

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais
Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LBMC)
Departamento de Genética e Evolução - DGE

“Análise da variabilidade genética e parentesco de *Lycalopex vetulus* (LUND, 1842), de uma região de cerrado do norte de Minas Gerais e sudeste de Goiás – Brasil. ”

Orientador: Pedro Manoel Galetti Junior.

São Carlos

2015

Universidade Federal de São Carlos
Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais
Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LBMC)
Departamento de Genética e Evolução - DGE

“Análise da variabilidade genética e parentesco de *Lycalopex vetulus* (LUND, 1842), de uma região de cerrado do norte de Minas Gerais e sudeste de Goiás – Brasil. ”

André Pereira da Silva

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

São Carlos

2015

Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da Biblioteca Comunitária UFSCar
Processamento Técnico
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S586a Silva, André Pereira da
Análise da variabilidade genética e parentesco de
Lycalopex vetulus (LUND, 1842), de uma região de
cerrado do norte de Minas Gerais e sudeste de Goiás -
Brasil / André Pereira da Silva. -- São Carlos :
UFSCar, 2015.
52 p.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de
São Carlos, 2015.

1. Raposa do campo. 2. Comportamento. 3. Genética
da conservação. 4. Diversidade genética. I. Título.



Folha de Aprovação

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato André Pereira da Silva, realizada em 10/06/2015:

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior
UFSCar

Prof. Dr. Marcelo Adorna Fernandes
UFSCar

Profa. Dra. Cibele Biondo
UFABC

Agradecimentos

Quero agradecer ao Professor Dr. Pedro Manoel Galetti Junior, meu orientador desde o TCC, em 2011. As oportunidades de aprendizagem que tive durante todos esses anos só foram possíveis graças ao seu apoio à pesquisa e ao desenvolvimento dos alunos. Muito obrigado pela oportunidade e confiança.

Ao Programa de Pós Graduação em Ecologia e Recursos Naturais. João, Roseli e Marcelo, muito obrigado por se esforçarem para resolver nossos problemas e por ter paciência com nossos atrasos. Muito obrigado pela ajuda financeira nas saídas de campo e congressos.

Agradeço às instituições de fomento. Ao CNPq, pela bolsa de mestrado e insumos de laboratório. À FAPESP, CAPES e ao SISBIOTA que contribuem com o laboratório.

Minha mãe, Maria de Fátima, por ser um grande exemplo de vida, um porto seguro. Você é uma das mulheres mais fortes que eu conheço. Obrigado pelo suporte durante todos esses anos, espero poder retribuir o orgulho que você me dá.

Meu pai, José Claudio, meu outro grande exemplo de vida. Obrigado por sempre estimular uma vida de estudos e por entender os momentos pelos quais passei durante todos esses anos. Sem dúvida, tudo teria sido muito mais difícil sem sua ajuda. Obrigado mesmo.

Meus avós Anita, José e Terezinha. Não tenho como expressar como os enxergo. Vocês passaram por tanta coisa nessa vida, são detentores de tanto conhecimento. Tenho uma grande sorte em compartilhar de minha vida com vocês, podendo, pelo menos um pouco, aprender com vocês. Vocês são grandes mestres.

Meu irmão, Daniel, e sua futura esposa (2016 vem aí), Joice. Do clichê, irmão não se escolhe mas amigo sim, tenho certeza de ter encontrado em você, Daniel, não somente um grande amigo, mas um dos melhores que poderiam existir você foi quem me estimulou nos estudos, te ver se matando para entrar na faculdade foi o que me levou a querer o mesmo, devo muito do que estou fazendo hoje a você. Joice, obrigado, primeiramente, por fazer meu irmão feliz, e também por ter se tornado parte tão importante da minha vida nesse interim. Valeuzão. Podem contar sempre comigo!

Ao Wagner, amigo de longa data e irmão por excesso de amizade. Você é uma ótima pessoa e é ótimo poder estar próximo de você. Obrigado por sempre achar “muito massa” as coisas que eu faço e por estar sempre lá quando precisei.

À Raysa, por todos esses anos de convivência, por tudo que me ensinou e por todo apoio que me deu. Não consigo colocar em palavras tudo de bom que desejo para sua vida e como sou grato por tudo.

Ao laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação, vocês são ótimos. Mesmo com alguns pequenos desentendimentos, sempre imperou em nosso convívio a parceria. Obrigado por tornarem o mestrado mais fácil, tanto na área intelectual como na social. Léo, Raphael, Carmen, Carla, Paola, Andreia, Gisele, Rosane, Ary, Carol, Andiará, Pamonha, Luiza, Jorge, Juan, Karen, Karla, Camila, Mariana, Renatinha e Paulo, valeu! Um agradecimento especial para Ueslei, Bruno e Alline Braga que tanto me ajudaram no mestrado.

Ao Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado, nas pessoas do Frederico, Fernanda, Mozart, Ricardo, Fabiana, Fredão, Caio e Stacie. Essa parceria foi muito mais do que profissional. Vocês se tornaram valiosos amigos e pessoas com as quais espero sempre manter contato. Obrigado por todo o aprendizado, pelas conversas e oportunidades.

Aos meus companheiros de república. Primeiro em 2009 (Zona do RoccoCréu), Roccão, valeu por ter compartilhado a vida, as contas e as mudanças comigo. Em 2010 a zona cresceu e virou QG Pedra 90, Rocco, Fitão, Bombinha, Iara, Vítor, Corvo, Nina e Godofredo. Vocês todos se tornaram grandes amigos, aprendi muito com a loucura de todos. Nossas festas e amizade foram muito importantes na formação do meu caráter (não sei se sou uma boa pessoa! Haha). Sempre lembrarei com carinho desse tempo. Por fim, desde 2014, queria agradecer a nova república, ainda Pedra 90. Rocco, Léo, Magrão, Lucão, Dé, Corvo (arrebenta na Austrália muleke), Nardo, Nina, Godofredo, Refrigerante e Jhonny Turbo. Apesar de morarmos juntos a pouco tempo, nossa amizade vem desde de 2008. Morar com vocês tem sido muito bom, jamais esquecerei nossas festas de comemoração de defesas de mestrado e qualificações. Só é possível festejar com tanta intensidade e, em tão poucas pessoas, as conquistas daqueles com os quais temos profunda amizade e respeito. As conquistas individuais sempre foram tratadas como coletivas. Sobrevivemos a períodos sem grana, ao Mohamed malucão, à selva, aos latidos e uivados dos cachorros, ao Fraaaangoooo. Nada nessa vida pode nos deter.

Não moraram comigo (mais ou menos), mas são pessoas as quais não consigo deixar de pensar quando devaneio sobre minha vida em São Carlos. Isabella (Isão), Gabi (Zé cobra), Marina (Bolovo) e Carmen (nega), obrigado mesmo, vocês são demais.

Aos Pedra 90, Pi, Guarani, Léo, Corvo, Rocco, Magrão, Fitão, desde o café da manhã dos campeões até nossas composições musicais e etílicas, tenho grande apreço por todos vocês, a graduação que marcou minha vida.

Amigos que extrapolaram o laboratório, Léo (esse léo tá em todo lugar), Rapha, Lucão e Carmen. Valeu pelas festas, conversar, pedaladas, e todos os bons momentos.

Agradeço às minhas bicicletas, Netuno (velha e sempre), GTX (desaparecida) e High One. Por me levarem, com um baixo custo monetário, a diversos lugares Por se tornarem meu principal meio de transporte. Espero que, um dia, toda a sociedade possa enxergar e respeitar o ciclista como parte integrante do trânsito.

Agradeço à natureza, que me permitiu apreciar tantas belas cenas. Grande exemplo de força, resiste a tantas pressões, por nós causadas. É triste ver o estado de exploração e de descaso no qual detentora de tanta beleza se encontra. Que um dia as pessoas possam reconhecer no ambiente natural não somente uma fonte de recursos, mas que, a manutenção e coexistência persistam pela sua simples existência. Achar motivos para defender a natureza não faz sentido, uma vez que denota que estamos lhe fazendo um favor, quando, na verdade, nós é que somos, por ela, defendidos.

Um especial obrigado aos lobos guarás, tamanduás bandeiras, cachorros do mato, quatis, sauás, saguis, micos pretos, macacos pregos, lontras, veados, antas, araras azuis, queixadas, catetos, jaguatiricas, por me permitirem observá-los em minhas saídas de campo.

Agradeço à Raposa do campo. Tão pequena em tamanho, mas gigante em beleza. Muito mais do que sua descrição técnica, presente no corpo do texto desta dissertação, a raposinha é um ente que persiste e resiste, embelezando o, já tão judiado, cerrado brasileiro. Me desculpe o estresse causado pelas capturas, deve ser difícil acordar não entendendo nada do que aconteceu, com brincos, colar, marcas de biópsia e seringas. Espero que nosso trabalho ajude a valer a pena tudo pelo que vocês passaram, e que, assim, possamos contribuir para ajudar muitas raposas ao redor do Brasil.



ÍNDICE

1.Introdução.....	13
1.1. Biologia da Conservação e Genética da Conservação.....	14
1.2 Marcadores Moleculares.....	16
1.3 Os Canídeos e sua história natural	16
1.4 A Raposa-do-campo (<i>Lycalopex vetulus</i>).....	17
2. Objetivos.....	21
3. Material e métodos.....	21
3.1. Área de estudo.....	21
3.2. Coleta de Sangue.....	25
3.3. Extração do DNA.....	27
3.4. Amplificação dos <i>loci</i> de microssatélites.....	28
3.5. Análise da Diversidade genética.....	30
4. Resultados.....	31
5. Discussão.....	37
6. Conclusão.....	41
Referências Bibliográficas.....	44

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: *Lycalopex vetulus*, observada no município de Cumari – GO. Foto: Frederico Gemesio Lemos.....18
- Figura 2: *Distribuição geográfica de Lycalopex vetulus*. Imagem elaborada pelo Instituto Chico Mendes (ICMBio), disponível em Lemos et al 2013.....20
- Figura 3: Área de estudo. Denotando os estados de Goiás (GO) e Minas Gerais (MG). A divisa dos municípios se dá pelo Rio Araguari. Shapes obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Podemos ver o pontos de captura das Raposas-do-Campo, triângulos representam fêmeas e círculos representam os Machos.....23
- Figura 4. Área de estudo com maior aproximação dos pontos e com imagem de satélite da paisagem. As informações de cada ponto pode ser encontrada na tabela 1. GO= Goiás, MG= Minas Gerais. Shapes obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Imagem de Satélite obtida pelo GoogleEarth®24
- Figura 5: *L. vetulus* capturado em armadilha do tipo Tomahawk®. (Foto: André Pereira da Silva).....25
- Figura 6: Procedimento de coleta de sangue. (Foto: André Pereira da Silva).....26
- Figura 7. Gráfico de barras fornecido pelo programa Structure (K=2), evidenciando a presença de apenas uma população.....32
- Figura 8. Análise de correspondência fatorial, podemos ver que há a presença de somente um grupo.....32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Informações Gerais da Amostras, ID Cenap= Número de tombamento da amostra no CENAP. Araguari – MG e Cumari - GO.....26

Tabela 2: Seqüências foward e reverse dos pares de primers de microssatélites isolados para C. *Familiaris* (FRANCISCO et al., 1996).....29

Tabela 3. Estimativa da taxa de alelos nulos, de acordo com os métodos utilizados pelo programa Microchecker.....32

Tabela 4. Dados relacionados à análise de EHW. EHWD= Valor de P para déficit de Heterozigotos, com intervalo de confiança de $0,005 < \alpha > 0,5$; EHWE: Valor de P para excesso de Heterozigotos, com intervalo de $0,005 < \alpha > 0,5$. EHW= Valor de P para o EHW, com intervalo de confiança de $0,005 < \alpha > 0,5$; Fis= Coeficiente de Endocruzamento; pLarger= Valor de P para excesso de heterozigotos, com intervalo de confiança de 0,5%; pSmaller= Valor de P para déficit de heterozigotos, com intervalo de confiança de 0,5%..... 33

Tabela 5. Características dos *loci* analisados. N=Número de indivíduos; Na= Número de Alelos; Ne= Número efetivo de Alelos; RA= Riqueza Alélica; Ho= Heterozigosidade observada; He= Heterozigosidade esperada; PIC= Conteúdo de Informação Polimórfica; PB= Tamanho do Loci, em pares de base.....34

Tabela 6. *Atribuição de relações de parentesco entre os indivíduos estudos. MLR= Atribuição realizada pelo programa ML-Relatedness; PCMC= Atribuição realizada pelos trabalhos de observação de Programa de Conservação Mamíferos do Cerrdo; PO = Parent/Offspring; FS= Full Siblings; HS = Half Siblings R= Relacionamento desconhecido. *****= Ausência de hipótese sobre relacionamento.....35*

Tabela 7. Cálculo da média de distância entre os indivíduos e seus aparentados. ID CENAP= Código de tombamento no CENAP; DR= Média da distância entre um indivíduo e seus parentes; DPI= Média da distância entre um indivíduo e seus Pais/Irmãos completos; DFPI= Média da distância entre as fêmeas e seus pais/irmãos completos; DMPI= Média da distância entre os machos e seus pais/irmãos completos.....36

Resumo

Neste estudo descrevemos a diversidade genética de uma população de raposas do campo (*Lycalopex vetulus*), animal cujo habitat se encontra na fitofisionomia de Cerrado, uma das mais fragmentadas e antropizadas do Brasil. Para tanto, foram capturados 33 indivíduos em uma região de fazendas de gado no norte de Minas Gerais e no sudeste de Goiás. Foram amplificados 10 *loci* de microssatélites. Os dados revelam que tais *loci* são úteis no estudo de genética da conservação. A diversidade genética, presente nos indivíduos capturados neste estudo, pode ser considerada alta, apesar do alto grau de fragmentação da área. O tamanho efetivo populacional calculado neste trabalho demonstra que a diversidade genética sustentada pelos animais estudados é representativa de uma população de aproximadamente 1.300 indivíduos. Realizamos estimativas de parentesco utilizando três métodos, um através da leitura dos genótipos por um *software*, outro através de informações obtidas por estudos de observação de campo e um último, utilizado somente quando os dois primeiros estavam em dissonância, baseado na análise visual par a par de todos os alelos dos *loci*. Com auxílio de georeferenciamento calculamos a distância entre indivíduos aparentados, atentando para possíveis variações de gênero. Concluimos que a raposa é capaz de se movimentar por grandes distâncias (superiores a trinta quilômetros) e que, aparentemente, não há diferença na capacidade de dispersão de machos e fêmeas.

Palavras-chave: Raposa do campo, comportamento, Genética da Conservação, Diversidade genética

Abstract

This study describes the genetic diversity of a population of Hoary foxes (*Lycalopex vetulus*), animal whose habitat is in the physiognomy of Cerrado, one of the most fragmented and disturbed areas of Brazil. To this end, 33 individuals were captured in a region of cattle ranches in northern Minas Gerais and southeast of Goiás. We amplified 10 microsatellite loci. Our data reveal that these loci are useful in the study of genetic conservation. The genetic diversity present in individuals captured in this study, can be considered high, despite the high degree of fragmentation in the area. The effective population size calculated in this study shows that the genetic diversity supported by the animals studied is representative of a population of approximately 1,300 individuals. We conducted kinship estimates using three methods, one by reading the genotype by software, another through information obtained by field observation studies and a final one, used only when the first two were at odds, based on par visual analysis to analyze all alleles of all loci. With the aid of GPS, the distance between related individuals, paying attention to possible gender's variation. We conclude that the fox is able to move long distances (over thirty kilometers) and that apparently there is no difference in the male and female dispersal capacity

Keywords: Hoary fox, behavior, Conservation genetic, Genetic diversity.

1. Introdução:

Um meio ambiente saudável e equilibrado é de extrema importância para os seres humanos, tal importância está, inclusive, presente no artigo 225 da constituição do Brasil:

[...] Todos têm direito ao meio ambiente ecologicamente equilibrado, bem de uso comum do povo e essencial à sadia qualidade de vida, impondo-se ao Poder Público e à coletividade o dever de defendê-lo e preservá-lo para as presentes e futuras gerações. [...] (BRASIL, 1988)

Diante de uma imposição pragmatizada da sociedade, em que se denota um dualismo “homem *versus* natureza”, há uma dicotomia que opõe o crescimento urbano e a conservação do meio ambiente. Entretanto, o homem não se encontra em um ambiente diferente do ambiente natural, mas sim em uma íntima ligação com o mesmo, dependendo, direta e indiretamente, de um meio ambiente saudável e conservado. (BRASIL, 1988; FRANKHAM et al., 2008). Dentro desse contexto surge a disciplina da Biologia da Conservação, que se dedica a evitar que ocorram extinções não naturais e a manter, ao máximo, o equilíbrio do meio ambiente (FRANKHAM et al., 2008).

Dentro deste panorama se encontra o cerrado brasileiro, fitofisionomia que ocupa o segundo lugar em extensão no Brasil, se distribuindo desde o planalto central, com pequenas manchas na Mata Atlântica, floresta Amazônica e Caatinga. Sua formação vegetal engloba formações campestres, savânicas e florestais (RIBEIRO E WALTER, 2008), conferindo, a este ecossistema, padrões biogeográficos de flora e fauna distintos (RIBEIRO E WALTER, 2008). Grande parte do cerrado vem sofrendo acelerado desmatamento devido à ação antrópica (MACHADO et al., 2004) o que o classifica como um dos 25 ecossistemas mais ameaçados do planeta (MYERS et al., 2000). Temos que, em 2002, 38,9 % dessa área já havia sido transformada em terras agrícolas, pastagem e reflorestamento (SANO et al., 2009). Como o cerrado é altamente vulnerável a ações antrópicas, Machado et al. (2004) projeta que, se as taxas de desmatamento se mantiverem, este bioma ficará restrito a unidades de conservação e áreas indígenas, até o final de 2030.

No cerrado, os mamíferos correspondem ao segundo grupo mais diverso, entre os vertebrados terrestres, representando, aproximadamente, 15% das espécies conhecidas (AGUIAR et al., 2004). Segundo Rodrigues et al. (2002) e Trole et al. (2007) fragmentações e alterações antrópicas do habitat, juntamente com pressões advindas de caça e outras ameaças (COSTA et al., 2005) se caracterizam como as principais ameaças aos mamíferos de médio e grande porte (acima de 1 kg de massa) (FONSECA E ROBINSON, 1990).

O avanço da exploração interiorana no Brasil foi especialmente marcante para o cerrado. Na década de 50, juntamente com a construção de Brasília houve uma crescente migração de pessoas para a região centro oeste do Brasil. Iniciou-se a chamada de política de expansão agrícola, que levou a um aumento nas alterações antrópicas na fitofisionomia de cerrado que, até então, era classificada como pobre em biodiversidade. Hoje o cerrado é mundialmente conhecido como um *hotspot* da biodiversidade, contando com leis próprias de conservação (BRASIL, 2005). Porém, sua história já é marcada pela exploração da terra para o plantio e criação de gado (KLINK E MACHADO, 2005). O que há, em grande parte, são mosaicos de áreas protegidas com áreas exploradas. Um mosaico de áreas deve ser uma fonte especial de estudo, pois, além de representar a grande realidade do cenário brasileiro, reflete, de uma maneira diferenciada, como as espécies selecionam e utilizam os ambientes, levando em consideração a disponibilidade de recursos (LAW E DICKMAN, 1998). Segundo o Sistema Nacional de Unidades de Conservação (SNUC) do Brasil, aproximadamente 8% do cerrado brasileiro encontra-se em áreas de proteção. Ou seja, dos 2.116.000 km² de regiões originalmente pertencentes ao cerrado no Brasil, somente 169.280 km² são de áreas protegidas (KLINK E MACHADO, 2005). Assim sendo, é de demasiada importância que estudos sejam realizados em tais áreas não protegidas, para que possamos formular eficientes estratégias governamentais de educação ambiental e regulamentação de atividades, a fim de proporcionar a coexistência entre as áreas protegidas e as áreas antropizadas, principalmente aquelas utilizadas com a exploração agropastoril.

1.1. Biologia da Conservação e Genética da Conservação.

Antigamente, o ato de se conservar a biodiversidade do planeta se justificava unicamente como um benefício à humanidade (JORDAN, 1995). Hoje, com o conhecimento de que todos os ecossistemas naturais têm sido alterados por ações

antrópicas, alguns até o ponto de colapsar, a Biologia da Conservação aparece como uma resposta da comunidade científica para essa “crise da biodiversidade” (MEFFE E CARROLL, 1941). Dentro da Biologia da Conservação existe a Genética da Conservação que é o uso da teoria e técnicas da genética para reduzir o risco de extinção das espécies (FRANKHAM et al., 2008). Tal subdisciplina é capaz de acessar dados populacionais de extrema importância para tomadas de ações conservacionistas, como a distribuição da variação genética dentro e entre populações, abundância populacional, o grau de parentesco entre os indivíduos, dieta, migração, grau de endogamia, fluxo gênico (MEFFE E CARROLL 1941; PALOMARES et al. 2002; MIOTTO et al. 2007; FRANKHAM et al 2008), presença de gargalos populacionais, que pode acometer pequenas populações levando-as a sofrer esse fenômeno que diminui o *fitness* dos indivíduos, devido à baixa diversidade genética, causada pelo pequeno tamanho da população (FRANKHAM et al., 2008). Tais dados são elucidados a partir do uso de marcadores moleculares em amostras de DNA da espécie alvo, que podem ser obtidas de maneira não-invasiva (e.g. pelos, fezes) ou através da captura da espécie e obtenção de algum tecido (AVISE, 2004; WAYNE E MORIN, 2004; PRUGH et al., 2005; MIOTTO et al., 2007).

Muitas vezes, populações não dependem somente de um grande número de indivíduos, mas sim de um tamanho efetivo populacional suficientemente grande para a manutenção da diversidade genética. Esse tamanho efetivo populacional é o tamanho de uma população ideal que se tornaria endogâmica na mesma taxa da população atual, ou seja, o tamanho efetivo populacional é uma medida do comportamento genético da população, relacionando-a com uma população ideal (FRANKHAM et al., 2008), esse dado pode ser acessado através da análise da diversidade genética das populações.

Outro importante fator que pode ser determinado pela estudo de genética de populações é o Coeficiente de Endogamia (Fis). A definição de um Fis é importante pois seu valor determina a probabilidade de que alelos, em um loco de um mesmo indivíduo, sejam idênticos por descendência. Tal probabilidade varia de 0, para indivíduos exogâmicos, a 1 para indivíduos completamente endogâmicos (FRANKHAM et al., 2008)

Em estudos de genética das populações, o EHW é importante para determinar fatores que denotem a ocorrência de evolução, como, por exemplo endogamia, seleção (natural e sexual), deriva genética, (FRANKHAM et al., 2008).

1.2. Marcadores Moleculares.

Nos últimos anos, vários marcadores moleculares têm sido usados em estudos de diversidade genética e biologia da conservação (AVISE, 2004), monitorando a variabilidade genética de populações em declínio, e assim, acessando suas consequências evolutivas (WAYNE E MORIN, 2004). Cada marcador molecular apresenta características que os tornam mais adequados frente à problemática (PEREZ-SWEENEY et al., 2003), sendo assim, a escolha cuidadosa entre diferentes tipos de marcadores direciona o trabalho para o problema a ser elucidado, desde a identificação de indivíduos, espécies e famílias até a formulação de hipóteses filogenéticas (SOLÉ-CAVA, 2001). Dentre esses marcadores moleculares, podemos citar aqueles usados para amplificar fragmentos de microssatélites (SSR – Simple Sequence Repeats) que consistem em pequenas sequências de 1 a 6 nucleotídeos de comprimento (como, por exemplo, CA, CAAC, ou GGAACC), repetidas lado a lado (FERREIRA E GRATTAPAGLIA, 1995). São abundantes no genoma nuclear de eucariotos (WEBER E WONG, 1993) e têm herança codominante, isto é, cada um dos alelos de um *locus* de um indivíduo pode ser identificado separadamente (SUNNUCKS, 2000). Microssatélites são marcadores largamente utilizados em estudos populacionais, pois poucos *loci* podem fornecer muitos alelos a serem examinados (PARKER et al., 1998). Devido a uma grande variação no número de unidades repetitivas para qualquer *locus* entre membros de uma espécie, os *loci* de microssatélites exibem alto polimorfismo (CULVER et al., 2001). Outro aspecto interessante na análise de microssatélites é a de que no genoma animal, em alguns casos, pode ocorrer conservação de sítios de microssatélites entre espécies relacionadas, tornando possível a utilização dos mesmos *primers*, comumente denominados heterólogos, entre espécies ou gêneros distintos (MENOTTI-RAYMOND E O'BRIEN, 1995).

1.3. Os canídeos e sua história natural

A família *Canidae* (*Mammalia*, *Carnivora*, *Caniformia*) é composta por 36 espécies, distribuídas por todo o mundo. Sua origem e diversificação se deu na

América do Norte, tendo como primeiro registro fóssil o *Hesperocyon* (Scott, 1890), no período Eoceno (40 Ma) (STAINS, 1975). Das três subfamílias das quais se tem registro fóssil, duas foram extintas entre o período Mioceno e o Pleistoceno, sobrando somente a subfamília Caninae (WANG E TEDFORD, 2007), que derivou em todas as espécies de canídeos viventes. A dispersão dos canídeos para fora da América do Norte se deu a aproximadamente 6 milhões de anos, para a Ásia e a Europa (WANG E TEDFORD, 2007); para a América do Sul a incursão foi mais recente, por volta de 3 milhões de anos atrás, a formação do istmo do Panamá favoreceu tal dispersão.

Os canídeos são conhecidos pela sua inerente capacidade de colonizar diversos tipos de habitats, demonstrando grande flexibilidade em seus requerimentos ecológicos (JOHNSON et al., 1996). Observa-se, nos canídeos, diversos traços incomuns que os canídeos apresentam, tais como; monogamia com cuidado parental, incorporação de adultos no grupo social por um longo período, cuidado aloparental, supressão reprodutiva em indivíduos subordinados, pseugravidéz, monoestria (MOEHLMAN, 1989; GEFFEN et al., 1996; MOEHLMAN E HOFER, 1997; ASA, 1997; ASA E VELDESPINO, 1998). De intrincada miríade de relações sociais, os canídeos, normalmente, requerem uma vasta área de vida, o que contrasta intimamente com uma relação conflituosa com o *Homo sapiens* (WILSON E DELAHAY, 2001). A perseguição por humanos representa uma das grandes ameaças sofridas pelos *Canidae*, muitas vezes devida à predação de animais de criação (ECHEGARAY E VILÀ, 2009). Tal predação pode causar danos econômicos, porém, muitas vezes, ocorre devido ao mal planejamento infra estrutural do local de alocação dos animais de criação. A grande capacidade de dispersão dos *Canidae* também se transcreve em conflitos com nosso modelo de sociedade, diversas mortes de fauna, causadas por atropelamentos são registradas todos os anos.

Grandes carnívoros apresentam-se em pequenas populações, devido à sua posição trófica e aos seus hábitos comportamentais, assim os distúrbios que afetam essas pequenas populações são propícios a causarem extinções locais com mais facilidade (WOODROFFE E GINSBERG, 1998). Além de mortes em estradas, a fragmentação, a alta quantidade de distúrbios, produzidos por centros urbanos, a simplificação ambiental, causada por sistemas agropecuários, configuram em mais um catalisador para a já complicada relação “homem x canídeos”

1.4. A Raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*).

A Raposa-do-campo (*Lycalopex vetulus*, Lund 1842) (Figura 1) é um canídeo de pequeno porte com corpo e membros delgados. Geralmente, a porção superior do corpo deste canídeo é de um “cinza pálido” e a porção inferior amarelada. *L. vetulus* apresenta, também, uma faixa branca na parte anterior do pescoço e na região ventral. Os machos podem ter uma faixa de pelagem negra que vai da nuca até a cauda, porém, esse dimorfismo sexual não está presente em todos os indivíduos (DALPONTE, 2009). *L. vetulus* figura como o menor canídeo brasileiro, com massa atingindo de 3 a 4 kg. De dieta essencialmente insetívora, térmitas (cupins e formigas) compreendem cerca de 36,6 a 59% de sua alimentação segundo J’acomo et al (2003) e Juarez e Marinho-Filho (2002) respectivamente. Lemos (2007), encontrou térmitas em 91,3% das amostras de fezes de raposas-do-campo analisadas, tal comportamento reflete morfológicamente em um tamanho diminuto do crânio e por uma dentição peculiar, com caninos pequenos e molares largos (DALPONTE, 2009). Além de insetos, outros grupos animais, (como pequenas aves e pequenos mamíferos) e vegetais podem ser consumidos (JUAREZ E MARINHO-FILHO, 2002; J’ACOMO et al., 2003; LEMOS, 2007, DALPONTE, 2009;). Tal hábito de generalização de nicho pode ser relacionado com o fato a *L. vetulus* estar em simpatria com outras duas espécies de canídeos de



Figura 1. *Lycalopex vetulus* observada no município de Cumari - GO. Foto: Frederico Gemesio Lemos.

maior porte, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*, Linnaeus, 1766). Como somente 18% dos 55 possíveis pares de simpatria entre canídeos sul americanos efetivamente ocorrem, essa grande extensão alimentar contribui para uma menor sobreposição de nicho, que aliada à alguma

evitação podem culminar em coexistência (MEDEL E JAKSIC, 1988; JUAREZ E MARINHO-FILHO, 2002; J'ACOMO et al., 2003; LEMOS, 2007). Um certo grau de generalização alimentar, que também é encontrada nos lobos-guará e nos cachorros-do-mato, reflete o período do Pleistoceno, em que a extinção de grandes herbívoros culminou na extinção dos grandes predadores, o que favoreceu, evolutivamente, os grupos de canídeos com hábitos alimentares mais generalizados (LANGGUTH, 1975; J'ACOMO et al., 2003).

Apesar de ter sido encontrado fósseis de *L. vetulus* na patagônia (Argentina), esse canídeo é endêmico da região central do Brasil, compreendendo os planaltos centrais, dentro de regiões de cerrado, priorizando a fitofisionomia de campo limpo e regiões de pastagem para criação de gado bovino (*Bos taurus*), até em zonas de transição, áreas abertas do pantanal (JUAREZ E MARINHO-FILHO, 2002; J'ACOMO et al., 2003; COURTENAY et al., 2005; LEMOS, 2007; ROCHA et al., 2008; DALPONTE, 2009; LEMOS et al., 2013). Sua distribuição inclui os estados de São Paulo (porção centro-nordeste e oeste), o norte do Piauí, o leste do Maranhão, o centro-sul do Mato Grosso, áreas secas do Mato Grosso do Sul, sul de Rondônia, Goiás, Tocantins, Distrito Federal, sudoeste da Bahia e centro-oeste de Minas Gerais (LEMOS et al., 2013) (Figura 2.).

Alguns estudos mostram que a raposa-do-campo tem hábitos monogâmicos, sendo encontrada em pares durante a estação de acasalamento, o que pode corresponder até a sete meses do ano, desde a formação dos pares até a dispersão dos filhotes (DALPONTE, 2009). Com um período de gestação de 50 dias e uma ninhada de 2 a 5 filhotes, *L. vetulus* apresenta cuidado parental considerável até os quatro meses de vida de sua prole, período em que a fêmea amamenta. A dispersão dos filhotes se dá entre o nono e o décimo mês de vida (DALPONTE, 2009), porém, dados complementares de dispersão não existem na literatura. Sua atividade de forrageamento se concentra durante o período crepuscular-noturno em que facilmente se observa os animais predando térmitas e se escondendo dentro de tocas abandonadas de tatu peba (*Euphractus sexcinctu*, Linnaeus, 1758), local também utilizado como ninho. (LEMOS, 2007; COURTENAY et al., 2005; DALPONTE, 2009;). Segundo, Courtenay et al. (2005) em um estudo com rádio colares em *L. vetulus*, a área de vida utilizada por um casal de raposas foi calculada em uma média de 456 ha. Juarez e Marinho-filho (2002) chegaram à um valor de área de vida de 385 ha, para uma fêmea, com período de amostragem de 36h, também com rádio colares. Ambos os

trabalhos não contemplaram uma variabilidade de indivíduos (quatro e três indivíduos, respectivamente)

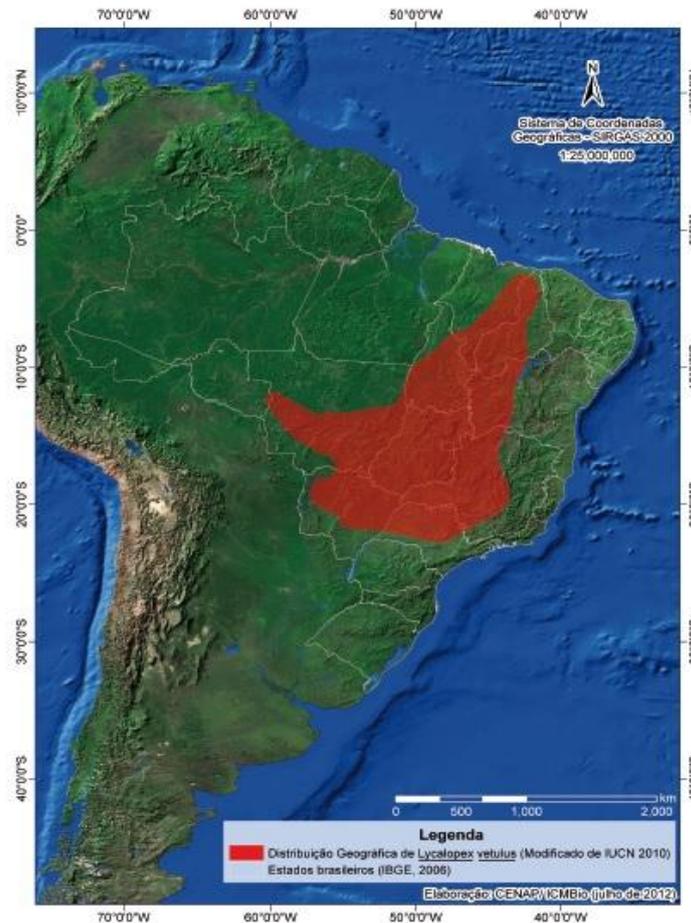


Figura 2. Distribuição geográfica de *Lycalopex vetulus*. Imagem elaborada pelo Instituto Chico Mendes (ICMBio), disponível em LEMOS et al 2013.

Mesmo sendo endêmica do Brasil, a falta de estudos sobre a raposa-do-campo caracteriza uma confusão no seu estado de conservação. *L. vetulus* é classificada como “de mínima preocupação” (*LC – Last Concern*) pela União Internacional pela Conservação da Natureza (IUCN – International Union for Conservation of Nature-2014), tal classificação é dada para um táxon que foi avaliado pelos critérios da IUCN e não se qualificou como criticamente em perigo, nem como ameaçada, nem como vulnerável, nem como quase ameaçada. Taxa muito difundidos e abundantes são incluídos nesta categoria e *L. vetulus* é considerado abundante em sua área de distribuição e com capacidade de adaptação frente às alterações antrópicas (DALPONTE E COURTENAY, 2004). Entretanto, segundo Lemos et al. (2013), *L. vetulus* deveria ser classificada como “Vulnerável”, por razões inerentes a destruição do

bioma Cerrado, que conta com menos de 20% de sua área original e ainda sofre grande pressão antrópica. Segundo os autores, a espécie perderá, pelo menos, 10% de seu habitat nas próximas três gerações (quinze anos). O estudo ainda cita que com “atropelamentos, mortes por cães domésticos, doenças, retaliação à suposta predação de animais domésticos e alta mortalidade de filhotes/juvenis, o declínio populacional deve, em uma estimativa conservadora, ter sido de, pelo menos, 30% nos últimos 15 anos e deve atingir o limite de 30% nos próximos 15 anos”.

A raposa-do-campo figura como um potencial animal símbolo do cerrado brasileiro, seu endemismo e suas peculiaridades deveriam ser fonte de esforço para a manutenção de pesquisas coordenadas para a geração de dados de maior coerência sobre importantes aspectos populacionais, como densidade e distribuição. Não se faz conservação sem que tais características sejam elucidadas.

2. Objetivos

Esse trabalho teve como objetivo acessar informações populacionais de *L. vetulus* através da análise genética do DNA obtido de amostras de sangue que foram coletadas de indivíduos *in situ* em três regiões de fazenda de gado, duas ao sul do estado de Goiás e uma ao norte do estado de Minas Gerais. Como objetivos específicos temos: 1) Elucidar a variação genética da população; 2) Denotar grau de parentesco entre os indivíduos; 3) Avaliar a distância entre os indivíduos aparentados; 4) Investigar sinal de redução (bottleneck) ou de expansão populacional; e 5) Investigar ocorrência de endocruzamento. Tais objetivos foram avaliados através de marcadores moleculares de microssatélites. A hipótese nula é a de que devemos encontrar alta variabilidade genética, devido à aparente grande adaptação da espécie frente a transformação do ambiente em sistema agro-pastoris, espera-se encontrar um baixo grau de parentesco entre os indivíduos da área, também devido aos componentes da paisagem que facilitariam o fluxo gênico, espera-se, também, não se encontrar nenhum sinal de *bottleneck*.

3. Material e Métodos

3.1. Área de Estudo

Os animais foram capturados, em fazendas de gado, localizadas nos municípios de Cumari –GO e Araguari- MG (Figura 3), Brasil Central. Com

aproximadamente 90% da vegetação sendo formada por pasto (*Brachiaria sp.*), nos 10% restantes encontra-se algumas áreas conservadas, apresentando regiões de cerrado *sensu stricto*, Cerradão, floresta de galeria e florestas semidecíduas, totalizando uma área de 15.000 ha. A figura 4 contrasta a área de estudo com seu grau de antropização, através de imagens de satélite obtidas pelo GoogleEarth® podemos ver com maior clareza o ambiente em que as raposas foram capturadas. A área de estudo mantém aproximadamente 1.700 cabeças de gado (*Bos taurus*). O clima tem duas estações bem definidas, uma úmida e quente que vai de setembro a março, e outra seca e fria, de abril a agosto (Lemos et al 2007). Observações em campo e evidências de espécies não alvo, capturadas nas armadilhas, indicam a presença de diversas espécies no local. Vivendo em simpatria com *L. vetulus* podemos citar lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*), cachorros do mato (*Cerdocyon thous*), Jeritatacas (*Conepatus semistriatus*, Boddaert, 1785), Onças pardas (*Puma concolor*, Linnaeus, 1771), quati (*Nasua nasua*, Linnaeus, 1766), Irara (*Eira barbara*, Linnaeus, 1758), Jaguatirica (*Leopardus pardalis*, Linnaeus, 1758), tatu peba (*Euphractus sexcinctu*), entre outros mamíferos. Evidenciando ainda mais a importância de se estudar áreas antropicamente fragmentadas e com alto grau de exploração.

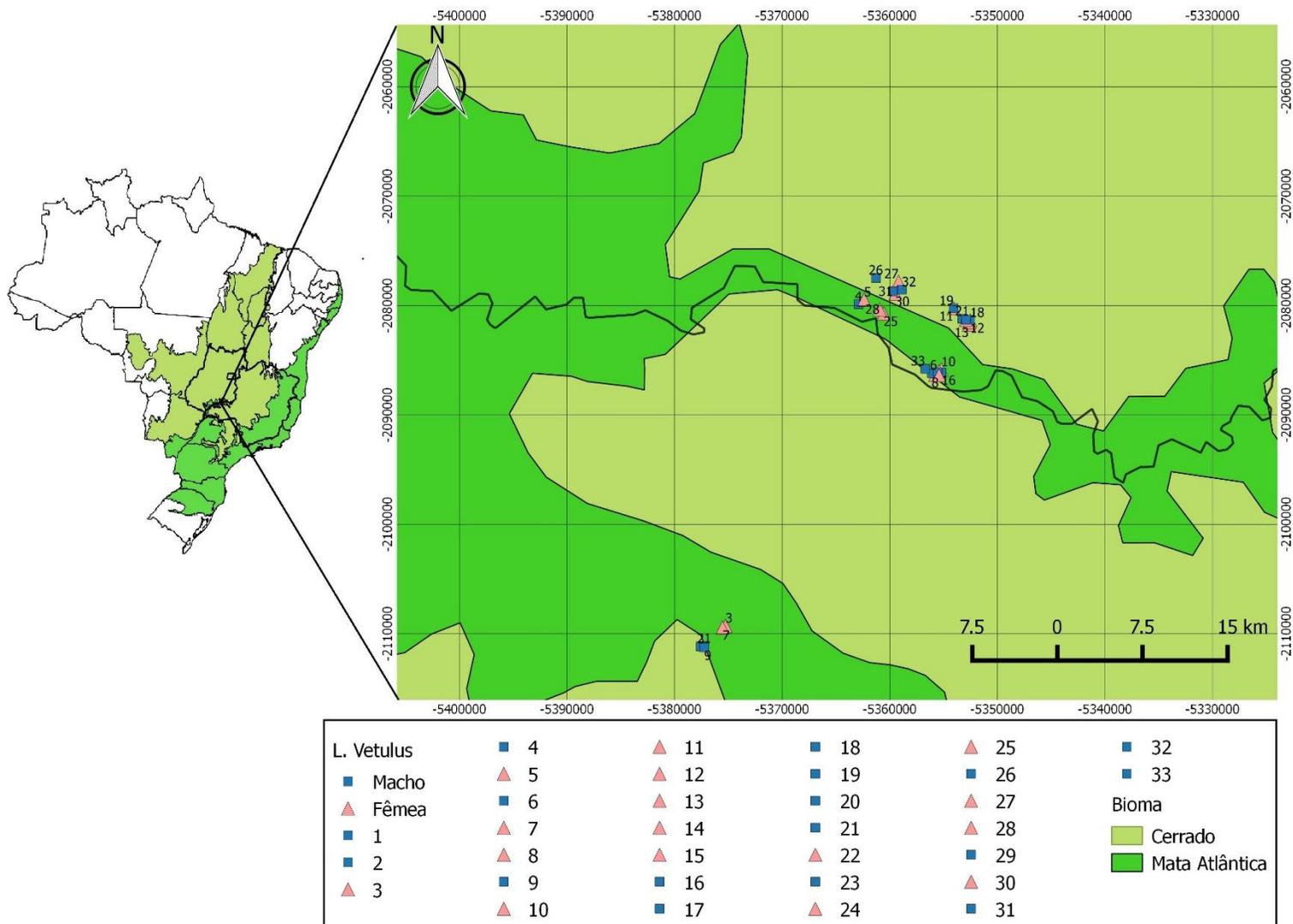


Figura 3. Área de estudo. Denotando os estados de Goiás (GO) e Minas Gerais (MG). A divisa dos municípios se dá pelo Rio Araguaari. Shapes obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Podemos ver o pontos de captura das Raposas-do-Campo, triângulos representam fêmeas e círculos representam os Machos

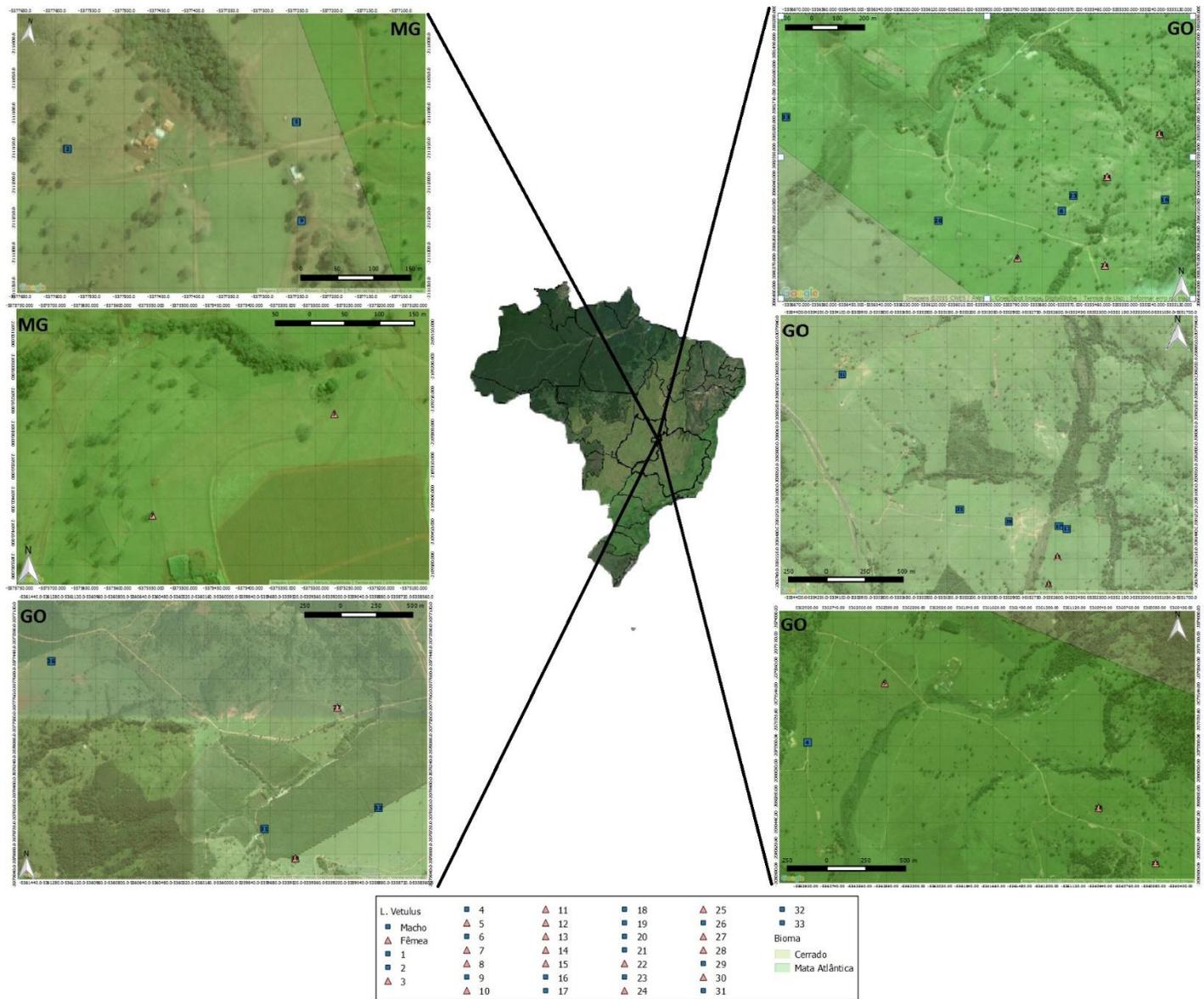


Figura 4. Área de estudo com maior aproximação dos pontos e com imagem de satélite da paisagem. As informações de cada ponto pode ser encontrada na tabela 1. GO= Goiás, MG= Minas Gerais Shapes obtidos pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Imagem de Satélite obtida pelo GoogleEarth®

3.2. Colela de Sangue.'

Os indivíduos de *L. vetulus* foram capturados em armadilhas do tipo tomahawk® (Figura 5), a disposição das armadilhas foi determinada após prévio estudo com a colocação de armadilhas fotográficas e de observações noturnas realizadas pelo Programa de Conservação Mamíferos do Cerrado (PCMC). As armadilhas foram armadas no final da tarde, aproximadamente às 16 horas. A checagem das mesmas se deu logo ao amanhecer, a fim de se aproveitar todo o período de atividade de *L. vetulus*. Ao ser constatado sucesso de captura (Figura 5), a equipe, com a presença de, pelo menos, um médico veterinário, avaliava a condição de saúde do animal. Após o uso de sedativos, amostras de sangue foram coletadas em tubos do tipo Vacutainer®, com EDTA (Figura 6), para evitar coagulação, e depois armazenadas em freezers (-20 °C) até o momento da extração do DNA. Foi obtido um total de 33 amostras, pertencentes à 17 machos e 16 fêmeas (tabela 1), os pontos de captura na área de estudo podem ser observados nas figuras 3 e 4. Todas as amostras de sangue foram tombadas, sob o código de identificação (ID CENAP) informados na Tabela 1 e armazenadas no Centro Nacional de Pesquisa e Conservação de Mamíferos Carnívoros (CENAP), centro de pesquisa criado pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA)



Figura 5: *L. vetulus* capturado em armadilha do tipo Tomahawk®. (Foto: André Pereira da Silva)

em 1994 e, hoje, parte integrante do Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio). Para verificar se todos os indivíduos pertencem à mesma população, *realizamos* um teste de estruturação populacional, utilizando o método *Bayesiano*, empregado pelo *software* Structure® 3.3 (PRITCHARD et al 2000) e uma análise de correspondência fatorial, pelo programa *Genetix* 4.05 (BELKHIR et al 1996-2004)



Figura 6: Procedimento de coleta de sangue. (Foto: André Pereira da Silva)

Tabela 1. Informações Gerais da Amostras, ID Cenap= Número de tombamento da amostra no CENAP. Araguari – MG e Cumari - GO

Número	ID CENAP	Sexo	Local	GPS (UTM 22k)	
1	bPve 354	Macho	Araguari-MG	784393	7938266
2	bPve 355	Macho	Araguari-MG	784078	7938234
3	bPve 356	Fêmea	Araguari-MG	786297	7939973
4	bPve 360	Macho	Cumari-GO	798456	7967527
5	bPve 361	Fêmea	Cumari-GO	798955	7967914
6	bPve 363	Macho	Cumari-GO	805304	7961499
7	bPve 364	Fêmea	Araguari-MG	786032	7939832

8	bPve 366	Fêmea	Cumari-GO	805132	7961325
9	bPve 367	Macho	Araguari-MG	784398	7938132
10	bPve 373	Fêmea	Cumari-GO	805683	7961785
11	bPve 374	Fêmea	Cumari-GO	806845	7967051
12	bPve 375	Fêmea	Cumari-GO	808298	7965987
13	bPve 376	Fêmea	Cumari-GO	808174	7965623
14	bPve 381	Fêmea	Cumari-GO	805480	7961625
15	bPve 382	Fêmea	Cumari-GO	808238	7965805
16	bPve 383	Macho	Cumari-GO	805700	7961535
17	bPve 384	Macho	Cumari-GO	808249	7966006
18	bPve 387	Macho	Cumari-GO	808298	7965987
19	bPve 388	Macho	Cumari-GO	806845	7967051
20	bPve 389	Macho	Cumari-GO	804834	7961470
21	bPve 390	Macho	Cumari-GO	807597	7966129
22	bPve 391	Fêmea	Cumari-GO	807919	7966044
23	bPve 392	Macho	Cumari-GO	805349	7961556
24	bPve 393	Fêmea	Cumari-GO	805466	7961291
25	bPve 394	Fêmea	Cumari-GO	800667	7966691
26	bPve 395	Macho	Cumari-GO	800030	7969775
27	bPve 396	Fêmea	Cumari-GO	802026	7969425
28	bPve 397	Fêmea	Cumari-GO	800310	7967064
29	bPve 400	Macho	Cumari-GO	807919	7966044
30	bPve 401	Fêmea	Cumari-GO	801716	7968390
31	bPve 402	Macho	Cumari-GO	801503	7968595
32	bPve 403	Macho	Cumari-GO	802303	7968728
33	bPve 370	Macho	Cumari-GO	804257	7961870

3.3. Extração de DNA.

O DNA das células sanguíneas foi extraído seguindo o protocolo de extração de DNA “fenol:clorofórmio:Álcool isoamílico” proposto por Sambrook et al. (1989). Primeiramente, 100 µL das amostras, pertencentes a cada *L. vetulus* foram aliquotadas em tubos de 1,5 mL. Seguem os passos realizados em cada alíquota: foi adicionado 200 µL de um tampão de lise, composto por Tris HCl (50 mM), EDTA (50 mM), NaCl (100 mM). Depois foi pipetado 20 µL de Dodecil sulfato de sódio 20% (SDS) e 15 µL de Proteinase K (20 mg/mL). As amostras foram, então, vortexadas e incubadas *overnight* em um termo bloco *Eppendorf Thermostat Plus®*, na temperatura de 55° C, para que houvesse o rompimento das células e a exposição do conteúdo citoplasmático. Após esta etapa, em uma capela de exaustão, foi adicionado 650 µL de uma mistura contendo Fenol, clorofórmio, álcool isoamílico, na proporção de

25:24:1 em partes para cada reagente respectivamente. Assim, a composição dos tubos foi misturada por inversão e então centrifugadas à 14.500 RPM pelo período de 30 minutos. Após a centrifugação a parte superior do sobrenadante das amostras foi transferido para novos tubos e foi realizada novamente a pipetagem de fenol, clorofórmio, álcool isoamílico, a mistura por inversão e a centrifugação. Posteriormente, retirou-se a parte superior do sobrenadante, e foi adicionado clorofórmio no mesmo volume do sobrenadante. A composição dos tubos foi misturada por inversão e depois centrifugadas à 14.500 RPM por 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para novos tubos e adicionou-se 10%, do volume do sobrenadante, de acetato de sódio 3M (pH 7,0) e 2,5 vezes o volume do sobrenadante de etanol absoluto gelado. As fases foram misturadas por inversão e armazenadas *overnight* à -20° C. Após esse período, os tubos foram centrifugados por 15 minutos à 14.500 RPM. Na próxima etapa o sobrenadante foi descartado, restando somente o *pellet*. Adicionou-se, então, 600 µL de etanol 70% e centrifugou-se os tubos por 10 minutos à 14.500 RPM. O sobrenadante foi novamente retirado e o último passo repetido. Ao final do procedimento, o sobrenadante foi retirado, o tubo é completamente seco, restando somente o *pellet*, que continha o DNA. Com os tubos secos, foram adicionados 100 µL de água MiliQ® para eluir o DNA extraído. Ao final, o produto de extração foi quantificado em um biofotômetro *Eppendorf* Biophotomer® e armazenadas à -20° C até o momento da amplificação do DNA.

3.4. Amplificação de loci de microssatélites

O DNA extraído foi submetido a ciclos de amplificação de fragmentos de microssatélites (SSR). Para tanto, foi utilizado 10 pares de *primers* heterólogos descritos originalmente para cachorro doméstico (*Canis familiaris*) por Francisco et al (1996) (Tabela 2), sendo a região 5' do *Forward* marcada com uma cauda universal de 18 pares de base M13 (TGT AAA ACG ACG GCC AGT), como descrito por Schuelke (2000), com o intuito de diminuir os custos das amplificações. Os *primers* foram testados para *L. vetulus* por da Fontoura-Rodrigues et al (2008). Todos os 10 *loci* foram classificados como polimórficos. Os fragmentos amplificados foram marcados por fluoróforo e os ciclos de amplificação foram testados a partir do descrito por Francisco et al (1996), culminando no seguinte protocolo de amplificação: em um volume final de 10 µL de PCR continha, 4 µL de GoTaq (Promega®) - tampão Buffer 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1U Taq DNA polimerase -; 0,2 pmol do *primer forward* e 0,8 pmol do *reverse*; 0,2 pmol de *primer* fluoróforescencete; 50 ng de

DNA e água deionizada MiliQ®. Cada ciclo de amplificação foi realizado em um termociclador da seguinte maneira: Um ciclo inicial de desnaturação à 94° C por 1 minuto, 29 ciclos de amplificação que compreendiam (94° C por 1 minuto, anelamento a 58° C por 45 segundos e extensão de 74° C por 1 minuto), seguido por 8 ciclos específicos para a amplificação da “cauda” M13, determinado por 94° C por 30 segundos, anelamento a 53° C por 45 segundos e extensão a 72° C por 45 segundos. Por fim, a extensão final foi realizada à 74° C por 5 minutos.

Tabela 2 Sequências forward e reverse dos pares de primers de microssatélites isolados para *C. familiaris* (Francisco et al., 1996)

Primer	Sequências	
	Forward	Reverse
2001	TCCTCCTCTTCTTTCCATTG	TGAACAGAGTTAAGGATAGACAC
2004	CTAAGTGGGGAGCCTCCT	ACTGTGACCTACTGAGGTTGCA
2006	TGGGGGCGTTAAGAGTAA	CTAGGCCTAAACCCCTGAGC
2010	AAATGGAACAGTTGAGCAT	CCCCTTACAGCTTCATTTTCC
2054	GCCTTATTCATTGCAGTTAG	ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC
2088	CCCTCTGCCTACATCTCT	TAGGGCATGCATATAACCAGC
2137	GCAGTCCCTTATTCCAACA	CCCCAAGTTTTGCATCTGTT
2132	CACTGGGAGTGGAGACTG	TGCACAGCCAAGTAGAGGTG
2140	GGGGAAGCCATTTTTAAA	TGACCCTCTGGCATCTAGGA
2159	GAATCCCACATCGGGC	ATTAAGTTTTGAAAGCCAGGTAAG

Após as reações, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose (1%) para se evidenciar a correta amplificação dos fragmentos de microssatélites. Os fragmentos amplificados pelos *primers* 2054, 2137, 2132, 2088, 2140 e 2001 foram genotipados em sequenciador automático MegaBACE ET-550R Size Standard (Amersham Biosciences) pela empresa DNA Consult (São Carlos, SP, Brasil). Os eletroferogramas das genotipagens foram analisados no programa MegaBace™ Fragment Profiler (GE Healthcare Life Sciences). Já os fragmentos amplificados pelos *primers* 2006, 2159, 2004, 2010, foram genotipados na empresa Macrogen Inc (Coréia do Sul) usando o sequenciador ABI3730XL (Applied Biosystems), os eletroferogramas foram analisados pelo programa Geneious R6 (Biomatters Ltd)

3.5. Análise da diversidade genética

Durante o processo de genotipagem e leitura dos genótipos, alguns erros podem ocorrer. Um desses erros se configura na presença de alelos nulos e *stuttering*. Estimamos a presença de tais erros pelo software Micro-Checker 2.2.3 (OOSTERHOUT et al., 2004).

O cálculo de PIC (*Polymorphism Information Content*) foi realizado pelo software CERVUS 3.0.6, descrito por Marshal et al. (1998). O PIC foi introduzido por Botstein et al. (1980), descrevendo a utilidade de um marcador genético. Assim sendo, os loci com valores de até 0,25 são considerados pouco informativos, de 0,25 a 0,5 são razoavelmente informativos e maiores que 0,5 são considerados altamente informativos

O teste para desequilíbrio de ligação foi obtido usando o programa Genepop 4.2.2 (RAYMOND E ROUSSET, 1995), verificando-se se a frequência observada da combinação alélica entre dois loci é igual à esperada de segregação independente. Para que os loci estudados sejam informativos eles devem apresentar segregação independente. Utilizamos a correção de Bonferroni (RICE, 1989), para corrigir os intervalos de significância.

O número de alelos (N_a), Número efetivo de alelos (N_e), heterozigosidade esperada (H_e) e heterozigosidade observada (H_o) foram calculados pelo programa GeneAlex 6.5 (PEAKALL E SMOUSE, 2006). Esses dados correspondem efetivamente à diversidade genética da população.

Valores de riqueza alélica (R_a), coeficiente de endogamia (F_{is}) e suas respectivas significâncias quanto ao déficit (p_{Larger}) e excesso ($p_{Smaller}$) de heterozigotos foram calculados pelo programa FSTAT (GOUDET, 1995).

O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e seus valores para déficit (EHWD) e excesso (EHWE) de heterozigotos foi realizado pelo programa Genepop. Os intervalos de significância foram corrigidos através da correção sequencial de Bonferroni (RICE, 1989). Como espera-se que os marcadores moleculares de microssatélites utilizados neste trabalho sejam neutros, é muito importante que os *loci*

se encontrem em EHW, pois, os mesmos, não podem estar sofrendo influências de forças evolutivas, como a seleção natural e sexual e deriva genética.

A presença de gargalo populacional foi verificada pelo programa Bottleneck 1.2.02 (PIRY et al., 1999)

O cálculo do tamanho efetivo populacional foi realizado pelo software Ne estimator 02.1 (DO et al., 2014), utilizando-se três métodos, um baseado no desequilíbrio de ligação, outro no excesso de heterozigotos e um último por coancestria molecular. O tamanho populacional efetivo foi calculado levando-se em consideração hipóteses de cruzamento ao acaso e de monogamia. Como a literatura a respeito do comportamento social de *L. vetulus* encontra consenso na opinião de que se trata de um animal monogâmico, resolvemos por enfatizar, como mais próximo da realidade o resultado encontrado pela hipótese monogâmica

É muito comum utilizar dados de microssatélites para se estimar as relações genealógicas ou o parentesco entre indivíduos de pais desconhecidos (BLOUIN, 2003). Para este fim, utilizamos duas diferentes abordagens, a fim de se chegar em uma relação de parentesco consenso. A primeira foi realizada com o programa ML-Relatedness (KALINOWSKI et al., 2006) que é um software que, ao mesmo tempo, calcula uma estimativa de parentesco de máxima verossimilhança, que apresenta uma menor média de erro do que os outros estimadores (MILLIGAN, 2003) e acomoda alelos nulos, comuns em estudos com microssatélites. A segunda abordagem foi através de observações de campo, realizadas pelo PCMC, que, há dez anos, realiza um extenso trabalho com as raposas do campo.

4. Resultados.

As análises de estruturação populacional, realizadas pelo método *Bayesiano* e pelo método de correspondência fatorial, indicaram que todos os indivíduos do estudo pertencem à mesma população, como pode ser visto nas figuras 7 e 8.

Nossas análises demonstraram a presença de alelos nulos nos *loci* 2001, 2140 e 2159 (Tabela 3). Para todos os *loci* há indícios de excesso de homozigotos como provável explicação para a presença de alelos nulos.

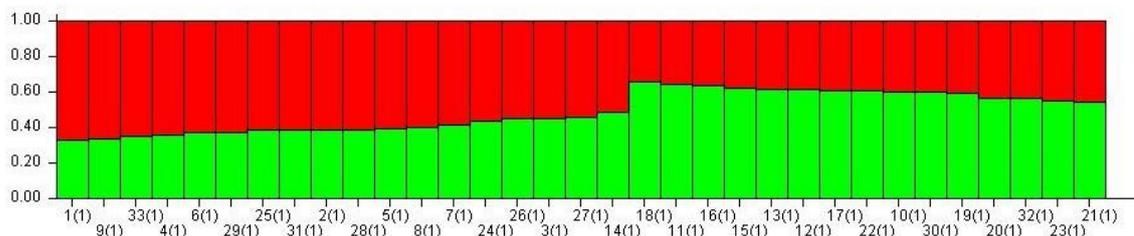


Figura 7. Gráfico de barras fornecido pelo programa Structure ($K=2$), evidenciando a presença de apenas uma população.

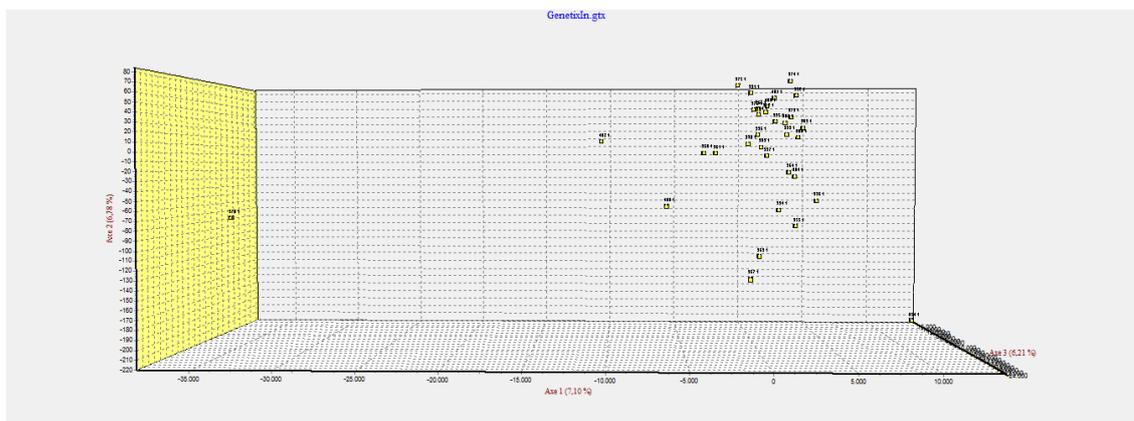


Figura 8. Análise de correspondência fatorial, podemos ver que há a presença de somente um grupo.

Tabela 3. Estimativa da taxa de alelos nulos, de acordo com os métodos utilizados pelo programa Microchecker.

locus	Alelos nulos	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
2001	Sim	0,2536	0,3545	0,2073	0,2652
2054	Não	0,0036	0,0044	0,0038	0,088
2088	Não	0,0507	0,0561	0,0474	0,1191
2137	Não	0,0119	0,0156	0,0145	0,1253
2132	Não	-0,0727	-0,0465	-0,0415	0,0669
2140	Sim	0,0768	0,0828	0,0722	0,0722
2006	Não	0,0373	0,051	0,0448	0,1593
2159	Sim	0,2468	0,3314	0,2276	0,491
2004	Não	-0,1079	-0,0862	-0,0845	0,1732
2010	Não	0,0391	0,0477	0,0423	0,0423

Após correção de Bonferroni não houve evidência de desequilíbrio de ligação para nenhum loci.

Após correção sequencial de Bonferroni, os *loci* 2001, 2006, 2159 2140 e 2010 apresentaram desvio significativo ao equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 4). Ao se observar estimativas do EHWD notamos que um déficit de heterozigotos explicaria o resultado para todos eles. Já os *loci* 2137 e 2004 aparecem fora do equilíbrio de Hardy-Weinberg porém, sem relação com déficit (EHWD) ou excesso (EHWE) de heterozigotos. Os resultados foram reanalisados, utilizando como parâmetro o coeficiente de endogamia (Fis). Associando-se os valores significativos de Fis com seus respectivos pLarger e pSmaller, chega-se à conclusão de que, somente pode-se explicar por déficit de heterozigotos os desvios no EHW encontrados nos *loci* 2001 e 2159. Nenhum dos desvios encontrados nos outros *loci* pode ser explicado pelo excesso ou déficit de heterozigotos, segundo o analisado pelo coeficiente de endogamia.

O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi considerado altamente informativo para todos os *loci*, com um valor médio de 0,796. Nenhum *loci* apresentou valor de PIC abaixo de 0,5 (Tabela 5).

Tabela 4. Dados relacionados a análise de EHW. EHWD= Valor de P para déficit de Heterozigotos, com intervalo de confiança de $0,005 < \alpha > 0,5$; EHWE: Valor de P para excesso de Heterozigotos, com intervalo de confiança de $0,005 < \alpha > 0,5$. EHW= Valor de P para o EHW, com intervalo de confiança de $0,005 < \alpha > 0,5$ Fis= Coeficiente de Endocruzamento; pLarger= Valor de P para excesso de heterozigotos, com intervalo de confiança de 0,5%; pSmaller= Valor de P para déficit de heterozigotos, com intervalo de confiança de 0,5%

Locus	EHWD	EHWE	EHW	Fis	pLarger	Psmaller
2001	0,0000	1,0000	0,0000	0,535	0,005	1,0000
2054	0,0689	0,9466	0,2111	0,025	0,485	0,6950
2088	0,1006	0,9266	0,3000	0,122	0,135	0,9350
2137	0,1378	0,8003	0,0001	0,047	0,285	0,8500
2132	0,0393	0,9482	0,1997	-0,082	0,925	0,2050
2140	0,0034	0,9993	0,0529	0,168	0,015	1,0000
2006	0,0000	1,0000	0,0168	0,113	0,065	0,9900
2159	0,0000	1,0000	0,0000	0,512	0,005	1,0000
2004	0,3202	0,6676	0,0002	-0,171	0,995	0,0250
2010	0,0050	0,9997	0,0103	0,106	0,500	0,9800
Média	0,068	0,929	0,079	0,138	0,342	0,768

Tabela 5. Características dos *Loci* analisados. N=Número de indivíduos; Na= Número de Alelos; Ne= Número efetivo de Alelos; RA= Riqueza Alélica; Ho= Heterozigidade observada; He= Heterozigidade esperada; PIC= Conteúdo de Informação Polimórfica; PB= Tamanho do *Loci*, em pares de base.

Locus	N	Na	Ne	RA	Ho	He	PIC	PB
2001	32	9,000	2,905	8,372	0,313	0,656	0,627	116-176
2054	32	9,000	4,719	8,923	0,781	0,788	0,761	148-184
2088	32	7,000	5,107	6,967	0,719	0,804	0,778	108-148
2137	31	18,000	9,856	16,928	0,871	0,899	0,891	120-352
2132	32	12,000	3,850	10,809	0,813	0,740	0,708	112-196
2140	33	13,000	9,470	12,523	0,758	0,894	0,885	100-180
2006	31	14,000	7,015	13,256	0,774	0,857	0,843	100-248
2159	26	13,000	6,347	13,000	0,423	0,842	0,826	108-284
2004	28	8,000	5,297	7,925	0,964	0,811	0,786	268-296
2010	33	12,000	7,510	11,107	0,788	0,867	0,852	140-352
Média	31,000	11,500	6,208	10,981	0,720	0,816	0,796	

Os dados de diversidade genética podem ser encontrados na tabela 5. O número médio de alelos encontrados nos indivíduos estudados foi de 11,5. Variando de 7 alelos, para o *locus* 2088 até 18 alelos, para o *locus* 2137. Já para o número efetivo de alelos (Ne), a variação foi menor, de 2,905 alelos, para o *locus* 2001, até 9,856 alelos, para o *locus* 2137. A média de Ne encontrada foi de 6,208 alelos nos indivíduos presentes nesta área de estudo. Em relação à riqueza alélica (Ra), temos um valor médio de 10,981, este dado leva em consideração não somente a frequência dos alelos encontrados, mas também seu grau de raridade. A heterozigidade esperada (He) é de 0,816, contrastando com uma heterozigidade observada (Ho) de 0,720. O que denota um déficit de heterozigotos, como já sugerido pelos valores de Fis e os testes de EHW.

Não encontramos nenhuma evidência de gargalo populacional. O que já era esperado a partir dos dados de diversidade genética supracitados, haja vista que os mesmos não correspondem ao comumente encontrado em população que passaram por gargalos populacionais recentes.

Pela hipótese monogâmica, o tamanho efetivo populacional, com um intervalo de confiança igual a 0,01, calculado é de 133,7. Já para a hipótese de cruzamento ao acaso, o Ne, com 0,01 de intervalo de confiança é igual a 42,1. Ambas

análises foram realizadas pelo método de desequilíbrio de ligação, que melhor funciona para pequenas amostragens e baixa quantidade de *loci*.

As estimativas de parentesco foram avaliadas pelo *software* ML-Relatedness e, quando possível, foram comparadas com as estimativas obtidas pelo PCMC (tabela 6).

Tabela 6. Atribuição de relações de parentesco entre os indivíduos estudados. MLR= Atribuição realizada pelo programa ML-Relatedness; PCMC= Atribuição realizada pelos trabalhos de observação de Programa de Conservação Mamíferos do Cerrdo; PO = Parent/Offspring; FS= Full Siblings; HS = Half Siblings R= Relacionamento desconhecido. *****= Ausência de hipótese sobre relacionamento.

Ind1	ind2	MLR	PCMC
bPve 354	bPve 394	FS	*****
bPve 355	bPve 361	HS	*****
bPve 356	bPve 376	HS	*****
bPve 356	bPve 383	HS	*****
bPve 356	bPve 387	HS	*****
bPve 360	bPve 396	FS	PO
bPve 360	bPve 397	HS	PO
bPve 361	bPve 364	HS	*****
bPve 361	bPve 382	HS	*****
bPve 361	bPve 395	HS	*****
bPve 361	bPve 370	HS	*****
bPve 363	bPve 381	HS	PO
bPve 364	bPve 393	HS	*****
bPve 366	bPve 374	HS	*****
bPve 366	bPve 390	HS	*****
bPve 366	bPve 391	HS	*****
bPve 373	bPve 392	FS	PO
bPve 373	bPve 381	HS	PO
bPve 373	bPve 388	HS	PO
bPve 373	bPve 393	HS	*****
bPve 373	bPve 401	HS	*****
bPve 373	bPve 383	PO	PO
bPve 373	bPve 389	PO	*****
bPve 373	bPve 375	U	PO
bPve 374	bPve 375	HS	*****
bPve 374	bPve 382	HS	*****
bPve 374	bPve 384	HS	*****
bPve 374	bPve 387	HS	*****
bPve 374	bPve 376	U	FS
bPve 375	bPve 376	HS	FS
bPve 375	bPve 382	HS	PO
bPve 375	bPve 384	HS	PO

bPve 375	bPve 391	HS	PO
bPve 376	bPve 382	HS	*****
bPve 376	bPve 384	HS	*****
bPve 376	bPve 391	PO	*****
bPve 381	bPve 383	FS	FS
bPve 381	bPve 388	FS	FS
bPve 381	bPve 389	FS	*****
bPve 381	bPve 397	HS	*****
bPve 382	bPve 387	HS	PO
bPve 382	bPve 391	HS	*****
bPve 382	bPve 384	PO	FS
bPve 383	bPve 388	FS	FS
bPve 383	bPve 389	HS	*****
bPve 383	bPve 389	HS	*****
bPve 383	bPve 392	HS	PO & HS
bPve 383	bPve 363	U	PO
bPve 384	bPve 391	FS	PO & HS
bPve 384	bPve 387	HS	PO
bPve 384	bPve 389	HS	*****
bPve 388	bPve 392	FS	HS
bPve 388	bPve 393	HS	*****
bPve 388	bPve 363	U	PO
bPve 389	bPve 363	U	R
bPve 389	bPve 393	HS	*****
bPve 392	bPve 381	U	HS
bPve 394	bPve 397	HS	*****
bPve 394	bPve 360	U	PO
bPve 395	bPve 360	U	PO
bPve 395	bPve 394	U	FS
bPve 396	bPve 397	FS	FS
bPve 396	bPve 401	HS	*****
bPve 397	bPve 401	HS	*****
bPve 397	bPve 402	HS	*****
bPve 401	bPve 403	PO	*****
bPve 401	bPve 375	U	PO
bPve 401	bPve 395	U	PO
bPve 401	bPve 402	U	FS
bPve 402	bPve 375	U	PO
bPve 402	bPve 395	U	PO

Tabela 7. Cálculo da média de distância entre os indivíduos e seus aparentados. ID CENAP= Código de tombamento no CENAP; DR= Média da distância entre um indivíduo e seus parentes; DPI= Média da distância entre um indivíduo e seus Pais/Irmãos completos; DFPI= Média da distância entre as fêmeas e seus pais/irmãos completos; DMPI= Média da distância entre os machos e seus pais/irmãos completos.

Número	ID CENAP	DR (km)	DPI (km)	DFPI (km)	DMPI (km)
1	bPve0354	34,6	34,6	4,24	3,81

2	bPve0355	35	0
3	bPve0356	33,9	0
4	bPve0360	1,54	4,27
5	bPve0361	17,86	0
6	bPve0363	1,73	0
7	bPve0364	31,65	0
8	bPve0366	5,93	0
9	bPve0367	0	0
10	bPve0373	2,03	1,52
11	bPve0374	1,98	0
12	bPve0375	0,37	0
13	bPve0376	6,19	0,52
14	bPve0381	2,17	2,28
15	bPve0382	1,8	0
16	bPve0383	0,31	2,137
17	bPve0384	1,55	0,664
18	bPve0387	12,63	0
19	bPve0388	4,95	5,93
20	bPve0389	1,54	0,82
21	bPve0390	5,7	0
22	bPve0391	1,49	0,435
23	bPve0392	1,70	0,43
24	bPve0393	7,75	0
25	bPve0394	8,76	34,6
26	bPve 395	0,44	0
27	bPve0396	2,76	3,6
28	bPve0397	2,89	3
29	bPve0400	0	0
30	bPve0401	1,87	0,7
31	bPve0402	0,5	0
32	bPve0403	0,704	0,704
33	bPve0370	8,4	0
Média		7,29	2,92

5. Discussão

Apesar de alguns loci apresentarem alelos nulos (Tabela 3) e outros desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), mesmo após correção sequencial de Bonferroni, todos os 10 *loci* utilizados neste trabalho se mostraram eficientes para o estudo de genética de populações. Tomamos por decisão manter todos os *loci* em questão, dado o fato de que outros prováveis fatores podem causar o excesso de homocigotos responsável por tais resultados, como, por exemplo, o baixo tamanho

amostral, seleção sexual e efeito Wahlund (que pode elevar a proporção de homozigotos em uma subpopulação mesmo que ela se encontre em panmixia). Após correção de Bonferroni, nenhum *loci* se encontrou em desequilíbrio de ligação. Em relação ao conteúdo de informação polimórfica, todos os *loci* são altamente informativos. Assim sendo, o desenvolvimento do proposto nos objetivos deste trabalho é factível utilizando-se dos supracitados marcadores moleculares.

Para os dados de diversidade genética encontrados, o grupo de indivíduos analisados neste estudo apresentou valores relativamente altos de heterozigosidade esperada (H_e) e observada (H_o), correspondentes à 0,816 e 0,720 respectivamente. Esses valores são maiores do que o esperado para populações naturais em perigo de extinção (FRANKHAM et al. 2008). Gottelli et al (1994), estimou H_e e H_o para *Canis simensis* (Rüppell, 1840), o lobo da etiópia, espécie ameaçada de extinção e encontrou valores médios iguais a 0,355 e 0,304 respectivamente. Iyengar et al (2005), demonstrou baixos níveis de heterozigosidade também para uma população de *Cuon alpinus* (Pallas, 1811), o cão selvagem asiático, também ameaçado, que apresentava valores médios de H_e e H_o iguais a 0,520 e 0,540, respectivamente. Os dados de heterozigosidade deste trabalho, são compatíveis com o encontrado para outras espécies de canídeos do cerrado brasileiro, como com *C. brachyurus* ($H_e=0,715$ e $H_o=0,748$) (LION E MARINHO FILHO, 2007), com *C. thous* ($H_e=0,740$) e com *L. vetulus* ($H_e=0,812$) (DA FONTOURA RODRIGUES et al., 2008). Os relativos altos valores de heterozigosidade aqui mostrados devem ser avaliados com cautela, uma vez que, como demonstrado por dados recentes, o conflito com humanos e a destruição do cerrado, em estimativas conservadoras, pode ter levado a uma diminuição de 30% na população de raposas do campo nos últimos 15 anos (LEMOS et al., 2013). Assim sendo, a manutenção de altos índices de heterozigosidade, provavelmente, se deve ao pequeno período de tempo em que a espécie tem sido afetada por fatores antrópicos, tendo em vista que a fragmentação do cerrado se confunde com o período de expansão agrícola neste bioma, em meados da década de 50. O que pode não representar tempo o suficiente para se verificar os efeitos na diversidade genética de uma população. Soma-se a este fato que, estudos em genética da conservação fazem maior sentido quando passíveis de comparações dos dados de diversidade genética com outras populações da mesma espécie, o que ainda é uma lacuna para *L. vetulus*.

Encontramos, também, um alto número de alelos neste estudo, com um valor médio de 11,5 alelos por *locus* (Tabela 5). Segundo Frankham et al. (2008), populações em perigo, apresentam, geralmente, pouco mais de dois alelos por *locus*. No trabalho realizado por Iyengar et al (2005), *C. alpinus* apresentou um valor médio de 3,81 alelos por *locus* no Santuário da Vida Selvagem de Mudummalai (Índia) e um valor médio de apenas 1,38 alelos por *locus* no Parque Nacional de Baluran (Java).

O cálculo do tamanho efetivo populacional (N_e), realizado neste estudo, resultou em um valor de 133,7 indivíduos, com um intervalo de confiança de 99%. O N_e calculado costuma representar 10% da população real, a qual explicaria a diversidade genética encontrada (PALSTRA E RUZZANTE, 2008). Assim sendo, possivelmente, a população, na qual os indivíduos presentes neste estudo, está inserida pode alcançar valores de 1.300 indivíduos. Número que não necessariamente é considerado alto, levando em consideração que, em um pequeno espaço de, aproximadamente, 15.000 ha, mais de 40 raposas foram capturadas e observadas no período de dois anos. Aparentemente, poucas barreiras são capazes de realmente impedir o fluxo gênico de *L. vetulus* e a baixa densidade populacional humana, somada com um alto índice de áreas rurais presentes na região centro oeste do Brasil, pode alocar esses possíveis 1.300 indivíduos, trocando material genético, em uma área que pode ser extremamente extensa. Uma vez que, melhores dados de dispersão sejam gerados, seremos capazes de estimar o tamanho da área na qual a real população está inserida.

Um total de 33 indivíduos capturados foram analisados neste trabalho. Deste total, temos uma proporção de, praticamente, 1:1 entre machos e fêmeas (Tabela 1). Nossa análise de parentesco demonstrou, primeiramente, que o rio Araguari, aparente barreira física e marco divisor dos estados de Goiás e Minas Gerais, não impede o contato entre raposas das duas áreas. O que pode ser constatado pelo fato de o indivíduo bPve 354, capturados em Minas Gerais, têm parentesco com diversos indivíduos da região de Goiás, como pode ser visto nas tabelas 6 e 5 e na imagem 3. Este é um importante dado de dispersão, uma vez que, não existe na literatura indicações de que Pais e filhos e irmãos completos possam se afastar tanto, Na tabela 6 podemos notar que indivíduos aparentados encontram níveis de distância que vão dos 35 km até, somente, 54 metros entre si. A média de distância, que indivíduos aparentados (DR) foi de 7,29 km.

O Grau de parentesco “irmãos completos” (Full Siblings – FS) não pode ser facilmente diferenciado do “pais e filhos” (Parents and Offspring – PO), devido a probabilidade de pais e filhos compartilharem a mesma percentagem de material genético que irmãos completos. Pequenos erros de genotipagem podem classificar relações de PO como FS e vice versa. Por isso, somente quando somadas às estimativas do PCMC e da análise visual, que pudemos determinar, com maior acurácia, qual a correta relação de parentesco.

O dado de afastamento entre parentes pode se tornar um tanto quanto subjetivo na medida em que o grau de relacionamento diminui. Grandes distâncias entre meio irmãos (HS) pode não ser tão representativa da capacidade de dispersão e movimentação da espécie, uma vez que envolve, ao mesmo tempo, a movimentação de um dos pais ou ambos pais, e a movimentação de cada irmão separadamente. Se olharmos as distâncias entre parentes próximos, como pais e filhos (PO) e irmãos completos (FS) o dado de dispersão e movimentação se torna mais objetivo. Uma vez que, nesses casos, a distância entre dois indivíduos depende somente da movimentação de ambos e há a certeza de que já estiveram juntos, no mesmo local durante uma mesma época. Temos que a distância entre dois indivíduos altamente aparentados (DPI), PO e FS, variou de 248 m até 34,6 km.

Ainda conjecturando a respeito da capacidade de dispersão de *L. vetulus*, podemos observar que o indivíduo macho bPve 354, capturado em Minas Gerais, apresentou uma distância de 34,6 km com o indivíduo fêmea bPve 394, capturado em Goiás. Nossa análise de parentesco demonstrou que esses indivíduos são altamente aparentados (FS). Apesar de não sermos capazes de inferir qual indivíduo percorreu uma maior distância, pois, não sabemos o local de nascimento dos mesmos e nenhum dos dois apresenta relações mais íntimas do que meio irmãos (HS) com os outros indivíduos da área, podemos ter uma ideia de potencial de afastamento entre dois *L. vetulus* nascidos no mesmo local. Não há indicações na literatura sobre dispersão de juvenis machos e fêmeas.

As raposas bPve 367 e bPve 400 não apresentaram nenhum nível de relacionamento com nenhum indivíduo capturado neste estudo (Tabela 6). Isso indica que não são pertencentes à área de estudo. Este dado é de extrema importância e corrobora o potencial dispersor já denotado pelas análises de distância e pelo tamanho populacional efetivo calculado com base na diversidade genética encontrada.

Indivíduos provenientes de outras áreas são determinantes no processo de evitação de endogamia. Assim como essas duas raposas-do-campo, provenientes de outras áreas, alcançaram os indivíduos da área de estudo em questão, o inverso pode acontecer. Resta esclarecer o real potencial dispersor da espécie, assim como diferenças sexuais nesse potencial. Já temos conhecimento que, esses indivíduos novos podem ter percorrido distâncias maiores de 30 km até serem capturados.

6. Conclusão

Lycalopex vetulus é um dos canídeos menos estudados do mundo. A falta de dados a despeito de sua organização social, diversidade genética e ontogenia faz com que se torne difícil a tomada de corretas decisões conservacionistas para esta espécie. A iniciativa do ICMBio em classificar *L. vetulus* no estado de vulnerável se dá por inferência diretamente proporcional aos distúrbios antrópicos causados no cerrado, ambiente no qual a raposa reside. Porém, ainda precisamos entender se os favorecimentos, ocasionados pela simplificação ambiental, como a diminuição da densidade de competidores (*C. thous* e *C. brachyurus*) e o aumento da disponibilidade de térmitas são o suficiente para se sobrepor aos efeitos negativos ocasionados pela presença do homem, como atropelamentos, morte por cães domésticos, perseguição por humanos e envenenamento. Dificilmente haverá extrema vantagem em ambientes simplificados, pois, evolutivamente, a espécie já se encontra adaptada a viver no bioma Cerrado. A densidade de competidores já é virtualmente evitada por diferenciação de nicho e ambientes naturais de cerrado já apresentam cupinzeiros o suficiente para a manutenção de tamanhos populacionais viáveis para a raposa-do-campo.

Nosso estudo mostrou que o uso de marcadores moleculares de microssatélites é útil na determinação de importantes dados com prospecção ecológica. Além disso devemos, sempre que possível, aliar informações genéticas com dados ecológicos, a fim de se obter uma maior acurácia em nossos resultados. A crua análise de genótipos, sem um prévio conhecimento da ecologia comportamental e da área de estudo em que a espécie foco se encontra não apresenta a mesma efetividade do que aqueles com múltiplas abordagens.

Os altos níveis de diversidade genética encontrados neste trabalho não devem ser interpretados como se a raposa-do-campo não precisasse de medidas de

proteção. Dados suplementares sugerem que esta espécie vem sendo deflagrada em seu habitat, por fatores diretos, como morte por conflitos com humanos, e indiretos, como a destruição e fragmentação de seu habitat, o Cerrado. Ademais, dificilmente vemos espécies se extinguindo devido à baixa diversidade genética. Até que tal fato ocorra, normalmente, outros fatores de maior impacto são responsáveis por eventos de extinções. A manutenção de altos níveis de diversidade genética se deve também a um favorecimento intrínseco ao comportamento ecológico da raposa, configurado em evitação de competição, acentuada capacidade de dispersão, baixos níveis de endogamia e grandes áreas de vida.

As relações de parentesco aqui estabelecidas deixam claro que os *softwares* utilizados não são capazes de definir com extrema acurácia relações entre indivíduos dos quais não se tem nenhuma informação de parentesco *a priori*. O ML-Relatedness é capaz de demonstrar a existência de parentesco na grande maioria dos casos, mas a definição precisa do parentesco nem sempre é clara. A melhor maneira é a associação dos dados genéticos, analisados em programas de computador e visualmente, com dados de observações de campo, desde que realizados por grupos com *expertise* no animal alvo. Nossa definição das relações de parentesco pôde estabelecer indicações do potencial de dispersão da espécie, dado escasso na literatura. Pela primeira vez foram encontrados indivíduos aparentados, mais de 30 km distantes entre si. Canídeos são dotados de extrema plasticidade e variação em relação ao seu comportamento social. Entender como eles se movimentam, como dispersam e se há diferenças marcantes entre machos e fêmeas é determinante no estudo de biologia da conservação.

A alta diversidade genética e os baixos níveis de endogamia são indicações otimistas para a conservação da raposa-do-campo. Uma vez que não se faz necessário nenhuma medida imediata de aumento do fluxo gênico para esta região. Devendo-se focar em soluções mais voltadas para educação ambiental, a fim de se permitir a coexistência com humanos. O tamanho populacional efetivo estimado provavelmente não corresponde a uma quantidade de indivíduos suficientemente grande para a manutenção da diversidade genética hoje encontrada, devido ao grande potencial de área de vida a ser utilizada pela espécie.

Mais importante do que conservar espécies alvo é conservar os biomas. Uma vez que o convívio sustentável seja estabelecido entre centros urbanos, áreas

rurais e áreas nativas, medidas ínfimas de conservação deverão ser estabelecidas para se manter a biodiversidade. *L. vetulus* é uma ótima espécie bandeira para a proteção do Cerrado. Endêmica deste bioma, carismática e de ampla distribuição, pode contribuir para que a conservação do cerrado seja amplificada.

Referências Bibliográfica

AGUIAR, L. M. S., MACHADO, R. B. E MARINHO-FILHO, J. (2004). A Diversidade Biológica do Cerrado. In Cerrado: ecologia e caracterização (L.M.S. Aguiar & A.J.A. Camargo, Ed.). **Embrapa Cerrados**, Planaltina, p.17-40

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

ASA, C. S. (1997). Hormonal and experiential factors in the expression of social and parental behavior in canids. In N. G. Solomon & J. A. French (Eds) **Cooperative Breeding in Mammals** (pp. 231–266).Cambridge: Cambridge University Press

ASA, C. S. E VALDESPINO, C. (1998). Canid reproductive biology: an integration of proximate mechanisms and ultimate causes. **American Zoologist**, 38, 251–259

BELKHIR K. et al. 1996-2004 “GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations”. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France). 1996-2004.

BOTSTEIN, D., WHITE, R. L., SKOLNICK, M. E DAVIS, R. W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms, **American Journal of Human Genetics** 32, 314–331.

BLOUIN M. S., (2003) DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. **Trends in Ecology & Evolution**, 18, 503–511

BRASIL. (1988). Constituição da República Federativa do Brasil. Brasília, DF: **Senado**, 1988. Ed. 35

BRASIL. (2005). Institui, no âmbito do Ministério do Meio Ambiente, o Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado - Programa Cerrado Sustentável, e dá outras providências. **Decreto nº 5.577, de 8 de novembro de 2005**. Brasília, DF, **Senado**, 2005.

COSTA, L. P., LEITE Y. L. R., MENDES S. L., E, DITCHFIELD A. B. (2005). Conservação de mamíferos no Brasil. **Megadiversidade** 1(1):103-112

COURTENAY, O.; MACDONALD, D. W., GILLINGHAM, S., ALMEIDA, G., E, DIAS R., (2005). "First observations on South America's largely insectivorous canid: the hoary fox (*Pseudalopex vetulus*). **Journal of Zoology**. Print ISSN 0952-8369

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

DA FONTOURA-RODRIGUES, M. L., LIMA-ROSA, C. A. V., TCHAICKA L., VALDEZ, F. P., RODRIGUES, F. H. G., PAULA, R., GOUGH, M. P., JOHNSON, W. E., BONATTO, S. L., EIZIRIK, E. (2008). Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of neotropical canids. **Molecular Ecology Resources**. Journal compilation © 2008 Blackwell Publishing Ltd DOI: 10.1111/j.1755-0998.2008.02103.x

DALPONTE, J. C. 2009. "*Lycalopex vetulus* (Carnivora Canidae)". **American Society of Mammalogists**. DOI 10.1644847.1

DALPONTE, J. C., COURTENAY O., (2004). Hoary fox *Pseudalopex vetulus* (Lund, 1842). Pp. 72–76 in *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan* (C. Sillero- Zubiri, M. Hoffmann, and D. W. Macdonald, eds.). **International Union for Conservation of Nature and Natural Resources/Species Survival Commission Canid Specialist Group**, Gland, Switzerland.

DO, C., WAPLES, R. S., PEEL D., MACBETH G. M., TILLET B. J., E, OVENDEN J. R. (2014). NeEstimator V2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size (N_e) from genetic data. **Molecular Ecology Resources**. 14, 209-214.

ECHEGARAY, J., VILÀ, C. (2009). Noninvasive monitoring of wolves at the edge of their distribution and the cost of their conservation. *Animal Conservation*. Print ISSN

1367-9430 Animal Conservation]] (2009) 1–5 c 2009 The Authors. Journal compilation c 2009 **The Zoological Society of London.**

FRANCISCO, L. V., LANGSTON A. A., MELLERSH C. S., NEAL C. I., E, OSTRANDER E. A. (1996). A class of polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. **Mammalian Genome** 7,359-362 (1996).

FRANKHAM, R.; BALLOU, JONATHAN D.; BRISCOE, DAVID A. (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Mercival R. Francisco e Izeni P. Farias (Trad.). **Ed. SBG. Ribeirão Preto-SP.** 2008. 262p.

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

FONSECA, G. A. B. E ROBINSON, J. G. (1990). Forest size and structure: competitive and predatory effects on small mammal communities. **Biol. Conserv.** 53:265-294.

GEFFEN, E.; GOMPPER, M.E.; GITTLEMAN, J.L.; Lu, H; MACDONALD, D.W.; WAYNE, R.K. 1996 "Size, Life-History Traits, and Social Organization in the Canidae: A Reevaluation". **Am. Nat.** 1996. Vol. 147. pp. 140-160

GOUDET, J. (1995). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível em: <http://www2.unil.ch/popgen/softwares/fstat.htm>. Acesso em: Jan, 2013.

GOTTELI D., SILLERO-ZUBIRI C., APPLEBAUM D., ROY M. S., GIRMAN D. J., GARCIA-MORENO J., OSTRANDER E. A., WAYNE R. K. (1994). Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf *Canis simensis*. **Molecular Ecology** (1994) 3,301-312

IUCN (2014) The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3. <www.iucnredlist.org>. Downloaded on 22 April 2015

IYENGAR A., BABU V. N., HEDGES S., VENKATARAMAN A. B, MACLEAN N., MORIN P. A. (2005). Phylogeography, genetic structure, and diversity in the dhole

(*Cuon alpinus*). **Molecular Ecology** (2005), 2281–2297. doi: 10.1111/j.1365-294X.2005.02582.x

J ´ACOMO A. T. A.; SILVEIRA L., DINIZ-FILHO J. A. F., (2003) Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. *J. Zool., Lond.* (2004) 262, 99–106 C _ 2004 **The Zoological Society of London** Printed in the United Kingdom DOI:10.1017/S0952836903004473

JORDAN C. F. (1995) Conservation: replacing quantity with quality as a goal for global management. New York: **John Wiley**, c1995. 340 p. ISBN 0-471-59515-2.

JOHNSON, W. E., FULLER, T.K., E FRANKLIN, W. L. (1996). Sympatry in canids. In *Carnivore behaviour, ecology and evolution*, Vol. 2: 189–219. **Gittleman, J.L.** (Ed.). Ithaca: Cornell University Press.

JUAREZ, K. M., MARINHO-FILHO, J. (2002). Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil. *Journal of Mammalogy*, 83(4):925-933. 2002. **American Society of Mammalogists.**

KALINOWSKI, S. T.; WAGNER, A. P.; TAPER, M. L. (2006). ML-RELATE: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. **Molecular Ecology Notes** (2006) 6, 576-579. Doi: 10.1111/j.1471-8286.2006.01256.x

KLINK, C. A.; MACHADO, R. (2005). Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology** 19(3): 707-713.

LANGGUTH A., (1975). Ecology and Evolution in the South American canids. In fox MW (ed) **The Wild Canis. Litton Educational Publishing.** New York, pp. 192-206

LAW, B.S. E DICKMAN, C.R. (1998). The use of habitat mosaics by terrestrial vertebrate fauna: implications for conservation and management. **Biodivers. Conserv.** 7:323-333.

LEMOS, F. G., (2007). "Ecologia e comportamento da raposa-do-campo pseudalopex vetulus e do cachorro do mato cerdocyon thous em áreas de fazenda no bioma cerrado." **Dissertação de mestrado** – Universidade Federal de Uberlândia

LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; BEISIEGEL, B. M.; JORGE, R. P. S.; PAULA, R. C.; RODRIGUES, F. H. G.; RODRIGUES, L. A.; (2013). "Avaliação do risco de extinção da Raposa-do-campo, *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842) no Brasil". **Avaliação do estado de conservação dos carnívoros. Biodiversidade Brasileira**, 3(1), 160-171, 2013.

LION, M. B.; MARINHO-FILHO, J.; (2007). "Diversidade genética e conservação do Lobo-Guará *Chrysocyon brachyurus*, em áreas protegidas do Distrito Federal. **Dissertação de Mestrado**

LUND, P. W. (1842). Fortsatte Bemaerkninger over Brasiliens Uddøde Dirskabning. Kongl. Dansk. Vid. **Selsk. Afhandll.** 9: 1-16.

MACHADO, R. B., RAMOS NETO, M. B., PEREIRA, P. G. P., CALDAS, E. F., GONÇALVES, D. A., SANTOS, N. S., TABOR, K., STEININGER, M., (2004). Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. Conservação Internacional do Brasil, Brasília. **Relatório técnico**

MARSHALL T. C., SLATE J., KRUIK L. E. B, PEMBERTON, J. M. (1998). Statistical confidence for likelihood-based paternity inference in natural populations. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 5, p. 639, 1998.

MEDEL R. G., E, JAKSIC F. M.. (1988). Ecología de los canidos sudamericanos: una revisión. **Revista Chilena de Historia Natural** 61:67–69.

MEFFE G, K.; CARROLL, C. R., (1941). Principles of conservation biology. **Sunderland: Sinauer**, c1994. 600 p. ISBN 0-87893-519-3

MENOTTI-RAYMOND M. A., O'BRIEN, S. J., (1995). Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. **Journal of Heredity**, 86: 319-322.

MILLIGAN B. G. (2003) Maximum-likelihood estimation of relatedness. **Genetics**, 163, 1153–1167

MIOTTO R. A., CIOCHETI G., RODRIGUES F. P., E, GALETTI JR., P. M. (2007). Determination of the Minimum Population Size of Pumas (*Puma concolor*) Through Fecal DNA Analysis in Two Protected Cerrado Areas in the Brazilian Southeast. **Biotropica** 39(5): 647–654 2007 DOI: 10.1111/j.1744-7429.2007.00315.x.

MYERS N., MITTERMEIER R. A., MITTERMEIER C. G., DA FONSECA G. A. B. E KENT J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** |vol 403 | 24 february 2000.

MOEHLMAN, P. D. (1989). Intraspecific variation in canid social systems. In **J. L. Gittleman** (Ed.) *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution* (pp. 143–163.). Ithaca: Cornell University Press.

MOEHLMAN, P. D. E HOFER, H. (1997). Cooperative breeding, reproductive suppression, and body mass in canids. In **N. G. Solomon & J. A. French** (Eds) *Cooperative Breeding in Mammals* (pp. 76–127). Cambridge: Cambridge University Press.

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

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

PALSTRA, F.P.; RUZZANTE, D.E. (2008). Genetic estimates of contemporary effective population size: what can they tell us about the importance of genetic stochasticity for wild population persistence?. **Molecular Ecology** 17:3428–3447.

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

PEAKALL R.; E, SMOUSE P. E. (2006). GENEALEX 6: genetic analysis in Excel. Population Genetic Software for Teaching and Research. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 1, p. 288-295, 2006

PEREZ-SWEENEY B. M., RODRIGUES F. P., MELNICK, D. J., (2003). Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. Em: Métodos de estudo em biologia da conservação e manejo da vida silvestre (eds. Cullen Jr L, Rudran R, Valladares-Padua C), pp. 343-380. **Editara UFPR**, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná, Brazil Piry et al. 1999

PIRY, S.; LUIKART, G.; CORNUET, JM; (1999). BOTTLENECK: A computer program for detecting recente reductions in efective size using ellele frequency data. **The Journal of Heredity**, v. 90, n. 4, p. 502-503, 1999.

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

PRUGH L. R., RITLAND C. E., ARTHUR M. A. E KREBS, C. J. (2005). Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. **Mol. Ecol.**, vol. 14, p. 1585-1596

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

RIBEIRO J. F., WALTER B. M. T. (2008). As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. In Cerrado: Ambiente e Flora (S.M. Sano, S.P. de Almeida & J.F. Ribeiro, Ed.). vol. 1. **Embrapa Informação Tecnológica**, Brasília, p.151-212.

RICE W. R; (1989). Analyzing tables of statistical tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223-225, 1989

ROCHA E. C.; SILVA E., FEIO R. N.; MARTINS S.V., E; LESSA G. (2008). Densidade populacional de raposa-do-campo *Lycalopex vetulus*. **Iheringia, Sér. Zool.**, Porto Alegre, 98(1)78-83, 30

RODRIGUES F. H. G., SILVEIRA L., JÁCOMO A. T. A., CARMIGNOTTO A. P., BEZERRA A. M. R., COELHO D. C., GARBOGINI H., PAGNOZZI J., E, HASS A. (2002). Composição e caracterização da fauna de mamíferos do Parque Nacional das Emas, Goiás, Brasil. **Rev. Bras. Zool.** 19(2):589-600

SAMBROOK J., FRITSCH E.F., MANIATIS T. (1989) Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2nd ed. Cold Spring Harbor: **Cold Spring Harbor Laboratory Press**, 1989

SANO E.E., ROSA R., BRITO J. L. S., FERREIRA L. G. (2009). Land cover mapping of the tropical savanna region in Brazil. **Environ. Monit. Assess.** DOI 10.1007/s10661-009-0988-4.

SANO S. N.; ALMEIDA S. P. (1988) Cerrado: ambiente e flora. Embrapa – **CPAC**, pp. xii- 56.

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

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

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

STAINS, H.J. (1975) Distribution and taxonomy of the Canidae. **The wild canids: their systematics, behavioral ecology and evolution**, p. 3-26.

TROLLE M., BISSARO M. C. E PRADO H. C. (2007). Mammal survey at a ranch of the Brazilian Cerrado. **Biodivers. Conserv.** 16(4):1205-1211.

WAYNE R. K., MORIN P. A., (2004). Conservation genetics in the new molecular age. **Front. Ecol. Environ.**, vol. 2, p. 89-97.

WANG X. E TEDFORD R. H. (2007). Evolutionary history of canids. In: The Behavioural Biology of Dogs (**P. Jensen, ed.**), pp. 3–20. CAB International, Cambridge.

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

WILSON, G.J.; DELAHAY, R.J.; 2001. "A review of methods to estimate the abundance of terrestrial carnivores using field signs and observation". **Wildlife Research** 28:151-164.

WOODROFFE R., GINSBERG J. R. (1998) Edge effects and the extinction of populations inside protected areas. **Science** 280:2126–2128