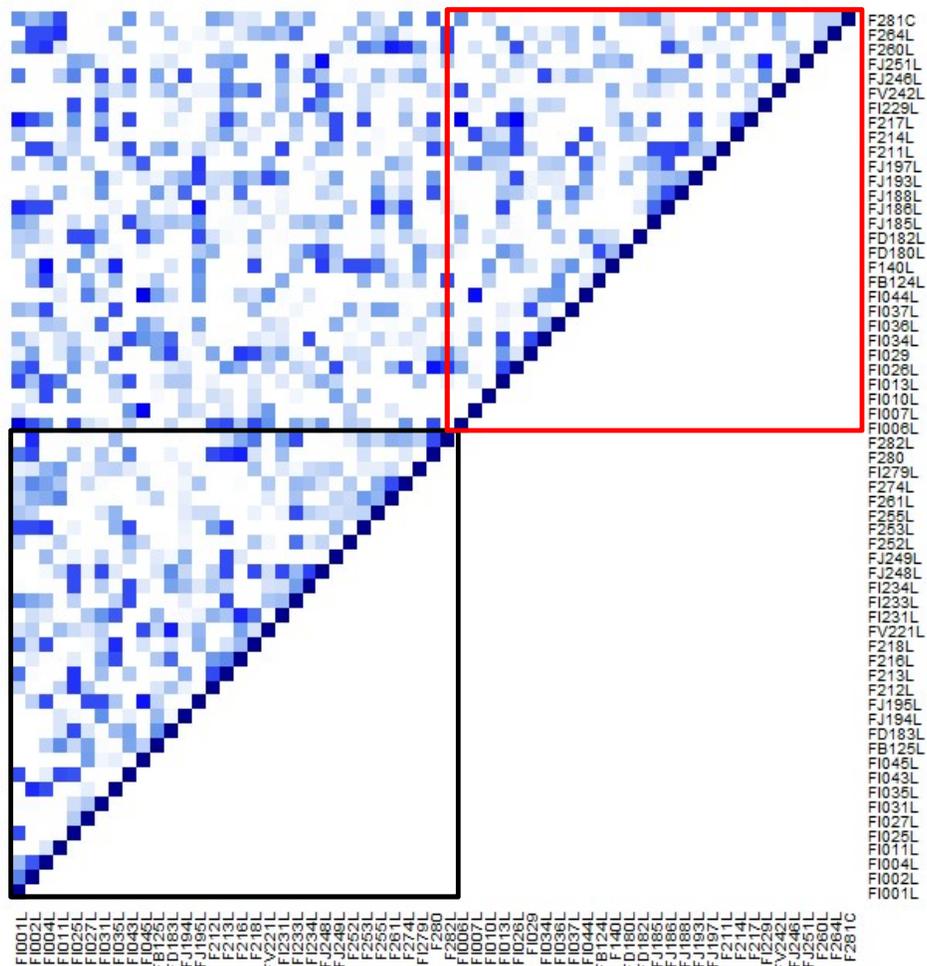


Para isso, analisamos as relações de parentesco par a par em um novo mapa de calor, no qual foram organizados os indivíduos por sexo. Entretanto, ao visualizar os resultados não foi evidenciado esse padrão, pois não existem valores maiores nas relações de parentesco entre as fêmeas que entre os machos, e assim mesmo, existem valores de parentesco baixos tanto entre as relações dos machos como das fêmeas (Figura.4.11).

Os indivíduos que mostraram valores altos para os coeficientes de parentesco (maiores a 0,5) são poucos, mas pertencem a áreas diferentes (Figura 4.6 e 4.7) indicando que os alelos

estão sendo efetivamente transportados entre as áreas, e que os indivíduos não ficam restritos às áreas amostradas. Assim, podemos concluir que machos e fêmeas apresentam comportamentos semelhantes e nenhum dos sexos parece mostrar sinais de filopatria.

Figura 4.11. Mapa de calor mostrando as relações de parentesco entre os indivíduos de *Chrysocyon brachyurus*. As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados e as cores claras, menores relações de parentesco entre os indivíduos. Nos quadrados se destacam as relações entre os indivíduos machos (preto) e entre as fêmeas (vermelho).



Os indivíduos das áreas amostradas encontram-se misturados, sem ter uma área que se comporte como fonte ou como sumidouro, pois não existe uma migração maior de indivíduos em algum sentido. Assim mesmo, os valores de parentesco sem nenhum padrão evidenciam que as áreas amostradas do estado de São Paulo não apresentam esta dinâmica.

A natureza generalista e oportunista das espécies permite que, apesar do isolamento estrutural das áreas amostradas, os indivíduos se movimentam entre os fragmentos existentes

mantendo o fluxo gênico e evitando isolamento das populações por estruturação funcional. Entretanto, esta natureza obriga aos indivíduos a atravessar grandes extensões desprotegidas, altamente urbanizadas e inclusive rodovias, expondo-os a perigos que podem levá-los à morte.

4.4.6 Números efetivos populacionais

Como todos os animais mostraram relações de parentesco altos e baixos independente da área onde foram coletados consideramos que todos os indivíduos amostrados pertencem a uma única população para calcular os números efetivos populacionais.

Para as análises dos números efetivos populacionais foram considerados os valores obtidos para o acasalamento monogâmico, pois na literatura as duas espécies são consideradas pertencentes a este tipo de sistema de acasalamento (RODDEN *et al.*, 2004; REIS *et al.*, 2011). Nesse modelo os números efetivos para ambas as espécies são menores quando considerado o sistema de acasalamento ao acaso que quando considerada a monogamia, pois a probabilidade para cada indivíduo de se reproduzir no primeiro sistema é menor.

Tabela 4.7. Números efetivos populacionais para *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus* usando o programa NeEstimator.

Cachorro-do-mato	Ne	Limites de confiança	
		Parametric	Jackknife
Acasalamento ao acaso	27,1	11,4– 522,0	14,1-94,9
Monogâmico	55,6	24,6-959,2	29,8-186,9
Lobo-guará	Ne	Parametric	Jackknife
Acasalamento ao acaso	138,5	54,8 - ∞	41,7 - ∞
Monogâmico	279,7	111,4 - ∞	85,4 - ∞

O tamanho efetivo populacional calculado para cachorro-do-mato indica que há aproximadamente 56 indivíduos contribuindo geneticamente (Tabela 4.7). Entretanto, acreditamos que este número esteja subestimado devido a vários eventos. Por exemplo, quando é calculado o Ne a partir de marcadores altamente polimórficos como os microssatélites, os programas excluem os alelos raros para facilitar a avaliação dos dados (WAPLES E DO, 2008). Os alelos raros podem ser influenciados pelo tamanho amostral, e não necessariamente por serem raros, subestimando assim o Ne. Além disso, o desequilíbrio de ligação é influenciado pela presença de fluxo gênico, sendo que animais diferentes dos próprios às populações podem aumentar o desequilíbrio de ligação, provocando assim,

subestimação do tamanho efetivo populacional (WAPLES, 2006) e consequentemente um valor de N_e menor ao real.

Para o lobo-guará, o valor de N_e calculado foi de 280 indivíduos para as áreas amostradas, e o valor se encontra entre os intervalos de confiança. Os valores indicam um alto número de indivíduos contribuindo geneticamente para a população e mostram que os valores de censo de lobo-guará para a área podem chegar a 2800 indivíduos quando utilizado o pressuposto de que o N_e corresponde a 10% do tamanho censo segundo Frankham (1995) ou 1400, quando assumido o valor de 20% proposto por Waples (2002). O número de animais nas áreas amostradas reitera a importância das unidades de conservação e dos remanescentes para a conservação e manutenção da espécie.

4.5 Conclusões

O número de indivíduos e as densidades encontradas nas áreas mostraram como os remanescentes de vegetação natural são uma fonte importante de recursos para as espécies, principalmente, em locais com alto grau de fragmentação, como o estado de São Paulo.

O número maior de lobos-guará machos indica que as amostras de fezes permitem uma maior detectabilidade da espécie, ao comparar com o cachorro-do-mato, e dos machos.

A movimentação de indivíduos entre as áreas pode ser um reflexo de que os locais não têm recursos suficientes para o número de animais e que os indivíduos precisam sair frequentemente em busca de recursos.

Encontrar valores altos nas relações de parentesco entre as áreas mostram que o fluxo de indivíduos ainda é constante.

Podemos afirmar que existe relação entre a distância geográfica e a relação de parentesco e que esta relação é negativa, pois à medida que a distância geográfica aumenta as relações de parentesco diminuem. Apesar de ter sido encontrados valores baixos de parentesco em todas as distâncias, diminuindo a inclinação das linhas de tendência, os valores de parentesco altos estão restritos a distâncias menores e são praticamente inexistentes nas maiores distâncias confirmando nossa hipótese.

Os dados deste estudo são mais uma evidência de que qualquer remanescente; tanto unidades de conservação integral, como remanescentes naturais mantidos por iniciativas particulares, torna-se importante para conservação da biodiversidade, principalmente em áreas com forte intervenção humana e altamente antropizadas como as existentes no estado de São Paulo.

5 CAPÍTULO 2: ANÁLISES GENÉTICO POPULACIONAIS DE CACHORRO-DO-MATO E DE LOBO-GUARÁ

5.1 Introdução

O crescimento e desenvolvimento das cidades, os sistemas de produção pecuária intensiva e monoculturas conduzem à diminuição de remanescentes de habitat natural e ao aumento da degradação deles. A transformação da paisagem altera drasticamente a estrutura e função das populações (GORMAN E RAFFAELLI, 2008) e, conseqüentemente, das dinâmicas ecológicas (RIBEIRO *et al.*, 2016), devido à perda de habitat, perda de recursos, isolamento e redução dos tamanhos populacionais.

Além da perda de hábitat e recursos, a fragmentação aumenta a probabilidade das populações sofrerem com outros riscos, como mortes por contato com animais domésticos (WEBER E RABINOWITZ, 1996) ou transmissão de doenças desses animais (GINSBERG E MACDONALD, 1990); e no caso dos canídeos, eles podem se tornar alvos para caçadores por atacarem criações de animais domésticos.

Populações pequenas são mais suscetíveis às forças evolutivas e aos efeitos negativos dos fenômenos ambientais, demográficos e genéticos (FAHRIG, 2003; FRANKHAM *et al.*, 2008). As conseqüências genéticas das forças evolutivas podem resultar em aumento dos indivíduos homozigotos, diminuição dos heterozigotos, aumento da ação da deriva, e conseqüente depressão endogâmica na população (JOHNSON *et al.*, 2001). Os problemas genéticos podem ser traduzidos em perda da variação genética e aumento da probabilidade de extinção de populações locais (O'BRIEN, 1994).

As migrações e o fluxo constante de indivíduos entre as populações dos remanescentes são importantes na manutenção da variação genética das espécies, porque elas permitem a entrada e saída recorrente de genes, o que proporciona o aumento da diversidade genética (FRANKHAM *et al.*, 2008). Contudo, isso se torna difícil em áreas fragmentadas localizadas em matrizes descontínuas com alta intervenção antrópica e, algumas vezes, divididas por grandes estradas.

Apesar da plasticidade e a capacidade de adaptação do lobo-guará e do cachorro-do-mato, as duas espécies se veem fortemente afetadas pelos problemas causados pela transformação da paisagem, enunciados anteriormente. A preocupação pela conservação das duas espécies aumenta, pois, tanto os lobos-guará quanto os cachorros-do-mato desempenham uma importante função ecológica nos ecossistemas, por serem espécies dispersoras de sementes e

controladoras dos tamanhos populacionais das presas (JUAREZ E MARINHO-FILHO, 2002; REIS *et al.*, 2011).

As duas espécies apresentam similaridades importantes, entretanto elas apresentam características biológicas e parâmetros populacionais diferentes. O cachorro-do-mato apresenta uma ampla distribuição na América do Sul (BERTA, 1982; COURTENAY E MAFFEI, 2004; REIS *et al.*, 2011), é considerada ua espécie social (MONTGOMERY E LUBIN, 1978; MACDONALD E COURTENAY, 1996), com densidades que vao desde 0,55 – 0,78 indivíduos/km² (FARIA-CORRÊA *et al.*, 2009; DESBIEZ *et al.*, 2010). O lobo-guará apresenta uma menor distribuição em relação ao cachorro-do-mato, pois o mesmo é considerado típico de savanas abertas, encontrando-se principalmente no Cerrado brasileiro (CARVALHO, 1976; REIS *et al.*, 2011). Dentro da família dos canídeos, é considerada uma das espécies menos sociais (BIBEN, 1983), as densidades encontradas para a espécie vao desde 0,03 até 0,1 indivíduos/km² (SILVEIRA 1999; RODRIGUES 2002; TROLLE *et al.* 2007; RAMALHO *et al.* 2014).

Para ter uma visão mais completa da situação atual das espécies, suas populações, seus recursos genéticos e suas funções ecológicas é importante conhecer a variação genética em paisagens fragmentadas para explicar dinâmicas populacionais das duas espécies de canídeos. Considerando que existe uma relação entre a dispersão, o fluxo gênico e a estrutura genética, a identificação da estrutura genética das populações permite inferir padrões da dispersão das populações selvagens (BOHONAK, 1999).

Neste contexto, no presente trabalho pretende-se trazer informações sobre a: a) variação genética, b) estrutura populacional das espécies de canídeos *Cerdocyon thous* (cachorro-do-mato) e *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará) em paisagens antropizadas da região centro-oeste e sudeste do Brasil, a partir de análises genético-populacionais e, c) avaliar as respostas genéticas das duas espécies, que apresentam dinâmicas populacionais diferentes.

5.2 Hipóteses

Assumindo que a fragmentação leva à redução da variação genética (FAHRIG, 2003; FRANKHAM *et al.*, 2008), acreditamos que populações que sofrem com pressões antropogênicas constantes apresentarão valores de diversidade genética reduzidos, assim como evidências de gargalos populacionais recentes.

Considerando que a diminuição de fluxo gênico pode levar a diferenciação das populações (FRANKHAM *et al.*, 2008) fragmentos mais isolados e/ou mais alterados apresentarão fluxo gênico reduzido e conseqüentemente, maiores sinais de diferenciação genética.

Populações pequenas são mais suscetíveis às forças evolutivas e aos efeitos negativos dos fenômenos ambientais, demográficos e genéticos (FAHRIG, 2003; FRANKHAM *et al.*, 2008), acreditamos assim que os lobos-guará apresentarão mais conseqüências genéticas recentes da alteração da paisagem que os cachorros-do-mato.

5.3 Material e métodos

5.3.1 Área de estudo

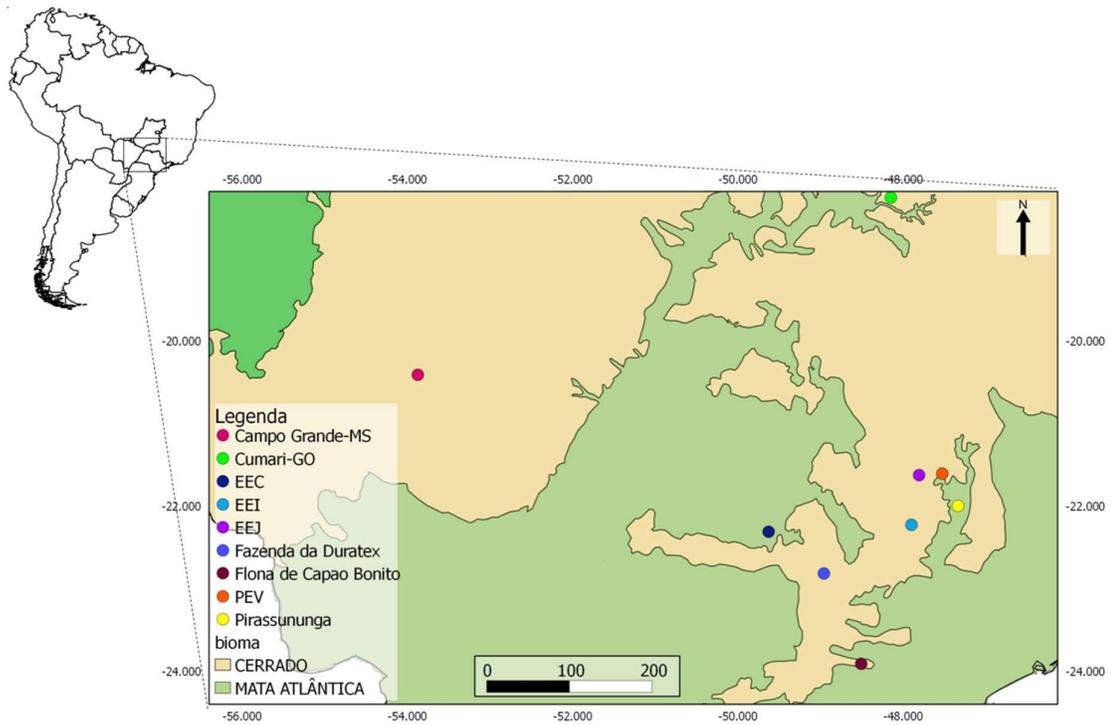
Durante os anos de 2012 a 2016 foram coletadas amostras de lobo-guará e cachorro-do-mato, principalmente, em nove áreas localizadas em três estados do Brasil: uma área em Mato Grosso do Sul (MS), uma área entre Goiás (GO) e Minas Gerais (MG) e sete no estado de São Paulo (SP), principalmente em unidades de conservação do estado (Figura 5.1). Adicionalmente, algumas amostras de animais atropelados foram coletadas em áreas próximas às nove áreas estudadas.

As coletas realizadas no estado de Mato Grosso do Sul concentraram-se entre os meses de abril de 2013 e março de 2014. Foram amostrados, exclusivamente, animais atropelados em três diferentes rotas, entre as coordenadas -19,510/-21,750 e -52,160/-57,509, que tiveram como ponto inicial na cidade de Campo Grande: o primeiro sobre a rodovia BR-262/MS terminando na ponte sobre o rio Paraguai com uma extensão total de 340 km; o segundo sobre a mesma rodovia terminando em Três Lagoas (305 km) e; o último de 275 km sobre a BR-163/MS e a BR-267/MS, chegando à cidade de Nova Andradina. A paisagem está caracterizada por culturas de pasto e agricultura, assim como de alguns remanescentes de Cerrado e Mata Atlântica. Todas as amostras da região foram disponibilizadas pelo Projeto Tatu Canastra Pantanal e pelo Projeto Anta Pantanal.

No estado de Goiás, as coletas foram realizadas durante quatro anos (2012 – 2016) em fazendas de gado localizadas entre os municípios de Cumari (GO) e Araguari (MG), entre as coordenadas -18.320/-18.427 e -48.080/-48.180. A maior parte da área (90%) está coberta por pasto (*Brachiaria* sp.) e 10% mantêm pequenos remanescentes de vegetação, como mata ciliar e cerrado *sensu stricto*. Foram coletadas, principalmente, amostras de sangue numa área total de 12000 ha, assim como amostras de animais atropelados em áreas próximas à estudada.

Todas as amostras da região foram coletadas e cedidas pelo Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado (PCMC).

Figura 5.1. Áreas de estudo onde foram coletadas amostras de tecido de animais atropelados, sangue de animais capturados ou amostras não invasivas (fezes) de *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus*.



Fonte: Elaborado pela autora

As amostras de fezes foram coletadas durante os meses de junho de 2012 a novembro de 2015 em unidades de conservação do estado de São Paulo: na Estação Ecológica do Jataí (EEJ), localizada próxima ao município de São Luiz Antônio, entre as coordenadas -21.504/-21.667 e -47.6080/-47.6648; no Parque Estadual Vassununga (PEV), situado no município de Santa Rita do Passo Quatro e localizado entre as coordenadas -21.4108/-21.722 e -47.469/-47.6094; na Estação Ecológica de Itirapina (EEI), localizada entre os municípios de Itirapina e Brotas, delimitada pelas coordenadas -22.193/-22.257 e -47.860/-47.931; na Estação Ecológica dos Caetetus (EEC), localizada entre os municípios de Gália e Alvilândia, entre as coordenadas -22.371/-22.433 e -49.669/-49.726; na Floresta Nacional de Capão Bonito (FLONA-CB), em uma área delimitada pelas coordenadas -23.843/-23.967 e -48.495/-48.539; e em remanescentes de vegetação natural dentro do estado: um próximo do município de Pirassununga, localizado na Academia da Força Aérea (AFA), entre as coordenadas -

21.952/-22.009 e -47.314/-47.353, e na Fazenda Rio Claro da Duratex® (Lençóis Paulista), entre as coordenadas -22.347/-22.530 e -48.8434/-48.989. Também foram coletadas amostras de animais atropelados próximo às unidades de conservação enunciadas.

5.3.2 Obtenção das amostras

Para o estudo foram coletados três tipos de amostras: tecido, sangue e fezes. Dos animais mortos por atropelamentos, foi coletada uma amostra de tecido (preferencialmente uma porção da orelha ou da língua) que foi armazenada em microtubos (de 2 mL) contendo álcool a 96%. As amostras de animais atropelados do estado de Goiás e São Paulo foram coletadas de maneira oportunista em estradas próximas ou que cortam as áreas estudadas.

As amostras de sangue foram armazenadas em tubos Vacutainer® com EDTA para extração de DNA e obtidas, em sua maioria, de animais capturados na área de estudo do estado de Goiás. Particularmente, no estado de São Paulo foram coletadas amostras de sangue pertencente a dois lobos-guará atropelados que não morreram, foram tratados em zoológicos e parques ecológicos e depois liberados de volta à natureza.

Para a captura dos cachorros-do-mato em Goiás foram utilizadas armadilhas tipo *Tomahawk*TM. Já os indivíduos de lobos-guará foram capturados utilizando uma armadilha tipo gaiola de arame galvanizado e com portas de fechamento de guilhotina acionadas por uma plataforma, desenhada especialmente para a espécie. As armadilhas foram distribuídas ao longo da área de estudo dependendo de dados previamente coletados pelo PCMC com armadilhas fotográficas e com observações noturnas das espécies. No final da tarde os dois tipos de armadilhas eram abertos e iscados (com sardinha) e ao amanhecer eram checadas. Com isso pretendia-se aproveitar o pico de atividade das espécies, assim como evitar desidratação e/ou golpe de calor dos animais que fossem eventualmente capturados. Os animais capturados foram avaliados e sedados por um veterinário com experiência em animais silvestres.

As coletas realizadas para o presente estudo foram aprovadas pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) segundo o n° UFSCAR CEUA 1165130815, de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA). O projeto também foi autorizado para ser desenvolvido dentro das unidades de conservação pelo Instituto Federal no PROCESSO SMA N°.: 260108 – 011.611/2012. Além disso, o Sistema de Autorização e

Informação em Biodiversidade – SISBIO permitiu o transporte de amostras das duas espécies sob o número 38613-3.

5.3.3 Extração de DNA

As extrações do DNA total das amostras de tecido e sangue foram realizadas seguindo o protocolo de fenol-clorofórmio descrito por Sambrook *et al.* (1989). Para a extração, foi utilizada uma porção de aproximadamente 1 cm² de tecido ou 100 µL do sangue total.

A extração das amostras de fezes foi realizada utilizando o Kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen), seguindo as recomendações do fabricante. Esse Kit é especialmente desenvolvido para a extração de DNA em amostras que podem apresentar inibidores da PCR, como é o caso das amostras de fezes. A extração foi realizada utilizando uma porção de aproximadamente 1 cm da camada externa das fezes.

5.3.4 Confirmação molecular da espécie

A confirmação molecular da espécie é indispensável em amostras de fezes, porém também necessária para amostras de tecido em alguns casos. Por exemplo, no caso do cachorro-domato, pois outras espécies de canídeos que ocorrem simpatricamente, como a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), podem ser identificadas erroneamente como pertencentes à mesma, principalmente, no caso dos atropelamentos onde algumas características taxonômicas diagnósticas podem ser perdidas dificultando ou impossibilitando a identificação morfológica.

Para isso foram utilizadas três regiões mitocondriais; o gene *ATP sintetase F0 subunidade 6* (ATP6) utilizando os *primers* ATP6-DF3 (5'- AAC GAA AAT CTA TTC GCC TCT - 3') (HAAG *et al.*, 2009) e ATP6-DR2 (5' - TGG ATG GAC AGT ATT TGT TTT GAT - 3') (CHAVES *et al.*, 2012); a região controle com os *primers* CanCR-F (5' - CCTATGTACGTCGTGCATTA - 3') e CanCR-R (5' - GATGGTTTCTCGAGGCATGG - 3') (RODRIGUEZ-CASTRO *et al.* submitted) e o rRNA12S (12S) utilizando os pares Car12Ss1-F (5' - GCTTAAACTCAAAGGACTT - 3') e o Car12Ss1-R (5' - TACACCTTGACCTAACTTTT - 3') (RODRIGUEZ-CASTRO *et al.* submitted).

As ampliações foram realizadas em Termociclador Veriti 96 Well Thermal Cycler (Applied Biosystems) para um volume final de 12 µL, de acordo com as recomendações dos autores. A amplificação dos produtos de PCR e dos controles negativos foi avaliada em gel

de agarose 1 %. As amostras que mostraram resultados positivos foram purificadas com as enzimas ExoSAP-IT (Affymetrix) e sequenciados em sequenciador automático 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

As sequencias foram editadas manualmente e analisadas no programa Geneious 8.0.2 (KEARSE *et al.*, 2012). Após da edição, as sequências foram comparadas com sequências das espécies estudadas e de outras espécies de canídeos e felinos, descarregadas da base de dados do *National Center of Biotechnology Information* (NCBI) *data bank* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Para considerar um indivíduo da espécie foram utilizados valores de 100% de *query coverage* e pelo menos 95% de *maximum identity*.

5.3.4.1 Linhagens de cachorro-do-mato

Num estudo molecular prévio foram descritos dois grandes clados para *Cerdocyon thous* no Brasil, denominados de clado norte e clado sul (TCHAIKA *et al.*, 2007). O clado norte ocorre, principalmente, no Norte e no Nordeste do Brasil, enquanto que o clado sul é mais representativo do Sul e Sudeste do país, no entanto, no centro do país e em algumas localidades do nordeste existem áreas onde coexistem indivíduos dos dois clados (TCHAIKA *et al.*, 2007).

No presente estudo, apesar dos sítios de coleta estar localizados na área de ocorrência do clado sul, alguns deles se encontram muito próximos de locais onde ocorrem conjuntamente os dos dois clados. Por essa razão, foi realizada uma análise utilizando a região controle do DNA mitocondrial (mtDNA), para classificar nossos animais, em relação aos clados definidos por Tchaicka *et al.* (2007).

Para isso o fragmento da RC foi amplificado por PCR utilizando os *primers* MTLPRO2 (5' - CACTATCAGCACCCAAAGCTG - 3') e CCR-DR1(5' - CTGTGACCATTGACTGAATAGC - 3') descritos por Tchaicka *et al.* (2007), seguindo as recomendações dos autores. Os produtos da PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% e purificados utilizando as enzimas ExoSAP-IT (Affymetrix). O sequenciamento dos produtos foi realizado automaticamente em sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

As sequências foram editadas manualmente no *software* Geneious 8.0.2 (KEARSE *et al.*, 2012) e alinhadas contra sequências da espécie (EF106981–EF107047) depositadas no Genbank por Tchaicka *et al.* (2007) usando-se a ferramenta ClustalW (THOMPSON *et al.*, 1994), implementada neste mesmo programa. Para estabelecer o clado ao qual pertencem as amostras coletadas elaboramos árvores de distância, com os alinhamentos, utilizando o

método de Neighbor-Joining (SAITOU E NEI, 1987) e o modelo de substituição de Jukes-Cantor (JUKES E CANTOR, 1969). A significância estatística foi estabelecida utilizando método de reamostragem *bootstrap*, com 1000 réplicas. Como grupo externo foram utilizadas sequências do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

5.3.5 Caracterização genética das populações

Para analisar a variação e o fluxo gênico nas populações de cachorro-do-mato e lobo-guará foram utilizados 11 *loci* microssatélites heterólogos (2001, 2004, 2006, 2010, 2018, 2054, 2088, 2132, 2137, 2140 e 2159) (FRANCISCO *et al.*, 1996). A amplificação dos *primers* foi testada, previamente, por vários autores em ambas as espécies mostrando resultados positivos (TCHAICKA, 2006; SALIM *et al.*, 2007; FONTOURA-RODRIGUES *et al.*, 2008; LION *et al.*, 2011; MANNISE *et al.*, 2012; RAMALHO *et al.*, 2014). Como complemento, no presente estudo, os produtos amplificados foram sequenciados para confirmar a especificidade dos *primers* e o *motif* dos microssatélites em questão.

As reações de amplificação seguiram o protocolo de Schuelke (2000), no qual um dos *primers* específicos é marcado com uma cauda de 18 pb (cauda M13) e um terceiro *primer*, acrescido de um fluoróforo, é utilizado na reação.

As PCRs foram realizadas para volume final de 10 µL contendo 50 ng do DNA molde; 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 2,5 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,2 µM de dNTPs; 0,2 pmol do *primer* com a cauda; 0,8 pmol do *primer* não marcado e da fluorescência para marcar o M13; 0,5 unidades de *Taq* DNA Polymerase Platinum (Invitrogen) ou 1 unidade quando usadas amostras de fezes; 0,25mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumin) para as amostras de fezes; e água ultrapura (q.s.p). As reações seguiram o seguinte programa de amplificação: 94°C durante 1 minuto; 27 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento dos *primers* por 45 segundos, 74°C por 1 minuto; seguidos de oito ciclos de 94°C durante 30 segundos, 53°C (incorporação do fluoróforo à cauda M13) por 45 segundos e 72°C a 45°C; e uma extensão final de 15 minutos a 72°C. A maioria dos *primers* específicos foi amplificada utilizando uma temperatura de anelamento de 58°C, a exceção dos *loci* 2010 e 2132 para os quais foram utilizadas temperaturas de 59°C e 60°C, respectivamente.

Os produtos de PCR foram avaliados em gel de agarose 1% e, posteriormente, genotipados em sequenciador automático ABI 3130 da Applied Biosystems. O tamanho dos alelos foi identificado no *software* Geneious R8 (KEARSE *et al.*, 2012).

Para evitar os erros de genotipagem, e aumentar o sucesso de amplificação das amostras de fezes, foram escolhidos para amplificação fragmentos pequenos, de menos de 200 pb. Assim mesmo, todos os *loci* microssatélites foram amplificados para cada amostra independentemente, no mínimo, duas vezes quando heterozigoto e três quando homozigoto, para confirmação do genótipo. Outros cuidados foram tomados com todas as amostras para diminuir as taxas de erro; como amplificação dos alelos e das amostras de forma aleatória e eliminação das amostras que apresentaram menos de 70% dos *loci* amplificados, como recomendado por Beja-Pereira *et al.* (2009). Erros de genotipagem foram avaliados pelo *software* Micro-Checker 2.2.3 (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

5.3.6 Sexagem

O sexo dos indivíduos capturados das duas espécies foi determinado em campo durante os procedimentos, e amostras destes indivíduos foram utilizadas como controles positivos para a identificação do sexo dos indivíduos atropelados e os amostrados por fezes.

O sexo dos indivíduos atropelados foi determinado utilizando análises de Melting de Alta-Resolução (HRM) no sistema de detecção para PCR em tempo real CFX96 (Bio-Rad). Para isso, um par de *primers* específico para sexagem de carnívoros ZFKF (5'-CAAAGGTGGCGATTCAATAA-3') e ZFKR (5'-ATGGAGAGCCACAAGCTRAC-3'), descrito previamente por Ortega *et al.* (2004) foi utilizado para amplificar uma região do gene Zink Finger (ZFx e ZFy), seguindo as concentrações, ciclos e temperaturas sugeridas por González *et al.* (2015a). As curvas de *Melting* permitiram estabelecer o sexo dos indivíduos em ambas as espécies (GONZÁLEZ *et al.*, 2015a), pois diferenças nas bases nucleotídicas das sequências de cada sexo mostram padrões diferentes nas curvas de dissociação de machos e fêmeas (RIRIE *et al.*, 1997; MORINHA *et al.*, 2013).

Como as amostras de fezes apresentam concentrações diferentes de DNA, e na maioria dos casos, insuficientes para esta metodologia foi necessário amplificar fragmentos de duas regiões diferentes por PCR tradicional para a determinação do sexo: o ZF e o gene da região determinante Y (SRY).

Para amplificação do ZF foram utilizados os *primers* enunciados anteriormente, descritos por Ortega *et al.* (2004). Esses *primers* amplificam uma região do *Zink finger* presente em machos e fêmeas que apresenta um polimorfismo para os machos. O polimorfismo corresponde a um único sitio de restrição para a enzima *TaqI*. Quando submetidas à ação da enzima, as amostras de fêmeas não sofrem nenhuma mudança, mostrando uma banda

correspondente ao tamanho originalmente amplificado (195 pb), enquanto que os machos apresentam duas bandas; uma de 195 pb do cromossomo X e uma menor (154 pb) do cromossomo Y, criada pela ação da enzima.

A amplificação dos fragmentos do *Zink finger* foi realizada usando o protocolo proposto pelos autores. Do mesmo modo, as concentrações para a ação da enzima de restrição *TaqI* seguiram as recomendações propostas, porém o tempo de incubação foi reduzido à metade, utilizando assim 1 hora e 30 minutos. A inativação da enzima foi feita com EDTA 0,5M como recomendado pelo fabricante. Todos os produtos de PCR submetidos à restrição, incluindo os controles positivos e negativos, foram corridos a 40 volts durante duas horas em gel de agarose 3%.

Para amplificação do gene SRY, foram utilizados os *primers* LUT-SRY F (5'-GAATCCCCAAATGCAAACTC-3') e LUT-SRY R (5'-GGCTTCTGTAAGCATTTTCCAC-3'), originalmente descritos para sexagem da lontra-europeia (*Lutra lutra*) por Dallas *et al.* (2000). Os *primers* foram amplificados conjuntamente com o gene ZF como controle positivo em uma reação *multiplex*. Para confirmar a amplificação do fragmento de interesse nas espécies estudadas, os produtos amplificados foram sequenciados automaticamente no sequenciador 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems).

As PCRs foram realizadas para volume final de 12 μ L, incluindo: 0,2 μ M de dNTPs; 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 3 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,3 pmol de cada *primer*; 0,25 mg/mL de BSA; 1 unidade de *Taq* Polymerase Platinum (Invitrogen); 50 ng do DNA molde e água ultrapura (q.s.p). As PCRs foram conduzidas em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems), com uma desnaturação inicial a 94°C durante 3 minutos; 40 ciclos de amplificação a 94°C por 45 segundos, 60°C por 45 segundos e 72°C por 90 segundos; e uma extensão final de 20 minutos a 72°C. Tanto fêmeas e machos apresentaram amplificação do ZF, por se tratar do controle positivo, entretanto ao utilizar o *primer* SRY, por se tratar de um *primer* próprio para amplificação de um fragmento do cromossomo Y somente é esperada a amplificação de uma banda de 70 pb dos machos. Os produtos das PCRs foram visualizados em gel de agarose 3%.

Foram considerados machos aqueles indivíduos que mostraram duas bandas ao ser amplificadas para o gene ZF após o tratamento com a enzima de restrição e que apresentaram amplificação do gene SRY, e fêmeas aqueles que mostraram uma única banda após a ação da

TaqI sobre o produto amplificado do ZF e nenhuma banda quando amplificado o SRY. As amostras que mostraram contradições nos dois resultados foram repetidas para os dois genes.

5.3.7 Estrutura genético-populacional

Inicialmente avaliamos a presença de estruturação populacional entre e dentro das áreas amostradas para saber quantas populações existem. Para isso, foram utilizados métodos de atribuição bayesiana com informação espacial com *software* BAPS 6 (Bayesian Analysis of Population Structure) (CORANDER *et al.*, 2008) e sem informação espacial no programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000). Do mesmo modo realizamos uma análise de correspondência fatorial (AFC), no programa GENETIX 4.0.5 (BELKHIR *et al.*, 1996). Foi calculado o valor par a par de F_{ST} (WRIGHT, 1949) e de R_{ST} (SLATKIN, 1995), um análogo ao índice de fixação de Wright, e o índice de diferenciação Jost (Dest) (JOST, 2008).

A análise de atribuição bayesiana nos permite estimar o número de populações (K) existentes no nosso conjunto de dados sem necessidade de informação prévia sobre o número de locais amostrados ou número de possíveis populações. As análises no *software* BAPS foram realizadas em nível individual e utilizando-se as coordenadas registradas com o GPS.

No programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000), avaliamos o número de populações buscando maximizar a probabilidade dos dados. Foram realizadas 10 corridas independentes de $K = 1-20$ com 200000 MCMC (*Markov chain Monte Carlo*) interações, e um período de *burn-in* de 100000, utilizando os modelos de *admixture* (assume que o indivíduo pode ter origem em distintas populações) e de frequências alélicas correlacionadas (pressupõe que as populações divergiram de um ancestral comum). Para cada valor de K, a média dos valores de probabilidade logarítmica e o desvio foram calculados. Em seguida, realizamos a correção de Evanno *et al.* (2005), que se baseia na taxa de mudança da probabilidade *a posteriori* dos dados entre sucessivos valores de K (ΔK). O ΔK foi avaliado no programa online Structure Haverster (EARL E VONHOLDT, 2012), que estima o número de populações, usando o método proposto por Pritchard *et al.* (2000) e Evanno *et al.* (2005).

Para explicar a maior quantidade de variância (alelos) com o menor número de componentes (*loci*) foi realizada uma análise de correspondência fatorial (AFC) no programa Genetix 4.05 (BELKHIR *et al.*, 1996), considerando o número de variações não correlacionadas. Do mesmo modo, análises discriminantes de componentes principais (DAPC) foram realizadas utilizando o pacote Adegenet no programa R (R CORE TEAM,

2013). Nesta análise são maximizadas as diferenças entre os grupos encontrados (JOMBART *et al.*, 2010).

Para verificar a diferenciação genética entre as populações definidas foi utilizado o R_{ST} (SLATKIN, 1995), uma medida de distâncias genéticas análogo ao F_{ST} . O F_{ST} (WRIGHT, 1949) leva em conta a variância das frequências alélicas entre as duas localidades, entretanto tem sido demonstrado que o F_{ST} , tenderá a subestimar o verdadeiro nível de diferenciação genética quando aplicados a dados de microssatélites, pois foi desenvolvido para marcadores bialélicos, enquanto que o R_{ST} assume que os alelos mudam de acordo com o modelo de *step-by-step* dando valor a cada repetição que está sendo adicionada (GOODMAN, 1997). O valor do R_{ST} foi utilizado para comparar as populações numa análise de AMOVA no programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006) e par a par no programa Arlequin 3.0 (EXCOFFIER *et al.*, 2005).

O valor de G_{ST} (NEI, 1973), análogo a F_{ST} , reflete a perda de heterozigosidade das subpopulações em relação à heterozigosidade total, porém se satura ao utilizar *loci* muito polimórficos, impedindo alcançar valores de 1 que representaria a diferenciação real das populações. A saturação se dá devido a que os três componentes dos estatísticos F estão interligados (variação local, variação entre populações e variação total). Nesse sentido, Jost (2008) propôs um índice corrigido para o cálculo da diversidade genética, o D_{est} , que utiliza o número efetivo de alelos para quantificar a diversidade genética. Para as análises populacionais foi utilizado este índice, que foi calculado utilizando o pacote DEMETics no programa R (R CORE TEAM, 2013), após verificação da estruturação populacional.

Outra abordagem bayesiana utilizando informação espacial foi utilizada para saber o número de clusters no pacote GENELAND (GUILLOT *et al.*, 2005) implementado no programa R (R CORE TEAM, 2013). Para as análises foram utilizadas frequências alélicas no correlacionadas, pois apesar de ser menos eficiente para detectar subestruturação, é mais sensível a isolamento por distância (GUILLOT *et al.*, 2005).

Do mesmo modo, também foi calculado o F_{ST} utilizando o *software* FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001), pois trabalhos realizados anteriormente com as espécies utilizaram este estimador, e assim, é necessário para poder realizar comparações.

As medidas diretas de dispersão de animais não necessariamente refletem o movimento dos alelos, pois, nem sempre os indivíduos que migram conseguem se reproduzir na nova localidade para que o fluxo gênico realmente ocorra. Para conseguir medidas mais corretas do fluxo gênico é utilizado o número de indivíduos que migram com sucesso (N_m) baseado

nos valores de F_{ST} ou nos alelos privados. Devido aos problemas que podem se apresentar ao trabalhar com o F_{ST} e microssatélites o N_m foi calculado utilizando o método dos alelos privados (SLATKIN, 1985) no programa Genepop 4.6 (RAYMOND E ROUSSET, 1995).

Além disso, os indivíduos foram atribuídos geneticamente às populações e migrantes de primeira geração foram detectados no programa GeneClass (PIRY *et al.*, 2004) utilizando o método baseado nas frequências, proposto por Paetkau *et al.* (1995), por ser mais indicado para trabalhar com microssatélites.

5.3.8 Diversidade genética das populações

Para testar se os *loci* não estão sofrendo a influência de forças evolutivas, como a seleção natural e sexual e/ou a deriva genética foi avaliado o desvio do EHW no programa Genepop 4.6 (RAYMOND E ROUSSET, 1995). Utilizando o mesmo programa foi calculado o desequilíbrio de ligação, para saber se os alelos dos *loci* estudados apresentam segregação independente para serem considerados informativos. O método de cadeias de Markov foi utilizado para ambos os cálculos e os intervalos de confiança, para todas as comparações múltiplas, foram ajustados utilizando a correção sequencial de Bonferroni (BENJAMINI E YEKUTIELI, 2001).

O índice de endocruzamento F_{IS} (WRIGHT, 1949), foi calculado no programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001) para avaliar os desvios das frequências dos genótipos heterozigotos esperados no EHW. Os valores de *p larger* (p_L) foram utilizados quando encontrados valores para excesso de heterozigotos na população, e o *p smaller* (p_S) quando evidenciado *déficit*.

A partir dos genótipos dos indivíduos, foi caracterizada a diversidade genética de cada população genética. Para isso, foi calculada a riqueza alélica (R_a), o número de alelos (N_a), o número efetivo de alelos (A_e), e a heterozigosidade observada (H_o) e a esperada (H_e) para cada *locus* no programa GenAEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006).

A riqueza alélica é um índice, calculado por rarefação, utilizado para conhecer o número de alelos independentemente do tamanho da amostra (GOUDET, 2001). Para permitir a comparação, o número de indivíduos foi extrapolado ao menor número amostral encontrado nas áreas estudadas, como sugerido por (FOULLEY E OLLIVIER, 2006). Para isso, foi utilizado a função AllelicRichRaref disponível no programa R (R CORE TEAM, 2013) no site (<https://github.com/KChavez-Congrains/AllelicRichRaref>).

O número de alelos efetivos é uma medida baseada na frequência dos alelos que dá mais valor a alelos frequentes. Assim, alelos raros contribuem pouco para a heterozigosidade e por

isso reduções nos tamanhos populacionais tem maior influência sobre alelos raros que sobre a heteroziguidade. Eventos históricos, como gargalos populacionais, podem levar a reduções populacionais e, conseqüentemente, números de alelos efetivos pequenos.

Os alelos nulos apontam falsos homozigotos, que se dão pela falta de amplificação, devido a mutações nas sequências flanqueadoras dos *primers*. Para verificar a presença de alelos nulos, foi utilizado o *software* Micro-checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

Também foi avaliado se as populações estudadas passaram por gargalos populacionais recentemente, utilizando o *software* BOTTLENECK (PIRY *et al.*, 1999). Para isso, utilizamos o teste de Wilcoxon, apropriado para análises com menos de 20 *loci* aplicado para o modelo de *two phase mutation* (TPM), com 30% para o modelo de alelos infinitos (IA) e 70% para o *Stepwise mutation* (SM). O modelo foi escolhido dependendo do comportamento das frequências alélicas de cada *locus*. Assim, quando a distribuição gráfica dos alelos apresentou forma de sino foi classificado como (TPM) e, quando um alelo foi muito mais frequente ao ser comparado contra os outros alelos foi classificado como (IA).

5.3.9 Distribuição espacial dos indivíduos e populações

Para saber se fragmentos mais isolados apresentarão fluxo gênico reduzido foi determinado, inicialmente, se as distâncias genéticas apresentam correlação com as distâncias geográficas foram realizadas comparações par a par entre cada indivíduo num teste de mantel no programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006).

Também foi realizada uma análise de correlação espacial (SAA) no *software* GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006). O SAA mede o grau de dependência das variâncias nas distâncias genéticas *versus* uma classe particular de distância. Os valores positivos significativos indicam que os indivíduos mais próximos geneticamente estão localizados mais perto que o esperado pelo acaso, enquanto que os valores negativos significativos mostram que os indivíduos se localizam buscando maximizar a distância genética (MANEL *et al.*, 2003). Para estas análises, utilizamos um intervalo de confiança de 95% e 9999 permutações a diferentes intervalos de distâncias: 50, 100 e 200 km.

5.3.10 Análises demográficas

O tamanho censo foi calculado utilizando o tamanho efetivo populacional. Para isso foi utilizado o método de desequilíbrio de ligação no *software* NeEstimator (DO *et al.*, 2014),

com um valor de probabilidade de 5%. Os valores de confiança foram calculados utilizando análises paramétricas e o método de *Jackknife*, incluídos nos programas. Os tamanhos populacionais foram calculados utilizando a proporção reportada para animais e vida livre de $N_e = 10\%N$ (FRANKHAM, 1995) e $N_e = 20\%N$ (WAPLES, 2002).

SEÇÃO 1. ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DO CACHORRO-DO-MATO EM PAISAGENS ANTROPIZADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL

5.4 Resultados e Discussão

Em total foram coletados 122 indivíduos de cachorro-do-mato: sendo 27 indivíduos atropelados e mortos, 75 indivíduos capturados e liberados e 20 indivíduos coletados utilizando amostras de fezes (Tabela 5.1). Na tabela se apresentam somente o número de indivíduos coletados nas amostras de fezes, para maiores informações sobre a individualização e número de amostras coletadas, consultar o capítulo 1.

Tabela 5.1. Número de cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) coletados nas áreas estudadas.

	Tecido	Sangue	Fezes	Total
Campo Grande-MS	15	-	-	15
Cumari-GO	4	75	1	80
EEJ-SP	1	-	-	1
EEl-SP	3	-	3	6
EEC-SP	1	-	-	1
FLONA -CB-SP	-	-	6	6
Pirassununga-SP	-	-	10	10
Outras -SP	3	-	-	3
Total	27	75	20	122

As amostras de tecido de cachorro-do-mato de outras localidades são: uma próxima a Campinas na SP-332, uma na estrada municipal Guilherme Scatena perto de Descalvado-SP, uma na estrada SP-225 que conduz de Jau a Brotas e uma da UFSCar *campus* São Carlos-SP. Essa última amostra não pertence a um animal atropelado, porém a um animal que foi morto pelo ataque de cães domésticos.

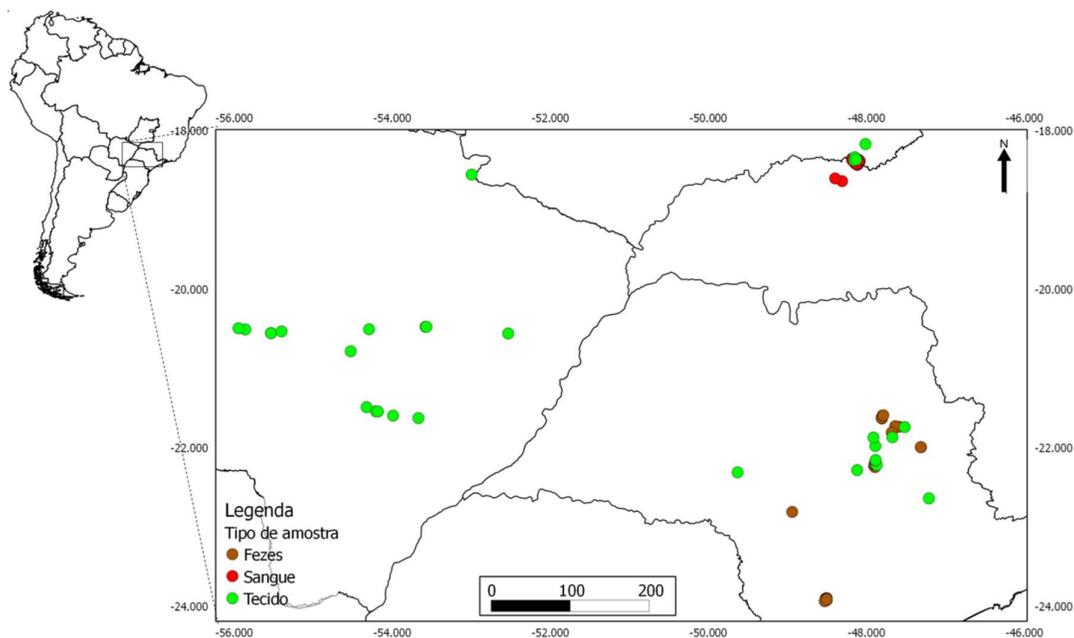
O animal morto por cães domésticos e o alto número de animais atropelados são evidências claras do conflito que vêm enfrentando os animais silvestres em regiões altamente antropizadas como são os remanescentes de Cerrado e Mata Atlântica. Também é necessário considerar que o número de animais afetados pelos conflitos é maior, uma vez que muitos animais atropelados e mortos em brigas não foram necessariamente encontrados, assim como os animais que foram eventualmente caçados.

5.4.1 Confirmação molecular das espécies

Os erros nas identificações aumentam quando se trabalha com animais atropelados, pois, em alguns casos perdem todas ou algumas características taxonômicas diagnósticas. Assim, das amostras 126 amostras coletadas, quatro animais (12,5%) identificados como sendo da espécie *Cerdocyon thous* (um encontrado entre Jau e Brotas-SP e três na área de Campo Grande-MS) foram confirmados molecularmente como sendo da espécie *Lycalopex vetulus*. A probabilidade de errar na identificação das duas espécies é alta, devido a que as identificações rápidas das espécies estão baseadas principalmente em diferenças de tamanho e peso, sendo que animais juvenis de *Cerdocyon thous* podem ser identificados equivocadamente como animais adultos de *L. vetulus*.

Os pontos de coleta dos indivíduos confirmados molecularmente como pertencentes à espécie podem ser verificados na figura 5.2.

Figura 5.2. Locais de coleta das amostras de *Cerdocyon thous*.



Fonte: Elaborado pela autora

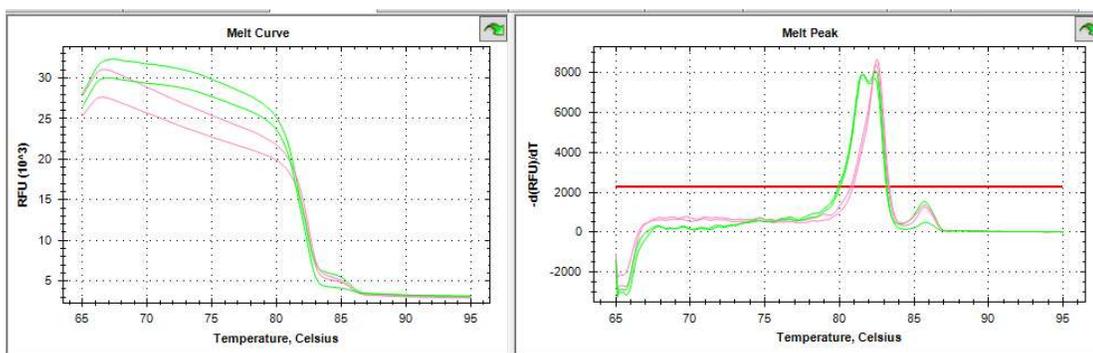
5.4.2 Atropelamentos

As carcaças dos indivíduos atropelados algumas vezes ficam expostas muito tempo às condições climáticas, levando a degradação do tecido e do DNA e, conseqüentemente, perda da amostra para análises genéticas. Neste estudo, não foi possível amplificar uma das

amostras que foi coletada em Mato Grosso do Sul por causa do estado de conservação do material genético.

Todas as amostras que não foram sexadas em campo mostraram resultados positivos para identificação do sexo molecularmente; amplificando o gene ZF por PCR em tempo real, para amostras de tecido e de sangue (Figura 5.3), ou utilizando os genes ZF e SRY para sexagem das amostras de fezes.

Figura 5.3. Padrão das curvas de *Melting* obtidas para *Cerdocyon thous*. As curvas dos machos (verde) mostraram dois picos, enquanto que as fêmeas (rosa) mostraram um único pico.



Assim, no total conseguimos a identificação do sexo de 122 amostras, as quais foram utilizadas nas análises subsequentes. Destas amostras, 63 indivíduos foram identificados como machos e, 59 como fêmeas. Considerando todas as áreas, foram mortos 14 machos e 12 fêmeas atropelados, 42 machos e 34 fêmeas capturados e liberados e sete machos e 13 fêmeas capturados por amostragem não invasiva (Tabela 5.2).

Tabela 5.2. Número de *Cerdocyon thous* coletados nas áreas estudadas e considerados para análises da estrutura genético-populacional da espécie.

	Tecido		Sangue		Fezes		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Campo Grande-MS	10	5	-	-	-	-	10	5
Cumari-GO	1	2	42	34	-	1	43	37
SP	3	5	-	-	7	12	10	17
Total	14	12	42	34	7	13	63	59

Considerando somente as amostragens focadas em um único tipo de amostra (atropelamento em MS e capturas em GO), vemos que há uma grande diferença entre a quantidade de machos atropelados. Assim mesmo, encontramos diferenças ao comparar o número de animais atropelados por sexo com a quantidade de machos e fêmeas esperados

para a espécie, que segundo Montgomery e Lubin (1978) deveria ser igual, se considerada a razão sexual esperada para a espécie.

A dispersão por machos jovens em mamíferos é comum, como reportado por Reis *et al.* (2011) e pode ser o motivo para encontrar um número maior de machos. No entanto, no primeiro capítulo não foi evidenciada a dispersão preferencial por algum dos sexos na espécie.

Independente do sexo mais atropelado, consideramos que o número de animais encontrados mortos por atropelamentos constitui uma amostragem representativa da população do entorno da rodovia. Do mesmo modo, muitos estudos de atropelamentos realizados com mamíferos de médio e grande porte apontam a espécie como a mais afetada por este evento (COELHO *et al.*, 2008; TURCI E BERNARDE, 2009; CACERES, 2011), inclusive considerando a área estudada no estado do Mato Grosso do Sul (ASCENSÃO *et al.*, 2017).

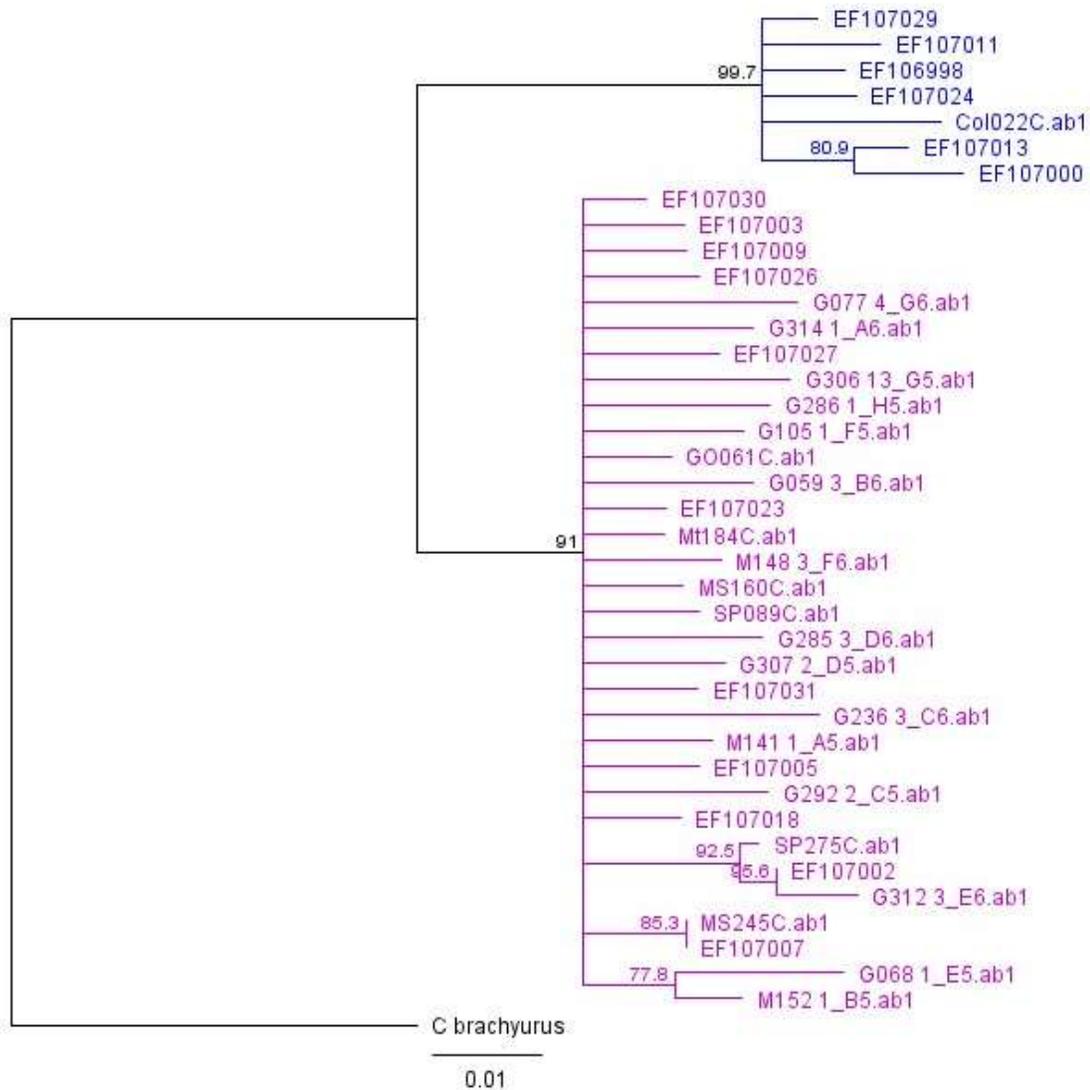
O impacto na morte dos animais atropelados é maior do que se estima quando se considera o papel ecológico que a espécie desempenha (BUENO E MOTTA-JUNIOR, 2004) e a perda de indivíduos devido aos atropelamentos torna-se mais preocupante para a conservação dos ecossistemas onde ela ocorre. Seria necessário estudar os efeitos das estradas sobre os processos ecológicos de controle populacional e regeneração paisagística para entender melhor o impacto real da perda de indivíduos (RIBEIRO *et al.*, 2016), para assim, buscar e depois implementar soluções para este problema.

5.4.3 Subespécies de *Cerdocyon thous*

As árvores de distância elaboradas utilizando 530 pb da região controle agruparam as sequências claramente, mostrando que todos os indivíduos estudados ($n = 122$) pertencem ao clado sul, ou seja, todos são de uma única subespécie (Figura 5.4).

A árvore não mostrou nenhuma relação entre o local de origem e os agrupamentos dentro do clado sul. Assim, para as análises de diversidade e de distribuição da variação genética do cachorro-do-mato foram utilizados marcadores microssatélites, pois as taxas mutacionais são mais altas, podendo explicar melhor eventos evolutivos recentes na espécie.

Figura 5.4. Árvore Neighbor-Joining para *Cerdocyon thous* mostrando que as amostras estudadas pertencem ao clado sul (destacado em roxo). O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) foi utilizado como grupo externo para enraizar a árvore. As sequências descarregadas da base de dados são as identificadas com os números EF106998-EF107031.



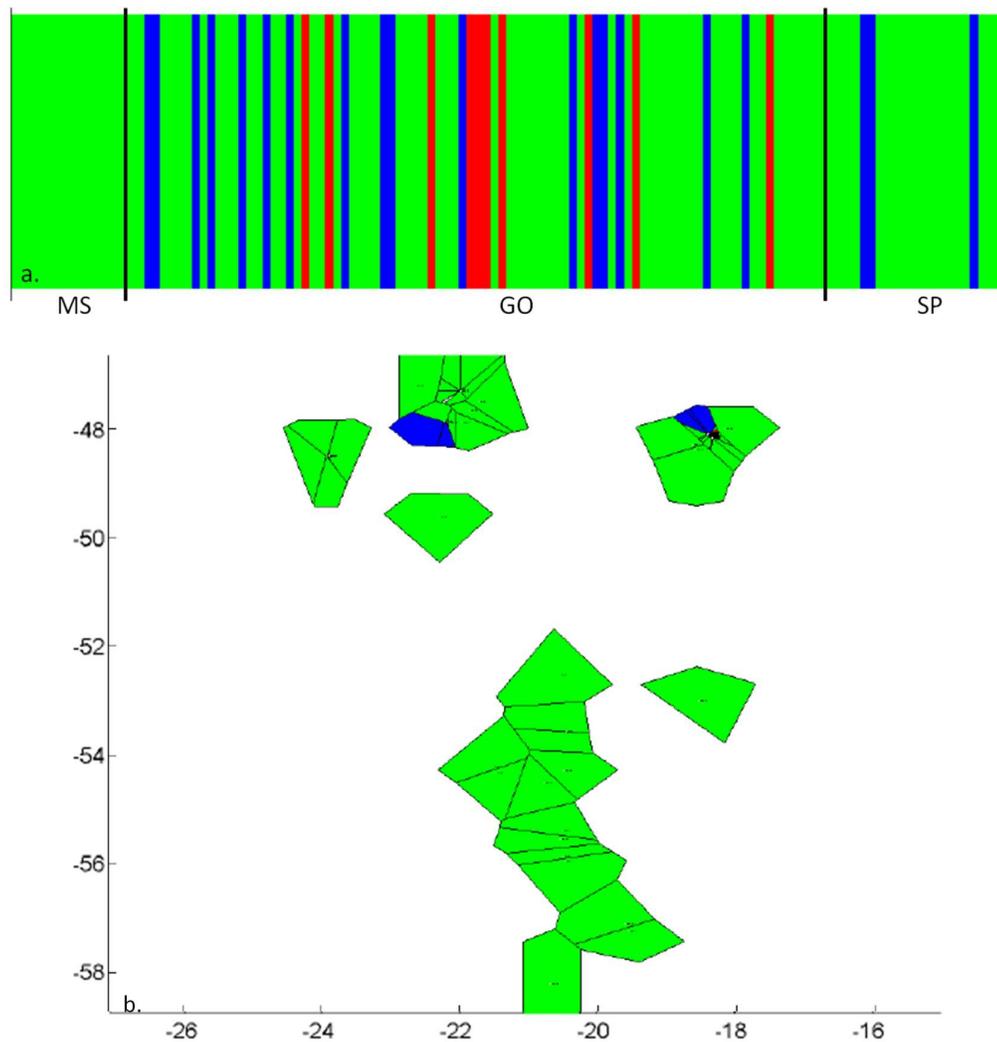
5.4.4 Estruturação populacional

O sequenciamento dos *loci* microssatélites mostrou resultados positivos para a amplificação do *motif*, confirmando a especificidade deles e que todos eles são tetranucleotídicos. Dois *loci* (2006 e 2159) mostraram problemas para a amplificação dos indivíduos e por essa razão foram descartados das análises.

Os valores de AMOVA, realizada com os nove *loci* restantes, mostraram que a variância maior existe entre os indivíduos 76%. A variância dentro dos indivíduos de cada uma das áreas alcança 12%, e 17% da variação se encontra entre as áreas amostradas.

As análises bayesianas mostraram a máxima probabilidade (1) para a presença de 3 *clusters* quando realizada a análise por indivíduos (Figura 5.5 a). Entretanto, estes *clusters* não apresentam uma relação clara com o ponto geográfico em que as amostras foram coletadas (Figura 5.5 b), e nenhuma relação com o sexo dos indivíduos, nem com os anos de coleta. Quando realizada a análise considerando as áreas amostradas, o valor do K foi de 1 com probabilidade máxima.

Figura 5.5. Atribuição dos indivíduos de *Cerdocyon thous* a três *clusters* no software BAPS.

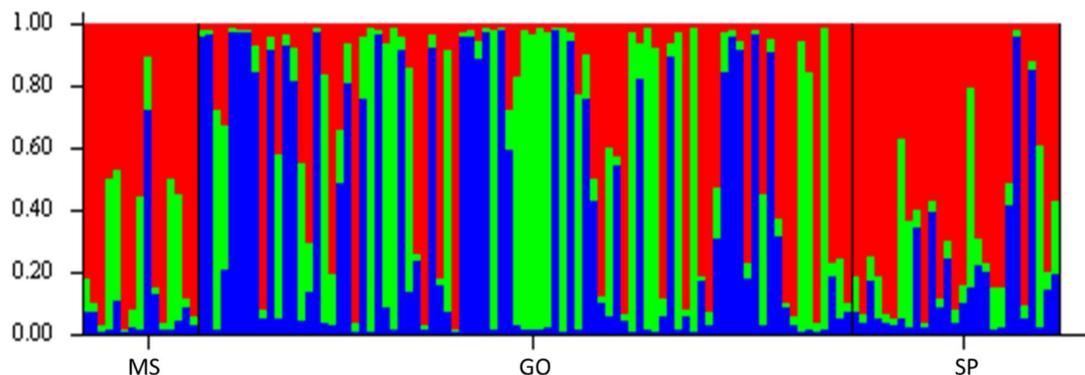


*Na parte superior do gráfico b se encontram os indivíduos amostrados no estado de São Paulo (SP), na superior direita Goiás (GO) e na parte inferior os indivíduos amostrados em Mato Grosso do Sul (MS).

As análises realizadas no STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000), tanto sem informação *a priori* como quando utilizada a informação sobre a origem geográfica, mostraram que os indivíduos de cachorro-do-mato das áreas amostradas apresentam altas probabilidades de

pertencer aos três *clusters* (Figura 5.6). O método de Pritchard *et al.* (2000), segundo o qual o melhor K é aquele que maximiza o valor de $\text{LnP}(K)$ e que possua a menor variância e o método de Evanno *et al.* (2005) que utiliza o valor do ΔK mostraram que o valor do K mais provável foi de 3 *clusters*.

Figura 5.6. Clustering bayesiano para *Cerdocyon thous* amostrados quando analisados sem informação da área de coleta, produzido pelo STRUCTURE. Cada indivíduo está representado por uma barra vertical dividida em K populações.

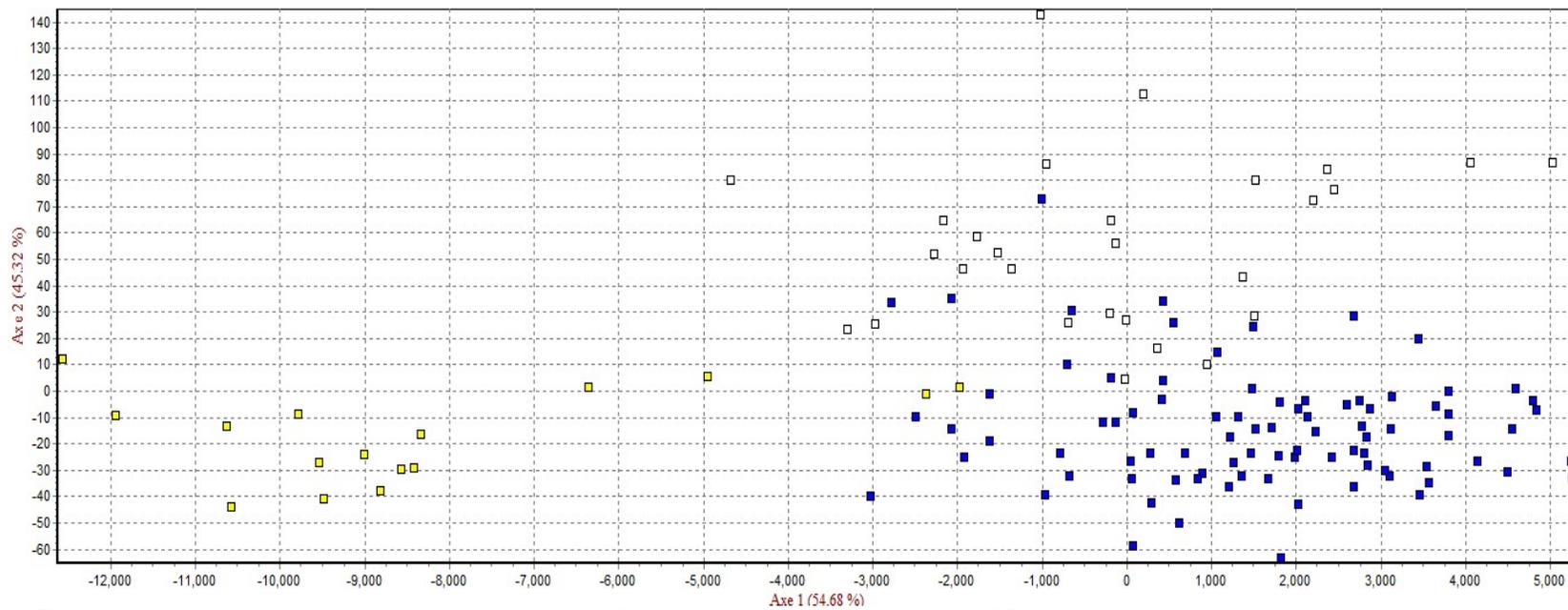


As áreas de MS e SP são mais parecidas e apresentam indivíduos pertencentes, principalmente, a um *cluster*. Dentro da área de GO encontramos indivíduos que apresentam mais probabilidade de pertencer a todos os *clusters* mostrando maior diferenciação quando comparada às outras duas áreas. A variação encontrada em GO pode ser explicada ao ser considerado o número de indivíduos amostrados na área, sendo que foram coletados quase três vezes mais animais que nas outras duas áreas. O número de indivíduos maior tende a aumentar a probabilidade de amostrar uma variabilidade maior.

Considerando que os animais atropelados podem não ser residentes das áreas analisadas, avaliamos se eles pertencem a *clusters* diferentes aos de cada área analisada ou se todos os atropelados pertencem a um mesmo *cluster*. No entanto, não foi encontrada nenhuma relação entre os animais atropelados e o *cluster* a que eles pertencem. Do mesmo modo, não encontramos relação entre os animais residentes, capturados ou coletados por fezes e o *cluster* ao que eles pertencem.

As análises de AFC também permitiram, visualizar uma estruturação populacional para os indivíduos amostrados (Figura 5.7). Além disso, podem diferenciar duas nuvens de pontos mais evidentemente nas análises de AFC, pois os indivíduos das áreas de GO e SP apresentam sobreposição. Nesta análise, foi evidenciada uma tendência na diferenciação das frequências alélicas de MS.

Figura 5.7. Análise Fatorial de Correspondência (AFC) para *Cerdocyon thous* considerando as três áreas de amostragem.



Em amarelo se encontram representados os indivíduos do MS, em azul os de GO e em branco os de SP.

Na análise fatorial, a soma dos dois primeiros fatores (54,68% e 45,32%) representou 100% da variação do espaço multifatorial. Consideramos que os resultados das análises bayesianas e as fatoriais de correspondência confirmam que as áreas amostradas apresentam diferenciação entre os indivíduos amostrados. É importante destacar que os indivíduos de MS mostram uma maior variação entre eles, pois os pontos se encontram dispersos no gráfico, o anterior pode ser uma evidencia de isolamento por distância na espécie, pois os pontos de coleta entre MS e as outras áreas variam de 500 a 1000 km, enquanto que os pontos mais distantes entre GO e SP estão a 500 km.

O valor de F_{ST} calculado neste estudo mostrou ser muito maior ao reportado na literatura para a espécie ($F_{ST} = 0,03367$, 95% CI= 0,0237-0,0465). Em estudos anteriores, Tchaicka (2006) encontrou um valor de $F_{ST} = 0,000041$ para a espécie. Além disso, o valor encontrado para os indivíduos aqui estudados ($F_{ST} = 0,03367$) apesar de ser pequeno é significativo.

Quando realizadas as comparações par a par entre as áreas amostradas os índices de R_{ST} e $Dest$ confirmaram que a diferenciação entre as áreas é menor entre GO e SP e maiores quando comparada a área de MS (Tabela 5.3). Os valores foram significativos para as comparações com a área de MS quando avaliado o valor de R_{ST} e para todas as comparações com o índice $Dest$, confirmando que existe diferenciação entre os indivíduos estudados nas áreas amostradas.

Tabela 5.3. Diferenciação populacional par a par para *Cerdocyon thous* nas áreas amostradas. Acima da diagonal estão apresentados os valores de R_{ST} e abaixo os valores de $Dest$.

	MS	GO	SP
MS		0,14757*	0,06949*
GO	0,1296*		0,02602
SP	0,1234*	0,0597*	

Os valores com asterisco mostraram ser significativos

Tchaicka (2006) utilizando amostras da distribuição total da espécie no Brasil (quase todo o território com exceção da floresta amazônica) não encontrou diferenciação populacional entre as áreas amostradas, utilizando os mesmos *loci* (assim como o *locus* 2006). É importante considerar que nossa amostragem não inclui todas os locais onde a espécie ocorre, o que pode estar fazendo mais evidente a diferenciação entre as áreas. Acreditamos que se as coletas tivessem sido realizadas de maneira sistemática com distâncias fixas a diferenciação encontrada entre as áreas, provavelmente, seria menos evidente.

As análises da de estruturação populacional mostraram que os indivíduos de cachorro-do-mato se encontram pertencem a três populações, MS, GO e SP, uma em cada área amostrada. Assim, as análises subsequentes de diversidade genética foram realizadas em cada uma dessas áreas para evitar inferências erradas como consequência do efeito Wahlund.

5.4.5 Diversidade genética dos cachorros-do-mato

A caracterização da diversidade genética considerando todo o conjunto amostral ($n=122$) mostrou que o *locus* mais polimórfico é o 2137 para todas as áreas amostradas (Tabela 5.4). A média do número de alelos (N_a) variou de 7,222 (SP) a 9,556 (GO), enquanto que a média de alelos efetivos (A_e) foi de 3,896 (SP) a 4,681 (MS) (Tabela 5.4). O alto número de alelos pode ser uma evidência de que a espécie não se encontra em perigo. A diferença encontrada entre o N_a e o N_e pode ser explicada pelo número de alelos privados e raros de cada uma das áreas estudadas. A área de GO apresentou uma média maior no número de alelos privados (1,333), seguida da área de MS (0,333) e de SP (0,111) (Tabela 5.4).

A diversidade genética estimada foi considerada alta em todas as áreas amostradas (valores de H_e e R_a superiores a 0,686 e 6,1, respectivamente) (Tabela 5.4). O valor de H_e encontrado quase igual ao reportado para a espécie, por Tchaicka (2006), em um estudo realizado com amostras de indivíduos de quase toda a distribuição da espécie no Brasil, onde foi reportado um valor de H_e de 0,64.

Assim mesmo, os valores encontrados são similares aos reportados anteriormente para outras espécies de canídeos sul-americanos; Silva (2015) encontrou valores de H_e de 0,816 e de R_a de 10,98 para a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*). Para o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) os valores encontrados foram de $H_e=0,72$ e $R_a=5,4$ (RAMALHO *et al.*, 2014) e $H_e= 0,75$ (FONTOURA-RODRIGUES, 2008).

Nas áreas de GO e SP, os valores H_e foram maiores que os de H_o . No entanto, a diferença foi mínima não mostrando significância para a deficiência de heterozigotos (Tabela 5.4). Contudo, na área de MS, o valor de H_o foi maior que o de H_e . O F_{IS} total para cada uma das áreas (Tabela 5.4) não mostrou a existência de excesso ou déficit de heterozigotos para as áreas, e conseqüentemente, nenhum indício de endogamia ou exogamia genética na população.

Tabela 5.4. Caracterização da diversidade genética de *Cerdocyon thous* nas três áreas amostradas.

	2001	2004	2010	2018	2054	2088	2132	2137	2140	Média	
MS	Pb	123-127	253-259	229-249	145-169	136-156	94-106	144-206	147-239	94-138	-
	N	15	15	15	15	15	15	15	15	15	-
	Na	2	5	6	6	6	4	9	17	11	7,333
	Ae	1,220	4,206	3,358	3,125	3,750	2,571	4,639	13,636	5,625	4,681
	Ra	3,382	4,987	5,723	5,643	6,533	4,417	6,036	12,087	9,213	6,446
	HWE	1	0,5585	0,0441	0,3766	0,2880	0,0359	0,0530	0,2554	0,4783	-
	Ho	0,200	0,867	1,000	0,800	0,667	0,400	0,733	0,867	0,867	0,711
	He	0,180	0,762	0,702	0,680	0,733	0,611	0,784	0,927	0,822	0,689
	F_{IS}	-0,077	-0,103	-0,395	-0,143	0,125	0,375	0,099	0,099	-0,02	T=0,003
	P(F_{IS})	0,8667	0,3167	0,0056	0,2444	0,2833	0,0167	0,2778	0,1444	0,5667	0,5167
GO	Pb	123-135	245-269	229-253	145-169	128-164	90-106	140-172	143-243	90-166	-
	N	80	79	80	79	80	80	80	80	79	-
	Na	5	7	7	8	10	5	9	22	13	9,556
	Ae	1,874	3,267	3,257	4,253	4,240	2,452	3,905	7,059	6,528	4,093
	Ra	3,692	3,998	5,399	5,574	6,201	4,625	6,633	11,54	7,742	6,156
	HWE	0,0014*	0,0240	0*	0,0005*	0,3128	0,0452	0,0049*	0*	0,0004*	-
	Ho	0,427	0,728	0,659	0,519	0,805	0,549	0,768	0,622	0,889	0,663
	He	0,466	0,694	0,693	0,765	0,764	0,592	0,744	0,858	0,847	0,714
	F_{IS}	-0,029	-0,036	-0,097	0,303	-0,041	0,085	-0,023	0,252	-0,038	T=0,048
	P(F_{IS})	0,4833	0,3556	0,0722	0,0056	0,2833	0,1833	0,3667	0,0056	0,2444	0,0278
SP	Pb	123-135	253-265	229-253	149-169	132-156	90-106	144-184	151-243	90-166	-
	N	27	22	26	25	26	26	27	26	27	-
	Na	4	4	6	6	7	5	8	15	10	7,222
	Ae	1,420	3,396	3,258	3,943	3,644	2,191	4,893	7,079	5,245	3,896
	Ra	3,319	5,09	5,935	5,918	6,676	4,389	6,656	13,225	9,394	6,733
	HWE	1	0,7374	0,0156	0,7145	0,9752	0,7341	0,5072	0,074	0,9966	-
	Ho	0,333	0,727	0,577	0,760	0,846	0,615	0,778	0,577	0,926	0,682
	He	0,296	0,706	0,693	0,746	0,726	0,544	0,796	0,859	0,809	0,686
	F_{IS}	-0,115	0,097	0,393	0,103	-0,092	-0,05	-0,093	0,272	-0,081	T=0,066
	P(F_{IS})	0,4944	0,4611	0,0167	0,2778	0,4222	0,6056	0,3611	0,0056	0,3667	0,0667

O tamanho dos alelos apresentado (Pb) não inclui os 18pb da cauda M13. *Valores significativos. O valor de p para o F_{IS} é: 0,00556. T=valor total para área.

Os valores calculados para o EHW não mostraram nenhum *locus* fora do equilíbrio para as áreas de MS e de SP, após a correção sequencial de Bonferroni. No entanto, a maioria deles mostrou valores significativos na área de GO (Tabela 5.4), podendo levar a concluir sobre uma possível subestruturação na área. A afirmação anterior pode ser reforçada, pois nas análises de estruturação populacional, esta área mostrou uma maior variabilidade genética.

As análises de diversidade genética foram realizadas na área de GO separando os indivíduos em quatro grupos, encontrados quando realizadas análises de estruturação para a área (grupo 1 - 4), aparentemente estes são grupos familiares e se diferenciam da população por alelos privados. Acreditamos que foi possível detectar essa subestruturação devido ao esforço amostral maior e ao grande número de indivíduos coletados na área. É necessário destacar que os grupos encontrados na área de GO não estão restritos a locais específicos dentro da área, aos anos de coleta nos que as amostras foram obtidas, ou ao sexo dos indivíduos.

Os indivíduos dos grupos 2 e 4 apresentam maior diferenciação nas análises de estruturação realizadas utilizando todos os animais estudados (Figuras 5.5 e 5.6), assim como alelos privados.

Nas análises de EHW dentro dos grupos familiares o *locus* 2137 mostrou-se em desequilíbrio em dois grupos (grupo 1 e 3), assim como os *loci* 2001 e 2018 no grupo 3 (Tabela 5.5).

Tabela 5.5. Caracterização da diversidade genética de *Cerdocyon thous* nos grupos familiares encontradas na área de GO.

<i>Locus</i>	2001	2004	2010	2018	2054	2088	2132	2137	2140	Total
Grupo 1										
HWE	1,000	0,089	0,222	0,676	0,7035	0,271	0,021	0,0001*	0,706	-
F_{IS}	-0,09	-0,365	-0,031	0,372	0,04	-0,132	-0,043	-0,175	0,109	-0,008
P(F_{IS})	0,5	0,0319	0,5167	0,0014	0,4625	0,1944	0,4931	0,2236	0,2806	0,4625
Grupo 2										
HWE	1,000	0,188	0,385	0,079	0,026	0,198	0,281	0,395	0,068	-
F_{IS}	-0,11	-0,362	-0,361	0,055	-0,194	-0,307	-0,207	-0,067	0,305	-0,129
P(F_{IS})	0,581	0,095	0,073	0,488	0,156	0,176	0,135	0,521	0,056	0,036
Grupo 3										
HWE	0,003*	0,058	0,005	0,001*	0,799	0,0286	0,223	0,0002*	0,766	-
F_{IS}	0,102	0,011	0,201	-0,022	-0,142	0,056	-0,119	0,076	0,462	0,063
P(F_{IS})	0,25	0,521	0,021	0,481	0,025	0,358	0,114	0,257	0,0014	0,019
Grupo 4										
HWE	0,047	1,000	0,451	0,792	0,314	0,047	0,929	1,000	0,501	-
F_{IS}	1	-0,216	-0,325	-0,096	-0,409	-0,143	-0,212	1	-0,006	-0,103
P(F_{IS})	0,044	0,508	0,117	0,743	0,057	0,3	0,413	0,047	0,648	0,068

*valores significativos após correção sequencial de Bonferroni. O valor de p para o F_{IS} é: 0.00139.

Uma vez que os *loci* utilizados são potencialmente neutros podemos concluir que os desvios no EWH se devem a amostragem insuficiente dos locais de onde vêm estes alelos, o que não permite ver a distribuição real das frequências alélicas. Assim, acreditamos que isto não é uma evidência de uma estruturação populacional real, e sim uma evidência de que a amostragem não foi suficiente para algumas famílias e que outras foram melhor amostradas na área. Os valores de F_{IS} não foram significativos para nenhum dos grupos encontrados, mostrando que não há indícios de endogamia ou exogamia na população (Tabela 5.5).

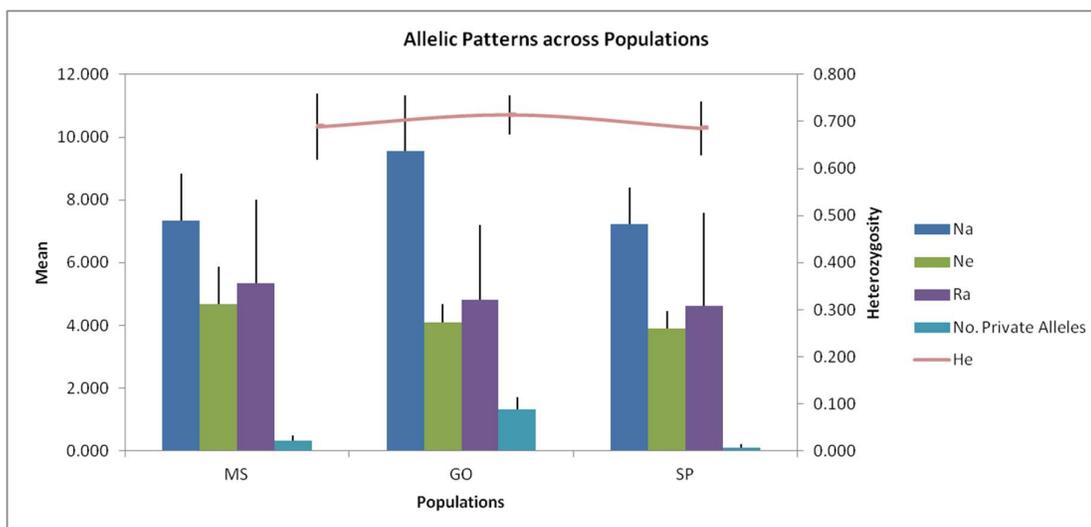
A área de GO mostrou valores maiores de diversidade (Tabela 5.4) sendo que a área amostrada é menor quando comparada com as outras duas áreas, SP e MS. O anterior pode ser evidência de um número maior de indivíduos amostrados na primeira área, assim como da subestruturação familiar nela encontrada.

Sem considerar a área de MS, onde todos os indivíduos estudados foram atropelados, vimos que existe uma grande importância de cada animal para a espécie. Na área de SP, o único alelo privado detectado na área pertencia a uma fêmea atropelada. Do mesmo modo, três fêmeas em GO que foram atropeladas apresentavam alelos privados desta área. Sendo que foram encontrados para a área nove alelos privados e três deles (33,33%) foram encontrados nesses animais atropelados. Assim, o fato dos alelos privados estar presentes nos indivíduos atropelados, permite concluir que a perda de um único indivíduo pode resultar em um impacto forte para manutenção da diversidade genética, assim como para manutenção do fluxo gênico, evitando assim, o isolamento e a estruturação populacional da espécie.

As análises de desequilíbrio de ligação para ver se alguns *loci* poderiam estar levando a inferências erradas na espécie mostraram que alguns *loci* podem estar em desequilíbrio nas áreas estudadas. Os *loci* 2010 e 2054 mostraram valores significativos na área de MS, o par 2010 e 2137 e o par 2001 e 2054 em GO e em SP, o par 2137 e o 2054. O *locus* 2137 mostrou uma frequência de alelos nulos maior que 5% nas áreas de GO e SP. Para evitar inferências equivocadas sobre a espécie, os *loci* 2054 e 2137 foram excluídos das análises.

Os valores de R_a (utilizando 15 indivíduos) mostraram que a área que apresenta uma maior riqueza foi MS ($R_a=5,351$), seguida por GO ($R_a=4,823$), e a que mostrou o menor valor foi a área de SP ($R_a=4,630$) (Figura 5.8). Ao comparar os valores de riqueza alélica de 1 até 15 amostras, também observamos o mesmo padrão (Figura 5.8).

Figura 5.8. Caracterização da diversidade genética de *Cerdocyon thous* nas áreas estudadas.



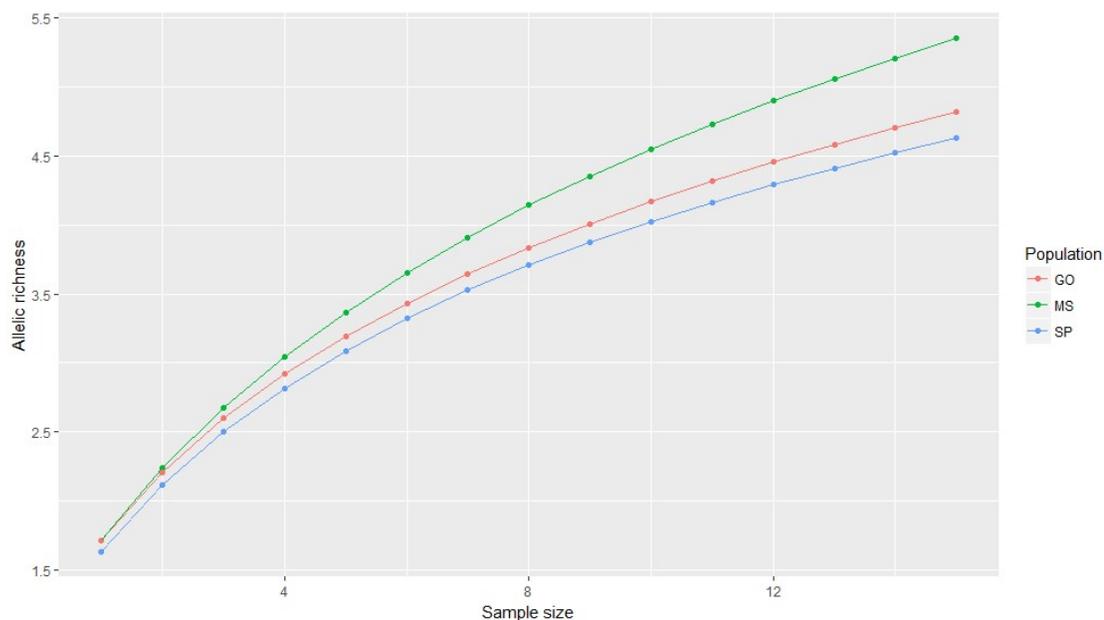
Ra para 15 indivíduos.

Podemos considerar que a Ra é uma medida mais aproximada à realidade sendo que os valores não dependem do número de animais amostrados na área, pois são corrigidos por rarefação para o tamanho amostral. Os valores altos na riqueza alélica de MS podem ser devido a que a coleta dos animais foi realizada numa área maior, o que pode estar mostrando esses altos valores de diversidade. É importante destacar que o número de alelos raros em GO influencia na riqueza alélica da área.

As distâncias encontradas entre os indivíduos de cachorro-do-mato podem explicar a riqueza alélica maior calculada para a área de MS (Figura 5.8 e 5.9), pois as distâncias dos pontos de coleta entre um indivíduo e outro nesta área ultrapassaram os 300 km (Figura 5.2).

Os valores baixos de Ra e Ne na área de SP podem ser evidência de gargalo populacional na área, sobretudo se consideramos que a redução na He não é muito grande (Figura 5.8). A perda de alelos raros ou privados é muito mais rápida devido à deriva quando há uma redução considerável no tamanho populacional. A He demora mais para diminuir, quando comparado com o Ra e o Ne, devido a que este valor está influenciado, principalmente, pelas frequências alélicas. Apesar das três áreas estudadas sofrerem com paisagens alteradas e com exploração agropecuária, a área de SP está há mais tempo sofrendo com a degradação do ambiente e pode assim, apresentar qualidades menores no habitat e maiores efeitos sobre a variabilidade genética das espécies.

Figura 5.9. Caracterização da riqueza alélica comparando as áreas estudadas utilizando até 15 indivíduos de *Cerdocyon thous*.



Em contrapartida ao acima exposto, as análises de *bottleneck* mostraram que a área de SP não apresenta evidências de gargalos populacionais ($p = 0,1$). Entretanto, os valores foram significativos para a área de GO ($p = 0,015$). A significância sobre o gargalo populacional pode ser dar devido a que as frequências alélicas se veem alteradas pela presença de alelos raros e uma amostragem deficiente sobre as frequências alélicas reais.

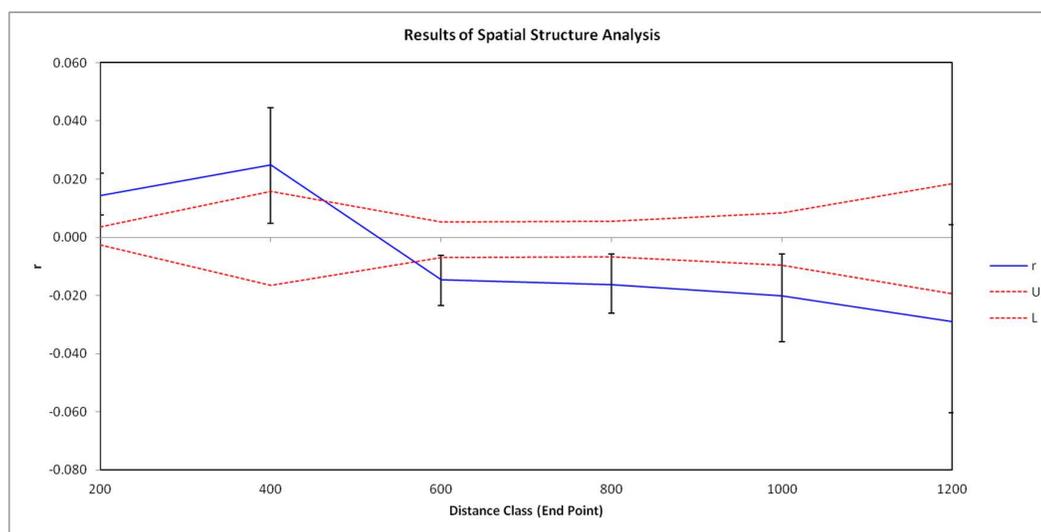
É importante destacar que, utilizando DNA mitocondrial, Tchaicka *et al.* (2007) relataram uma expansão populacional para a espécie, faz 108625 anos, enquanto que nesse estudo encontramos evidências de redução recente nos tamanhos populacionais. Com isso, podemos concluir que a espécie está sendo afetada pelas mudanças de paisagem causadas por eventos antropogênicos.

5.4.6 Distribuição da variação genética dos cachorros-do-mato

Apesar de que nossas coletas não foram realizadas sistematicamente utilizando distâncias fixas, e que existem áreas de distribuição da espécie que não foram amostradas, as análises de distância de mantel permitiram concluir que existe correlação positiva entre a distância geográfica e a distância genética, ainda que o coeficiente de correlação pode ser considerado baixo ($r^2 = 0,011$) este valor mostra significância estatística ($p < 2,2 \times 10^{-16}$).

Tchaicka *et al.* (2007) reportaram anteriormente isolamento por distância para a espécie. Do mesmo modo, nossas análises de correlação espacial (SAA) mostraram valores positivos até os 400 km, ou seja, indivíduos geneticamente parecidos se encontram mais próximos do que o esperado ao acaso (Figura 5.9). Numa escala menor, com classes de distância a 50 e 100 km foi observado que, de 400 a 600 km, os dados se comportam igual aos dados simulados (intervalos de confiança), mostrando que, nessa distância, a distribuição dos indivíduos pode ser explicada pelo acaso. Essa tendência muda a partir dos 600 km, onde a correlação é negativa, sendo que indivíduos menos distantes geneticamente se distribuem menos próximos que o esperado pelo acaso, mostrando que eles apresentam padrões para fuga de endogamia (Figura 5.10).

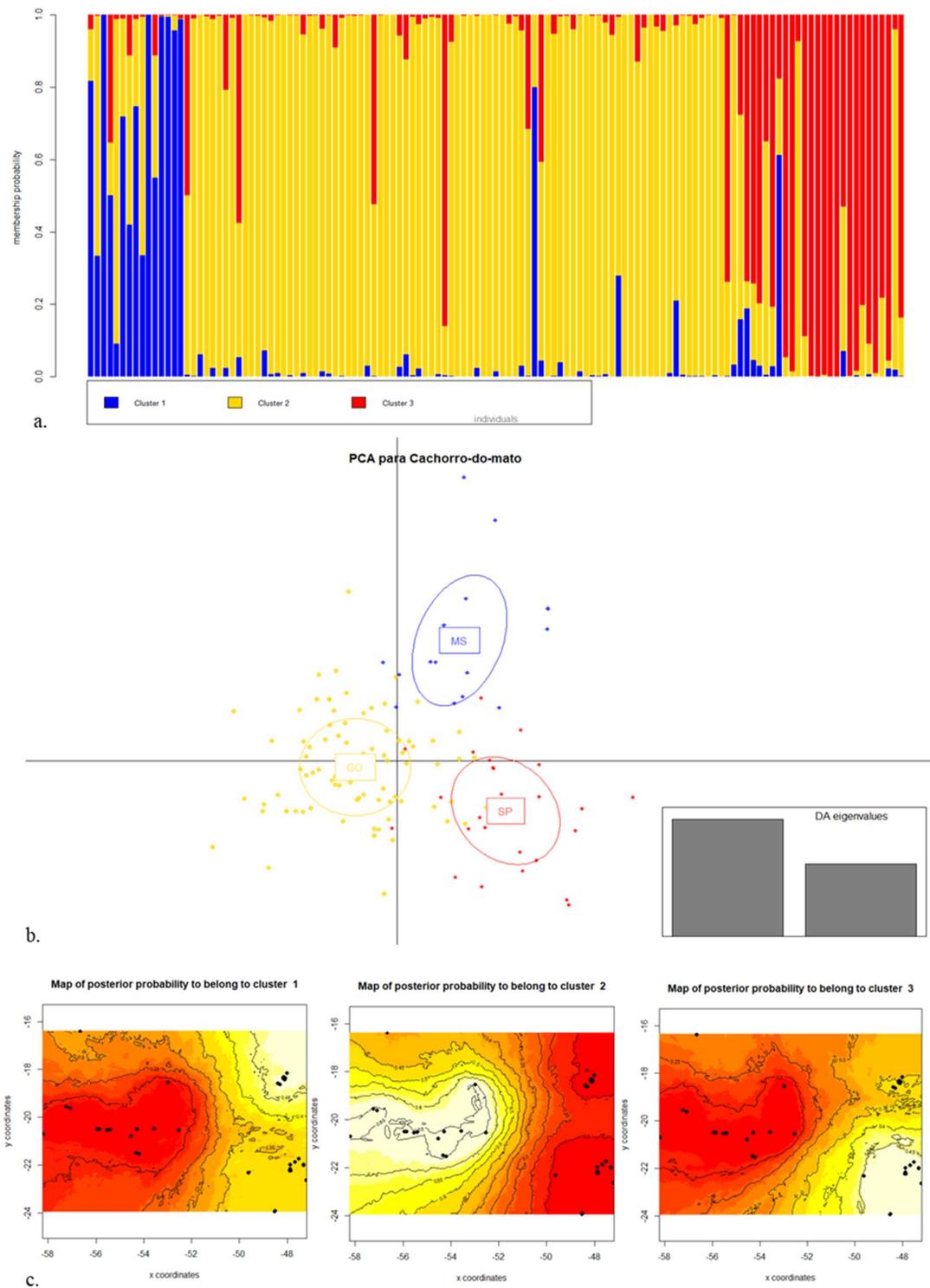
Figura 5.10. Autocorrelação espacial (SAA) para todos os indivíduos de *Cerdocyon thous* com classes de distância de 200 km. Os valores com intervalo de confiança de 95%, para a hipótese nula de que não existe estrutura espacial, estão representados pelas linhas vermelhas ponteadas.



O isolamento por distância ajuda a explicar melhor os valores maiores de diferenciação encontrados para a área de MS (Tabela 5.3), assim como o padrão evidenciado na figura da Análise Fatorial de Correspondência (AFC) (Figura 5.7), pois a área amostrada neste estado foi muito maior, maximizando assim a diferença entre os indivíduos localizados nos pontos extremos da amostragem.

As análises de estruturação populacional utilizando a análise de componentes principais para os sete *loci* que não apresentam desequilíbrio de ligação (2001, 2004, 2010, 2018, 2088, 2132 e 2140) reafirmaram a existência de três populações para a espécie (Figura 5.11). Do mesmo modo, o modelo espacial implementado no GENELAND detectou os mesmos três *clusters* para a espécie (Figura 5.11).

Figura 5.11. Estruturação populacional entre os indivíduos de *Cerdocyon thous* das áreas estudadas (a) através de análises de componentes principais (PCA) (b). O mapa mostra a probabilidade posterior dos indivíduos para os três clusters significativos (Cluster 1 GO, Cluster 2 MS, Cluster 3 SP).



O tamanho efetivo populacional alcançou valores de infinito na área de MS, sugerindo que esse método não é resolutivo para nossa amostra. Por outro lado, permitiu calcular os valores para as áreas de GO e SP (Tabela 5.6).

Tabela 5.6. Números efetivos populacionais para *Cerdocyon thous* nas três áreas estudadas usando o método de desequilíbrio de ligação no programa NeEstimator.

		Ne	Limites de confiança	
			Parametric	Jacknife
MS	Acasalamento ao acaso	∞	98,6- ∞	106- ∞
	Monogâmico	∞	199,1- ∞	213,9- ∞
GO	Acasalamento ao acaso	33,2	26-43,1	22,5-51,1
	Monogâmico	68	53,6-87,8	46,7-103,6
SP	Acasalamento ao acaso	41,9	20,3-230,9	20,1-244
	Monogâmico	85,4	42,2-460,7	41,8-494,6

Em GO foi possível calcular o tamanho efetivo populacional permitindo concluir que a área mantém, aproximadamente, 68 indivíduos de cachorro-do-mato que se reproduzem (Tabela 5.6) e cerca de 340 indivíduos em total para a espécie, quando utilizado o valor mais conservador proposto por Waples (2002), ou 680, ao utilizar o proposto por Frankham (1995). Se considerarmos que as coletas foram realizadas numa área de aproximadamente 120 km² podemos concluir que as densidades de cachorro-do-mato na área estão entre 2,8 e 5,7 ind/km².

Ao analisar os valores para o tamanho efetivo populacional para a área de SP, vemos que é de 85 indivíduos, aproximadamente. Considerando que a área amostrada é maior em SP do que em GO podemos inferir que o número de animais que se reproduz e efetivamente passa os alelos de geração em geração é menor na área de SP, aumentando assim a preocupação com esta área.

As áreas de GO e SP mostraram um maior número de indivíduos migrantes ($N_m=3,4454$) entre elas. As probabilidades de pertencer a cada população (valor de Q) também são observadas na Figura 5.11a, onde vemos que há indivíduos de cada *cluster* com altas probabilidades de pertencer a outro. Os valores também confirmam o observado na diferenciação populacional avaliada pelo Dest (Tabela 5.3) e na análise fatorial de correspondência (AFC; Figura 5.7), onde as duas áreas mostraram ser mais parecidas. Do mesmo modo, isto é explicado pelas distancias às que se encontram localizadas as áreas, sendo que o ponto mais distante entre GO e SP está a 600 km e o mais próximo a 300 km, aproximadamente (Figura 5.2). Igualmente, o fluxo de indivíduos se dificulta com a área de

MS à medida que as distâncias entre as áreas aumentam (distância entre MS e GO com $N_m = 2,0$ e distância aproximada de 470-1000 km; e distância entre MS e SP com $N_m = 1,8$, e distância aproximada de 350-900 km). Outro fator a ser considerado é a permeabilidade e o grau de alteração da paisagem. Assim o número de indivíduos migrantes entre GO e SP foi o menor. Isto pode ser um reflexo do número de animais que tentam migrar, mas não tem sucesso em chegar, se estabelecer ou se reproduzir.

Quando os indivíduos foram atribuídos às áreas amostradas, vimos que a maioria deles apresentava uma alta probabilidade de pertencer ao local onde foi coletado. Entretanto, aproximadamente, 20% dos indivíduos apresentaram probabilidades altas (maiores que 0,5) de pertencer a outra área, sendo que não existe uma preferência para o local de atribuição. Isto reforça a ideia de que o fluxo de indivíduos de cachorros-do-mato entre as áreas é alto.

Foram identificados migrantes de primeira geração nas três áreas. Sendo que MS apresentou 20% e as áreas de GO e SP menos de 10% de migrantes deste tipo. Acreditamos que o valor maior detectado para MS se deve a que as coletas nesta área foram realizadas unicamente com animais atropelados. Por essa razão, são detectados animais com características genéticas que permitem ser atribuídos às outras áreas estudadas.

Dos animais identificados como migrantes em GO, somente um corresponde a um indivíduo que apresenta alelos privados. A probabilidade maior mostra que este indivíduo pertence à área de MS, mostrando como o fluxo de indivíduos entre as áreas realmente acontece. O fato de não ter identificado como migrantes os animais que apresentam os alelos privados na área de GO se deve a que não foram coletados indivíduos pertencentes a todas as áreas de ocorrência da espécie. Seria necessário ter informações genéticas das áreas mais ao norte e mais ao leste da área amostrada de GO para poder estabelecer se os indivíduos com alelos privados, que se destacam da população amostrada, têm origem nessas áreas e se eles são migrantes de primeira geração ou se simplesmente os alelos surgiram na área estudada.

Considerando a biologia da espécie, seus hábitos generalistas e sua capacidade de deslocamento e adaptação, podemos sugerir que apesar da estruturação populacional os indivíduos conseguem superar barreiras geográficas, como grandes rios e estradas. A habilidade da espécie em usar paisagens antropogênicas foi comprovada por Jácomo *et al.* (2004) e por Lyra-Jorge *et al.* (2008).

Entretanto, é importante considerar que o aumento da densidade das populações humanas nos três estados amostrados (IBGE, 2010), seguido por uma rápida transformação da

paisagem, estimulam o surgimento de áreas menos permeáveis, ou de fragmentos muito isolados, os quais criam barreiras, causando assim um grande impacto à espécie que mantém sua variabilidade genética por meio de um fluxo constante de indivíduos.

5.5 Conclusões

Apesar que na literatura é reportada uma única população para a espécie os indivíduos de cachorro-do-mato apresentam estruturação genética que corresponde às três populações amostradas; uma para Mato Grosso do Sul, uma para Goiás e uma para São Paulo. Assim cada área amostrada é única e cada uma delas contribui para a manutenção da diversidade genética da espécie. Entretanto, é importante destacar a necessidade de estudos que incluam amostragens na distribuição total da espécie para poder definir os limites de cada população.

As diferenças genéticas entre os indivíduos aumentam à medida que as distâncias geográficas aumentam, mostrando que a espécie apresenta isolamento por distância, e assim, o fluxo gênico diminui em áreas mais isoladas.

Apesar a estruturação o fluxo de indivíduos é constante entre as áreas, permitindo a manutenção da alta variabilidade genética para a espécie, assim como de valores altos de diversidade genética. As características biológicas da espécie fazem com que rios e estradas não sejam barreiras para os indivíduos.

O número de animais atropelados, e o número de alelos perdidos pelos atropelamentos (30,7% do total de alelos privados encontrados) são um problema importante para a espécie, pois com eles há uma grande perda de variabilidade genética.

Áreas com paisagens urbanas e alteradas, como a área de São Paulo, mostram reduções na diversidade genética, como reflexo dos impactos causados nos ambientes e devido a sua ausência de permeabilidade. No entanto, paisagens antropizadas, porém com maior permeabilidade, como os espaços destinados à agricultura ou a pastos para gado, permitem uma convivência sustentável com os indivíduos de cachorro-do-mato, pois estes apresentam uma alta capacidade de adaptação e hábitos generalistas.

SEÇÃO 2. ESTRUTURA GENÉTICO-POPULACIONAL DO LOBO-GUARÁ EM PAISAGENS ANTROPIZADAS DA REGIÃO CENTRO-OESTE E SUDESTE DO BRASIL.

5.6 Resultados e Discussão

Foram coletados um total de 93 indivíduos de lobo-guará: sendo seis animais em MS, 12 em GO e 75 nas áreas de SP (Tabela 5.7). Entre eles, o número total de animais atropelados e mortos foi de 13 indivíduos, 19 indivíduos foram capturados e liberados e 61 indivíduos coletados utilizando amostragem não invasiva (fezes). Para maior informação sobre a metodologia de individualização das amostras não invasivas, consultar o capítulo 1.

Tabela 5.7. Número de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) coletados nas áreas estudadas.

	Tecido	Sangue	Fezes	Total
Campo Grande-MS	6	-	-	6
Cumari-GO	1	11	-	12
EEJ-SP	-	1	11	12
PEV-SP	1	-	2	3
EEL-SP	1	-	25	26
FLONA -CB-SP	-	-	2	2
Pirassununga-SP	-	-	17	17
Rio Claro Duratex-SP	-	-	3	3
Outras	4	7	1	12
Total	13	19	61	93

As amostras de tecido de lobo-guará de outras localidades correspondem a duas amostras de tecido de animais atropelados na rodovia SP-215, entre as cidades de São Carlos e Descalvado, e mais duas amostras na SP-318, que conduz de São Carlos a Ribeirão Preto, próximo à UFSCar. As amostras de sangue com origem não especificada na tabela 5.7 são quatro amostras de animais capturados e liberados pelo Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros (CENAP): um do Parque Nacional da Serra da Canastra-MG, um em Pouso Alegre-MG, um de Itatiba-SP, e um de Monteiro Lobato-SP. As amostras restantes são de uma amostra coletada pelo projeto Pró-carnívoros, perto da cidade de Promissão - SP; um animal atropelado, tratado pelo Parque Ecológico de São Carlos (PESC) e liberado próximo da área; e uma amostra de origem desconhecida. A última amostra

de fezes, com origem desconhecida, da espécie foi coletada no *campus* de São Carlos da UFSCar.

É importante destacar que a amostra de sangue da EEJ também foi de um animal que foi atropelado, tratado pelo PESC e liberado próximo à região onde foi encontrado. Os dois indivíduos que passaram por este procedimento, apesar de serem atropelados foram considerados como capturados, pois eles voltaram para natureza e conseguem, eventualmente, se reproduzir e contribuir geneticamente para a população.

O grande número de indivíduos capturado utilizando amostras não invasivas mostra o sucesso desta técnica para a espécie. Isto foi documentado anteriormente para a espécie por Lion *et al.* (2011), que identificaram três vezes mais animais utilizando a amostras não invasivas que utilizando armadilhas.

5.6.1 Impacto dos atropelamentos

Considerando a amostragem realizada unicamente com animais atropelados (na área de MS, num total de 920 km de estrada amostrados), foi calculado um total de seis animais atropelados por ano. É necessário destacar que essa coleta não foi realizada sistematicamente e não temos o esforço amostral para a área. Entretanto, o valor encontrado é maior ao reportado para a espécie em outras áreas estudadas: nas estradas que circundam a Estação Ecológica de Águas Emendadas-GO, Rodrigues (2002) reportou uma média de 4,5 lobos-guarás atropelados por ano; enquanto que no Parque Nacional da Serra da Canastra, a média encontrada durante oito anos foi de 3,9 animais (GAMBARINI E PAULA, 2013).

Porém, a avaliação feita pela ARTESP (Agência Reguladora de Serviços Públicos Delegados de Transporte do Estado de São Paulo) reporta valores superiores aos encontrados neste estudo, aumentando a preocupação sobre a conservação da espécie. Em apenas seis rodovias, a ARTESP relatou 46 animais atropelados em cinco anos (GAMBARINI E PAULA, 2013). Inclusive, em estudos focados em atropelamentos de vertebrados, é comum encontrar registros para a espécie (por exemplo; CACERES, 2011; SARANHOLI *et al.*, 2016; ASCENSÃO *et al.*, 2017).

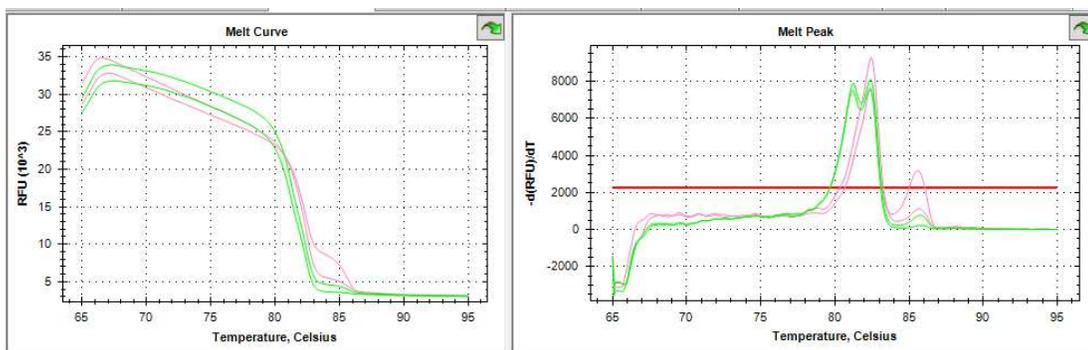
Ao comparar o número de animais encontrados na área de GO (12 indivíduos), onde o esforço amostral é grande, podemos inferir que o número de animais mortos por atropelamentos em MS (seis indivíduos) representa uma grande porção da população de lobos que ocorre na área.

Os atropelamentos já são considerados uma ameaça severa para a espécie (PAULA *et al.*, 2013), principalmente quando analisamos que, na maioria das vezes, os animais que são atropelados são indivíduos jovens em fase de dispersão. Em algumas populações estima-se que os atropelamentos sejam responsáveis pela morte de um terço à metade da produção anual de filhotes (RODRIGUES, 2002).

5.6.2 Sexagem

A técnica HRM foi satisfatória para a identificação do sexo das amostras de tecido e sangue dos lobos-guará (Figura 5.12). Do mesmo modo, a amplificação dos *primers* para a identificação do sexo das amostras de fezes foi bem-sucedida (ver capítulo 1).

Figura 5.12. Padrão das curvas de *Melting* para *Chrysocyon brachyurus*. As curvas dos machos (verde) mostraram dois picos, enquanto que as fêmeas (rosa) mostraram um único pico.



Assim, no total, foram encontrados 49 machos e 44 fêmeas de lobo-guará. O total de machos atropelados foi cinco, enquanto as fêmeas foram oito indivíduos. Dos animais capturados, 11 foram machos e oito foram fêmeas. O número de animais capturados com amostras não invasivas foi de 33 machos e 28 fêmeas (Tabela 5.8).

Incluindo os dois animais que foram atropelados, tratados e liberados foram encontrados um total de seis machos atropelados e nove fêmeas. Assim, vemos que existe um número maior de fêmeas atropeladas e que esse evento se deu na área de São Paulo. O número alto de atropelamentos em São Paulo pode ser um reflexo da ausência de recursos nos territórios onde os animais se estabeleceram e da necessidade de sair em busca desses recursos para suprir essa necessidade.

Tabela 5.8. Número de *Chrysocyon brachyurus* coletados nas áreas estudadas e considerados para análises da estrutura genético-populacional da espécie

	Tecido		Sangue		Fezes		Total	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
Campo Grande-MS	4	2	-	-	-	-	4	2
Cumari-GO	1	-	7	4	-	-	8	4
SP	-	6	3	3	33	28	36	37
Outras	-	-	1	1	-	-	1	1
Total	5	8	11	8	33	28	49	44

Foi observado que há um número maior de machos na área de Mato Grosso do Sul, onde as coletas de animais atropelados foram realizadas utilizando unicamente este tipo de amostragem. Tanto machos como fêmeas apresentam áreas de vida do mesmo tamanho (GAMBARINI E PAULA, 2013) a probabilidade maior para os atropelamentos dos machos pode ser explicada, pois os machos exploram outras áreas além dos limites dos territórios (GAMBARINI E PAULA, 2013).

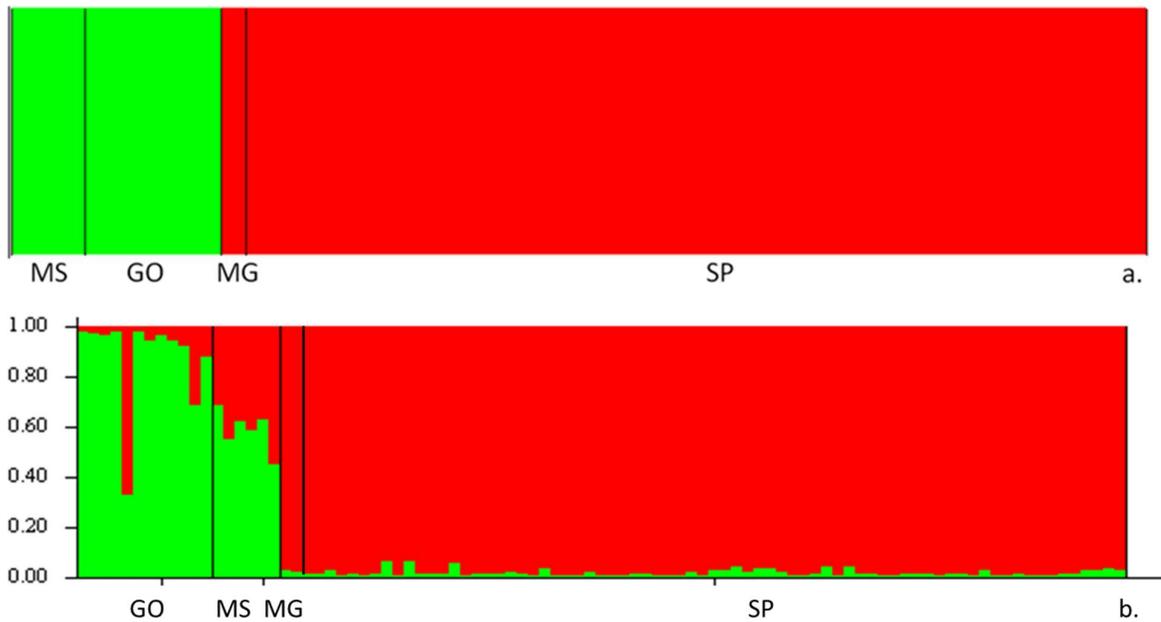
5.6.3 Estrutura populacional do lobo-guará

Nove dos onze *loci* utilizados mostraram resultados satisfatórios quando sequenciados para o lobo-guará, em que a amplificação do fragmento de interesse apresentou o *motif* de repetição tetranucleotídeo. Os *loci* 2006 e 2159, os quais apresentaram problemas para a amplificação, foram excluídos de todas as análises.

A análise de variação molecular mostrou que 84% da variância encontrada está entre os indivíduos e que 15% dela está entre as áreas amostradas. O 1% restante corresponde à variância encontrada dentro dos indivíduos.

As análises bayesianas realizadas, sem utilizar a informação da área de coleta dos indivíduos, tanto no STRUCTURE 2.3.4. (PRITCHARD *et al.*, 2000), utilizando o método de Pritchard *et al.* (2000) e de Evanno *et al.* (2005), como no BAPS 6 (CORANDER *et al.*, 2008), mostraram que a maior probabilidade é dos indivíduos pertencerem a três *clusters*. Porém, ao utilizar informações sobre o local de origem dos indivíduos os maiores valores de p ($p = 1$) foram para um $K = 2$ (Figura 5.13).

Figura 5.13. Gráfico de barras obtido pelo (a) BAPS e pelo (b) STRUCTURE com $K = 2$, representado a estruturação populacional dos indivíduos de *Chrysocyon brachyurus*.



A maioria de estudos realizados com a espécie mostra a existência de uma única população, no entanto os autores destes estudos trabalharam em áreas menores e fragmentos próximos. Por exemplo, De Mattos *et al.* (2004), utilizando marcadores proteicos, encontraram uma única população em três áreas amostradas do estado de São Paulo. Por sua parte, Lion *et al.* (2011) estudaram a espécie com marcadores microsatélites em quatro áreas no Distrito Federal e reportaram que os indivíduos pertencem a uma única população.

González *et al.* (2015b) com uma amostragem contemplando a distribuição da espécie e utilizando o gene mitocondrial do D-loop encontraram uma única população para os indivíduos que ocorrem no Brasil.

Utilizando microsatélites, Salim *et al.* (2007) e Fontoura-Rodrigues (2008), com amostragens mais abrangentes da distribuição da espécie, em áreas de GO, MG e SP, identificaram uma única população de lobos-guará, provavelmente devido à proximidade das áreas amostradas.

Para as análises de diferenciação par a par, os dois indivíduos amostrados em MG foram incluídos como parte das amostras de SP (devido à similaridade com os indivíduos dessa área), pois o número amostral da área é muito baixo. As análises de diferenciação apresentaram valores baixos para as todas as áreas, entretanto houve valores estatisticamente

significativos para a área de GO (Tabela 5.9). Os valores foram superiores para o R_{ST} entre MS e MG-SP e para o Dest entre GO e MG-SP, reforçando o a existência de duas populações.

Tabela 5.9. Diferenciação populacional par a par para *Chrysocyon brachyurus* nas áreas amostradas. A diagonal superior apresenta os valores de R_{ST} e na inferior os valores de Dest.

	MS	GO	MG-SP
MS		0.01944	0.07330
GO	0.0019*		0.05244*
MG-SP	0.0989	0.2432	

Os valores com asterisco mostraram ser significativos

Assim como o encontrado neste estudo, Salim *et al.* (2007) reportou valores menores de diferenciação entre as áreas de São Paulo e o triângulo mineiro ao comparar essas contra outras áreas: uma perto de Belo Horizonte (MG) e outra próxima ao DF em Goiás. O mesmo autor reportou diferenças significativas entre o DF (GO) e o estado de São Paulo. Igualmente, Fontoura-Rodrigues (2008) analisando amostras da espécie do DF, de SP e de MG encontrou valores de R_{ST} maiores ao comparar as áreas de SP e GO. O autor explicou que a maior diferenciação pode ser explicada devido à maior distância longitudinal que separa essas áreas. Em nosso caso, as áreas de GO e SP se encontram mais próximas entre si e MS apresenta as maiores distâncias (Figura 5.3).

Contudo, foi concluído que os indivíduos estudados pertencem a duas populações, sendo uma representada pelos indivíduos amostrados em MS e em GO e a outra representada pelos de MG e SP. A estruturação populacional aqui encontrada entre os lobos-guará provavelmente se deve às pressões do ambiente e à transformação da paisagem por ser uma estruturação recente, detectada com marcadores microssatélites e não detectada por outros autores quando realizadas análises com DNA mitocondrial. A estruturação é mais evidente entre São Paulo e os demais estados, talvez por ser um estado com intervenção industrial mais forte e mais antiga.

Mesmo que a espécie seja conhecida por possuir hábitos generalistas e considerada uma espécie que se adapta facilmente a ambientes antropizados, ela está sendo afetada pela fragmentação de habitat e mostrando estruturação genética. Pois ao tentar alcançar áreas para obter recursos, fica mais sujeita a atropelamentos, retaliação, maior contato com doenças transmitida por animais domésticos, entre outros.

Outras espécies de carnívoros reconhecidas por hábitos generalistas e alta capacidade de adaptação também mostraram estruturação em ambientes altamente antropizados (Por

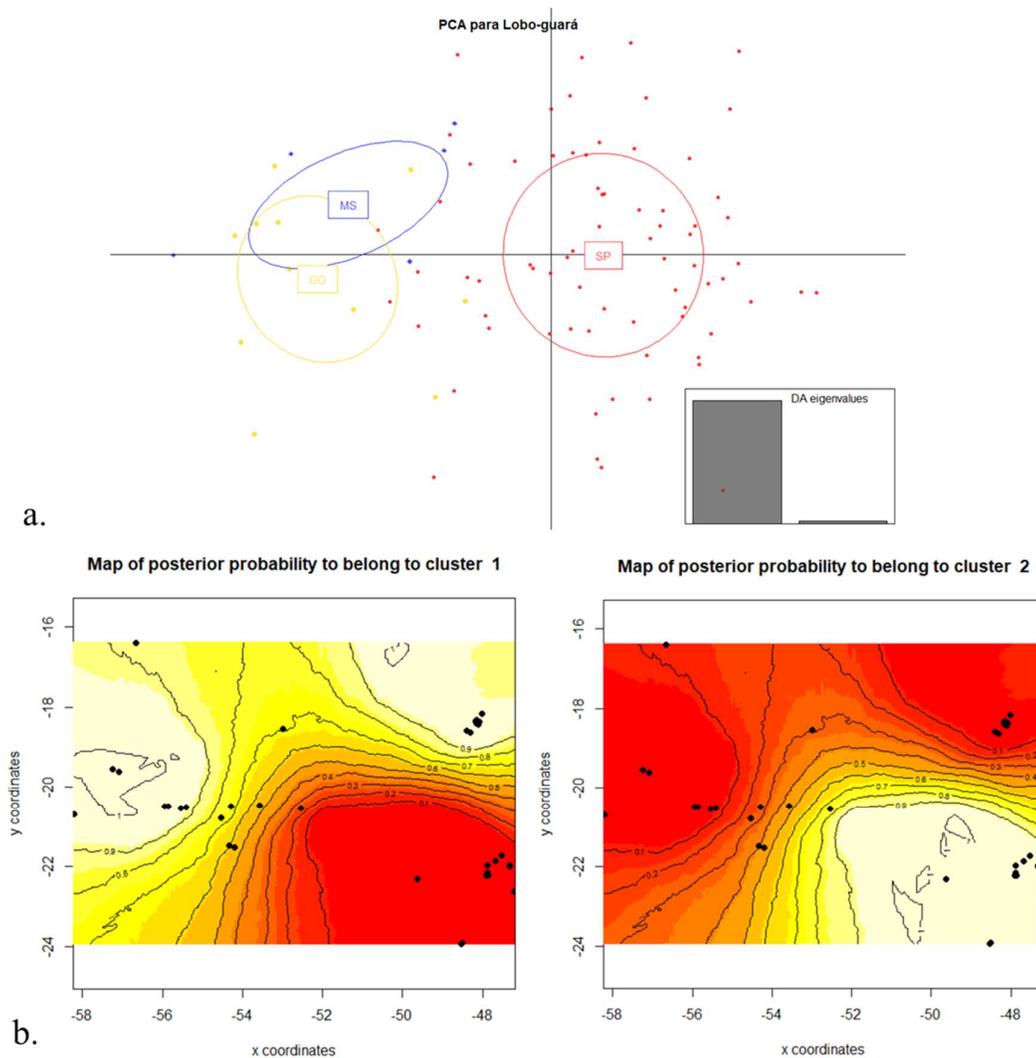
exemplo, em *Puma concolor* SARANHOLI *et al.*, 2017.; *Canis simensis* GOTTELLI *et al.*, 1994; *Panthera onca* HAAG *et al.*, 2010; e *Panthera pardus* DUTTA *et al.*, 2013). Assim, a configuração da paisagem, intensidade das mudanças ambientais, história de vida, ecologia e comportamento das espécies conduzem à diferenciação genética, incluso, de espécies de hábitos generalistas (DUTTA *et al.*, 2013).

As análises de PCA também mostraram que existe diferença entre as áreas amostradas e separou os indivíduos da área de GO dos indivíduos da área de SP (Figura 5.14). O mapa de probabilidade posterior do GENELAND também detectou os mesmos dois *clusters* para a espécie (Figura 5.14). Assim mesmo, na figura 5.14 podemos observar que a área de GO apresenta uma maior variabilidade genética entre os indivíduos amostrados na área.

Assim, a área de Goiás pode ser considerada uma área de convergência entre indivíduos de áreas não amostradas neste estudo, como por exemplo de indivíduos que ocorrem mais ao norte e ao leste, o que aumenta a variabilidade genética da espécie. Este evento parece não ser exclusivo dos lobos-guará, uma vez que indivíduos de cachorro-do-mato amostrados nesta área apresentam alelos privados que os diferenciaram do resto dos indivíduos amostrados em áreas mais ao sul e mais ao oeste (ver secção 1). No entanto, para confirmar se a afirmação anterior se cumpre para as espécies é necessário realizar mais estudos na área, assim como amostrar indivíduos de áreas localizadas mais ao norte e ao leste da área estudada.

Comparando as duas espécies estudadas nas mesmas áreas, é importante destacar que encontramos um número de populações diferentes para cada espécie. Assim para o cachorro-do-mato encontramos três populações que correspondem às áreas estudadas (Seção 1), enquanto que para o lobo-guará foram duas populações, a de SP e a de GO-MS. Acreditamos que essas diferenças são consequência da biologia própria de cada espécie, assim as áreas de vida menores e a menor capacidade de dispersão do cachorro-do-mato pode explicar o número maior de populações encontradas para a espécie.

Figura 5.14. Análises de componentes principais (PCA) entre os indivíduos estudados de *Chrysocyon brachyurus* (a). O mapa mostra a probabilidade posterior dos indivíduos para os dois clusters significativos (Cluster 1 MS e GO, Cluster 2 SP).



5.6.4 Diversidade genética das populações de lobo-guará

Assim como para o cachorro-do-mato (ver seção 1), o *locus* que se mostrou mais polimórfico para todos os 93 indivíduos de lobo-guará estudados foi o 2137 (Tabela 5.10). De maneira geral, os valores de número de alelos (N_a), número efetivo de alelos (A_e) e riqueza alélica (R_a) foram maiores para a população de MG e SP. Embora a amostragem fosse maior nesta área, podemos concluir que a diversidade é maior, pois foi utilizada a R_a que é uma medida que permite a comparação entre duas amostragens com valores amostrais diferentes.

Embora o número de alelos encontrado para o lobo-guará (tabela 5.10) seja menor que o encontrado para o cachorro-do-mato (tabela 5.4), ele ainda é um número alto, sugerindo que,

apesar das pressões sofridas pela espécie, ela ainda mantém uma variação genética alta nas áreas estudadas. No entanto, é necessário considerar que estes valores podem ser reflexo da diversidade genética histórica da espécie e, em longo prazo, a redução do fluxo gênico pode representar um risco para a viabilidade genética das populações locais. Os valores de A_e alcançam a metade do valor do N_a nas duas populações estudadas, mostrando um número grande de alelos privados na população, pois a medida de A_e está baseada na frequência alélica.

A diversidade genética, medida utilizando a heterozigosidade, mostrou valores altos para a espécie ($He = 0,646$ para MS-GO e $He = 0,737$ para MG-SP) (Tabela 5.10). Os valores obtidos foram similares ao reportados anteriormente para a espécie por outros autores: $He = 0,66$ para o DF e Belo Horizonte e $He = 0,68$ para o triângulo Mineiro (SALIM *et al.*, 2007), $He = 0,738$ para o DF e $He = 0,74$ na ESECAE (Estação Ecológica Águas Emendadas) no DF (LION, 2007), $He = 0,75$ em GO, SP e MG (FONTOURA-RODRIGUES, 2008) e $He = 0,72$ na EEJ em SP (RAMALHO *et al.*, 2014). Esses altos valores indicam que as populações da espécie não têm passado por recentes mudanças demográficas drásticas (GIRMAN *et al.*, 2001).

Ao comparar os valores apresentados pela espécie com aqueles reportados para outras espécies de canídeos sul americanos encontramos que são maiores que os apresentados pelo cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) com $He = 0,64$ (TCHAIKA, 2006) e $He = 0,682-0,714$ (Tabela 5.4), semelhantes aos apresentados pelo graxaim-do-campo (*Lycalopex gymnocercus*) com $He = 0,79$ (FONTOURA-RODRIGUES, 2008), porém menores que os apresentados pela raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), com $He = 0,81$ (FONTOURA-RODRIGUES, 2008) e $He = 0,816$ (SILVA, 2015).

Outras causas foram apontadas para explicar os valores altos de heterozigosidade na espécie. Prates (2008), afirmou que aproximadamente 15 mil anos atrás a espécie passou por um evento de gargalo seguido por uma rápida expansão populacional, corroborada por Fontoura-Rodrigues (2008). Assim, a espécie apresenta valores de diversidade nucleotídica muito baixa, porém apresenta valores de heterozigosidade altos.

Tabela 5.10. Caracterização da diversidade genética de *Chrysocyon brachyurus* nas duas populações encontradas.

		2001	2004	2010	2018	2054	2088	2132	2137	2140	Média
MS - GO	Pb	132-140	258-270	239-269	153-169	134-146	92-100	140-180	230-244	118-138	-
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	-
	Na	3	4	4	5	4	3	8	8	6	5,000
	Ae	1,497	2,906	2,502	2,769	2,689	2,561	4,000	6,000	4,408	3,259
	Ra	3	4	4	8	6	8	4	3	5	5
	HWE	0,4109	0,4409	0,7176	0,9033	0,2793	0,285	0,9528	0,9727	0,1572	-
	Ho	0,333	0,611	0,667	0,722	0,667	0,722	0,889	0,944	0,722	0,697
	He	0,332	0,656	0,600	0,639	0,628	0,610	0,750	0,833	0,773	0,646
	F_{IS}	0,064	0,118	-0,107	-0,134	0,003	-0,12	-0,191	-0,092	0,055	T=-0,053
	P(F_{IS})	0,3667	0,3306	0,3472	0,3306	0,5667	0,35	0,0639	0,3194	0,4083	0,169
MG - SP	Pb	128-140	258-270	235-273	149-169	134-150	92-104	140-172	212-256	118-166	-
	N	75	53	69	60	62	75	72	50	75	-
	Na	4	4	6	6	5	4	9	12	8	6,444
	Ae	2,878	2,301	4,262	4,020	4,083	2,758	6,400	8,929	4,452	4,454
	Ra	3,89	3,943	5,995	12	7,878	8,602	5	3,996	5,996	6,366
	HWE	0,3361	0,0006*	0,1403	0,1744	0,1118	0,4687	0,0873	0,0006*	0,1844	-
	Ho	0,653	0,453	0,681	0,717	0,694	0,733	0,778	0,660	0,880	0,694
	He	0,653	0,565	0,765	0,751	0,755	0,637	0,844	0,888	0,775	0,737
	F_{IS}	0,005	0,208	0,117	0,054	0,09	-0,144	0,085	0,266	-0,128	T=0,066
	P(F_{IS})	0,5611	0,0417	0,0361	0,2583	0,1278	0,0556	0,075	0,0028	0,0167	0,005

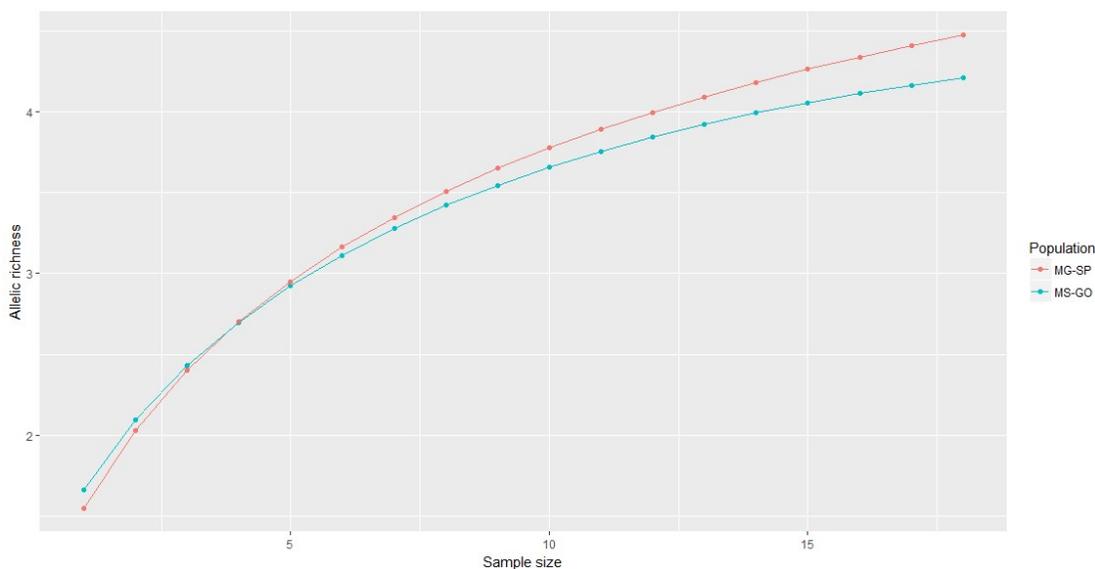
O tamanho dos alelos apresentado (Pb) não inclui os 18pb da cauda M13. *Valores significativos após correção sequencial de Bonferroni. O valor de p para o F_{IS} é: 0,002. T=valor total para área.

Valores de H_o maiores que os valores de H_e , como os encontrados na população de MS-GO, indicam um excesso de heterozigotos (Tabela 5.10). Enquanto que quando o H_e maior H_o , como foi evidenciado na população de MG-SP, são associados a déficit de heterozigotos (Tabela 5.10). Os valores de F_{IS} foram pequenos e não significativos, para as duas populações, mostrando que não há indícios desses eventos, assim como não existem indícios de endogamia ou exogamia nas populações.

Os valores de riqueza alélica, calculados para um mínimo de 18 indivíduos, foram maiores para MG-SP ($R_a= 4,472$) que para MS-GO ($R_a= 4,209$) mostrando que a primeira população apresenta maior diversidade genética. Os valores calculados de 1 até 18 mostraram ser maiores em MG-SP na maioria dos tamanhos amostrais (Figura 5.15).

Os valores calculados para o EHW não mostraram valores significativos para o desvio do equilíbrio em nenhum *locus* para a população de MS-GO. No entanto, mostraram valores significativos para dois *loci* na população de MG-SP, os *loci* 2004 e 2137 (Tabela 5.10). Os valores de F_{IS} não foram significativos para excesso ou déficit de heterozigotos para explicar o desvio do EHW. Apesar de que todos os *loci* mostraram que as frequências estimadas para os alelos nulos foram próximas a zero. O *locus* 2137 na população MG-SP foi a exceção, e por essa razão foi excluído das análises posteriores.

Figura 5.15. Riqueza alélica entre as populações de *Chrysocyon brachyurus*.



Uma vez que as forças evolutivas que causam desvios do EHW atuam em escalas locais (SUGG *et al.*, 1996), sendo diferente para cada população, podemos afirmar que a seleção

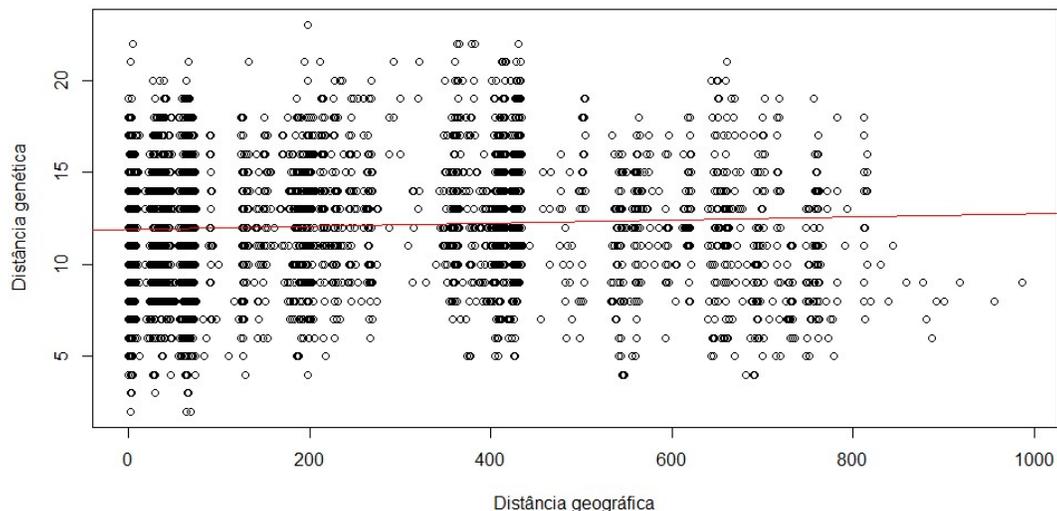
natural, a deriva genética ou a uma amostragem insuficiente podem estar influenciando a população de MG-SP. Assumindo que os *loci* utilizados são potencialmente neutros, consideramos que a seleção natural não está agindo sobre eles, desconsideramos esta força evolutiva como possível causa. Analisando os valores de F_{IS} (Tabela 5.10) vemos que o valor encontrado para o *locus* é alto ($F_{IS} = 0,208$), mostrando que pode existir um *déficit* de heterozigotos, porém o valor encontrado não foi significativo ($p = 0,0417$). Com isso, podemos afirmar que a deriva pode estar agindo sobre a população.

As análises entre os *loci* revelaram que existe desequilíbrio de ligação entre o par 2132 e 2018, entre o 2001 e o 2018 e entre o 2954 e o 2018 na população de MG-SP. Na população de MS-GO, nenhum *locus* apresentou valores significativos para o desequilíbrio de ligação. Desse modo, o *locus* 2018 também foi excluído para as próximas análises.

5.6.5 Distribuição da variação genética

O teste de mantel revelou que existe isolamento por distância nos indivíduos da espécie (Figura 5.16), assim como esperado quando avaliados os valores de diferenciação populacional (Tabela 5.9).

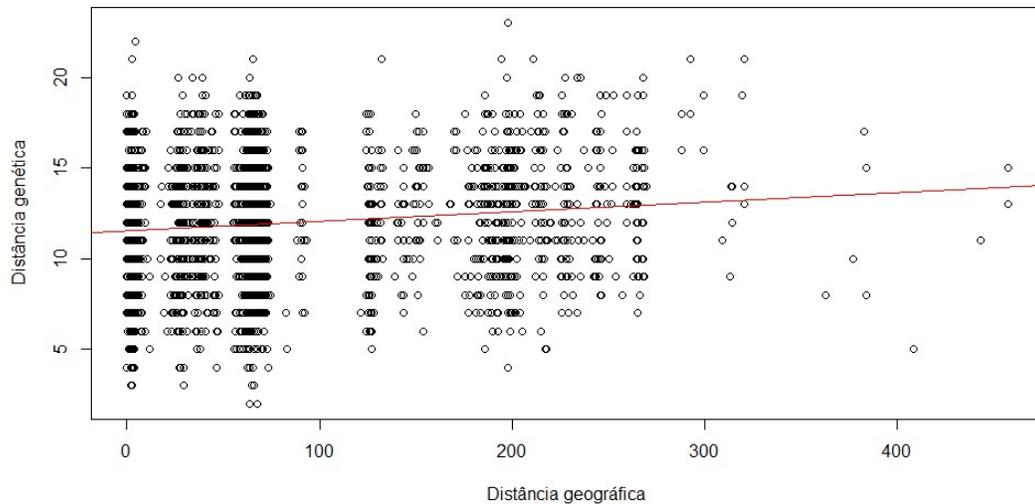
Figura 5.16. Correlação entre a distância genética e a distância geográfica dos indivíduos de *Chrysocyon brachyurus* amostrados. A linha vermelha mostra a tendência da regressão.



Quando consideradas as populações às quais os indivíduos pertencem, vimos que a população MS-GO não apresentou valores significativos para isolamento por distância ($r^2 = 0,0110$ $p = 0,2235$), enquanto que a população de MG-SP estes valores foram altos e

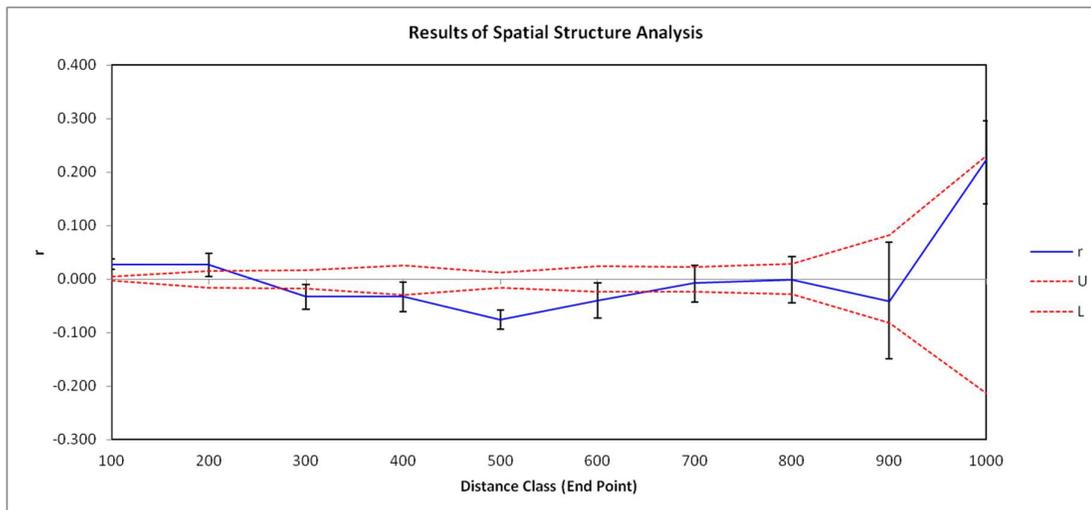
significativos ($r^2 = 0,0149$, $p < 0,01$). Considerando que a amostragem é insuficiente para o estado de Minas Gerais ($n = 2$) se assumiu que as afirmações sobre a distribuição da variação genética dos lobos-guará da população MG-SP se aplicam unicamente aos indivíduos do estado de São Paulo (Figura 5.17).

Figura 5.17. Correlação entre a distância genética e a distância geográfica dos indivíduos de *Chrysocyon brachyurus* da população de MG-SP. A linha vermelha mostra a tendência da regressão.



As análises de autocorrelação espacial mostraram que a distribuição dos indivíduos corresponde a isolamento por distância, pois, nas classes até os 200 km, os valores mostram significância para agrupamento de indivíduos com distâncias genéticas menores e entre os 300 e 600 km os indivíduos parecem se afastar dos mais aparentados. O agrupamento nos primeiros quilômetros e o afastamento nos últimos pode ser explicado porque inicialmente os lobos-guará permanecem nas famílias, mas logo mais eles dispersam para novos territórios, o que explicaria o comportamento dos dados até os 600 km. Nos valores de distância geográfica maior não houve correlação, pois os valores se comportaram igual aos esperados ao acaso, mostrando que as distâncias geográficas a partir dos 700 km não explicam a distribuição dos indivíduos (Figura 5.18).

Figura 5.18. Autocorrelação espacial (SAA) para todos os indivíduos de *Chrysocyon brachyurus* com classes de distância de 200 km. Os valores com intervalo de confiança de 95%, para a hipótese nula de que não existe estrutura espacial, estão representados pelas linhas vermelhas ponteadas.



Quando analisamos a autocorrelação espacial por populações, foi observado que os indivíduos das populações encontradas (MS-GO e MG-SP) não sofrem influência da distância geográfica, pois os dados se encontraram entre os intervalos de confiança, mostrando que a distribuição dos indivíduos na paisagem pode ser explicada ao acaso.

Apesar da influência da distância geográfica na distribuição da variação genética da espécie, não há barreiras geográficas para os indivíduos de lobo-guará. Particularmente na área de GO, esse fato foi reportado para outras espécies de canídeos, para *Lycalopex vetulus* (SILVA, 2015) não houve estruturação populacional quando avaliado o rio Araguaí e, da mesma maneira, para cachorro-do-mato (seção 1). Assim por não existir uma barreira física, se acredita que os alelos privados, que atualmente se encontram restritos a representantes de uma família na área, podem se propagar pela população e posteriormente à população de MG-SP.

Assim, foi concluído que a distância geográfica influencia o comportamento e localização dos indivíduos, porém também acreditamos que a distribuição dos indivíduos de lobo-guará e da sua variabilidade genética está determinada pela paisagem, o uso e a ocupação do solo. Paisagens mais permeáveis como áreas para agricultura e pastagens para gado permitem mais facilmente o deslocamento de animais (FAHRIG, 2003; 2007; RIBEIRO *et al.*, 2016). Dessa maneira, se acredita que a diferença na paisagem, sendo mais alterada no estado de São Paulo, influencia na capacidade de deslocamento dos indivíduos da espécie.

A influência da paisagem sobre a distribuição e deslocamento dos indivíduos pode estar intensificando os efeitos da deriva sobre a população. A distância euclidiana (distância em linha reta) pode não ser tão importante na hora de determinar a localização e a movimentação dos indivíduos. Deste modo, a resistência da paisagem e a distância percorrida para chegar de um ponto a outro, utilizando as áreas mais permeáveis, são mais importantes para a espécie.

Segundo González *et al.*(2015b) utilizando dados do D-loop, a espécie de lobo-guará apresenta sinais de expansão populacional. No entanto, nossos dados mostram um comportamento contrário, com evidencia para diminuição no tamanho populacional, que pode ser explicado pelas mudanças e a transformação da paisagem.

O teste de Wilcoxon mostrou valores de *bottleneck* significativos na população de MS-GO, somente com o modelo de alelos infinitos. No entanto, consideramos que este não é o modelo para explicar nossos dados, sendo que somente o alelo 2140 mostrou esse comportamento quando analisados os gráficos das frequências alélicas. Por essa razão, foi considerado que esta população não sofreu gargalos populacionais recentes (Tabela 5.11).

Tabela 5.11. Verificação dos gargalos populacionais nas populações encontradas para os indivíduos de *Chrysocyon brachyurus* estudados.

	Modelo IA	Modelo SM	Modelo TPM
MS-GO	0,02344	0,81250	0,10938
MG-SP	0,00781	0,03906	0,00781

Modelo de alelos infinitos (IA), *Stepwise mutation* (SM) e *two phase mutation* (TPM).

Na população de MG-SP foi evidenciada uma situação diferente, sendo que todos os modelos apontaram para um evento de gargalo populacional recente. Foi concluído assim que a população de lobos-guará de São Paulo sofreu uma redução considerável do tamanho populacional, durante no mínimo uma geração, levando assim a redução da diversidade genética e mostrando evidências da ação da deriva genética, como apontado pelos valores apresentados na tabela 5.10.

A outra espécie de canídeo estudada no estado, o cachorro-do-mato, não mostrou evidências de eventos de redução populacional recente. Apesar das duas espécies serem consideradas generalistas, o cachorro-do-mato parece suportar melhor as pressões sofridas pelas mudanças ambientais.

Populações fragmentadas apresentam maior risco de extinção local devido a eventos estocásticos ambientais, genéticos ou demográficos (FRANKHAM *et al.*, 2008). Entre os eventos genéticos, são citados o aumento do efeito da deriva genética e a diminuição da variabilidade genética (FRANKHAM *et al.*, 2008). Considerando o anterior, podemos afirmar

que a população de lobos-guará de São Paulo está sendo afetada pela fragmentação e sofrendo consequências genéticas.

Tem sido argumentado que áreas protegidas em paisagens fragmentadas são muito importantes, pois agem como amortecedores contra os impactos antropogênicos (NOSS *et al.*, 1996; RYLANDS E BRANDON, 2005; SHIVIK, 2006). Mesmo que as amostras de lobo-guará da população de São Paulo foram coletadas, em sua maioria, em unidades de conservação e em estradas próximas às unidades, encontramos indícios de populações fragmentadas, e ação da deriva genética. Isto não indica que as unidades de conservação não estejam cumprindo sua função, porém pode ser um indicio de que as áreas protegidas não são suficientes para a manutenção de um número grande de espécies, ou espécies como carnívoros, as quais apresentam necessidades maiores de território e recursos. Outra explicação, que não exclui a anterior, é que as pressões antropogênicas externas são tão fortes que conseguem atingir as unidades de conservação.

O comportamento generalista da espécie (DEVICTOR *et al.*, 2008; LYRA-JORGE *et al.*, 2010) e a capacidade de viver em regiões com baixa qualidade de habitat (COELHO *et al.*, 2008; LYRA-JORGE *et al.*, 2008) permite-a explorar locais deslocando-se entre várias áreas, incluindo as áreas protegidas e as que não são e que inclusive more em elas. Nossos dados mostram que indivíduos que ocorrem em áreas fragmentadas não ficam restritos aos fragmentos de vegetação nativa e exploram a região como um todo, assim como reportado para outras espécies de carnívoros de grande e médio porte (DE AZEVEDO, 1996; FRANKLIN *et al.*, 1999; DONADIO *et al.*, 2001; LYRA-JORGE *et al.*, 2008).

Considerando o anterior, a necessidade de conservação não se restringe às áreas protegidas, mas também a conectividade da paisagem. Esta necessidade de corredores para a conectividade deve buscar ligar todas as áreas onde a espécie ocorre, conectando as unidades de conservação entre elas, assim como com outras áreas não protegidas. Tem sido demonstrado para grandes carnívoros que identificar os corredores com menor custo para conectar populações remotas de espécies em perigo facilita a conservação numa escala maior (HUCK *et al.*, 2010; RABINOWITZ E ZELLER, 2010).

Pires *et al.* (2000) baseados nas características ecológicas e comportamentais da Puma (*Puma concolor*) e do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) têm desenhado possíveis corredores ecológicos para conectar a estação ecologia de Itirapina e a do Jataí, assim como outras unidades de conservação da região com áreas não protegidas numa extensão de 18 km no estado de São Paulo. Considerar as informações dadas pelos autores não somente

ajudariam manter o fluxo e a variabilidade genética da espécie como também contribuiriam à conservação de outras espécies com menores necessidades ecológicas e dos Biomas nos que estas espécies habitam.

5.6.6 Número de indivíduos migrantes

Apesar da estruturação detectada para a espécie e a fragmentação do habitat, os indivíduos de lobo-guará mantêm níveis altos de diversidade genética e fluxo gênico. O número de indivíduos que migram com sucesso entre as populações encontradas foi ($Nm = 0,5217$). Valores menores que um são considerados baixos, pois apesar de que, inicialmente, foi argumentado que um indivíduo migrante por geração é suficiente para prevenir diferenciação populacional devido à deriva e permitir adaptações locais (WRIGHT, 1931; SLATKIN, 1987), este valor foi calculado sobre alguns pressupostos que não se cumprem em populações naturais, tais como tamanho de censo igual ao tamanho efetivo, e probabilidade igual para qualquer migrante de qualquer subpopulação, existindo assim equilíbrio entre fluxo gênico e deriva genética.

Assim, tem sido sugerido que valores maiores de Nm são necessários para equilibrar a ação da deriva genética em populações reais (MILLS E ALLENDORF, 1996), assim como quando se busca a conservação da diversidade no nível de alelos (GREENBAUM *et al.*, 2014), e especialmente quando as populações estão sujeitas a flutuações populacionais (VUCETICH E WAITE, 2000), como é no caso do lobo-guará. Deste modo, tem sido recomendado um mínimo de 1 e um máximo de 10 indivíduos migrantes por geração para manter a conectividade das populações (MILLS E ALLENDORF, 1996), sugestão testada e aprovada por Wang (2004).

As análises para atribuição dos indivíduos confirmaram que as duas populações compartilham indivíduos. Do mesmo modo, ao estimar os migrantes, os dados revelaram que, entre as duas populações detectadas (MS-GO e MG-SP), há oito indivíduos migrantes. Considerando que o programa detecta somente indivíduos migrantes de primeira geração, o valor calculado corresponde a uma única geração. Assim, o valor se encontra entre o que foi sugerido por Mills e Allendorf (1996) e por Wang (2004), e mostra que existe migração e que esta tem permitido a manutenção da variabilidade genética da espécie.

Outros autores que trabalham com carnívoros com alta capacidade de deslocamento têm reportado presença de fluxo gênico entre as populações e entre 1 - 10 indivíduos migrantes que se reproduzem por geração. Entretanto os mesmos autores argumentam que estes valores

são baixos para superar os efeitos da deriva genética e evitar a estruturação populacional (DUTTA *et al.*, 2013; MCMANUS *et al.*, 2015; TENSEN *et al.*, 2016). Assim, tem sido discutido que são necessários mais de 10 indivíduos migrantes por geração para manter o fluxo gênico (VUCETICH E WAITE, 2000).

Três indivíduos foram identificados como migrantes da população de MS-GO para MG-SP e cinco no sentido contrário. Acreditamos que o maior valor se deve à maior representatividade no número de animais coletados na área e não a uma maior migração neste sentido. Assim, podemos afirmar que não foi evidenciada uma dinâmica de fonte-sumidouro entre as populações detectadas. Entretanto, podemos afirmar que o estado de conservação da área e a perda de diversidade evidenciada na população de São Paulo podem conduzir a uma população sumidouro, onde a variação genética será perdida.

Um dos indivíduos identificados como migrantes de primeira geração de MS-GO é o indivíduo que apresenta maior probabilidade de pertencer a população de MG-SP quando realizada análise de estruturação populacional com o programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.* 2000) (Figura 5.13 b). O anterior demonstra mais uma vez, e de maneira mais clara, o fluxo constante de indivíduos entre as duas populações identificadas.

É também importante destacar que os animais migrantes, que podem manter o fluxo gênico levando os alelos entre as populações muitas vezes são mortos, principalmente, por atropelamentos e, portanto, retirados da população. A estruturação e a ausência de fluxo gênico podem levar a endogamia nas populações e, conseqüentemente, a aumentar o risco de extinções locais. Tem sido provado que populações pequenas em paisagens altamente antropizadas, mesmo com altas taxas de migração, podem ser extintas em 100 anos (SWEANOR *et al.*, 2000).

Assim, vemos que, apesar da existência de fluxo de indivíduos entre as duas populações detectadas, a necessidade de realizar planos para manutenção da espécie que contemplem a conservação da diversidade genética é urgente, principalmente ao considerar a população de São Paulo. Por sofrer mais com as pressões antropogênicas e com mudanças históricas e recentes nos tamanhos populacionais, essa população pode ter seu risco de extinção aumentado. A detecção de sinais de *bottleneck* recente, e as evidências da ação da deriva genética, já são conseqüências desse processo.

5.7 Conclusões

Podemos concluir que, apesar da espécie possuir hábitos generalistas e ser considerada uma espécie que se adapta facilmente a ambientes alterados, ela está sendo afetada pela fragmentação de hábitat, pelas pressões antropogênicas e mostrando consequências biológicas como é a diferenciação genética.

Na literatura é reportada uma única população para a espécie, no entanto, neste estudo foram achadas duas populações: uma que inclui indivíduos dos estados de São Paulo e a região do triângulo mineiro (Minas Gerais) e outras com indivíduos de Mato Grosso do Sul e Goiás. É necessário utilizar amostras que incluam a distribuição geográfica completa da espécie, para saber quais os limites das populações encontradas, se existem mais populações da espécie e como elas se encontram distribuídas espacialmente.

É importante considerar e destacar a importância do fluxo de indivíduos constante que existe entre as populações, não só no lobo-guará, mas também no cachorro-do-mato. Assim, apesar de existir áreas fragmentadas o fluxo gênico permite que as populações não fiquem isoladas, permitindo a manutenção da variabilidade genética.

O número de indivíduos de lobo-guará atropelados tem um impacto importante para a espécie, principalmente quando considerada a perda de alelos raros ou privados que se dá quando morre um indivíduo. Do mesmo modo, as populações encontradas podem ficar isoladas se o número de atropelamentos é muito alto ou simplesmente muito frequente.

Os tamanhos dos fragmentos não foram tão importantes para a espécie como se acreditava, porém o estado de conservação da paisagem e o nível de permeabilidade causaram fortes impactos na diversidade genética da espécie. Assim, paisagens mais alteradas, mais antropizadas e menos permeáveis tiveram um maior efeito sobre as populações. Uma paisagem como a que apresenta o estado de São Paulo mantém populações com menores valores de diversidade genética, mostrando efeitos da deriva genética e com evidências de eventos de reduções populacionais importantes como é o gargalo populacional detectado. Isto leva a considerar o estado de São Paulo como prioritário para implementar ações que ajudem na conservação da espécie.

A biologia e ecologia da espécie podem explicar a recente diminuição populacional encontrado em São Paulo como consequência da fragmentação e degradação da paisagem. Por essa razão, a outra espécie estudada, o cachorro-do-mato, ainda não apresentou evidências mesmo ocorrendo na mesma paisagem. Assim, concluímos que os tamanhos populacionais

menores que os do cachorro-do-mato, e os hábitos solitários dos lobos-guará podem ser os que melhor explicam as consequências genéticas da alteração da paisagem sobre a espécie.

6 CAPÍTULO 3: RELAÇÕES DE PARENTESCO EM CACHORRO-DO-MATO E LOBO-GUARÁ

6.1 Introdução

Os métodos para análises de parentesco se dividem em duas categorias principais: relações de parentesco e análises de paternidade (BLOUIN, 2003). Os primeiros trazem informações de coancestria, que permitem inferir sobre dispersão limitada por sexo e estrutura genético espacial dentro e entre populações, enquanto que os segundos permitem estabelecer as relações entre os indivíduos permitindo realizar inferências sobre o comportamento social, o sistema de acasalamento e a estrutura familiar de uma espécie.

Os marcadores microsatélites têm sido amplamente utilizados, principalmente, para avaliar as relações de parentesco. Eles permitem estudar a distribuição de cada um dos indivíduos na paisagem avaliando possíveis correlações entre a disposição espacial e as relações genéticas. Entre os estudos utilizando esta abordagem podemos destacar os que avaliaram autocorrelações espaciais e testes de mantel (Por exemplo. DOUBLE *et al.*, 2005; STANTON *et al.*, 2015).

As análises de paternidade utilizando marcadores moleculares também têm sido amplamente utilizadas. Entretanto, Blouin (2003) afirma que a ecologia e a evolução poderiam extrair muitas informações dos pedigrees das populações naturais. Seguindo essas recomendações, alguns estudos têm explorado as questões sobre os sistemas de acasalamento, dispersão e sistemas sociais em espécies selvagens (Por exemplo; TABERLET *et al.*, 1997; GOOSSENS *et al.*, 2005; ZHAN *et al.*, 2007; MIÑO *et al.*, 2011; STANTON *et al.*, 2015).

As espécies de canídeos tornam-se interessantes para realizar ambas as análises uma vez que apresentam: i) alta capacidade de dispersão, ii) diferentes sistemas sociais e, iii) o sistema de acasalamento monogâmico é comum dentro desta família (KLEIMAN, 1977), enquanto que é uma característica rara dentro da classe mamíferos, sendo que unicamente 5 a 10% das espécies desta classe o apresentam (KLEIMAN, 1977; DOBSON *et al.*, 2010).

Duas espécies de canídeos que apresentam sistemas sociais e de acasalamento diferentes são o cachorro-do-mato e o lobo-guará. O cachorro-do-mato é uma espécie gregária, sendo que os indivíduos da espécie são encontrados principalmente em grupos familiares (MONTGOMERY E LUBIN, 1978), enquanto que os lobos-guará são solitários (GAMBARINI E PAULA, 2013).

Embora as duas espécies formam um casal para toda a vida (KLEIMAN, 2011) cada uma delas apresenta um sistema de acasalamento: os cachorros-do-mato apresentam monogamia obrigatória (REIS *et al.*, 2011), enquanto que os lobos-guará são monogâmicos facultativos (RODDEN *et al.*, 2004).

Dentro desse contexto, neste capítulo nos propusemos utilizar marcadores microssatélites para avaliar a estrutura genético espacial das duas espécies e possíveis limitações de dispersão ligadas ao sexo em uma área antropizada do estado de Goiás, assim como confirmar algumas observações realizadas em campo por observação com os dados moleculares.

6.2 Hipóteses

O comportamento de dispersão por machos jovens em mamíferos é comum (REIS *et al.*, 2011), já as fêmeas usualmente exibem comportamentos filopátricos (REIS *et al.*, 2011). Assim acreditamos que as fêmeas apresentam maiores valores de parentesco entre elas e, pela dispersão preferencial em machos, os valores de parentesco apresentados entre eles serão menores. Além disso, acreditamos que os valores médios de parentesco genético dos indivíduos de famílias conhecidas pelas observações ecológicas serão maiores que o valor encontrado para todos os indivíduos analisados.

6.3 Material e métodos

6.3.1 Área de estudo

Durante os anos de 2012 a 2016 foram coletadas amostras de cachorro-do-mato e lobo-guará, numa área de 12000 ha. A área se encontra localizada entre os municípios de Cumari (GO) e Araguari (MG), entre as coordenadas -18.320/-18.427 e -48.080/-48.180. A maior parte dela pertence a fazendas de gado, com 90% da extensão coberta por pasto (*Brachiaria* sp.) e o 10% restante por pequenos remanescentes de vegetação natural, como mata ciliar e cerrado *sensu stricto*.

6.3.2 Obtenção das amostras

Para a coleta de amostras do cachorro-do-mato e do lobo-guará foi estabelecida uma parceria com o Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado (PCMC). O PCMC vem acompanhando os canídeos da área desde 2009 realizando coleta de dados ecológicos, biológicos e etológicos das espécies alvo deste estudo e da raposa-do-campo (*Lycalopex*

vetulus). O programa realiza capturas das espécies e coleta dados biométricos, amostras de sangue e biopsias para estudos de: parasitas, estresse, avaliação de conflitos com humanos e animais domésticos, assim como análises genéticas.

Para as capturas dos cachorros-do-mato foram utilizadas armadilhas tipo *Tomahawk*TM (Figura 6.1a), enquanto que para as dos lobos-guará foram desenhadas especialmente para a espécie armadilhas tipo gaiola de arame galvanizado e com portas de fechamento de guilhotina acionadas por uma plataforma (Figura 6.1b).

As armadilhas foram distribuídas ao longo da área de estudo, utilizando dados de ocorrência dos indivíduos previamente coletados pelo PCMC, com armadilhas fotográficas e observações noturnas das espécies. No final da tarde os dois tipos de armadilhas eram abertos e iscados (com sardinha) e ao amanhecer checados. Com isso, pretendia-se aproveitar o pico de atividade das espécies, assim como evitar desidratação e/ou golpe de calor dos animais que fossem eventualmente capturados.

Figura 6.1. (a) *Cerdocyon thous* capturado em armadilha *Tomahawk*TM. (b) *Chrysocyon brachyurus* em armadilha desenhada para coleta da espécie. Os dois indivíduos aguardam a liberação após coleta de material de sangue.



Fonte: Rodriguez-Castro, Karen 2014

Fonte: Rocha, Fabiana 2013

Para este estudo foram coletadas amostras de sangue em tubos Vacutainer® com EDTA dos animais capturados. Além das amostras de sangue, também foram coletadas amostras de animais eventualmente atropelados em áreas próximas à estudada e amostras de fezes. Todas as amostras coletadas foram armazenadas a -20°C e se encontram no banco de tecidos do laboratório de Biodiversidade e Conservação. O local de captura ou de atropelamento foi georreferenciado utilizando um GPS.

É necessário destacar que a coleta das amostras biológicas foi realizada por um veterinário, legalmente autorizado, especialista em animais silvestres, que priorizou a saúde do animal.

Assim mesmo, as coletas de animais atropelados encontram-se de acordo com os preceitos da Lei 11.794, de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de São Carlos (CEUA/UFSCAR) segundo o número UFSCAR CEUA 1165130815. Este projeto também foi autorizado pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBIO para transporte de amostras das duas espécies sobre o número 38613-3.

6.3.3 Extração de DNA e amplificações

O DNA total das amostras de sangue e de tecido foi extraído utilizando o protocolo de fenol-cloroformio descrito por Sambrook *et al.* (1989). A amostra de fezes foi extraída utilizando o Kit QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen) próprio para este tipo de amostras, seguindo as recomendações do fabricante. Após a extração, 11 *loci* microssatélites (2001, 2004, 2006, 2010, 2018, 2054, 2088, 2132, 2137, 2140 e 2159) descritos, inicialmente, para cachorro-doméstico (FRANCISCO *et al.*, 1996) foram utilizados para amplificação das duas espécies. Os *primers* heterólogos foram testados anteriormente em espécies de canídeos sul-americanos mostrando resultados positivos (FONTOURA-RODRIGUES *et al.*, 2008), e previamente em estudos com as duas espécies de interesse (TCHAICKA, 2006; SALIM *et al.*, 2007; LION *et al.*, 2011; MANNISE *et al.*, 2012; RAMALHO *et al.*, 2014). Adicionalmente, os *primers* foram amplificados e sequenciados para confirmar sua especificidade e o *motif*.

Para aumentar a eficiência das genotipagens foi utilizada uma cauda universal de 18 pares de bases (cauda M13), marcada com um fluoróforo, na região 5' do *forward* de todos os *primers*, (SCHUELKE, 2000). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1% e genotipados no sequenciador automático ABI 3130 da Applied Biosystems. Para análises dos genótipos foi utilizado o *software* Geneious R8 (Biomatters Ltd.).

As PCRs foram realizadas incluindo: 0,2 μ M de dNTPs; 1X do buffer tris-KCl (Tris-HCl 20 mM pH 8,4 e KCl 50mM); 2,5 mM de MgCl₂ (50 mM, Invitrogen); 0,2 pmol do *primer Forward*; 0,8 pmol do *primer reverse* e da fluorescência para marcar a cauda M13; 0,5 unidade de *Taq* Polymerase Platinum (Invitrogen); 50 ng do DNA molde e água ultrapura (q.s.p) para volume final de 10 μ L. Para amplificação das amostras de fezes foi utilizada uma unidade de *Taq* Polymerase Platinum (Invitrogen) e, adicionalmente, 0,25mg/mL de BSA (Bovine Serum Albumin).

A amplificação dos produtos foi iniciada com uma desnaturação a 94°C durante 1 minuto; seguida de 27 ciclos de amplificação a 94°C por 1 minuto, 58°C (59°C para o *locus* 2010 ou 60°C para o *locus* 2132) por 45 segundos, 74°C por 1 minuto; e 8 ciclos para incorporação do fluoróforo à cauda M13 de 94°C durante 30 segundos, 53°C por 45 segundos e 72°C a 45°C; e uma extensão final de 10 minutos a 72°C. As amplificações foram realizadas em termociclador Veriti 96 (Applied Biosystems).

6.3.4 Caracterização das populações

Inicialmente foi avaliada a subestruturação populacional em cada uma das espécies estudadas. Para isso, foi utilizado o *software* STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000) e o *software* BAPS 6 (Bayesian Analysis of Population Structure) (CORANDER *et al.*, 2008) que utilizam inferência bayesiana para estabelecer o número de populações às quais as amostras pertencem. Para as análises foram utilizados dois modelos; o de admixture que assume que os indivíduos podem ter origem em distintas populações, e o modelo que assume que as frequências alélicas estão correlacionadas, pois as populações divergiram de um ancestral comum. O número de populações dado pelo programa STRUCTURE foi verificado utilizando os métodos de Pritchard *et al.* (2000) e Evanno *et al.* (2005).

Análises de componentes principais (PCA) também foram realizadas utilizando o programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006) buscando resumir a diversidade genética das populações.

6.3.5 Caracterização dos *loci* microssatélites

A existência de desvios na frequência observada da combinação entre os alelos de um par de *loci* analisados foi avaliada para testar desequilíbrio de ligação no programa Genepop 4.6 (RAYMOND E ROUSSET, 1995). Outro parâmetro que foi analisado, neste mesmo programa, foi o equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE). A correção sequencial de Bonferroni (BENJAMINI E YEKUTIELI, 2001) foi utilizada para corrigir os valores de *p* desta análise, pois o trabalho com microssatélites é uma análise multivariada.

O índice de endocruzamento F_{IS} foi calculado no programa FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001) para avaliar o desvio das frequências esperadas no HWE para os genótipos heterozigotos (TEMPLENTON, 2006), utilizando os valores de *p larger* (pL) quando encontrados valores para excesso de heterozigotos na população, e o *P smaller* (pS) quando

foi evidenciado *déficit*. Para verificar a presença de alelos nulos utilizamos o *software* Micro-checker (VAN OOSTERHOUT *et al.*, 2004).

Valores de diversidade genética também foram calculados utilizando a riqueza alélica (Ra) no *software* FSTAT 2.9.3 (GOUDET, 2001), o número de alelos (Na), o número efetivo de alelos (Ae), e a heterozigiosidade observada (Ho) e a esperada (He) para cada *locus* no programa GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006).

6.3.6 Análises de parentesco

Para conhecer o poder de discriminação dos *loci* microssatélites utilizados foi calculada a probabilidade de identidade (P_{ID}), a probabilidade de identidade quando os indivíduos são relacionados ($P_{ID (sib)}$) e a probabilidade de exclusão (PE) no *software* GenAlEx 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006). A P_{ID} calcula a probabilidade de dois indivíduos não relacionados, tirados ao acaso dentro da população estudada, apresentarem o mesmo perfil *multilocus* (PAETKAU *et al.*, 1995). O PE calcula a probabilidade de exclusão da paternidade em três situações diferentes: (i) quando se conhece os pais (PE1), (ii) quando falta o genótipo de um dos pais (PE2) e (iii) quando nenhum dos pais é conhecido (PE3). Os valores totais para PI foram obtidos multiplicando os valores de cada *locus*, e a probabilidade combinada de exclusão foi calculada utilizando a fórmula proposta por Jamieson e Taylor (1997):

$$P = 1 - (1 - P_1)(1 - P_2)(1 - P_3) \cdots (1 - P_k)$$

onde k é o número de *loci* utilizados.

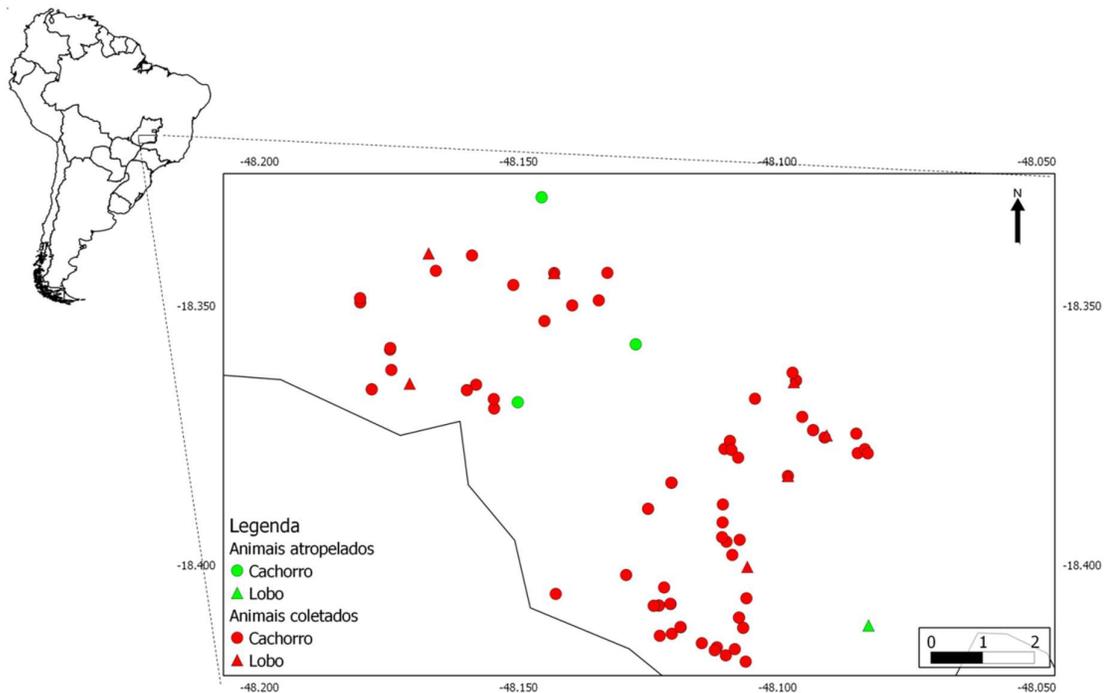
O valor de parentesco dos indivíduos foi calculado utilizando o *software* ML-relate (KALINOWSKI *et al.*, 2006) utilizando estimadores de máxima verossimilhança (WAGNER *et al.* 2006). O valor de parentesco (r), uma medida que utiliza o número de alelos compartilhados sobre o valor total dos alelos, considerando a identidade por descendência entre os indivíduos (BLOUIN, 2003). No programa, a estimativa de parentesco é calculada utilizando a máxima verossimilhança e utiliza também uma correção para alelos nulos, comuns em estudos com microssatélites. Vários estudos apontam que as estimativas de máxima verossimilhança são mais precisas para calcular valores de parentesco quando comparadas com outros estimadores, como são os estimadores de *momentum* (MILLIGAN, 2003; WAGNER *et al.*, 2006; WANG, 2007; 2011).

O valor de parentesco foi utilizado para comparar os valores médios das famílias conhecidas pelas observações ecológicas *versus* o valor médio encontrado para a população em cada uma das espécies. Este valor também foi comparado considerando as distâncias geográficas e o sexo dos indivíduos para testar estrutura genético-espacial das duas espécies e possíveis limitações de dispersão ligadas ao sexo.

6.4 Resultados e Discussão

Foram analisadas 80 amostras de cachorro-do-mato, sendo 75 de animais capturados, quatro de animais que foram atropelados e mortos e uma amostra de fezes. Além disso, foram capturados 11 lobos-guará e um animal da espécie atropelado, somando um total de 12 indivíduos para a área. O mapa mostra a localização onde os indivíduos foram capturados ou atropelados, dependendo o caso (Figura 6.2).

Figura 6.2. Pontos de coleta das amostras no estado de Goiás (Brasil) para *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus*.



Fonte: Elaborado pela autora

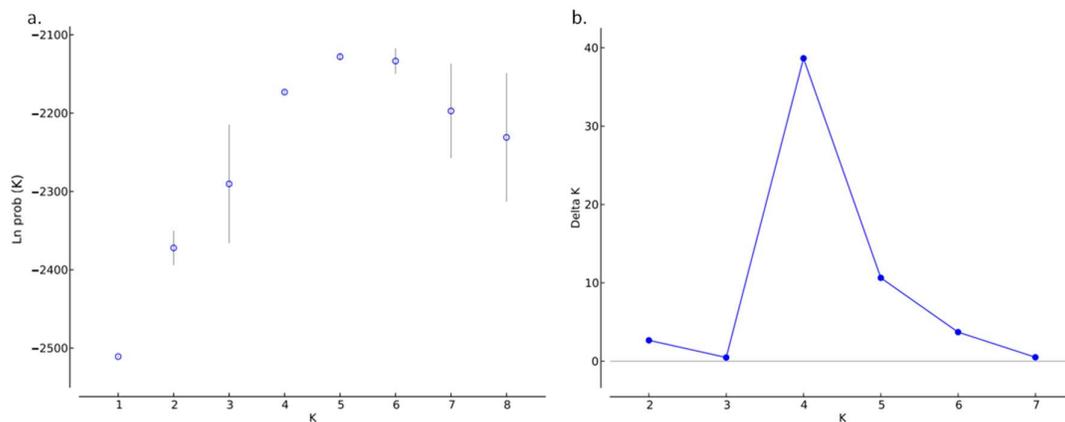
Todas as amostras tiveram o DNA extraído e amplificadas para nove *loci* microssatélites (2001, 2004, 2010, 2018, 2054, 2088, 2132, 2137, 2040), com exceção de quatro amostras de cachorro-do-mato que amplificaram menos de seis *loci* microssatélites. As quatro amostras

foram excluídas das próximas análises por não amplificar 70% dos *loci*, como recomendado por Beja-Pereira *et al.* (2009).

6.4.1 Estrutura populacional

Os 80 indivíduos de cachorro-do-mato estudados pertencem à subespécie do clado sul (mais informações na seção 1 do capítulo 2). As análises bayesianas destes indivíduos no programa BAPS (CORANDER *et al.*, 2008) revelaram que os indivíduos pertencem a um único *cluster*, entretanto as análises com o *software* STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000) mostraram que estes pertencem a quatro *clusters* diferentes (Figura 6.3). Considerando que os cachorros-do-mato pertencem a uma única população, baseados nos resultados do BAPS e do capítulo 2, podemos assumir que esta estrutura representa uma subestruturação, que pode chegar a se tratar de grupos familiares, que são evidenciados ao aumentar a resolução e o poder estatístico das análises (CHENG *et al.*, 2013), como ilustrado por Willems *et al.* (2012).

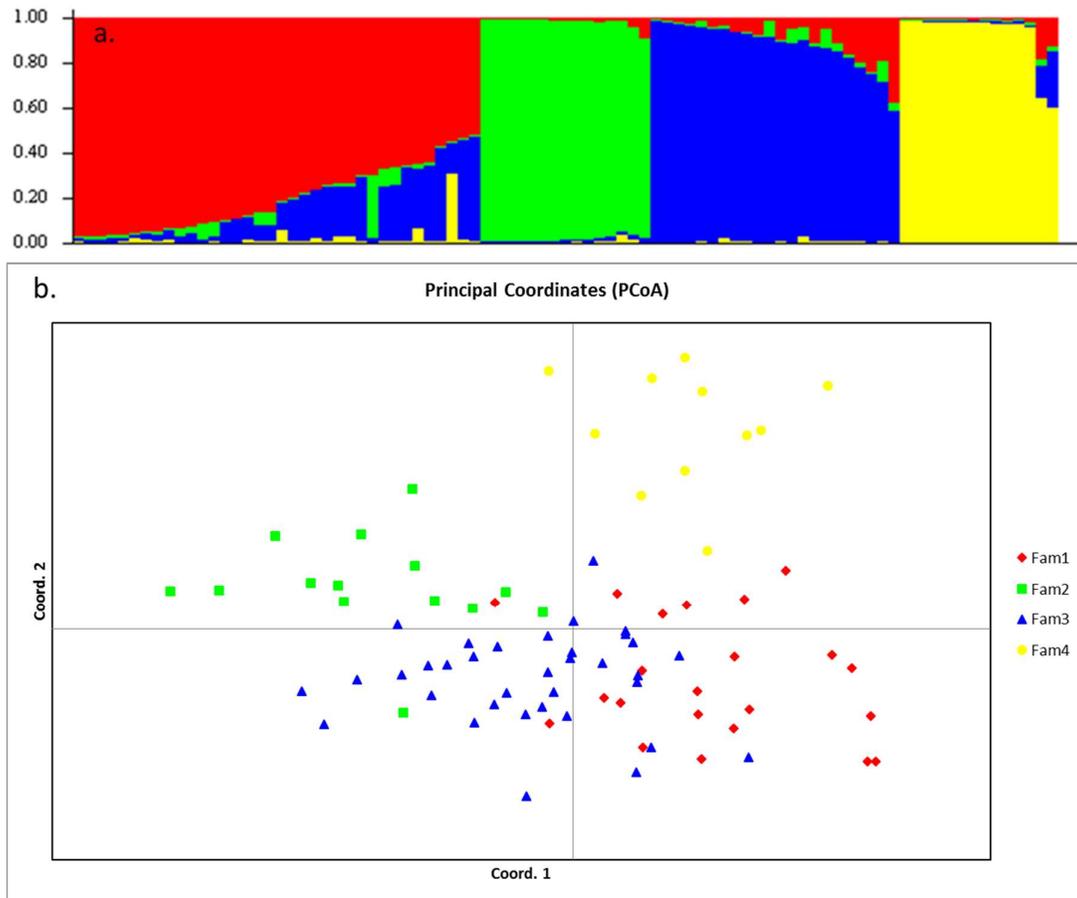
Figura 6.3. Número de subpopulações encontradas na área de Goiás para *Cerdocyon thous*. O gráfico representa (a) o método de Pritchard *et al.* (2000) e (b) o método de Evanno *et al.* (2005).



Entre as quatro subpopulações, a 1 e 3 mostraram uma variação maior e, aparentemente, estão formadas por indivíduos mais diferentes entre eles. No entanto, a subpopulação 2 e 4 apresentaram um número menor de indivíduos e maior similaridade entre eles (Figura 6.4). Análises realizadas com valores diferentes de K (3 - 8) mostraram que os indivíduos das subpopulações 2 e 4 sempre se mantiveram agrupados, enquanto que os indivíduos das subpopulações 1 e da 3 se reagruparam ou se subdividiram, podendo chegar a mostrar que as subpopulações 2 e 4 podem ser considerados uma família.

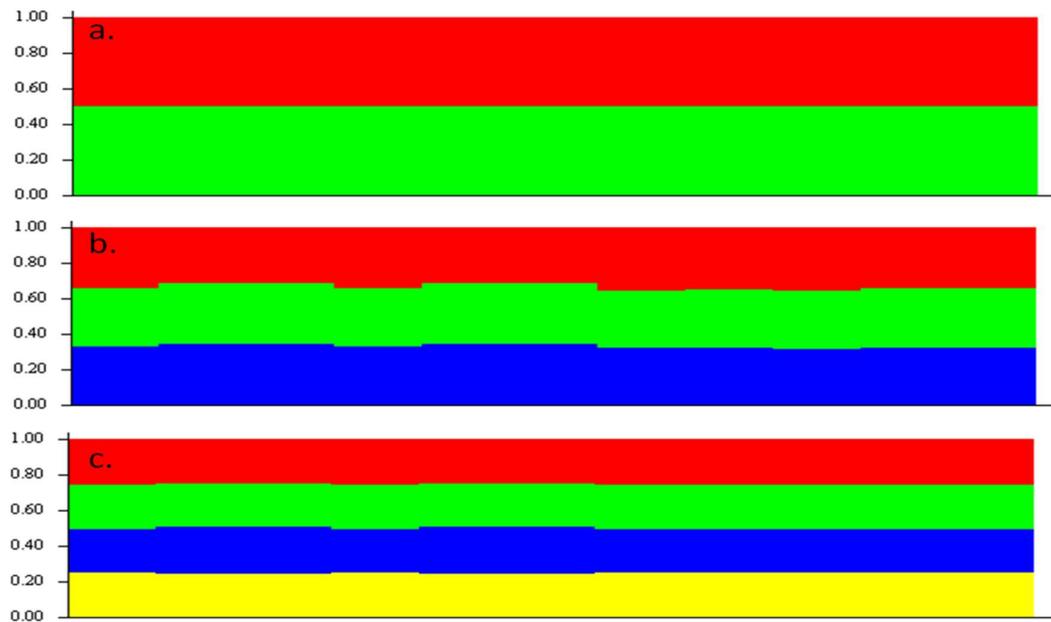
É necessário considerar que análises agrupando os indivíduos por ano de coleta, sexo ou local de origem não mostraram nenhum tipo de agrupamento ou *cluster*, mostrando que os grupos obtidos não correspondem a este tipo de informação.

Figura 6.4. Gráfico de barras obtido pelo (a) STRUCTURE com $K=4$, representado a subestruturação populacional de *Cerdocyon thous*. (b) Análises de componentes principais (PCA) das subpopulações encontradas.



Ao contrário dos resultados para os cachorros-do-mato, ao analisar os indivíduos de lobo-guará observamos que a maior probabilidade é para um $K = 1$ utilizando as análises bayesianas nos dois programas, ou seja, todos eles pertencem a uma única população não sendo possível detectar subestruturação familiar (Figura 6.5).

Figura 6.5. Gráfico de barras obtido pelo STRUCTURE com (a) K=2, (b) K=3 e (c) K=4 para *Chrysocyon brachyurus*.



6.4.2 Diversidade populacional

Dois valores mostraram significância para desequilíbrio de Hardy Weiberg no *locus* 2137 (Tabela 6.1). O mesmo *locus* não mostrou valores significativos para os valores de F_{IS} , mostrando que não há excesso ou *déficit* de heterozigotos. Entretanto, o *locus* não foi excluído das análises posteriores, pois acreditamos que o desvio encontrado seja devido ao efeito Wahlund (HARTL *et al.*, 1997), uma vez que os indivíduos desta subpopulação (Subpopulação 1) mostraram mudar de agrupamento quando utilizados diferentes valores de K.

De modo geral as subpopulações não apresentaram valores significativos para excesso ou *déficit* de heterozigotos pelo valor do F_{IS} (Tabela 6.1), mostrando que geneticamente não há evidencias de endogamia ou exogamia dentro das subpopulações e/ou os indivíduos da área.

Apesar dos valores de F_{IS} não apresentarem significância para nenhuma das subpopulações, duas delas, a 2 e a 4, mostraram valores positivos maiores a 0,10 (Tabela 6.1). O valor pode estar refletindo a estruturação mais forte e as relações familiares mais fortes encontradas nela quando realizadas as análises bayesianas no programa STRUCTURE. Entretanto acreditamos que essa estruturação não será causadora de isolamento populacional, pois, aparentemente, não existem barreiras espaciais ou temporais para a espécie dentro da área estudada.

Tabela 6.1. Caracterização dos *loci* microssatélites das subpopulações de *Cerdocyon thous* da área de GO.

<i>Locus</i>	2001	2004	2010	2018	2054	2088	2132	2137	2140	Média
Subpopulação 1										
HWE	1,000	0,089	0,222	0,676	0,703	0,271	0,021	0,0001*	0,706	-
F _{IS}	-0,090	-0,365	-0,031	0,372	0,040	-0,132	-0,043	-0,175	0,109	T=-0,008
P(F _{IS})	0,500	0,031	0,516	0,001	0,462	0,194	0,493	0,223	0,281	0,463
Subpopulação 2										
HWE	1,000	0,188	0,385	0,079	0,026	0,198	0,281	0,396	0,068	-
F _{IS}	-0,110	-0,362	-0,361	0,055	-0,194	-0,307	-0,207	-0,067	0,305	T=-0,129
P(F _{IS})	0,581	0,095	0,073	0,488	0,156	0,176	0,135	0,521	0,056	0,036
Subpopulação 3										
HWE	0,003*	0,058	0,005	0,001*	0,799	0,029	0,223	0,0002*	0,766	-
F _{IS}	0,102	0,011	0,201	-0,022	-0,142	0,056	-0,119	0,076	0,462	T=0,063
P(F _{IS})	0,250	0,521	0,021	0,481	0,025	0,358	0,114	0,257	0,0014	0,019
Subpopulação 4										
HWE	0,047	1,000	0,451	0,792	0,315	0,047	0,929	1,000	0,501	-
F _{IS}	1,000	-0,216	-0,325	-0,096	-0,409	-0,143	-0,212	1,000	-0,006	T=-0,103
P(F _{IS})	0,044	0,508	0,117	0,743	0,057	0,300	0,413	0,047	0,648	0,068

*valores significativos após correção sequencial de Bonferroni. O valor de p para o F_{IS} é: 0,00139. T=valor total para área.

Os indivíduos de lobo-guará da área amostrada não mostraram valores significativos para desvio de Hardy Weiberg (Tabela 6.2), indicando que as frequências genotípicas se mantêm constantes entre as gerações. Do mesmo modo, é uma evidência de que os acasalamentos se produzem ao acaso. Esta última afirmação é reforçada ao analisar os valores de F_{IS} (Tabela 6.2) que não mostraram significância estatística para endogamia ou exogamia genética.

Tabela 6.2. Caracterização dos *loci* microssatélites dos indivíduos de *Chrysocyon brachyurus* da área de GO.

	2001	2004	2010	2018	2054	2088	2132	2137	2140	Média
HWE	0,559	0,023	0,444	0,874	0,833	0,624	0,832	1,000	0,072	-
F _{IS}	0,018	0,206	0,148	-0,253	-0,006	-0,128	-0,163	-0,136	0,12	T=-0,022
P(F _{IS})	0,589	0,217	0,328	0,161	0,611	0,45	0,244	0,322	0,311	0,422

*Valores significativos após correção sequencial de Bonferroni. O valor de p para o F_{IS} é: 0,00556. T=valor total para área.

Foram encontrados valores para desequilíbrio de ligação entre os pares 2010 e 2137 e o 2132 e 2018 para os cachorros-do-mato. Adicionalmente, os *loci* 2137 e 2018 mostraram valores significativos para desvio de HWE em alguma subpopulação. Assim, as análises subsequentes foram realizadas sem eles para corrigir os dois desvios. Do mesmo modo, os pares 2132 e 2054, 2004 e 2088, e 2004 e 2018 para os lobos-guará mostraram valores significativos para desequilíbrio de ligação e, os *loci* 2054 e 2004 desequilíbrio de HWE. Assim, para esta espécie o *locus* 2054 foi excluído, pois mostrou valores menores para diversidade genética e o 2004, pois mostrou desequilíbrio de ligação com dois *loci* diferentes.

6.4.3 Distribuição espacial das relações de parentesco

Os valores encontrados para probabilidade de identidade ($P_{ID} = 5,54 \times 10^{-7}$ cachorro-do-mato e $P_{ID} = 4,5 \times 10^{-6}$ lobo-guará) e para a probabilidade de identidade quando os indivíduos são relacionados ($P_{ID (Sib)} = 0,003$ cachorro-do-mato e $P_{ID (Sib)} = 0,005$ lobo-guará) foram considerados satisfatórios para a identificação e individualização dos indivíduos de ambas as espécies. Valores de PI inferiores a 0,001 são considerados suficientes (PAETKAU *et al.*, 1998; WAITS *et al.*, 2001) e demonstram que as análises foram conduzidas maneira confiável.

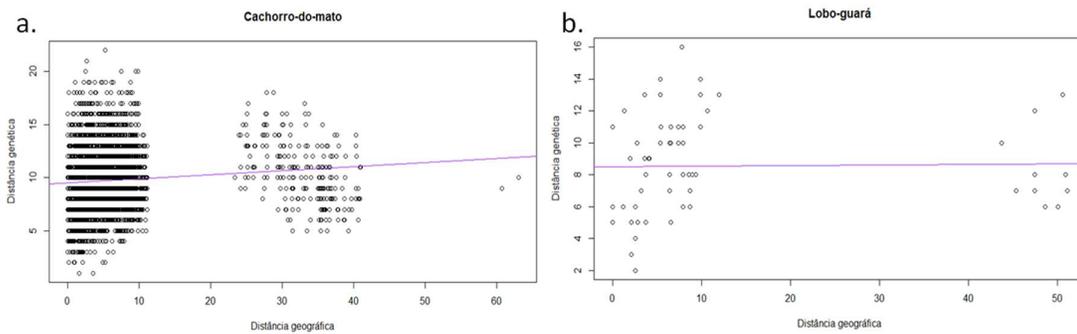
Os valores de probabilidade de exclusão combinada (PCE), para todas as situações: quando se conhecem os pais (PE1), quando falta o genótipo de um dos pais (PE2) e quando nenhum dos pais é conhecido (PE3) mostraram valores relativamente altos (Tabela 6.3). o valor de PCE também mostrou valores satisfatórios, demonstrando que o painel de *primers* utilizado é útil, não só para estimativas de variabilidade genética e de estruturação das espécies de canídeos, como também para calcular as relações de parentesco entre os indivíduos das duas espécies.

Tabela 6.3. Valores da probabilidade de exclusão (PE) por *locus* nas duas espécies.

<i>Cerdocyon thous</i>				<i>Chrysocyon brachyurus</i>			
<i>Locus</i>	PE1	PE2	PE3	<i>Locus</i>	PE1	PE2	PE3
2001	$2,3 \times 10^{-1}$	$1,1 \times 10^{-1}$	$3,6 \times 10^{-1}$	2001	$2,1 \times 10^{-1}$	$8,3 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-1}$
2004	$4,5 \times 10^{-1}$	$2,8 \times 10^{-1}$	$6,4 \times 10^{-1}$	2010	$3,3 \times 10^{-1}$	$1,7 \times 10^{-1}$	$5,1 \times 10^{-1}$
2010	$4,7 \times 10^{-1}$	$2,9 \times 10^{-1}$	$6,6 \times 10^{-1}$	2018	$3,3 \times 10^{-1}$	$1,8 \times 10^{-1}$	$4,9 \times 10^{-1}$
2054	$5,6 \times 10^{-1}$	$3,8 \times 10^{-1}$	$7,4 \times 10^{-1}$	2088	$2,8 \times 10^{-1}$	$1,6 \times 10^{-1}$	$4,1 \times 10^{-1}$
2088	$3,5 \times 10^{-1}$	$1,9 \times 10^{-1}$	$5,3 \times 10^{-1}$	2132	$5,7 \times 10^{-1}$	$3,9 \times 10^{-1}$	$7,7 \times 10^{-1}$
2132	$5,2 \times 10^{-1}$	$3,4 \times 10^{-1}$	$7,0 \times 10^{-1}$	2137	$5,7 \times 10^{-1}$	$3,9 \times 10^{-1}$	$7,5 \times 10^{-1}$
2140	$7,0 \times 10^{-1}$	$5,4 \times 10^{-1}$	$8,7 \times 10^{-1}$	2140	$5,1 \times 10^{-1}$	$3,3 \times 10^{-1}$	$7,1 \times 10^{-1}$
PCE	0,9906	0,9303	0,9996		0,9770	0,8682	0,9984

As análises de correlação realizadas entre as distâncias genéticas e as distâncias geográficas mostraram que existe correlação positiva entre as duas variáveis (Figura 6.6). Apesar dos valores serem pequenos para cachorro-do-mato ($r^2 = 0,0096$), eles se mostraram significativos ($p \ll 0,001$), entretanto para os lobos-guará estes valores não mostraram significância ($r^2 = 0,0003$; $p = 0,88$) (Figura 6.6).

Figura 6.6. Distância genética em função da distância geográfica para todos os indivíduos de (a) *Cerdocyon thous* e (b) *Chrysocyon brachyurus* amostrados em Goiás.

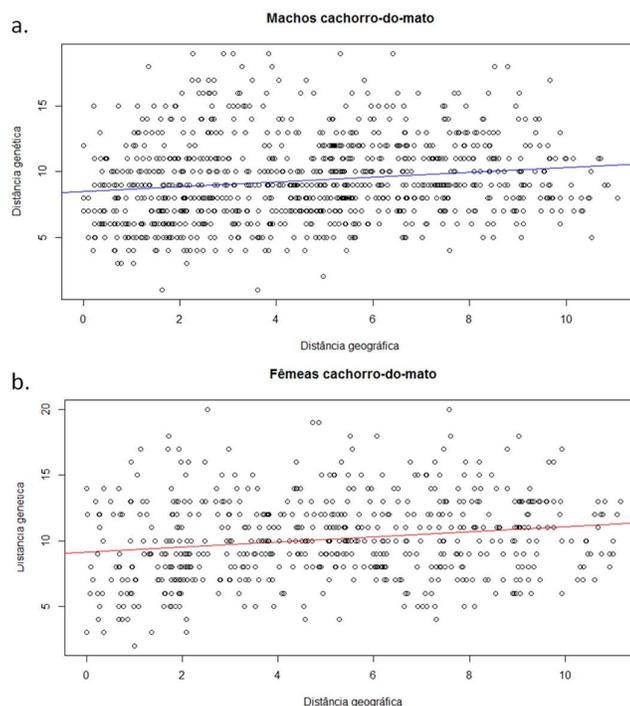


As análises mostraram que os valores de correlação e de significância estatística se mantiveram ao excluir os indivíduos coletados em distâncias inferiores a 15 km. Estes indivíduos foram excluídos devido a que não foram coletadas amostras em todas as distâncias geográficas.

Ao analisar as correlações considerando o sexo dos indivíduos amostrados, foi observado que a disposição na área dos indivíduos, tanto dos machos como das fêmeas de cachorro-do-mato, parece ser altamente influenciada pelas distâncias geográficas. Assim, indivíduos mais aparentados se localizam mais próximos do que aqueles que são menos relacionados, sem importar o sexo dos indivíduos (Figura 6.7). Os valores de correlação para ambos mostraram ser positivos ($r^2 = 0,025$ para machos e $r^2 = 0,033$ para fêmeas) e altamente significativos ($p < 0,01$) para os dos sexos (Figura 6.7).

O número baixo de indivíduos amostrados para o lobo-guará não permitiu realizar regressões lineares por sexo, pois acreditamos que o número de animais poderia interferir no poder estatístico das análises. No entanto, o número de lobos-guará que ocorrem na área não é muito diferente do número de animais capturados, principalmente, se é considerado que os animais da área são monitorados durante vários anos e que a grande maioria dos lobos-guará da área foram coletados.

Figura 6.7. Distância genética em função da distância geográfica para os indivíduos de *Cerdocyon thous* (a) machos e (b) fêmeas amostrados em Goiás com distâncias geográficas menores a 15 km.



Os valores de F_{IS} calculados para estabelecer se existe endogamia ou exogamia entre os indivíduos do mesmo sexo não mostraram valores altos positivos ou negativos e nenhum deles foi significativo, reafirmando que não há filopatria ou dispersão preferencial para nenhum dos sexos nas duas espécies estudadas (Tabela 6.4).

Tabela 6.4. F_{IS} por sexo para avaliar indícios de endogamia ou exogamia na população.

		2001	2004	2010	2140	2132	2054	2088	Todos
<i>Cerdocyon thous</i>	Machos	0,026	-0,183	0,101	-0,037	-0,107	-0,132	0,134	-0,036
	P(F_{IS})	0,493	0,021	0,150	0,350	0,168	0,075	0,093	0,132
	Fêmeas	0,163	0,121	-0,011	-0,061	0,069	0,048	0,019	0,043
	P(F_{IS})	0,139	0,125	0,532	0,268	0,239	0,346	0,532	0,104
		2001	2010	2137	2140	2132	2088	2018	Todos
<i>Chrysocyon brachyurus</i>	Machos	0,125	0,354	-0,204	0,097	-0,126	-0,424	-0,228	-0,060
	P(F_{IS})	0,364	0,186	0,236	0,471	0,432	0,239	0,386	0,250
	Fêmeas	-0,200	-0,286	0,053	0,250	-0,263	0,200	-0,412	-0,091
	P(F_{IS})	0,839	0,539	0,600	0,418	0,468	0,468	0,343	0,307

Na maioria de mamíferos são reportados padrões de dispersão assimétrica, onde os machos dispersam ao alcançar a maturidade sexual e as fêmeas apresentam comportamentos filopátricos (DOBSON, 1982; REIS *et al.*, 2011). Além disso, para lobos-guará foram

reportadas fêmeas que mostraram comportamentos filopátricos durante a dispersão de juvenis, em um parque protegido da Bolívia (EMMONS *et al.*, 2012), embora este comportamento não seja reportado em outras áreas de ocorrência da espécie (GAMBARINI E PAULA, 2013).

Estudos sobre dispersão igualitária para machos e fêmeas foram apresentados para outras espécies de canídeos. Em cães-selvagens-africanos (*Lycaon pictus*), o número de machos e fêmeas que dispersam é similar (GIRMAN *et al.*, 1997), mesmo que as distâncias percorridas pelos indivíduos de cada sexo sejam diferentes, sendo maiores para os machos (GIRMAN *et al.*, 2001). No cachorro-vinagre (*Speothos venaticus*), a comparação dos valores de parentesco médio entre machos e fêmeas não mostraram diferenças significativas, sugerindo que não existe dispersão preferencial por parte de algum dos sexos (BARRAGÁN, 2015).

Entretanto, em locais onde as densidades são altas ou onde as áreas circundantes estão altamente antropizadas os padrões de dispersão mostraram diferenças em relação ao esperado. Assim, Kamler *et al.* (2013) num estudo realizado com telemetria e marcadores genéticos reportaram que indivíduos da raposa-orelhas-de-morcego (*Otocyon megalotis*) mostraram maiores distâncias de dispersão para fêmeas, quando se esperava um padrão de dispersão maior para machos. Do mesmo modo, o lince-euroasiático (*Lynx lynx*) apresenta dispersão preferencial em machos, no entanto, foi observado que numa área altamente modificada os machos da espécie tentavam migrar, mas regressavam à sua área natal, pois nas áreas circundantes não haviam recursos suficientes para seu estabelecimento (ZIMMERMANN *et al.*, 2007).

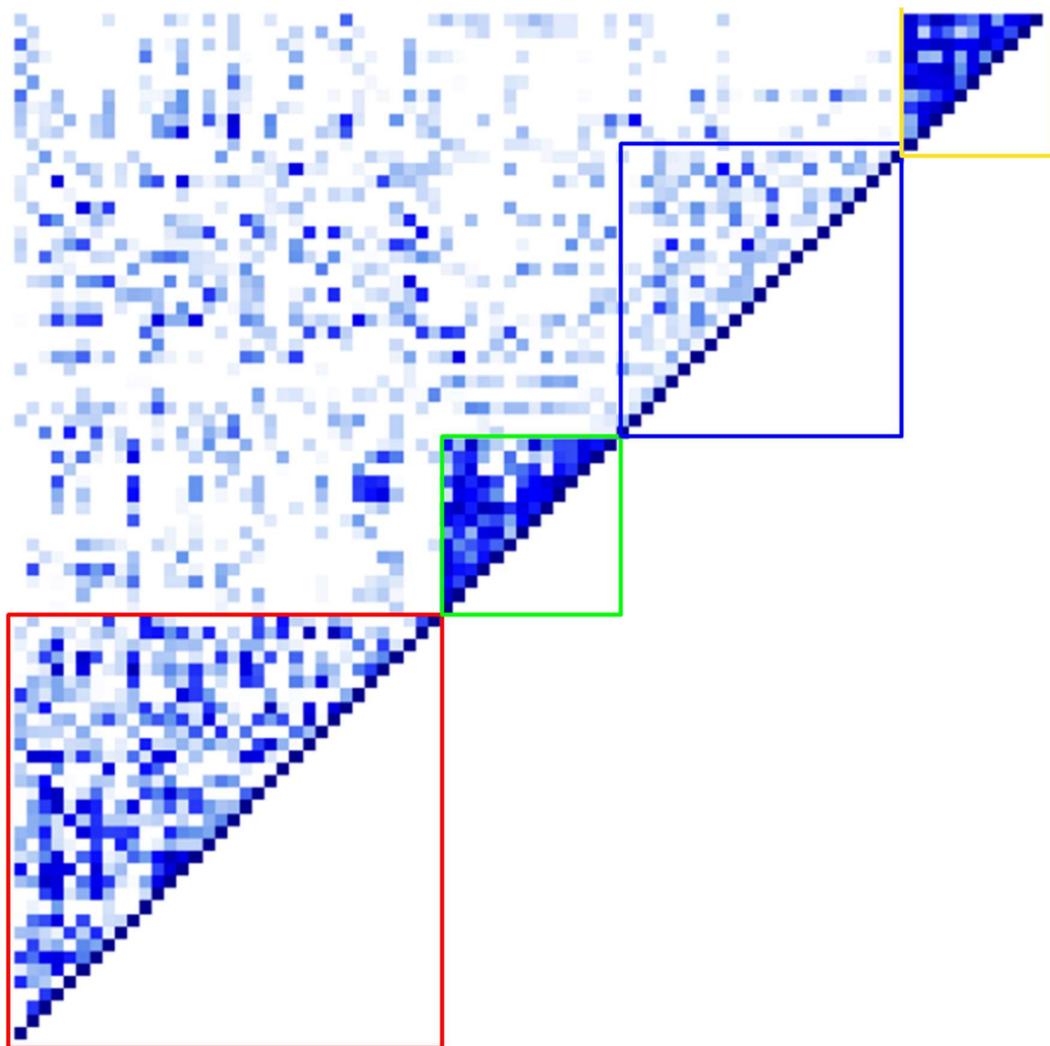
Assim, podemos concluir que a os indivíduos de cachorro-do-mato e lobo-guará são fortemente influenciados pela distância geográfica, como já tinha sido reportado para ambas as espécies, por Tchaicka (2006) para o cachorro-do-mato e por Prates (2008) para o lobo-guará. Entretanto, nenhuma das espécies apresenta filopatria ou dispersão preferencial para nenhum dos sexos, mas este comportamento pode estar influenciado pela alteração da paisagem circundante e pela fragmentação encontrada nesta área.

6.4.4 Relações de parentesco dentro das subpopulações de *Cerdocyon thous*

Ao analisar as relações de parentesco dos indivíduos de cachorros-do-mato dentro das subpopulações encontradas nas análises populacionais (Figura 6.4), foram encontrados valores altos entre todos os indivíduos analisados. Entretanto esses valores foram maiores dentro das subpopulações 2 e 4. Assim, é possível concluir que apesar da existência da

subestruturação, também existem valores de relações altos entre indivíduos que não pertencem a elas, sugerindo que na área estudada essas não se encontram separadas ou isoladas, e que existe fluxo de indivíduos entre elas e, conseqüentemente, fluxo gênico (Figura 6.8). Considerando o comportamento e o sistema de acasalamento monogâmico da espécie, esperávamos que a maioria dos indivíduos amostrados pertencesse a famílias. Assim como, se esperava encontrar indivíduos com baixa ou nenhuma relação de parentesco, que seriam aqueles que estariam chegando à população.

Figura 6.8. Relações de parentesco entre todos os indivíduos de *Cerdocyon thous* da área de Goiás. As cores escuras indicam relações de parentesco maiores, ou seja, animais mais relacionados, e as claras menores relações. As cores dos quadrados correspondem às utilizadas para representar as subpopulações encontradas nas análises populacionais.



Ao analisar os dados genéticos considerando as informações ecológicas obtidas pelo PCMC foi possível evidenciar que a subpopulação 2, identificada somente com os dados

genéticos, corresponde a uma família que tem sido amplamente monitorada pelo programa. O valor de parentesco médio desta família alcança valores consideravelmente maiores ($r \bar{X} = 0,4249$) quando comparados com a população total ($r \bar{X} = 0,0994$). Do mesmo modo, quando analisado o valor médio para a subpopulação 4 encontramos que este é de $r \bar{X} = 0,5183$. Isto permite concluir que os dados genéticos correspondem aos dados ecológicos e que as informações genéticas obtidas da área contribuem ao melhor entendimento da espécie.

Acreditamos que o fato da família 2 ter sido acompanhada mais de perto e possuir uma maior quantidade de informações ecológicas e biológicas, reflete na quantidade de material biológico da família, da facilidade para sua obtenção e, conseqüentemente, nos resultados da estrutura genético-populacional mais definida. Também é possível que os indivíduos dessa família mantenham um maior domínio do território na área.

Dentro das outras duas subpopulações encontramos valores médios de relação de parentesco maiores ao encontrado na população, mas muito menores aos encontrados dentro das duas subpopulações enunciadas anteriormente (subpopulação 1 $r \bar{X} = 0,1979$; subpopulação 4 $r \bar{X} = 0,1703$). Isto confirma que as relações entre as subpopulações 2 e 4 são muito mais fortes que as encontradas nas subpopulações 1 e 4.

6.4.5 Relações de parentesco dos indivíduos de *Chrysocyon brachyurus*

Os doze indivíduos de lobos-guará pertenceram a duas famílias, com exceção de dois indivíduos que mostraram valores de parentesco de zero, indicando ser não relacionados, pois não compartilham alelos por descendência com nenhum dos indivíduos analisados.

As informações genéticas correspondem às observações realizadas em campo pelo PCMC. Os valores meios de parentesco são maiores dentro das famílias detectadas ($r \bar{X} = 0,6360$ e $r \bar{X} = 0,6644$) que para o total da população estudada ($r \bar{X} = 0,2458$).

Os valores médios entre as duas famílias identificadas são consideravelmente mais altos que os encontrados para toda a população de lobos-guará da área estudada, como é esperado. Ao calcular o valor médio entre os indivíduos não relacionados encontramos que é muito menor que o valor médio para todos os indivíduos encontrados ($r \bar{X} = 0,0119$), mostrando que estes indivíduos podem vir de outras áreas. A capacidade de deslocamento da espécie permite o movimento de animais entre áreas distantes, aumentando assim a variabilidade genética e evitando a endogamia, como tem sido observado com os valores altos de heterozigosidade e F_{IS} (Tabela 6.2).

É importante destacar que na área de Goiás um indivíduo de lobo-guará apresenta o maior e o menor alelo para o *locus* 2132, e que estes dois alelos são privados e exclusivos de uma família da área. Os dois alelos pertencem a uma fêmea identificada durante as observações de campo como mãe de uma ninhada, e a seus filhotes. Este dado é um claro exemplo de como os alelos são transmitidos de geração em geração e como estes, eventualmente, pode se espalhar pela população. A probabilidade de que dois alelos diferentes tenham surgido na área de Goiás é baixa, levando a pensar que estes alelos podem ter vindo de populações localizadas geograficamente mais ao norte ou ao leste da população estudada. Ressaltamos que estes alelos não foram encontrados em nenhuma das populações estudadas nos capítulos anteriores.

O valor médio encontrado para os cachorros-do-mato ($r \bar{X} = 0,0994$) foi muito menor que o encontrado para os lobos-guará ($r \bar{X} = 0,2458$), isto pode ser devido ao número de animais coletados em cada uma das áreas e ao comportamento que as duas espécies apresentam. Também acreditamos que o comportamento dos lobos guará pode aumentar os valores médios de parentesco, uma vez que os animais aparentados se encontram em áreas próximas, como foi observado nas análises de distribuição espacial, mesmo que o lobo-guará apresente um comportamento solitário.

6.5 Conclusões

Os indivíduos de cachorro-do-mato e lobo-guará são fortemente influenciados pela distância geográfica chegando a apresentar isolamento por distância entre os indivíduos das espécies.

Não existe evidencia de filopatria ou dispersão preferencial para nenhum dos sexos em nenhuma das espécies, mas esse padrão encontrado pode estar sendo influenciado pela fragmentação e alteração da paisagem circundante, reduzindo o sucesso de deslocamento da espécie.

As observações ecológicas e biológicas realizadas em campo puderam ser corroboradas com as análises genéticas mostrando correspondência entre as duas análises.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Todos os estudos realizados utilizando amostras não invasivas precisam começar pela confirmação da espécie para evitar inferências e conclusões erradas sobre as espécies, e aumentar assim a confiança nos resultados. Do mesmo modo, as confirmações tornam-se indispensáveis quando se trabalha com amostras de animais atropelados, ou com indivíduos que perdem as características taxonômicas diagnósticas. A confirmação molecular tem mostrado ser uma ferramenta útil e eficiente em ambos os casos.

O número de amostras encontradas, principalmente nas unidades de conservação, é uma evidência de que a abordagem não invasiva junto com as análises moleculares permitem realizar estudos com espécies de difícil visualização ou manipulação e que, além disso, com esta metodologia é possível reunir uma grande quantidade de informações ecológicas e biológicas das espécies.

Os dados desse trabalho são mais uma evidência de que qualquer remanescente, protegido e não protegido, torna-se importante para conservação da biodiversidade, principalmente em áreas fortemente antropizadas, e da necessidade e importância de interligar esses fragmentos. A criação de corredores ecológicos ajudaria à conservação do lobo-guará, assim como também de outras espécies generalistas, com poucas necessidades ecológicas e tolerantes às mudanças da paisagem. Protegendo essas áreas e mantendo o fluxo das espécies generalistas também se conservam aquelas que são sensíveis, e podem ser mais afetadas devido à quebra de conectividade.

Áreas que são mais permeáveis apresentam uma maior quantidade de recursos para as espécies, permitem um melhor deslocamento dos indivíduos na paisagem e apresentam populações mais saudáveis geneticamente. Nosso caso, as áreas estudadas nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul apresentam essas características e são melhores para as espécies quando comparado com a área de São Paulo que é uma área em que as intervenções antrópicas causaram um maior impacto.

Acreditamos que a área estudada de Goiás é importante para a conservação das espécies, pois pode ser um local de contato onde pode existir intercâmbio de alelos entre as áreas localizadas mais ao Sul e ao Sudeste com áreas do Norte e do Leste do país. Caso a área não seja uma área de contato, ela continua sendo importante para conservação, pois nela foram encontrados valores maiores de diversidade e além disso, porque sua localização permite que os alelos privados e raros se propaguem nas populações do Sudeste do Brasil.

Durante as amostragens observamos a presença de outras espécies que convivem em simpatria com as espécies estudadas. Dentre as espécies identificadas molecularmente podemos citar a raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*), procionidos e felinos. Isto é mais uma evidencia da importância de fragmentos de área natural em paisagens altamente modificadas e de áreas utilizadas de maneira sustentável para a conservação das espécies e dos biomas.

A convivência com outras espécies de carnívoros e de canídeos indica que a separação temporal e de nicho entre as espécies simpátricas é aparentemente mais importante que a segregação espacial, como foi descrito anteriormente por Sunarto *et al.* (2015). Entretanto, é importante destacar que também foram identificadas amostras de cachorro-doméstico (*Canis familiaris*) que mostram a facilidade de contato entre espécies domésticas e silvestres, aumentando a preocupação por problemas como transmissão de doenças, concorrência por recursos e/ou até mesmo conflitos entre espécies.

O número de animais atropelados e o número de alelos perdidos pelos atropelamentos são um problema importante para as espécies, pois com cada indivíduo perdido há uma grande perda na variabilidade genética, principalmente quando os animais atropelados apresentam alelos raros ou privados. Acreditamos que em áreas onde o número de indivíduos atropelados seja muito alto os efeitos genéticos podem incrementar-se e conduzir ao isolamento populacional, principalmente para os lobos-guará que apresentam números populacionais menores.

REFERÊNCIAS

- AASEN, E.; MEDRANO, J. F. Amplification of the ZFY and ZFX genes for sex identification in humans, cattle, sheep and goats. **Nature Biotechnology**, v. 8, n. 12, p. 1279-1281, 1990. ISSN 1087-0156.
- ASCENSÃO, F. et al. Spatial patterns of road mortality of medium–large mammals in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Wildlife Research**, 2017. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1071/WR16108> >.
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, 2009. ISSN 1365-2699.
- BALME, G. A.; HUNTER, L. T. B.; SLOTOW, R. Evaluating methods for counting cryptic carnivores. **The Journal of Wildlife Management**, v. 73, n. 3, p. 433-441, 2009. ISSN 1937-2817.
- BARRAGÁN, C. E. **Caracterização da estrutura sócio-genética de uma população de vida livre de cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) (Lund, 1842)**. 2015. (Master). Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, Brazil.
- BAUM, K. A. et al. The matrix enhances the effectiveness of corridors and stepping stones. **Ecology**, v. 85, n. 10, p. 2671-2676, 2004. ISSN 1939-9170.
- BEJA-PEREIRA, A. et al. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Mol Ecol Resour**, v. 9, n. 5, p. 1279-301, Sep 2009. ISSN 1755-0998 (Electronic) 1755-098X (Linking). Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21564900> >.
- BELKHIR, K. et al. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. **Laboratoire génome, populations, interactions, CNRS UMR**, v. 5000, p. 1996-2004, 1996.
- BENJAMINI, Y.; YEKUTIELI, D. The control of the false discovery rate in multiple testing under dependency. **Annals of statistics**, p. 1165-1188, 2001. ISSN 0090-5364.
- BERTA, A. *Cerdocyon thous*. **Mammalian Species Archive**, v. 186, p. 1-4, 1982. ISSN 0076-3519.
- BIBEN, M. Comparative ontogeny of social behaviour in three South American canids, the maned wolf, crab-eating fox and bush dog: implications for sociality. **Animal Behaviour**, v. 31, n. 3, p. 814-826, 1983. ISSN 0003-3472.
- BICKHAM, J. W. et al. Genetics and preliminary hormone analyses in Western Gray whale biopsy samples collected off Sakhalin Island in 2011. Scientific Committee Annual Meeting 2013 (SC65A), 2013.

- BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 10, p. 503-511, 2003. ISSN 0169-5347.
- BOHONAK, A. J. Dispersal, gene flow, and population structure. **The Quarterly Review of Biology**, v. 74, n. 1, p. 21-45, 1999. ISSN 0033-5770.
- BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: the miracle ahead. **In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant**, v. 38, n. 2, p. 221-228, 2002. ISSN 1054-5476.
- BOTSTEIN, D. et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. **American journal of human genetics**, v. 32, n. 3, p. 314, 1980.
- BRESSAN, P. M. et al. **Fauna ameaçada de extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados**. São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo: Secretaria do Meio Ambiente: 648 p. 2009.
- BUENO, A. D. A.; MOTTA-JUNIOR, J. C. Food habits of two syntopic canids, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*), in southeastern Brazil. **Revista Chilena de Historia Natural**, v. 77, n. 1, p. 5-14, 2004. ISSN 0716-078X.
- CABRERA, A. On some South American canine genera. **Journal of Mammalogy**, v. 12, n. 1, p. 54-67, 1931. ISSN 0022-2372.
- CACERES, N. C. Biological characteristics influence mammal road kill in an Atlantic Forest–Cerrado interface in south-western Brazil. **Italian Journal of Zoology**, v. 78, n. 3, p. 379-389, 2011/09/01 2011. ISSN 1125-0003. Disponível em: < <http://dx.doi.org/10.1080/11250003.2011.566226> >. Acesso em: 2013/05/17.
- CARDOSO DA SILVA, J. M.; BATES, J. M. Biogeographic Patterns and Conservation in the South American Cerrado: A Tropical Savanna Hotspot: The Cerrado, which includes both forest and savanna habitats, is the second largest South American biome, and among the most threatened on the continent. **BioScience**, v. 52, n. 3, p. 225-234, 2002. ISSN 0006-3568.
- CARVALHO, C. T. D. Aspectos faunísticos do cerrado – o lobo guará (Mammalia, Canidae). **São Paulo, Instituto Florestal (Boletim técnico)**. 16p, 1976.
- CHAME, M. Terrestrial mammal feces: a morphometric summary and description. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, p. 71-94, 2003. ISSN 0074-0276.
- CHAVES, P. B. et al. DNA barcoding meets molecular scatology: short mtDNA sequences for standardized species assignment of carnivore noninvasive samples. **Molecular Ecology Resources**, v. 12, n. 1, p. 18-35, 2012. ISSN 1755-0998.
- CHENG, L. et al. Hierarchical and spatially explicit clustering of DNA sequences with BAPS software. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 5, p. 1224-1228, 2013. ISSN 0737-4038.

- COELHO, I. P.; KINDEL, A.; COELHO, A. V. P. Roadkills of vertebrate species on two highways through the Atlantic Forest Biosphere Reserve, southern Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, v. 54, n. 4, p. 689-699, 2008. ISSN 1612-4642.
- CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC bioinformatics**, v. 9, n. 1, p. 539, 2008. ISSN 1471-2105.
- COURTENAY, O.; MAFFEI, L. *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). In: SILLERO-ZUBIRI, C.; HOFFMANN, M., et al (Ed.). **Canids: foxes, wolves, jackals and dogs: status survey and conservation action plan**. Gland, Switzerland: IUCN Publications, 2004. ISBN 2831707862.
- CROOKS, K. R. Relative sensitivities of mammalian carnivores to habitat fragmentation. **Conservation Biology**, v. 16, n. 2, p. 488-502, 2002. ISSN 1523-1739.
- DAKIN, E.; AVISE, J. Microsatellite null alleles in parentage analysis. **Heredity**, v. 93, n. 5, p. 504-509, 2004. ISSN 0018-067X.
- DALLAS, J. F. et al. Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints. **Conservation Genetics**, v. 1, n. 2, p. 181-183, 2000. ISSN 1566-0621.
- DE AZEVEDO, F. Notes on the behavior of the margay *Felis wiedii* (Schinz, 1821), (Carnivora, Felidae), in the Brazilian Atlantic Forest. **Mammalia**, v. 60, n. 2, p. 325-328, 1996. ISSN 0025-1461.
- DE MATTOS, P. S. R. **Epidemiologia e genética populacional do Lobo Guará, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1915) (Carnívora, Canidae) na região Nordeste do estado de São Paulo**: Tese de Doutorado. Universidade Federal de São Carlos. 98pp. 2003.
- DE MATTOS, P. S. R. et al. Populational genetic structure of free-living maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) determined by proteic markers. **Brazilian Journal of Biology**, v. 64, n. 3B, p. 639-644, 2004. ISSN 1519-6984.
- DECANDIA, A. et al. A novel molecular method for noninvasive sex identification of order Carnivora. **Conservation Genetics Resources**, p. 1-3, 2016. ISSN 1877-7252.
- DESBIEZ, A. L. J.; BODMER, R. E.; TOMAS, W. M. Mammalian densities in a Neotropical wetland subject to extreme climatic events. **Biotropica**, v. 42, n. 3, p. 372-378, 2010. ISSN 1744-7429.
- DEVICTOR, V.; JULLIARD, R.; JIGUET, F. Distribution of specialist and generalist species along spatial gradients of habitat disturbance and fragmentation. **Oikos**, v. 117, n. 4, p. 507-514, 2008. ISSN 1600-0706.
- DO, C. et al. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular ecology resources**, v. 14, n. 1, p. 209-214, 2014. ISSN 1755-0998.
- DOBSON, F. S. Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. **Animal behaviour**, v. 30, n. 4, p. 1183-1192, 1982. ISSN 0003-3472.

DOBSON, F. S.; WAY, B. M.; BAUDOIN, C. Spatial dynamics and the evolution of social monogamy in mammals. **Behavioral Ecology**, v. 21, n. 4, p. 747-752, 2010. ISSN 1045-2249.

DONADIO, E. et al. Activity patterns, home-range, and habitat selection of the common hog-nosed skunk, *Conepatus chinga* (Mammalia, Mustelidae), in northwestern Patagonia. **Mammalia**, v. 65, n. 1, p. 49-54, 2001. ISSN 1864-1547.

DOUBLE, M. et al. Dispersal, philopatry, and infidelity: dissecting local genetic structure in superb fairy-wrens (*Malurus cyaneus*). **Evolution**, v. 59, n. 3, p. 625-635, 2005.

DUTTA, T. et al. Fine-scale population genetic structure in a wide-ranging carnivore, the leopard (*Panthera pardus fusca*) in central India. **Diversity and Distributions**, v. 19, n. 7, p. 760-771, 2013. ISSN 1472-4642.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361 2012.

EITEN, G. The cerrado vegetation of Brazil. **The Botanical Review**, v. 38, n. 2, p. 201-341, 1972. ISSN 0006-8101.

EMMONS, L. H. et al. Social interactions and reproduction. In: EMMONS, L. (Ed.). **The maned wolves of Noel Kempff Mercado National Park**. Washington: Social interactions and reproduction (Smithsonian Institution Scholarly Press), 2012. p.57-75.

ESTES, J. A. et al. Trophic downgrading of planet Earth. **Science**, v. 333, n. 6040, p. 301-306, 2011. ISSN 0036-8075.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-2620, 2005. ISSN 1365-294X.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolutionary bioinformatics**, v. 1, 2005. ISSN 1176-9343.

FAHRIG, L. Effects of habitat fragmentation on biodiversity. **Annual review of ecology, evolution, and systematics**, p. 487-515, 2003. ISSN 1543-592X.

_____. Non-optimal animal movement in human-altered landscapes. **Functional Ecology**, v. 21, n. 6, p. 1003-1015, 2007. ISSN 1365-2435.

FARIA-CORRÊA, M. et al. Activity, habitat use, density, and reproductive biology of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) and comparison with the pampas fox (*Lycalopex gymnocercus*) in a Restinga area in the southern Brazilian Atlantic Forest. **Mammalian Biology-Zeitschrift für Säugetierkunde**, v. 74, n. 3, p. 220-229, 2009. ISSN 1616-5047.

FARRELL, L. E.; ROMAN, J.; SUNQUIST, M. E. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. **Molecular Ecology**, v. 9, n. 10, p. 1583-1590, 2000. ISSN 1365-294X.

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, Brasil. 42pp 2008.

FONTOURA-RODRIGUES, M. L. D. et al. Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 4, p. 898-900, 2008. ISSN 1755-0998.

FOULLEY, J.-L.; OLLIVIER, L. Estimating allelic richness and its diversity. **Livestock Science**, v. 101, n. 1, p. 150-158, 2006. ISSN 1871-1413.

FRANCISCO, L. et al. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. **Mammalian Genome**, v. 7, n. 5, p. 359-362, 1996. ISSN 0938-8990.

FRANKHAM, R. Effective population size/adult population size ratios in wildlife: a review. **Genetical Research**, v. 66, n. 02, p. 95-107, 1995. ISSN 1469-5073.

_____. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological conservation**, v. 143, n. 9, p. 1919-1927, 2010. ISSN 0006-3207.

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

FRANKLIN, W. L. et al. Ecology of the Patagonia puma *Felis concolor* patagonica in southern Chile. **Biological Conservation**, v. 90, n. 1, p. 33-40, 1999. ISSN 0006-3207.

GAMBARINI, A.; PAULA, R. C. D. **Histórias de Um Lobo - Stories Of A Golden Wolf**. 2013. ISBN 978-85-60120-28-4.

GINSBERG, J. R.; MACDONALD, D. D. W. **Foxes, wolves, jackals, and dogs: an action plan for the conservation of canids**. Iucn, 1990. ISBN 2880329965.

GIRMAN, D. et al. Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Molecular Ecology**, v. 10, n. 7, p. 1703-1723, 2001. ISSN 1365-294X.

GIRMAN, D. J. et al. A molecular genetic analysis of social structure, dispersal, and interpack relationships of the African wild dog (*Lycaon pictus*). **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 40, n. 3, p. 187-198, 1997. ISSN 0340-5443.

GONZÁLEZ, S. et al. Sex determination of three Neotropical canids by high resolution melting analysis. **Conservation Genetics Resources**, p. 1-3, 2015a. ISSN 1877-7252.

GONZÁLEZ, S. et al. Population structure of mtDNA variation due to Pleistocene fluctuations in the South American maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815): management units for conservation. *Journal of Heredity*, v. 106, n. S1, p. 459-468, 2015b.

GOODMAN, S. J. RST Calc: a collection of computer programs for calculating estimates of genetic differentiation from microsatellite data and determining their significance. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 9, p. 881-885, 1997. ISSN 1365-294X.

GOOSSENS, B. et al. Patterns of genetic diversity and migration in increasingly fragmented and declining orang-utan (*Pongo pygmaeus*) populations from Sabah, Malaysia. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 2, p. 441-456, 2005. ISSN 1365-294X.

GORMAN, M. L.; RAFFAELLI, D. The functional role of wild mammals in agricultural ecosystems. **Mammal Review**, v. 38, n. 2-3, p. 220-230, 2008. ISSN 1365-2907.

GOTTELLI, D. et al. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. **Molecular Ecology**, v. 3, n. 4, p. 301-312, 1994. ISSN 1365-294X.

GOUDET, J. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995). 2001.

GREENBAUM, G. et al. Allelic richness following population founding events—A Stochastic modeling framework incorporating gene flow and genetic drift. **PloS one**, v. 9, n. 12, p. e115203, 2014. ISSN 1932-6203.

GRIFFITHS, A. et al. **Genética. Madrid, ES**: McGraw-Hill Interamericana 1995.

GRIFFITHS, A. J. et al. Introdução à genética. In: (Ed.). **Introdução à genética**: Guanabara Koogan, 2008.

GUILLOT G., et al. GENELAND: a computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Resources**, v. 5, p. 712–715, 2005.

HAAG, T. et al. 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**, v. 19, n. 22, p. 4906-4921, 2010. ISSN 1365-294X.

HAAG, T. et al. Development and testing of an optimized method for DNA-based identification of jaguar (*Panthera onca*) and puma (*Puma concolor*) faecal samples for use in ecological and genetic studies. **Genetica**, v. 136, n. 3, p. 505-512, 2009. ISSN 0016-6707.

HARTL, D. L.; CLARK, A. G.; CLARK, A. G. **Principles of population genetics**. Sinauer associates Sunderland, 1997.

HUCK, M. et al. Habitat suitability, corridors and dispersal barriers for large carnivores in Poland. **Acta Theriologica**, v. 55, n. 2, p. 177-192, 2010. ISSN 0001-7051.

IBGE. **Censo demográfico 2010. Brasil**. Brasília, DF 2010.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. 2016. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/>>.

JÁCOMO, A. T. A.; SILVEIRA, L.; DINIZ FILHO, J. A. F. Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. . **Journal of Zoology**, v. 262, p. 99-106, 2004.

JÁCOMO, A. T. D. A. et al. Home range and spatial organization of maned wolves in the Brazilian grasslands. **Journal of Mammalogy**, v. 90, n. 1, p. 150-157, 2009. ISSN 1545-1542.

JAMIESON, A.; TAYLOR, S. C. S. Comparisons of three probability formulae for parentage exclusion. **Animal Genetics**, v. 28, n. 6, p. 397-400, 1997. ISSN 1365-2052. Disponível em: < <http://https://doi.org/10.1111/j.1365-2052.1997.00186.x> >.

JARNE, P.; LAGODA, P. J. Microsatellites, from molecules to populations and back. **Trends in ecology & evolution**, v. 11, n. 10, p. 424-429, 1996. ISSN 0169-5347.

JOHNSON, W. et al. Applications of genetic concepts and molecular methods to carnivore conservation. **Conservation Biology Series-Cambridge**, p. 335-358, 2001.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: a new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC genetics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010. ISSN 1471-2156.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular ecology**, v. 17, n. 18, p. 4015-4026, 2008. ISSN 1365-294X.

JUAREZ, K. M.; MARINHO-FILHO, J. Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil. **Journal of Mammalogy**, v. 83, n. 4, p. 925-933, 2002. ISSN 1545-1542.

JUKES, T. H.; CANTOR, C. R. Evolution of protein molecules. **Mammalian protein metabolism**, v. 3, n. 21, p. 132, 1969.

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

KALINOWSKI, S. T.; TAPER, M. L.; MARSHALL, T. C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. **Molecular ecology**, v. 16, n. 5, p. 1099-1106, 2007. ISSN 1365-294X.

KAMLER, J. F. et al. Genetic structure, spatial organization, and dispersal in two populations of bat-eared foxes. **Ecology and evolution**, v. 3, n. 9, p. 2892-2902, 2013. ISSN 2045-7758.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647-1649, 2012.

KLEIMAN, D. G. Monogamy in Mammals. **The Quarterly Review of Biology**, v. 52, n. 1, p. 39-69, 1977. Disponível em: < <http://www.journals.uchicago.edu/doi/abs/10.1086/409721> >.

_____. Canid Mating Systems, Social Behavior, Parental Care and Ontogeny: Are they Flexible? **Behavior Genetics**, v. 41, n. 6, p. 803, 2011. ISSN 1573-3297. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1007/s10519-011-9459-0>>.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 707-713, 2005. ISSN 1523-1739.

KLINK, C. A.; MOREIRA, A. G. Past and current human occupation, and land use. **The cerrados of Brazil: ecology and natural history of a neotropical savanna**, p. 69-88, 2002.

KOHN, M. H.; WAYNE, R. K. Facts from feces revisited. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12, n. 6, p. 223-227, 1997. ISSN 0169-5347.

KREBS, J. R.; DAVIES, N. B.; PARR, J. An introduction to behavioural ecology. **Blackwell Scientific Publications**, 1993.

LINDBLAD-TOH, K. et al. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. **Nature**, v. 438, n. 7069, p. 803-819, 2005. ISSN 0028-0836.

LION, M. B. **Diversidade genética e conservação de Lobo-Guará *Chrysocyon brachyurus*, em áreas protegidas do Distrito Federal**: Dissertação de Mestrado. Universidade de Brasília, Brasil. 66pp 2007.

LION, M. B. et al. Conservation genetics of maned wolves in a highly impacted area of the Brazilian Cerrado biome. **Genetica**, v. 139, n. 3, p. 369-381, 2011. ISSN 0016-6707.

LYRA-JORGE, M. C.; CIOCHETI, G.; PIVELLO, V. R. Carnivore mammals in a fragmented landscape in northeast of São Paulo State, Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 17, n. 7, p. 1573-1580, 2008. ISSN 0960-3115
1572-9710.

LYRA-JORGE, M. C. et al. Influence of multi-scale landscape structure on the occurrence of carnivorous mammals in a human-modified savanna, Brazil. **European Journal of Wildlife Research**, v. 56, n. 3, p. 359-368, Jun 2010. ISSN 1612-4642. Disponível em: <[Go to ISI://000277787900016](http://www.isinet.com/000277787900016)>.

MACDONALD, D.; COURTENAY, O. Enduring social relationships in a population of crab-eating zorros, *Cerdocyon thous*, in Amazonian Brazil (Carnivora, Canidae). **Journal of Zoology**, v. 239, n. 2, p. 329-355, 1996. ISSN 1469-7998.

MACHADO, R. B. et al. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. **Conservation International do Brasil, Brasília**, 2004.

MANEL, S. et al. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 18, n. 4, p. 189-197, 2003. ISSN 0169-5347.

MANNISE, N. et al. Análisis genético sobre la presencia de Aguará Guazú (Carnivora, Mammalia) en Uruguay. **Boletín de la Sociedad Zoológica del Uruguay**, v. 21, n. 1-2, p. 30-38, 2012.

MANTOVANI, J. E.; PEREIRA, A. Estimativa da integridade da cobertura vegetal de Cerrado através de dados TM/Landsat. **Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto**, v. 9, p. 11-18, 1998.

MARSHALL, T. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular ecology**, v. 7, n. 5, p. 639, 1998. ISSN 0962-1083.

MASSARA, R. L. et al. Ecological interactions between ocelots and sympatric mesocarnivores in protected areas of the Atlantic Forest, southeastern Brazil. **Journal of Mammalogy**, p. gyw129, 2016. ISSN 0022-2372.

MCMANUS, J. S. et al. Gene flow and population structure of a solitary top carnivore in a human-dominated landscape. **Ecology and evolution**, v. 5, n. 2, p. 335-344, 2015. ISSN 2045-7758.

MESTRE, F. et al. Combining distribution modelling and non-invasive genetics to improve range shift forecasting. **Ecological Modelling**, v. 297, p. 171-179, 2015. ISSN 0304-3800.

MILLIGAN, B. G. Maximum-likelihood estimation of relatedness. **Genetics**, v. 163, n. 3, p. 1153-1167, 2003. ISSN 0016-6731.

MILLS, L. S.; ALLENDORF, F. W. The one-migrant-per-generation rule in conservation and management. **Conservation Biology**, v. 10, n. 6, p. 1509-1518, 1996. ISSN 1523-1739.

MIÑO, C. I. et al. Reconstructing genetic mating systems in the absence of parental information in colonially breeding waterbirds. **BMC Evol Biol**, v. 11, p. 196, 2011. ISSN 1471-2148 (Electronic) 1471-2148 (Linking). Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21740559>>.

MIOTTO, R. A. et al. Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 6, p. 1447-1455, 2011. ISSN 1566-0621 1572-9737.

MIOTTO, R. A. et al. Estimating puma *Puma concolor* population size in a human-disturbed landscape in Brazil, using DNA mark-recapture data. **Oryx**, v. 48, n. 02, p. 250-257, 2014. ISSN 0030-6053 1365-3008.

MITTERMEIER, R. A. et al. **Hotspots: Earth's biologically richest and most endangered terrestrial ecoregions**. CEMEX, SA, Agrupación Sierra Madre, SC, 1999. ISBN 9686397582.

MMA. **Biodiversidade Brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros**. Brasília: MMA Ministerio de Meio Ambiente, 2002.

- MOEHLMAN, P. D. Ecology of cooperation in canids. In: RUBENSTEIN, D. I. e WRANGHAM, R. W. (Ed.). **Ecological aspects of social evolution**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1986. p.282-302.
- MONTGOMERY, G. G.; LUBIN, Y. Social structure and food habits of crab-eating Fox in Venezuela Llanos. **Acta Cientifica Venezolana**, v. 29, p. 382-383, 1978.
- MORIN, D. J. et al. Bias in carnivore diet analysis resulting from misclassification of predator scats based on field identification. **Wildlife Society Bulletin**, v. 40, n. 4, p. 669-677, 2016. ISSN 1938-5463.
- MORIN, P. 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, n. 7, p. 1835-1844, 2001. ISSN 1365-294X.
- MORIN, P. A. et al. Non-invasive sampling and DNA amplification for paternity exclusion, community structure, and phylogeography in wild chimpanzees. **Primates**, v. 34, n. 3, p. 347-356, 1993. ISSN 0032-8332.
- MORINHA, F. et al. High-resolution melting analysis for bird sexing: a successful approach to molecular sex identification using different biological samples. **Molecular ecology resources**, v. 13, n. 3, p. 473-483, 2013. ISSN 1755-0998.
- MUKESH, L. K. S.; CHAROO, S. A.; SATHYAKUMAR, S. Species identification and molecular sexing from feces of Kashmir stag (*Cervus elaphus hanglu*). **Conservation genetics**, v. 7, n. 3, p. 677-680, 2015.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853-858, 2000. ISSN 0028-0836.
- NEI, M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 70, n. 12, p. 3321-3323, 1973. ISSN 0027-8424.
- NOSS, R. F. et al. Conservation Biology and Carnivore Conservation in the Rocky Mountains. **Conservation Biology**, p. 949-963, 1996. ISSN 0888-8892.
- O'BRIEN, S. J. A role for molecular genetics in biological conservation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, n. 13, p. 5748-5755, 1994. ISSN 0027-8424.
- ORTEGA, J. et al. A reliable, non-invasive method for sex determination in the endangered San Joaquin kit fox (*Vulpes macrotis mutica*) and other canids. **Conservation Genetics**, v. 5, n. 5, p. 715-718, 2004. ISSN 1566-0621.
- PAETKAU, D. et al. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular ecology**, v. 4, n. 3, p. 347-354, 1995. ISSN 1365-294X.
- PAETKAU, D.; STROBECK, C. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. **Molecular Ecology**, v. 3, n. 5, p. 489-495, 1994. ISSN 1365-294X.

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. ISSN 1523-1739.

PAULA, R. et al. Avaliação do estado de conservação do Lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. **Biodiversidade Brasileira**, v. 3, n. 1, p. 146-159, 2013.

PAULA, R. C. D.; MEDICI, P.; MORATO, R. G. **Maned Wolf Action Plan - Population and Habitat Viability Assessment/Plan de Acción para la Conservación del Aguará Guazu - Análisis de Viabilidad Poblacional y de Hábitat.** . Brasília, Brasil: Edições IBAMA, 2008.

PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. **Molecular ecology notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006. ISSN 1471-8286.

PIRES, A. M. Z. C. R. **Diretrizes para conservação da biodiversidade em planos de manejo de Unidades de conservação. Caso de estudo: Estação Ecológica de Jataí e Estação Experimental de Luiz Antônio (Luiz Antônio-SP).** . 1999. 165 (Doutorado). Tese de doutorado, Universidade federal de São Carlos, São Carlos.

PIRES, J. et al. Estratégias “inter situ” de conservação: elaboração de cenários regionais para a conservação da biodiversidade. **Anais do V Simpósio de Ecossistemas Brasileiros: Conservação**, v. 1, p. 61-69, 2000.

PIRY, S. et al. GeneClass2: A Software for Genetic Assignment and First-Generation Migrant Detection. **Journal of Heredity**, v. 95, p. 536-539, 2004.

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, J. BOTTLENECK: A computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. 90 (4): 502–503.: doi: 10.1093/jhered/90.4. 502. **View Article PubMed/NCBI Google Scholar**, 1999.

PRATES, P. H. D. S. J. **Diversidade genética e história evolutiva do Lobo-Guará (*Chrysocyon brachyurus*):** Tese de doutorado. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - Brasil. 71pp 2008.

PRIMACK, R.; RODRIGUES, E. **Biologia da Conservação.** Londrina, Paraná: Gráfica e Editora Planta, 2001. 328 p.

PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945-959, 2000. ISSN 0016-6731.

QGIS DT, Q. G. D. T. Quantum GIS Geographic Information System. Open Source Geospatial Foundation Project. <http://qgis.osgeo.org>. 2012.

QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. **Evolution**, p. 258-275, 1989. ISSN 0014-3820.

R CORE TEAM. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria., 2013. Disponível em: < <http://www.R-project.org/> >.

RABINOWITZ, A.; ZELLER, K. A. A range-wide model of landscape connectivity and conservation for the jaguar, *Panthera onca*. **Biological conservation**, v. 143, n. 4, p. 939-945, 2010. ISSN 0006-3207.

RAMALHO, F. D. P. et al. Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) minimum population size and genetic diversity in a Cerrado protected area of southeastern Brazil revealed by fecal DNA analysis. **Mammalia**, 2014. ISSN 1864-1547 0025-1461.

RANTA, P. et al. The fragmented Atlantic rain forest of Brazil: size, shape and distribution of forest fragments. **Biodiversity and Conservation**, v. 7, n. 3, p. 385-403, 1998. ISSN 0960-3115.

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

REIS, N. R. D. et al. **Mamíferos do Brasil; Mammals of Brazil**. Segunda. Universidade Estadual de Londrina, 2011. ISBN 8590639509.

RIBEIRO, H. J. **Plano de manejo do Parque Estadual de Vassununga**. . São Paulo: Instituto Florestal, 2009. 309.

RIBEIRO, M. C. et al. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, n. 6, p. 1141-1153, 2009. ISSN 0006-3207.

RIBEIRO, M. C. et al. Dealing with Fragmentation and Road Effects in Highly Degraded and Heterogeneous Landscapes. In: GHELIER-COSTA, C.; LYRA-JORGE, M. C., et al (Ed.). **Biodiversity in Agricultural Landscapes of Southeastern Brazil: De Gruyter Open**, 2016. cap. 4, p.43-64. ISBN 9783110480849.

RIPPLE, W. J.; BESCHTA, R. L. Large predators limit herbivore densities in northern forest ecosystems. **European Journal of Wildlife Research**, v. 58, n. 4, p. 733-742, 2012. ISSN 1612-4642.

RIPPLE, W. J. et al. Widespread mesopredator effects after wolf extirpation. **Biological Conservation**, v. 160, p. 70-79, 2013. ISSN 00063207.

RIRIE, K. M.; RASMUSSEN, R. P.; WITTEWER, C. T. Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. **Analytical biochemistry**, v. 245, n. 2, p. 154-160, 1997. ISSN 0003-2697.

ROBERGE, J. M.; ANGELSTAM, P. Usefulness of the umbrella species concept as a conservation tool. **Conservation Biology**, v. 18, n. 1, p. 76-85, 2004. ISSN 1523-1739.

RODDEN, M.; RODRIGUES, F.; BESTELMEYER, S. Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*). In: SILLERO-ZIBIRI, C.; HOFFMAN, M., et al (Ed.). **Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs-2004**. Status survey and Conservation Action Plan., 2004.

RODGERS, T. W.; JANEČKA, J. E. Applications and techniques for non-invasive faecal genetics research in felid conservation. **European Journal of Wildlife Research**, v. 59, n. 1, p. 1-16, 2013. ISSN 1612-4642.

RODRIGUES, F. H. G. **Biologia e conservação do lobo guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, D. F.** 2002. (Doutor). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Campinas, SP - Brasil.

RODRÍGUEZ-CASTRO, K. G. et al. Molecular species identification for scat samples of South American felids and canids. **Conservation Genetics Resources**, 2017. [s.d.].

RUIZ-GARCIA, M.; SHOSTELL, J. M. Molecular Population Genetics, Evolutionary Biology, and Biological Conservation of Neotropical Carnivores. **Nova science publishers**, 2013. ISBN 162417079X.

RYLANDS, A. B.; BRANDON, K. Brazilian protected areas. **Conservation biology**, v. 19, n. 3, p. 612-618, 2005. ISSN 1523-1739.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular biology and evolution**, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987. ISSN 0737-4038.

SALIM, D. et al. Genetic variability in maned wolf based on heterologous short-tandem repeat markers from domestic dog. **Genet Mol Res**, v. 6, n. 2, p. 348-357, 2007.

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

SANTOS, E. F.; SETZ, E. Z.; GOBBI, N. Diet of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and its role in seed dispersal on a cattle ranch in Brazil. **Journal of Zoology**, v. 260, n. 2, p. 203-208, 2003. ISSN 1469-7998.

SARANHOLI, B. H. et al. Roadkill hotspots in a protected area of Cerrado in Brazil: planning actions to conservation. **Rev. MVZ Córdoba**, v. 21 n. 2, p. 5441-5448, 2016. ISSN 0122-0268.

SARANHOLI, B.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; GALETTI, P. Evidence of Recent Fine-Scale Population Structuring in South American *Puma concolor*. **Diversity**, v. 9, n. 4, p. 44, 2017.

SCHLÖTTERER, C.; TAUTZ, D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. **Nucleic acids research**, v. 20, n. 2, p. 211-215, 1992. ISSN 0305-1048.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. **Nature biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 233-234, 2000. ISSN 1087-0156.

SHIVIK, J. A. Tools for the edge: what's new for conserving carnivores. **BioScience**, v. 56, n. 3, p. 253-259, 2006. ISSN 0006-3568.

SILVA, A. P. D. **Análise da variabilidade genética e parentesco de *Lycalopex vetulus* (LUND, 1842), in natura, em uma região de cerrado do norte de Minas Gerais e sudeste de Goiás – Brasil.** 2015. (Master). Departamento de Genética e Evolução - DGE, UFSCar, Sao Carlos-SP Brasil.

SILVA, J. M. C. D.; CASTELETTI, C. Status of the biodiversity of the Atlantic Forest of Brazil. **The Atlantic Forest of South America: Biodiversity Status, Threats, and Outlook.** CABS and Island Press, Washington, p. 43-59, 2003.

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

SLATKIN, M. Gene flow in natural populations. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 16, p. 393–430, 1985.

_____. Gene flow and the geographic structure of natural populations. **Science (Washington)**, v. 236, n. 4803, p. 787-792, 1987. ISSN 0036-8075.

_____. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, v. 139, n. 1, p. 457-462, 1995. ISSN 0016-6731.

SPRINGER, M. S. et al. Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 132-143, 2001. ISSN 0737-4038.

STANTON, D. W. et al. Enhancing knowledge of an endangered and elusive species, the okapi, using non-invasive genetic techniques. **Journal of Zoology**, v. 295, n. 4, p. 233-242, 2015. ISSN 1469-7998.

STONEKING, M. Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots. **The American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 4, p. 1029-1032, 2000. ISSN 0002-9297.

SUGG, D. W. et al. Population genetics meets behavioral ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 11, n. 8, p. 338-342, 1996. ISSN 0169-5347.

SUNARTO, S. et al. Cat coexistence in central Sumatra: ecological characteristics, spatial and temporal overlap, and implications for management. **Journal of Zoology**, v. 296, n. 2, p. 104-115, 2015. ISSN 1469-7998.

SWEANOR, L.; LOGAN, K.; HORNOCKER, M. Cougar Dispersal Patterns, Metapopulation Dynamics, and Conservation. **Conservation Biology**, v. 14, n. 3, p. 798-808, 2000. ISSN 0888-8892.

TABANEZ, M. F. et al. Plano de Manejo da Estação Ecológica dos Caetetus. **IF Sér. Reg., São Paulo**, v. 29, 2005.

TABARELLI, M. et al. Challenges and opportunities for biodiversity conservation in the Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology**, v. 19, n. 3, p. 695-700, 2005. ISSN 1523-1739.

TABERLET, P. et al. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 9, p. 869-876, 1997. ISSN 1365-294X.

TABERLET, P. et al. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 24, n. 16, p. 3189-3194, 1996. ISSN 0305-1048.

TABERLET, P.; WAITS, L. P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, n. 8, p. 323-327, 1999. ISSN 0169-5347.

TCHAICKA, L. **Abordagens filogenéticas, filogeográficas e populacionais em canídeos sul-americanos**: Tese de Doutorado. Universidade Federal de Rio Grandedo Sul. Brasil. 193pp 2006.

TCHAICKA, L. et al. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). **Molecular Ecology**, v. 16, n. 4, p. 819-838, 2007. ISSN 1365-294X.

TEMPLENTON, A. R. **Population genetics and microevolutionary theory**. Hoboken, New Jersey.: John Wiley & Sons., Inc., Publication., 2006.

TENSEN, L. et al. Genetic diversity and spatial genetic structure of African wild dogs (*Lycaon pictus*). **Conservation genetics**, v. 17, n. 4, p. 785-794, 2016. ISSN 1566-0621.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice **Nucleic Acids Research.**, v. 22, n. 22, p. 4673-4680, 1994.

TROLLE, M. et al. Camera-trap studies of maned wolf density in the Cerrado and the Pantanal of Brazil. **Biodiversity and Conservation**, v. 16, n. 4, p. 1197-1204, 2007. ISSN 0960-3115.

TURCI, L. C. B.; BERNARDE, P. S. Vertebrados atropelados na Rodovia Estadual 383 em Rondônia, Brasil. **Revista Biotemas, Florianópolis**, v. 22, n. 1, p. 121-127, 2009.

VALIÈRE, N. GIMLET: a computer program for analysing genetic individual identification data. **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 3, p. 377-379, 2002. ISSN 1471-8286.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535-538, 2004. ISSN 1471-8286.

VIEIRA, E. Highway mortality of mammals in central Brazil. **Ciencia e cultura(Sao Paulo). Sao Paulo**, v. 48, n. 4, p. 270-272, 1996. ISSN 0009-6725.

VUCETICH, J. A.; WAITE, T. A. Is one migrant per generation sufficient for the genetic management of fluctuating populations? **Animal Conservation**, v. 3, n. 3, p. 261-266, 2000. ISSN 1469-1795.

- WAGNER, A.; CREEL, S.; KALINOWSKI, S. Estimating relatedness and relationships using microsatellite loci with null alleles. **Heredity**, v. 97, n. 5, p. 336-345, 2006. ISSN 0018-067X.
- WAITS, L. P.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular ecology**, v. 10, n. 1, p. 249-256, 2001. ISSN 1365-294X.
- WANG, J. Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. **Conservation Biology**, v. 18, n. 2, p. 332-343, 2004. ISSN 1523-1739.
- _____. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. **Genetics Research**, v. 89, n. 3, p. 135-153, 2007. ISSN 1469-5073.
- _____. COANCESTRY: a program for simulating, estimating and analysing relatedness and inbreeding coefficients. **Molecular ecology resources**, v. 11, n. 1, p. 141-145, 2011. ISSN 1755-0998.
- WAPLES, R. S. Definition and estimation of effective population size in the conservation of endangered species. **Population viability analysis**, p. 147-168, 2002.
- _____. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. **Conservation Genetics**, v. 7, n. 2, p. 167-184, 2006. ISSN 1566-0621.
- WAPLES, R. S.; DO, C. LDNE: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. **Mol Ecol Resour**, v. 8, n. 4, p. 753-756, 2008. ISSN 1755-0998.
- WASSER, S. et al. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. **Molecular Ecology**, v. 6, n. 11, p. 1091-1097, 1997. ISSN 1365-294X.
- WAYNE, R. K. et al. Molecular systematics of the Canidae. **Systematic biology**, v. 46, n. 4, p. 622-653, 1997. ISSN 1063-5157.
- WEBER, W.; RABINOWITZ, A. A global perspective on large carnivore conservation. **Conservation Biology**, v. 10, n. 4, p. 1046-1054, 1996. ISSN 1523-1739.
- WILLEMS, R. J. et al. Restricted gene flow among hospital subpopulations of *Enterococcus faecium*. **MBio**, v. 3, n. 4, p. e00151-12, 2012. ISSN 2150-7511.
- WILSON, K. R.; ANDERSON, D. R. Evaluation of two density estimators of small mammal population size. **Journal of Mammalogy**, p. 13-21, 1985. ISSN 0022-2372.
- WOODROFFE, R.; GINSBERG, J. R. Edge effects and the extinction of populations inside protected areas. **Science**, v. 280, n. 5372, p. 2126-2128, 1998. ISSN 0036-8075.
- WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. **Genetics**, v. 16, n. 2, p. 97-159, 1931. ISSN 0016-6731.

_____. The genetical structure of populations. **Annals of Human Genetics**, v. 15, n. 1, p. 323-354, 1949. ISSN 1469-1809.

ZANCHETTA, D. et al. **Plano de Manejo Integrado: Estações Ecológica e Experimental de Itirapina-SP**. São Paulo, p.318. 2006

ZIMMERMANN, F.; BREITENMOSER-WÜRSTEN, C.; BREITENMOSER, U. Importance of dispersal for the expansion of a Eurasian lynx *Lynx lynx* population in a fragmented landscape. **Oryx**, v. 41, n. 3, p. 358–368, 2007.

ZHAN, X. et al. Molecular analysis of dispersal in giant pandas. **Molecular ecology**, v. 16, n. 18, p. 3792-3800, 2007. ISSN 1365-294X.