



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

**Caracterização da estrutura sócio-genética de uma população de vida livre de
cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) (Lund, 1842)**

Carmen Elena Barragán Ruiz

Orientador: Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

São Carlos

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

Caracterização da estrutura sócio-genética de uma população de vida livre de cachorro vinagre (*Speothos venaticus*) (Lund, 1842)

Carmen Elena Barragán Ruiz

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Genética Evolutiva e Biologia Molecular.

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

B268c Barragán Ruiz, Carmen Elena
Caracterização da estrutura sócio-genética de uma
população de vida livre de cachorro vinagre (*Speothos
venaticus*) (Lund, 1842) / Carmen Elena Barragán
Ruiz. -- São Carlos : UFSCar, 2016.
82 p.

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

1. Genética. 2. *S. venaticus*. 3. Marcadores
genéticos. 4. População. I. Título.



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 Dissertação de Mestrado da candidata Carmen Elena Barragán Ruiz, realizada em 14/08/2015.

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior
UFSCar

Prof. Dr. Marco Antonio Del Lama
UFSCar

Prof. Dr. Flavio Guimarães Rodrigues
UFMG



“Here's to the crazy ones. The misfits. The rebels. The troublemakers. The round pegs in the square holes. The ones who see things differently. They're not fond of rules. And they have no respect for the status quo. You can quote them, disagree with them, glorify or vilify them. About the only thing you can't do is ignore them. Because they change things. They push the human race forward. And while some may see them as the crazy ones, we see genius. Because the people who are crazy enough to think they can change the world, are the ones who do.”

Steve Jobs.



AGRADECIMENTOS

Começo agradecendo minha família parte de mim mesma, sempre presente em minha vida e responsável por toda a base emocional. A meus pais Deyanira Ruiz Cuervo e Mauricio Cifuentes Torres, meus adoráveis avós Rodolfo Ruiz Arce e Carmenza de Ruiz e a meus queridos irmãos Mauricio Cifuentes e Katalina Cifuentes.

Ao meu orientador Pedro Manoel Galetti Jr. e sua esposa Patrícia Domingues de Freitas que acreditaram em mim e ajudaram com seu grande conhecimento.

A meu amigo Jorge Enrique Cruz, que me ajudou muito em cada fase, em tudo o que estava ao seu alcance. Rosane da Silva, que tenho como irmã, também me apoiou, ensinando e aconselhando em cada etapa transitada, sempre dando o melhor e me amando incondicionalmente. Marisa Vieira, Ana M. Burbano, Hernan Ceron e Mauricio Carrillo por seu apoio nos momentos chaves.

Aos meus companheiros de laboratório que alegraram cada dia com sua companhia e contribuíram para o desenvolvimento do trabalho. Principalmente a André Pereira da Silva, por sua paciência, apoio e imenso carinho, assim como também a Raphael Oliveira pela sua ajuda em diferentes situações onde só a voz de um irmão era necessária. Também a Edson Lima, Herson Lima, Tatiane Pires, Gisele Lima, Rodrigo Pinto e Malu Pinto, pesquisadores atentos em cada etapa do desenvolvimento do projeto.

E por fim ao programa de Pós-graduação em Genética e a todas as instituições participantes: Parque Ecológico Municipal de Americana, Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte, Fundação Jardim Zoológico de Brasília, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Zoológico Municipal de Piracicaba, Pro-Carnívoros, CENAP (Centro Nacional de Conservação de Mamíferos Carnívoros), além de entidades de apoio financeiro CNPq.



RESUMO

Considerando que o *S. venaticus*, apresenta uma ampla distribuição, estimada desde o Panamá até o norte da Argentina, o cachorro-vinagre é considerado “quase ameaçado” pela IUCN e “vulnerável (VU)” pelo MMA. A deficiência de dados moleculares e biológicos dessa espécie deve-se, principalmente, às dificuldades de captura e observação em ambientes naturais, indicando uma baixa na densidade populacional da espécie. Assim sendo, os objetivos foram: determinar a estrutura sócio-genética dos grupos familiares de *S. venaticus*, assim como estimar relações de parentesco e parâmetros populacionais, tais como diversidade genética e estruturação populacional para as populações *ex situ* e *in situ*. Para tanto foram utilizados 12 marcadores genéticos microssatélites desses, três *primers* específicos e nove heterólogos e um marcador mitocondrial (CR - *d-loop*). Foi extraído o DNA de 38 amostras de sangue dessas, 23 provenientes do banco de amostras do CENAP/ICMBio, coletadas nos municípios de N. Xavantina e Água Boa (MT), localizados ao norte do Rio das Mortes. Os nove locos heterólogos apresentaram um $PIC > 0,6$. Análises de estruturação populacional, estimaram um F_{ST} de 0,165 entre populações, considerando uma diferenciação maior entre que dentro de populações, sem evidencia de estruturação. Valores médios de heterozigosidade observada (H_o) por marcadores codominantes, indicaram uma deficiência na população cativa, enquanto dados de diversidade haplotípica foram iguais para ambas populações, apresentando cinco haplótipos e seis mutações. Dados de diversidade e riqueza alélica, quando comparados para ambas populações, apresentaram uma baixa para a população cativa. As análises de parentesco, sugeriram que 23.8% dos indivíduos da população *in situ*, possuem algum grau de parentesco entre si, indicando desvios na composição social esperada para *Speothos* com base nas observações de campo. Os resultados obtidos representam avanço importante no conhecimento da composição social da espécie. No entanto, apontam também a necessidade de ampliar o número de indivíduos amostrados e realizar um acompanhamento em campo visando elucidar as questões que surgiram a partir deste estudo.



ABSTRACT

Whereas the *S. venaticus*, has a wide distribution, estimated from Panama to northern Argentina, the dog vinegar is considered "near threatened" by the IUCN and "Vulnerable (VU)" by MMA. The molecular and biological data deficiency of this species is due mainly to the difficulties of capturing and observing natural environments, indicating a decline in population density of the species. Therefore, the objectives of this study were to determine the socio-genetic structure of family groups of *S. venaticus*, as well as estimate of kinship and population parameters such as genetic diversity and population structure, comparing parameters of genetic diversity between representatives of nature and captivity. For this, we used 12 microsatellite genetic markers, three specific primers and nine heterologous originally described for *Canis familiaris* and mitochondrial marker (*CR - d-loop*). They were obtained 38 blood samples of these, one 23 from the sample bank of CENAP/ICMBio, samples from the municipalities of N. Xavantina and Água Boa (MT), located of north the Mortes's river, a place with great agricultural exploitation, reducing the closed portion by human actions. The nine heterologous *loci* showed a $PIC > 0,6$. Average values of observed heterozygosity (H_o) by codominant markers indicated a deficiency in the captive population, while haplotype diversity of data were the same for both populations. Diversity of data and allelic richness when compared to both populations showed a low for the captive population. Analysis of population structure, estimated a F_{ST} 0,165 between populations. Kinship analysis, suggested that 23.8% of individuals in the population in situ. However, also point out the need to expand the number of individuals sampled and conduct a follow-up field to elucidate the issues that emerged from this study.

Keywords: microsatellite, conservation, canidae, bush dog, CENAP



SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
1.1 CANÍDEOS.....	11
1.2 Speothos venaticus (Cachorro vinagre).....	12
1.2.1 Características morfológicas e comportamentais	13
1.2.2 Caça dieta habitat e movimentação	15
1.2.3 Studbook da espécie	17
1.3 MARCADORES MOLECULARES.....	18
1.3.1 Marcadores mitocondriais e microssatélite	18
1.3.3. Por que fazer análises de parentesco?	19
1.3.4. Por que realizar análises de variabilidade genética?	20
1.4 PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE	20
2. JUSTIFICATIVA.....	21
3. OBJETIVOS	22
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Área de coleta e amostras.....	24
4.2 Conservação e extração de DNA	27
4.3 Amplificações, sequenciamento e genotipagem	28
4.3.1 Marcador Mitocondrial d-loop	28
4.3.1.1 Diversidade Genética	29
4.3.1.2 Análises de Neutralidade.....	29
4.3.2 Marcadores Microssatélites.....	31
4.3.2.1 Diversidade Genética	32
4.3.2.2 Análises de estrutura populacional.....	33
4.4 Análises de Parentesco	35
4.4.1 Paternidade e maternidade	35



4.5 Informações a priori	37
4.5.1 População de vida livre	37
4.5.2 População cativa ex situ	37
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.2 Extração e quantificação de DNA	39
5.3 Caracterização dos locos microssatélite e mitocondriais	39
5.3.1. Mitocondrial d-loop.....	39
5.3.1.1 Análises de Neutralidade.....	43
5.3.2 Marcadores Microssatélites.....	44
5.4 Estruturação populacional	48
5.5 Análises de parentesco	52
5.5.1 Paternidade	55
6. CONCLUSÕES.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	65



LISTA DE FIGURAS

- Figura-1: Distribuição de *Speothos venaticus* segundo a IUCN no ano de 2013. b. Potencial distribuição sul americana de *Speothos venaticus*, gerada por um modelo envolvendo quatro variáveis bioclimáticas, selecionadas pela ENFA junto aos pontos de avistamento e presença da espécie..... 13
- Figura 2: Fotografia de um indivíduo adulto de *Speothos venaticus* em N. Xavantina-MT. Nota-se o rádio colar utilizado em estudos de rádio telemetria, durante campanhas feitas no ano 2014. As duas fotografias correspondem ao mesmo indivíduo 14
- Figura 6: Heredograma da população cativa de cachorro vinagre, baseado no *studbook*, última atualização 2011. Indica-se em azul os indivíduos coletados. Cada indivíduo possui informações de ano de nascimento, ano da morte, ID segundo o registro do *studbook* e local de cativoiro. 38
- Figura 7: Amplificação da CR-Dloop. Gel de agarose 2%. M: Marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Life Technologies Inc., Carlsbad, Califórnia). Br: Controle negativo. 39
- Figura 8 Rede de haplótipos dos indivíduos cativos. A. Note-se os dois haplótipos representantes, dos grupos cativos; subdivisão por cores dos indivíduos, por local. B. Indica-se haplótipos compartilhados com a população *in situ*..... 40
- Tabela 3. Distribuição haplotípica por família. Indica-se o ID: Identidade do indivíduo; S.I: sexo informado; família correspondente de cada indivíduo; H: haplótipos ao que pertence.
- Figura 9: a. Rede de haplótipos por famílias. b. Figura de barra mostrando a frequência de haplótipos por família..... 41
- Figura 10: Gráfico de *mismatch distribution* gerado pela simulação das frequências de mutação para cada população. (a). População da natureza, com Raggedness index: 0.13409735 p-value: 0.38110000. (b). População cativa, com Raggedness index: 0.80165289. 44
- Figura 11: Figura mostrando os componentes significativos estatisticamente, usados na análise de componentes principais multivariadas (PCA) dos indivíduos de vida livre, por local de coleta. A.B (Água Boa-MT), N.X (N. Xavantina-MT). 48
- Figura 12: Padrão de distribuição espacial dos indivíduos da natureza de *S. venaticus*. 49



Figura 13: Análise bayesiana com $k=2$ (Vida livre e cativoiro). Cada indivíduo é representado por uma barra enumerada do número 1-38, atribuídos a populações encontradas em diferentes cores (verde=vida livre; vermelho=cativoiro).	49
Figura 14: A. Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Evano et al., (2005). B. Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Pritchard (2000).	50
Figura 15: Padrão de distribuição espacial, das duas populações (vida livre e cativoiro) geradas pela análise bayesiana. Em amarelo vida livre e em azul cativoiro.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parques zoológicos que doaram amostras biológicas de <i>S. venaticus</i>	25
Tabela 2. Sitios polimórficos dos cinco haplótipos encontrados nas duas populações. As linhas representam cada haplótipo.	40
Tabela 3. Distribuição haplotípica por família. Indica-se o ID: Identidade do indivíduo; S.I: sexo informado; família correspondente de cada indivíduo; H: haplótipos ao que pertence.	
Figura 9: a. Rede de haplótipos por famílias. b. Figura de barra mostrando a frequência de haplótipos por família.....	41
Tabela 4. Índices de diversidade haplotípica para as populações de vida livre e cativoiro, determinadas para <i>d-loop</i>	42
Tabela 5. Testes de neutralidade feitos para <i>d-loop</i> , em ambas populações independentemente.	43
Tabela 6. Parâmetros de variação genética nas populações de cativoiro e vida livre, a partir dos dados microssatélite.	46
Tabela 7. Índices de distâncias genéticas médias, entre e dentro das populações de <i>S. venaticus</i>	52
Tabela 8. Probabilidades de exclusão por loco na população <i>in situ</i>	55
Tabela 9. Estimativa de atribuição de pais/mães, por médio de parâmetros de verossimilhança gerados pelo programa Cervus.	58



Tabela 10. Estimativa de atribuição de pais/mães, por meio do teste “*Parent pair*”, para a população de vida livre, com parâmetros de verossimilhança gerados pelo programa Cervus.....61

ANEXOS

Anexo 1. Informação das amostras doadas pelo CENAP. Indica-se: Código do Indivíduo (banco de dados do CENAP), sexo, data de coleta, procedência, Local da coleta (município), coordenadas de ponto e grupo familiar estabelecido por observações de campo, nos 23 indivíduos de vida livre.76

Anexo 2. Informações dos indivíduos cativos de cachorro vinagre (*Speothos venaticus*). (RL) registro de laboratório, (SI) Sexo informado pelo zoológico, (DC) data de coleta, (SI) sigla do zoológico.77

Anexo 3. Primers microssatélites específicos e heterólogos testados nas populações. Para cada um é informado (*F*= forward; *R*= reverse), (*Tt*) temperatura teórica, (*Te*) temperatura de amplificação na população atual, (*S.A*) sucesso de amplificação.79

Anexo 4. Indicação da presença de alelos nulos. Considerando todos os indivíduos como uma população só.81

Anexo 5. Estimativa do melhor estimador para realizar análises de parentesco.83

Anexo 6. Tabela indicando o coeficiente *r* par a par gerado pelo programa Coancestry.84

Anexo 7: Heredogramas das famílias constituídas *a priori*, por informações ecológicas; as datas encontradas acima de cada indivíduo, são as datas de captura e coleta biológica; indivíduos mortos são indicados com um “X” no centro. A. Grupo familiar um B. Grupo familiar dois C. Grupo familiar três D. Grupo familiar cinco E. Grupo familiar sete.....85



1. INTRODUÇÃO

1.1 CANÍDEOS

A distribuição dos canídeos abrange uma grande variedade de habitats, desde os quentes desertos até os gelados campos árticos (EISENBERG, 1981; WAYNE, 1996; SILLERO-ZUBIRI et al., 2004). Muitos vivem em grupos de até mais de dez indivíduos e são exclusivamente carnívoros, capturando presas grandes por cooperação e podendo apresentar uma organização social bastante complexa. Outros são solitários e muitos permanecem somente em pares.

Dentro da diversidade de espécies da ordem carnívora, os canídeos sul-americanos são caracterizados por alto endemismo. Doze espécies de canídeos são nativas do continente americano, sendo onze delas endêmicas: cachorro do mato (*Cerdocyon thous* - Linnaeus, 1766); lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus* - Illiger, 1815); cachorro vinagre (*Speothos venaticus* - Lund, 1842); cachorro de orelha curta (*Atelocynus microtis* - Sclater, 1883); raposinha do cerrado (*Lycalopex vetulus* - Lund, 1842); cachorro do campo (*Lycalopex gymnocercus* - G. Fischer, 1814); zorro culpeo (*Lycalopex culpaeus* - Molina, 1782); chilla (*Lycalopex griséus* - Gray, 1837); raposa de Darwin (*Lycalopex fulvipes* - Martin, 1847); zorro sechura (*Lycalopex sechurae* - Thomas, 1900); e raposa das Ilhas Falkland, (*Dusicyon australis* - atualmente extinta). Sendo apenas a raposa cinza (*Urocyon cinereoargenteus*) aquela que ocorre na América do Norte e Central e estende sua distribuição até o Norte da América do Sul.

Embora no continente sul-americanos exista uma alta diversidade quando comparado aos outros continentes, esta é ainda a região com maior ausência de dados (DD) referentes a este grupo. Duas espécies (*A. microtis*; *L. vetulus*) foram consideradas como DD no ano de 2011 pela IUCN ¹ e o MMA², mas no 2013 os seus status de conservação foram modificadas para vulnerável (VU) pelo MMA e quase ameaçadas

¹

IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*), última atualização 2013.

²

Ministério do Meio Ambiente



(NT) pela IUCN para ambas as espécies, comprovando assim a alta deficiência de dados obtidos até hoje.

1.2 *Speothos venaticus* (Cachorro vinagre)

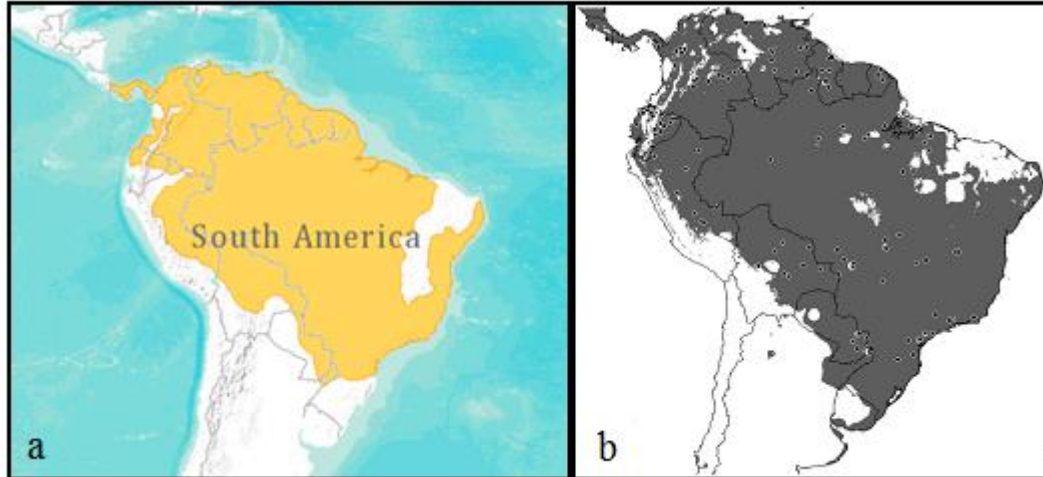
Segundo Linares (1967), três subespécies do gênero são reconhecidas atualmente: *S. v. panamensis*, de porte pequeno e coloração clara, presente no noroeste de América do Sul; *S. v. venaticus* de porte médio e coloração escura, encontrado no interior das Guianas, norte e centro do Brasil até Mato Grosso, nordeste do Peru, leste do Equador, leste da Bolívia e norte do Paraguai e também presente na bacia do Rio Amazonas; e *S. v. wingei* de cor clara e porte semelhante aos anteriores, com ocorrência no sudeste do Brasil. O cachorro vinagre é um dos três representantes do gênero *Speothos* de canídeos neotropicais conhecidos mundialmente até hoje.

No norte do Brasil nos estados do Amapá, Pará, Maranhão e Tocantins, a espécie é amplamente distribuída, porém suas ocorrências são fragmentadas e pouco avistadas (OLIVEIRA, 2009). Embora historicamente tenha uma ampla distribuição com registros que vão desde o norte do Panamá até o sul do Brasil e norte de Argentina, passando por algumas regiões, como o leste de Bolívia, Peru e Equador (ZUERCHER, G.L et al., 2004), o *S. venaticus*, é considerado quase ameaçado pela IUCN, vulnerável à extinção C1 no Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção do MMA e regionalmente ameaçado nos estados de Maranhão, São Paulo e Minas Gerais (OLIVEIRA, 2007).



Figura-1: Distribuição de *Speothos venaticus* segundo a IUCN no ano de 2013.

b. Potencial distribuição sul americana de *Speothos venaticus*, gerada por um modelo envolvendo quatro variáveis bioclimáticas, selecionadas pela ENFA junto aos pontos de avistamento e presença da espécie.



Fonte: Gil, 2011.

1.2.1 Características morfológicas e comportamentais

O *S. venaticus* apresenta estruturas especializadas tais como: pernas curtas e robustas, orelhas e caudas curtas, um padrão de coloração de pelagem marrom (diferente de outros canídeos) e membranas interdigitais. Tais membranas interdigitais segundo Lima em observações pessoais, descreve elas como estruturas não relacionadas com os hábitos semiaquáticos descritos para a espécie, mas sim com a necessidade de escavar o substrato para ter acesso às suas presas.

Em média *Speothos venaticus* mede entre 20-30 cm de altura, pesa entre 5-8 kg e tem entre 58-75 cm de comprimento (ZUERCHER et al., 2004), sendo então considerado um mamífero de pequeno porte que apresenta perda de dentes molares, consequência de sua dieta hipercarnívora³. (FLOWER, 1880; LINARES, 1970 E KLEIMAN, 1992)

³ Habito alimentar, especializado no consumo de carne.



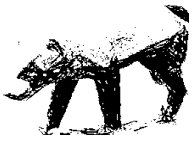
Figura 2: Fotografia de um indivíduo adulto de *Speothos venaticus* em N. Xavantina-MT. Nota-se o rádio colar utilizado em estudos de rádio telemetria, durante campanhas feitas no ano 2014. As duas fotografias correspondem ao mesmo indivíduo



Fonte: Pires e Barragán, 2014.

Segundo Biben (1982), Deutsch (1983), Defler (1986) e Peres (1991), o cachorro vinagre é um canídeo altamente social que vive em grupos de até 12 indivíduos. Conserva sempre uma estrutura sólida, caracterizada por um casal dominante e uma prole que permanece junto ao grupo por um longo tempo (OLIVEIRA, 2007). De acordo com estudos realizados pela Associação de Pesquisa e Conservação da Vida Silvestre (Criadouro Onça Pintada), existem casos recentes de estruturas sociais formadas por duas fêmeas irmãs e dominantes em animais de cativeiro.

O desenvolvimento do ciclo reprodutivo não é representado por uma época evidente e vai depender dos casais dominantes do grupo. Segundo observações em cativeiro, algumas fêmeas dominantes concebem a partir dos 10 meses de vida duas ninhadas de filhotes por ano, com uma gestação que dura em média 67 dias (variando entre 62 a 70 dias) (NOWAK, 1991). Assim, indivíduos em cativeiro de cachorro vinagre apresentam um comportamento hierárquico, no qual os jovens do grupo são “socialmente castrados”. Em situações nas que duas fêmeas *alfas* reprodutivas são mantidas no grupo, diversas brigas intensas entre as mesmas são registradas. Por tanto, muitos estudos propõem que para a manutenção do comportamento altruísta dentro do grupo, somente uma fêmea *alfa* deve existir. (FREEMAN J.C. E HERRON S, 2009).



1.2.2 Caça dieta habitat e movimentação

Lima (2012) descreve três possíveis padrões característicos de movimentação. 1). Nômade; a espécie nunca repete a mesma área e tem uma constante movimentação; 2). Seminômade; o grupo usa a área por um curto período de tempo (1-2 meses), movimentando-se para outra área, já visitada; 3). Territorial; o grupo de indivíduos usa a mesma área por um longo período de tempo. Estimando que os movimentos podem ser alterados, segundo a composição etária do grupo. Pesquisas de monitoramento feitas pelo ICMBio⁴, descreveram fortes atividades grupais durante os períodos da manhã (6h-7h) e da noite(20h-23h) mas mesmo assim, a espécie é considerada de difícil detecção no bioma estudado. Cachorro vinagre possui entre 4,56-150 km² de área de vida em grupos de até sete indivíduos, fitofisionomia cerrado. (LIMA E. S et al., 2012).

As adaptações morfológicas a certos habitats, fazem do seu comportamento para caça uns dos mais eficientes. Seu porte pequeno, pernas curtas e robustas, cauda vigorosa, dentes modificados (perda dos molares) e garras fortes, são características que ajudam na captura das suas presas. Lima (2009), descreve o tatu galinha (*D. novemcinctus*- Linnaeus, 1758) como uma das suas principais presas. Este tatu vive de forma solitária e em tocas, características que facilitam o trabalho de caça.

Os grupos sociais caçam em média um tatu galinha por dia e o gasto energético não é elevado, se o número de indivíduos do grupo é grande. Porém, um grupo maior, possibilita uma caça de menor custo energético. Normalmente, os indivíduos não brigam pela presa caçada e na maioria das vezes o alimento é repartido praticamente entre todos os indivíduos do grupo, na mesma proporção. Em algumas observações realizadas por Lima, um dos membros jovens do grupo regurgita o alimento, para alimentar outro membro, mais jovem que ele.

⁴ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade.



Estudos realizados no Bioma do Pantanal por Lima (2009) e Zuercher G.L et al. (2004), sobre a dieta do cachorro vinagre, mostraram que 94,1% das amostras de fezes coletadas continham tatu galinha. Em Nova Xavantina (MT), foi encontrada uma grande representação do tatu galinha na dieta desses canídeos, cerca de 97,6%, de um total de 41-42 caças realizadas. Isso evidencia que o *D. novemcinctus* é realmente uma das principais presas de porte médio, dentro de diversos biomas, para a espécie. Outra presa representativa para *S. venaticus* é a paca (*Agouti paca* - Linnaeus, 1766), mas, que apresenta maior dificuldade de caça pela rápida movimentação dela, além de possuir uma estrutura complexa de toca, que permite sua saída por vários lugares conectados baixo terra. Dalponte (1997) e Lima (2009) descrevem o cachorro vinagre como uma das espécies de canídeos que apresenta uma dieta hipercarnívora, baseados nos resultados de um estudo de dieta, no qual a proporção de traços de folhas, insetos e frutos encontradas em 100% das amostras de fezes, foi pouca.

Nos municípios de Água Boa e Nova Xavantina (MT), observações feitas por Lima (2009) através de registros de rádio telemetria determinaram que diferentes grupos sociais utilizam ambientes naturais abertos e/ou florestais na mesma proporção. De um total 166 tipos de habitats disponíveis em diferentes áreas de ocorrência, a espécie foi registrada em 57 desses habitats (DEMATTEO K. E. E LOISELLE, 2008), incluindo áreas reflorestais (71% intactos), florestas decíduas (9%), cerrados (2%), mosaico de florestas decíduas e campos (1%), *shrubland*⁵ (0,5%), mosaico de campos (0,5%), mosaico de floresta e campos (0,5%) e cerrado sazonalmente inundado (0,5%).

O *S. venaticus* é considerado predominantemente de ambientes florestais como: mata atlântica, mata amazônica e cerrado (FILHO, 1972 E LANGGUTH, 1975). Dados recentes sugerem que esses animais também podem utilizar ambientes perturbados por ação antrópica (áreas abertas) na mesma proporção que áreas preservadas (LIMA E. S et al., 2012 E OLIVEIRA, 2009) .

⁵ Áreas caracterizadas por possuir vegetação, dominada por arbustos. Podem ocorrer naturalmente ou por resultado da atividade humana.



1.2.3 *Studbook* da espécie

Os *studbooks* são registros genealógicos que proporcionam informação sobre todos os indivíduos encontrados em cativeiro de uma determinada espécie. Essas informações detalhadas são registradas ano a ano e atualizadas por grupos de pesquisa especializados em documentar a história demográfica das espécies. No nosso caso o *studbook* do canídeo *S. venaticus* (última atualização no ano de 2011), possui algumas informações relevantes da espécie.

O último *studbook* produzido para o cachorro-vinagre foi gerado para avaliação da história de vida da espécie. Informações como identificação do indivíduo, sexo, identidade dos pais, data e local de nascimento e data e local da morte foram levantadas, quando conhecidas. Animais com data de morte desconhecida, bem como aqueles ainda vivos ao final do ano de 2011, foram censurados. Para indivíduos censurados, a última data com informação necessária foi incluída em nossas análises. Animais vivos até o levantamento das informações, e classificados como censurados não foram incluídos basicamente pela perda de contato entre o responsável do *studbook* e as instituições encarregadas, ou então, pela perda de muitas informações. Informações recentes, não foram encontradas, dificultando contextualizar o cenário atual da espécie em cativeiro.

O principal objetivo dos programas de manutenção de espécies em cativeiro é garantir o bem-estar das mesmas. Para espécies ameaçadas é comum realizar tentativas de reprodução que mantenham o número populacional local. Uma parte de parques zoológicos reconhece a importância de manter as espécies como unidades evolutivas e por tanto manter altos índices de diversidade genética dentro das unidades, no entanto, outros apontam a problemática da representatividade genética. Muitos indivíduos são o resultado de um número baixo de casais reprodutivos e a representação é determinada por apenas um fragmento genético, que torna as unidades rapidamente endogâmicas e potencialmente inviáveis (FRANKHAM et al., 2002).

Partindo dos últimos registros obtidos do *Studbook*, existem oito instituições que possuem a espécie em cativeiro: Parque 1). Ecológico Municipal de Americana (São Paulo - SP); 2). Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte (Minas Gerais - MG); 3).



Fundação Jardim Zoológico de Brasília (Distrito Federal - DF); 4). Fundação Parque Zoológico de São Paulo (SP); 5). Zoológico Municipal de Piracicaba (SP); 6). Zoológico Municipal de Campinas-Bosque dos Jequetibas (SP); 7) Criadouro Conservacionista Luciano do Valle Sabóia; 8). Campina Grande do Sul (PR).

1.3 MARCADORES MOLECULARES

1.3.1 Marcadores mitocondriais e microssatélite

O DNAm_t, possui características únicas que o tornam apropriado para estudos evolutivos e de transcendência histórica: possui uma frequência alta de mutações (cinco a dez vezes maior que qualquer fragmento de DNA nuclear), não sofre recombinação e tem transmissão unidirecional pela via materna das espécies, ao longo das gerações.

Esse DNA mitocondrial (DNAm_t) é um genoma haploide, circular, de pequeno tamanho e que está presente em centenas a milhares de cópias por célula. A região controladora (CR) do DNAm_t é, frequentemente usada em estudos de genética de populações, dada sua alta variabilidade em suas sequências de nucleotídeos, resultado de uma alta taxa de mutação, consideravelmente maior em todo o DNAm_t, do que em segmentos nucleares (FERREIRA, 2001).

Por outra parte, os marcadores nucleares possuem características moleculares que facilitam o estudo da genética de populações. Esses marcadores, são compostos por pequenas sequências de nucleotídeos em tandem, com repetições a cada dois, três ou quatro bases. São utilizados por estarem ao longo do genoma, ter um tamanho pequeno e, além disso, ser suficientemente polimórficos para fazer as inferências de análises de populações. Também apresentam herança codominante, possibilitando a identificação codominante dos genótipos para cada indivíduo e respondem melhor, quando relacionados com fragmentação do ambiente e às mudanças no tempo (ZANE, BARGELLONI E PATARNELLO, 2002).

O uso de marcadores moleculares altamente polimórficos, como os microssatélites, é uma estratégia amplamente utilizada para se estimar parentesco e para



se estudar sistemas genéticos de acasalamento em populações naturais, que não respondem às estimativas ideais (BLOUIN, 2003; WEBSTER E REICHART, 2003). Estes marcadores também têm sido introduzidos nas análises de parentesco por Queller et al., (1993).

1.3.3. Por que fazer análises de parentesco?

Entender e conhecer as relações de parentesco, nas populações naturais, vai além de saber as características gerais de uma população. Perguntas referentes ao parentesco genético ou social são abertas a discussão na maioria das espécies e tem sido predita como produto da evolução sobre sucessos reprodutivos e seleções de grupo (AVISE, 2004). Os interesses pelas questões de parentesco, em estudos de populações naturais são usados com o objetivo de responder incógnitas sobre comportamentos entre grupos familiares, sistemas de acasalamento, padrões de dispersão de gametas e indivíduos, grau de vagilidade e filopatria, dispersão sexo-diferencial e processos populacionais histórico-demográficos (AVISE, 2004).

As estimativas de parentesco também têm ajudado (se olharmos no tempo) algumas teorias como a teoria da evolução de grupos (HAMILTON, 1964 E QUELLER, 1985) ou o isolamento pela distância e a filopatria (MACTOQ E LACEY, 2004). Agora, se olharmos desde uma perspectiva da genética da conservação, estas estimativas de parentesco genético têm tido uma aplicação experimental, ajudando nos programas de translocação de populações *in situ* e *ex situ*, preservação da viabilidade genética das espécies, cruzamentos *ex-situ*, entre outras (LACY, 1994; RUSSELLO E AMATO, 2004).

O parentesco genético entre indivíduos e sua estruturação espacial, é um dos fatores da diversidade genética que responde importantes aspectos da biologia de certas espécies, como táticas reprodutivas, comportamentos sociais, dispersão de indivíduos, entre muitos outros (HAMILTON, 1964; ROUSSET, 2002).

1.3.4. Por que realizar análises de variabilidade genética?



A variabilidade genética é definida como sendo toda a variação biológica hereditária gerada, principalmente, por mutações nas sequências de nucleotídeos durante a replicação do DNA, que é acumulada durante o processo evolutivo. A quantidade de diversidade genética em uma população depende de fatores evolutivos como a seleção natural, endogamia, deriva genética, fluxo gênico e mutação, os quais contribuem para o aumento e/ou diminuição da mesma numa população (FREEMAN E HERRON, 2009).

Essa diversidade genética, mantida em altos níveis por diversos processos ao longo do tempo, vem sendo altamente ameaçada por diferentes processos antropogênicos, que interferem nos processos adaptativos das espécies; tornando-se assim, importante a tentativa de conservação de espécies altamente ameaçadas. A genética da conservação abarca uma inter-relação de diferentes linhas de pesquisa, que são aplicadas a diferentes campos da biologia, ou seja, é uma área interdisciplinar que contribui com estratégias de conservação, baseadas, principalmente na descrição genética das espécies

1.4 PROGRAMA DE CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE

É importante integrar diversas áreas biológicas, ao se pensar na conservação das espécies, com o fim de aumentar o entendimento de características comportamentais, fisiológicas e moleculares das mesmas. Tudo isso, envolve certos parâmetros de diversidade genética como por exemplo: potenciais estruturas sociais, padrões de comportamento e níveis de diversidade genética diferentes aos esperados, que são mantidos nas espécies, ou que, pelo contrário, são níveis justificados por desequilíbrios ecossistêmicos ocasionados por diferentes forças evolutivas recentes, ou processos externos (ROUSSELLO, 2004).

Na divulgação mais recente da lista de espécies ameaçadas de extinção no Brasil (2014), o MMA e o ICMBio, estudo inédito sobre a fauna brasileira feito com 12.256 espécies avaliadas, demonstrou-se que 170 espécies (4 anfíbios, 23 aves, 14 mamíferos, 2 reptéis, 45 invertebrados terrestres e 82 peixes e invertebrados aquáticos), saíram da



lista de espécies ameaçadas graças a diferentes pesquisas realizadas, mostraram resultados significativos de aspectos genéticos e biológicos das espécies.

Cabe salientar que no caso da espécie em questão, *S. venaticus*, já há um plano de ação nacional para sua conservação, iniciado no ano de 2012, pelo ICMBio. O plano tem como objetivo principal, a redução da vulnerabilidade e a ampliação dos conhecimentos biológicos da espécie, assim como a redução de habitats inadequados, diminuindo a remoção de indivíduos e melhorando o estado sanitário das populações. Dentro dos objetivos específicos, estão: ampliar o conhecimento aplicado a conservação do cachorro vinagre; ampliar a proteção e conectividade dos habitats remanescentes para o cachorro vinagre, em todos os biomas de ocorrência da espécie; avaliar e mitigar o impacto da degradação de habitats sobre as populações de cachorro vinagre.

Os anteriores objetivos vêm sendo trabalhados ao longo de vários anos propondo planos de ação que geram diferentes tipos de produto de pesquisa, elevando a informação anual sobre a biologia da espécie. Dentro desses planos, está a ampliação de conhecimento sobre a variabilidade genética das populações conhecidas atualmente de cachorro vinagre, objetivo que termina sendo principal para esta pesquisa.

2. JUSTIFICATIVA

O cachorro vinagre é uma espécie considerada vulnerável (VU) pelo critério C1; critério por às análises de viabilidade populacional da mesma, somando Amazônia, Pantanal e Mata Atlântica. A população estimada da espécie é aproximadamente 9.350 indivíduos, dos quais, os pertencentes ao Cerrado, tem uma probabilidade de extinção de 100% em 100 anos, modelagem de viabilidade baseadas em parâmetros biológicos e demográficos do leste do Mato Grosso, com média de tempo de extinção de 33 anos. Além disso, é possível que a média de tempo de extinção diminua, por outras tantas problemáticas, que abrangem a espécie como: doenças transmitidas por cães domésticos, sarna sarcóptica⁶ (perda de pelo) reportada por DeMatteo, 2008, (no seu

⁶ Doença de pele em cães, causada pelo parasita de *Sarcoptes scabiei*.



contato com localidades urbanas), e a caça e atropelamento de sua principal presa (tatu galinha), são só algumas das ameaças que a espécie sofre atualmente.

Em geral a fragmentação de paisagem assim como a ação antropogênica termina na diminuição da densidade populacional de muitas espécies, resultando então na criação de várias manchas de ambientes, pequenas e isoladas, que alteram os padrões de movimentação das populações e trazem juntos problemas associados a endogamia, variações demográficas drásticas e flutuações no tamanho populacional. (LIMA, 2008). A degradação de ambientes naturais traz consigo consequências genéticas marcantes que alteram comportamentos e comprometem características fenotípicas das espécies. O esclarecimento da estrutura social e genética da espécie se tornou crucial para conservação. Identificar o padrão social traz consigo consequências diretas sobre os padrões da distribuição de diversidade genética da espécie atualmente, permitindo esclarecer diversos tipos de comportamentos (ALCOCK, 2012).

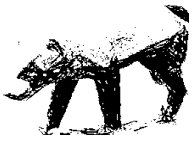
Entendendo isso é possível dizer que não existe uma quantidade de estudos suficiente com informações concretas sobre a biologia da espécie, tornando importante compreender aspectos moleculares das populações, bem como da espécie que validem métodos de conservação.

3. OBJETIVOS

Geral

- ▲ Determinar a estrutura sócia genética dentro e entre grupos sociais de indivíduos amostrados da espécie *S. venaticus*, *in situ* e *ex situ*, utilizando marcadores microssatélites e mitocondriais; realizando assim, o primeiro estudo comparativo da variabilidade genética com representantes de grupos cativos e da natureza.

Específicos



- ▲ Padronizar uma série de marcadores nucleares e mitocondriais que sejam informativos para o estudo de diversos parâmetros da espécie;
- ▲ Estimar parâmetros sócio genéticos para *S. venaticus* dentro e entre os diferentes grupos sociais, de modo a verificar comportamentos replicados em outros canídeos sul americanos;
- ▲ Avaliar as distâncias genéticas entre os grupos familiares e comparar a divergência entre as duas populações;
- ▲ Estimar a variabilidade genética dos grupos familiares dos indivíduos *in situ* e *ex situ*;
- ▲ Comparar parâmetros de variabilidade genética entre as duas populações;
- ▲ Analisar a ocorrência de endogamia e caracterizar a constituição social dentro dos grupos, com verificação de parentesco, tendo como indicador a variável temporal e espacial;
- ▲ Determinar a dispersão dos animais, em relação aos dois sexos;
- ▲ Estimar as possíveis relações familiares entre os indivíduos de vida livre, com o fim de entender a biologia comportamental da espécie;
- ▲ Gerar uma série de informações que revalidem processos conservacionistas indicados para a espécie, a partir de critérios moleculares;

Para a aplicação dos objetivos, foram formuladas algumas hipóteses que sustentaram nossas análises.

Hipótese:

As informações obtidas pelos métodos de observação ecológica *a priori*, sobre a estrutura social dos grupos, são também explicadas por informações moleculares, hipótese que será testada a partir da comparação dos dados encontrados através de análises moleculares e observações feitas em campo.

A análise de parentesco entre os indivíduos de cada grupo explica os pares socialmente monogâmicos, assim como as análises de paternidade explicam a dominância social de algumas fêmeas e machos. Essa nossa hipótese será testada com análises de parentesco dentro e entre os grupos sociais. Análises mitocondriais para



determinação de possíveis mães, com identificação de fêmeas (alfas) também serão dados levantados.

Casais alfas do grupo foram ligados através do tempo e responderam ao padrão de dispersão correspondente a cada sexo (filopatria para fêmeas e dispersão ampla para machos). Essa nossa última hipótese será testada a partir de dados de consanguinidade entre fêmeas e machos separadamente, identificando quais são as possíveis causas da dispersão para ambos os sexos.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Área de coleta e amostras

Foram feitos diferentes tipos de coleta de material biológico como coleta de material biológico em saídas de campo e doação de material biológico pelas instituições parques ecológicas/zoológico. Um total de 38 amostras de sangue (23 de vida livre e 15 de cativeiro) foi obtido. Dessas, 29 amostras foram cedidas pelo banco de material biológico do CENAP ⁷ e 22 das amostras corresponde a animais de vida livre capturados no leste do estado de Mato Grosso, Brasil (Figura 4).

As amostras coletadas nas saídas de campo foram o sucesso de diversas tentativas de captura da equipe do plano de ação do cachorro vinagre que atua na cidade de Nova Xavantina-MT (Figura 3). As campanhas foram realizadas objetivando principalmente a captura de indivíduos da espécie no seu habitat natural, dado a dificuldade de encontrar a espécie. Diversas estratégias foram propostas a partir desse proposito, conseguindo que uma delas desse certo. O envolvimento da comunidade nativa através de educação ambiental por médio de folhetos que indicavam diferentes características morfológicas e comportamentais da espécie, conseguindo assim mais informações sobre localizações e avistamentos atuais da espécie. A implementação

⁷ Centro Nacional de Conservação de Mamíferos Carnívoros.



desta estratégia resultou na captura de dois grupos de indivíduos com até quatro indivíduos.

Figura 3: Fotografia da equipe encarregada das campanhas ecológicas para captura de *Speothos venaticus* no estado de Mato Grosso-Nova Xavantina



Fonte: Pires, 2014.

Um total de oito amostras foram obtidas de animais cativos presentes em diversas instituições (Anexo 1). Os parques zoológicos que contribuíram com os indivíduos amostrados em cativeiro são apresentados na Tabela 1. A indicação da localização geográfica desses parques ecológicos, assim como a localização geográfica das amostras obtidas na natureza é mostrada na Figura 4 e Figura 5.

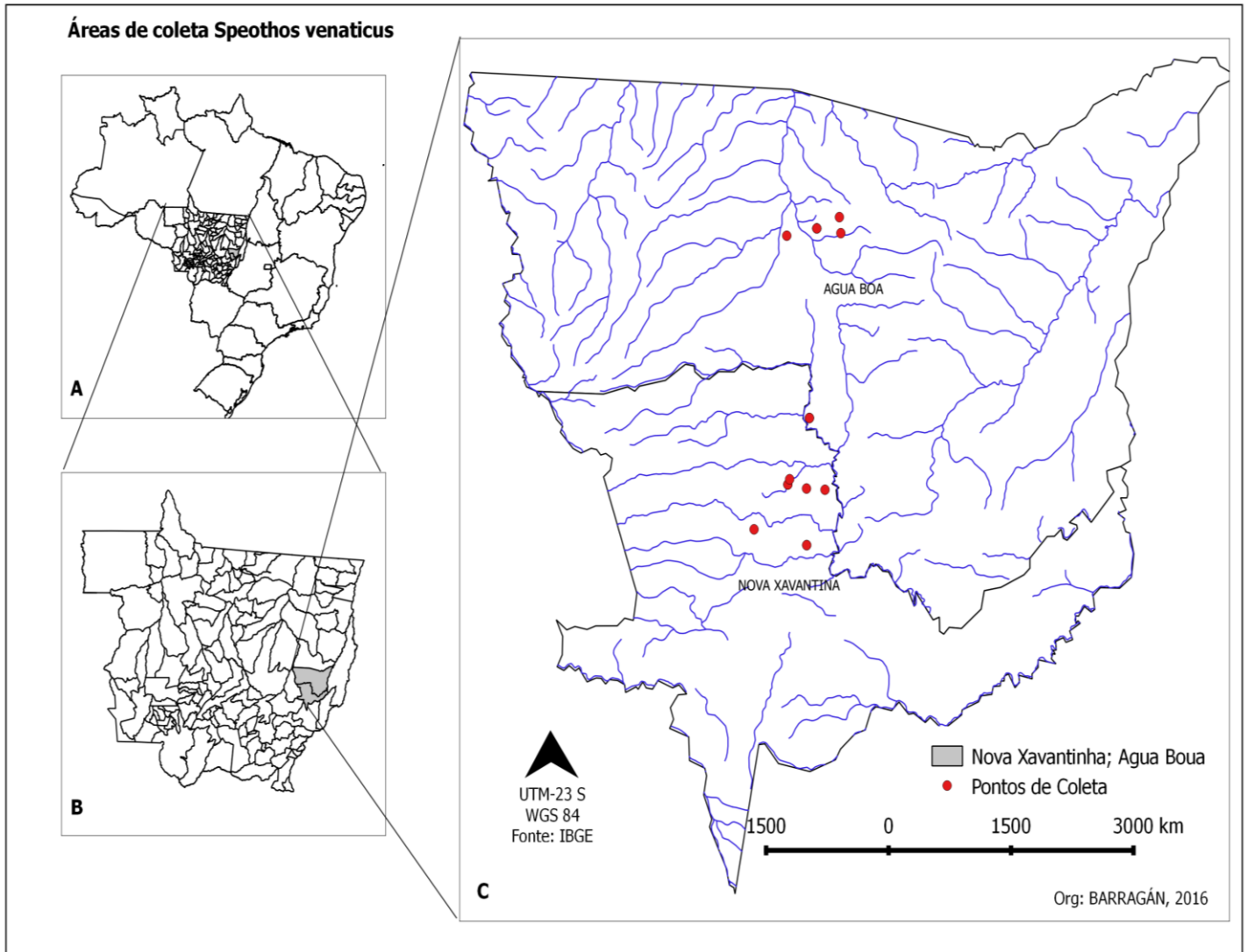
Tabela 1: Parques zoológicos que doaram amostras biológicas de *S. venaticus*.

Instituições	Sigla	Número de Indivíduos
Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	3
Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte	FZB-BH	5
Fundação Jardim Zoológico de Brasília	FJZB	1
Fundação Parque Zoológico de São Paulo	FPZSP	2*
Zoológico Municipal de Piracicaba	ZMP	4
Total		15

*As amostras biológicas correspondentes aos indivíduos da Fundação Parque Zoológico de São Paulo, não foram consideradas como parte do grupo cativo e sim classificados dentro dos indivíduos de vida livre. Os respectivos indivíduos foram introduzidos ao FPZSP após ter sido capturados no estado de Rondônia.



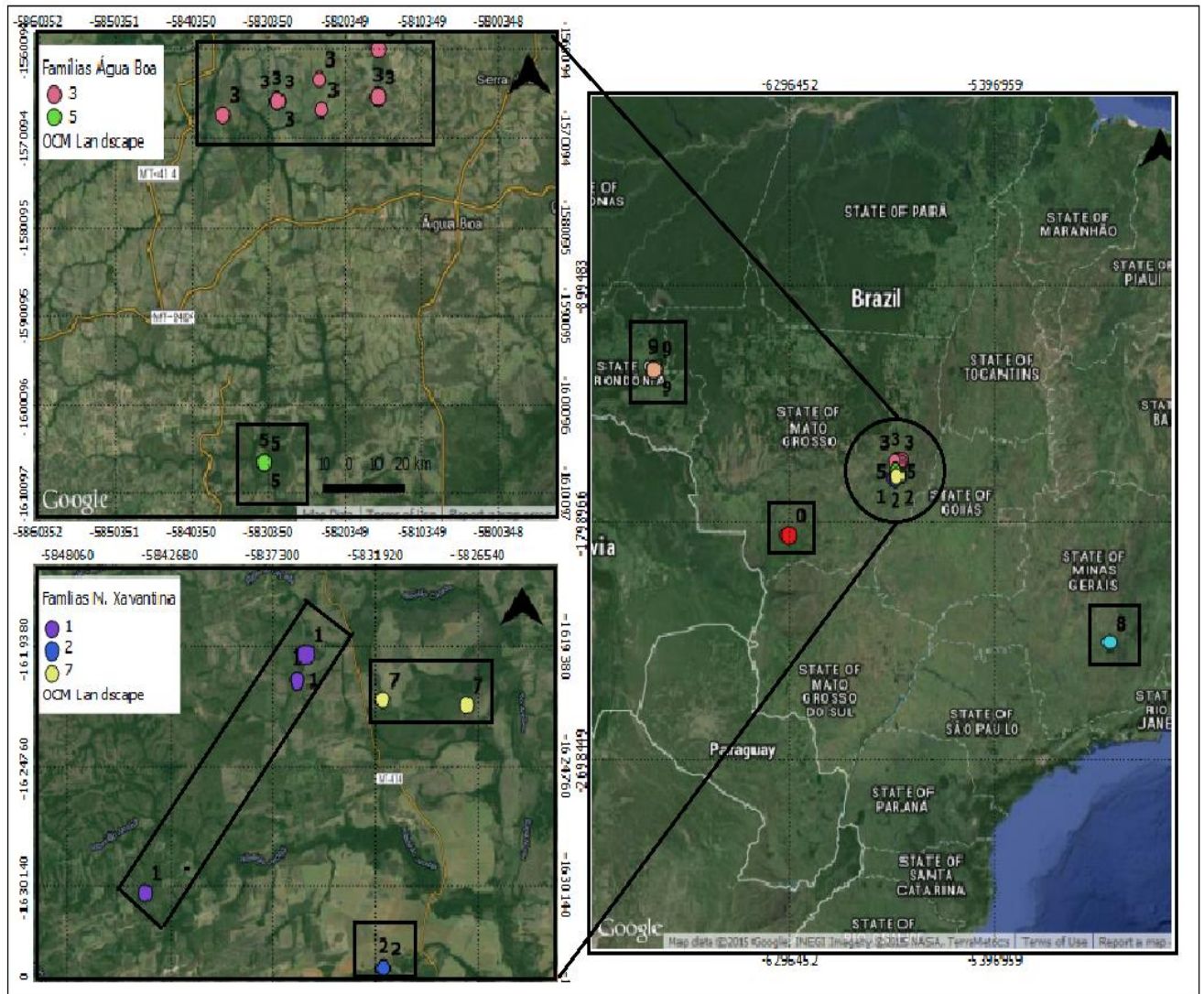
Figura 4: Áreas de coleta A). Brasil indicando os diferentes pontos de coleta nos estados de São Paulo, Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso. B). Sobreposição de biomas, estados e pontos de coleta em cativeiro. C). Sobreposição de biomas, estados e pontos de coleta em vida livre. D). Principais pontos de coleta, área alvo de desenvolvimento de PAN cachorro vinagre.



Fonte: Barragán, 2015. *Shapes* obtidos do site: <http://www.portaldemapas.ibge.gov.br/>



Figura 5: Mapa com sobreposição de estados, pontos de coleta e biomas indicando a localização das famílias trabalhadas em vida livre.



Fonte: Barragán, 2015. Adaptado do site: <http://www.googleearth.com.br/>

Os municípios de Nova Xavantina e Água Boa estão localizados ao norte do rio das Mortes e sua economia é baseada na agricultura e pecuária. Dentro das características desta região estão as baixas altitudes presentes, que fazem que a região possua um território plano, dominado pela vegetação de cerrado.

A área escolhida dentro destes municípios possui o maior número de avistamentos já registrados da espécie. Uma larga porção de cerrado e mata nativa está sendo fragmentado, aumento cada ano devido ao aumento de paisagem antrópica.



4.2 Conservação e extração de DNA

As amostras fornecidas pelas instituições vinculadas foram armazenadas com Tris (Hidroxi-metilaminometano), EDTA (Ácido Etil-enodiamino-tetracético), solução formada por Tris+EDTA+SDS, e Citrato de Na⁺.

As extrações de DNA foram feitas utilizando os protocolos de fenol-clorofórmio e o Salino descrito por Sambrook et al., (1989) adaptado no laboratório de Biologia Molecular e Conservação (LabBMC) da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). A quantidade e a qualidade do DNA foi verificada em gel de agarose 1%, tendo como parâmetro o marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder*® (Life Technologies Inc., Carlsbad, Califórnia). As quantificações do DNA foram realizadas com o auxílio do biofotômetro (Eppendorf Corp. Hamburgo, Alemanha).

4.3 Amplificações, sequenciamento e genotipagem

4.3.1 Marcador Mitocondrial *d-loop*

O marcador mitocondrial foi utilizado com o objetivo de estimar parâmetros de diversidade, além de contrastar distribuições haplotípicas com dados de parentesco. Foram utilizadas sequências mitocondriais na amplificação da região controle, MTLPRO2 (5'-CACTATCAGCACCCAAAGCTG-3') CCR-DR1 (5'-CTGTGACCATTGACTGAATAGC-3') descritas por Tchaicka, L. (2006).

A reação teve um volume final de 12µL, com 1 U de Taq (Platinum), Buffer 10x, 2,0 mM MgCl₂, 10pmol de cada primers, e 1-50ng de DNA por µL, com condições de amplificação de 1ciclo de desnaturação a 94°C por cinco minutos; 35 ciclos a [94°C por trinta segundos, com anelamento numa temperatura de 55°C por 45s e 72°C por 45s]; um ciclo de 72°C por sete minutos e uma temperatura final de 4°C.

Os produtos de PCR <560pb foram sequenciados num sequenciador automático ABIS 3500 da *Genetic Analyzer*, na empresa Macrogen Inc.- Coreia do Sul



(<http://www.macrogen.com/eng/>). As sequências foram analisadas, editadas e alinhadas usando o software *Geneious* R7 (Biomatters Ltd.) com auxílio da ferramenta *ClustalW* (THOMPSON; HIGGINS e GIBSON, 1994), que realiza alinhamentos múltiplos. Todas as sequências foram verificadas no *GenBank* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), por meio da ferramenta *BLASTn*, para confirmação da amplificação do gene.

4.3.1.1 Diversidade Genética

Os índices de diversidade haplotípica (hd), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (n), e diversidade nucleotídica (π) para as populações *ex situ* e *in situ*, foram estimados usando os programas *DNA Sequence Polymorphism* (DNAsp) versão 5.10 (LIBRADO; ROZAS, 2009). e MEGA 5.2 (TAMURA et al., 2011).

As distâncias genéticas ou divergências intra e interpopulacionais, foram calculadas no MEGA 5.2, baseadas no modelo de (K2P) (KIMURA, 1980). Esse modelo considera a ocorrência das bases Adenina, Timina, Guanina e Citosina em igual frequência, assim como também leva em consideração taxas diferentes para substituições. Esse modelo, foi escolhido para calcular as distâncias genéticas, já que apresenta maior desempenho estatístico, quando as distâncias são pequenas além de exigir menos esforços computacionais e estatísticos (HEBERT et al., 2004; SANTOS, 2012). As análises usaram *bootstrap* (10000 pseudo-replicas).

4.3.1.2 Análises de Neutralidade

Com o propósito de avaliar a existência de diferentes forças evolutivas agindo sobre a variabilidade genética haplotípica da espécie, diversos testes de neutralidade são descritos. Para comparar o poder estatístico dos testes, foi feita uma análise considerando três dos testes mais usados.



Um deles, o teste de Tajima (D), é baseado no modelo no qual os sítios ao longo de uma sequência de DNA sofrem mutações independentes e irregulares, as quais possuem uma probabilidade infinitamente pequena de serem reversas (EPPERSON, 2003). Considerando isso, o teste realiza a correlação entre duas estimativas: número de sítios segregantes e número médio de diferenças nucleotídicas obtidas na sequência de DNA, analisado par a par, assim como a relação entre essas e o modelo de mutação neutra (TAJIMA, 1993). Valores significativamente baixos de zero (negativos), para este teste, podem sugerir expansão populacional e/ou seleção purificadora atuando, enquanto valores significativamente maiores a zero (positivos) podem indicar um efeito gargalo recente ou a presença de seleção balanceadora (HOLSINGER et al., 2002). A teste proposto por Tajima (1989), é baseado na seguinte equação:

$$T = \frac{\pi - K/a_n}{\sqrt{\text{Var}(\pi - K/a_n)}},$$

Na qual, π é o número médio de diferenças nucleotídicas entre duas sequências, K , é o número de sítios segregantes e n , é o tamanho amostral. Então,

$$a_n = 1 + \frac{1}{2} + \dots + \frac{1}{n-1}.$$

O principal parâmetro da teoria neutra de evolução, é $\theta = 4N\mu$, no qual N é o tamanho efetivo da população e μ é a taxa de mutações por sequência e geração, parâmetro adoptado por todos os testes.

O segundo teste utilizado, foi o proposto por Fu e Li (1997) (FS), baseado no mesmo modelo de Tajima, utilizando a distribuição haplotípica, que testa a presença de seleção natural, porém quando o modelo neutro é rejeitado, só é colocada a seleção natural como uma das muitas causas possíveis.

O terceiro teste utilizado foi o de Ramos-Onsins e Rozas (R_2), que leva em consideração os mesmos parâmetros dos outros dois testes, mas também, considera o



modelo de *mismatch distribution* (SLATKIN E HUDSON, 1991; ROGERS E HARPENDING, 1992). O *mismatch distribution*, é um método que tem demonstrado que em regiões de DNA onde não há recombinação e o tamanho das populações é finito, são apresentadas distribuições incompatíveis ao esperado para populações em crescimento. O R_2 , utiliza frequências mutacionais e é estatisticamente definido como:

$$R_2 = \frac{\left(\sum_{i=1}^n \left(U_i - \frac{k}{2} \right)^2 / n \right)^{1/2}}{S}$$

Onde n , é o número amostral; S , o total de sítios segregantes; k , o número médio de diferenças nucleotídicas entre duas sequências e U_i , o número de mutações na sequência i . A lógica deste teste é que o número de mutações nos ramos da genealogia depois de um crescimento populacional seja $k/2$ e que conseqüentemente existam valores de R_2 baixos.

Sabendo isso, foram calculados e comparados os três testes descritos anteriormente no programa DnaSP 5.10.01 (ROZAS E ROZAS, 2009). Foram considerados como parâmetros o número total das mutações, número médio de diferenças nucleotídicas, assim como, o número amostral de cada população. Os testes de Tajima e FS, são estimados com $p > 0,05$, enquanto para o R_2 o programa estima intervalos de confiança que devem ser comparados com os valores estimados a partir do método de análise *mismatch distribution*, no Arlequin 3.5.1.3, no qual é encontrado o valor da soma de quadrados (SSD), com seus respectivos p-value.

Para conhecer a significância do teste de R_2 , foram feitas duas simulações que pressupõem que: i). A população possui um tamanho populacional constante ii). A população possui tamanho populacional em crescimento ou declino. Essas simulações, também identificam os valores esperados para *theta* inicial e *theta* final, ponderando as frequências mutacionais para cada população.



4.3.2 Marcadores Microsatélites

Para as análises populacionais foram testados 8 marcadores microsatélites específicos, descritos para a espécie por DeMatteo (2009). Estes marcadores foram padronizados no LabBMC. A padronização foi feita com a inclusão da cauda 5'- M-13, seguindo o protocolo de Shuelke (2000). Também foram testados onze marcadores microsatélites heterólogos originalmente descritos para cachorro doméstico (*Canis familiaris*), por Francisco L. V et al. (1996) e testados em outros canídeos sul-americanos por Fontoura-Rodrigues et al., (2008). (Anexo 3).

Com diferentes temperaturas de anelamento adaptadas por Fontoura-Rodrigues, et al., (2008), contendo no *primer forward* a cauda 5'- M13 que usa fluorescências determinadas como NED, FAM, VIC e PET. O protocolo de PCR usado para a amplificação dos locos conteve: um volume final de 10 μ L, dos quais contem 1U de GoTaq (Promega) (Mix pronto com tampão Buffer 1x, 0,20 mM de dNTPs, 1,5 mM de MgCl₂, 1U de Taq DNA polimerase), MgCl₂ a 2mM, BSA 10x, cada *primers* a 8pmol, e fluorescência específica de amplificação a 8pmol com DNA diluído num intervalo que pode ir de 1-30ng por μ L. As condições de temperaturas, usadas para a amplificação dos locos incorporam 1ciclo de desnaturação a 94°C por um minuto; 20 ciclos [94°C por um minuto, anelamento entre 54-60°C (dependendo do primer) por 45s, 74°C por um minuto]; 8 ciclos [94°C por 30s, 53°C por 45s, 72°C por 45s]; e uma extensão de 1 ciclo de 74°C por 20 minutos e 20°C ∞ .

Cada um dos microsatélites foi amplificado independentemente 2-3 vezes no caso de ser homozigoto e entre 1-2 vezes para heterozigoto, objetivando confirmar a veracidade da informação nos testes de microsatélites para a espécie. Os produtos de PCR que estão entre 100-300 *pb*, foram genotipados num sequenciador automático ABIS 3500 da *Genetic Analyzer*, na empresa Macrogen Inc. - Coreia (<http://www.macrogen.com/eng/>) e analisados usando o software *Geneious* R7 (Biomatters Ltd.).



4.3.2.1 Diversidade Genética

Foi estimada a presença de alelos *dropout*, alelos nulos e falsos alelos, através do programa MicroChecker (VAN OOSTERHOUT et al., 2004). Objetivando a diminuição de erro nas análises posteriores.

Foi realizado o teste dos desvios de equilíbrio de Hardy-Weinberg (DHW) (realizando a correspondente separação dos indivíduos da natureza dos de cativo) e teste de desequilíbrio de ligação, usando o software Genepop 3.4 (RAYMOND e ROUSSET, 1995). As análises de diversidade genética, determinando parâmetros como heterozigosidade esperada (H_e), observada (H_o), número de alelos (N_a), riqueza alélica (A) e coeficiente de endocruzamento (F_{IS}) foram estimados no RStudio (ambiente de desenvolvimento integrado (IDE)), que inclui ferramentas para a execução de códigos, que permitem funções para estimar diferentes parâmetros. Dentro do RStudio foram usados diferentes *packages* como *gstudio*, criado para tornar mais fácil a inclusão de dados genéticos populacionais, ou diferentes bases de dados no software R, no qual são estimados parâmetros de variabilidade genética, o Hierfstat (GOUDET. J, 2005), *package* que estima F-estatísticas e componentes de variância usando razão de verossimilhança, e o *ggmap* 2.4 (KAHLE'S, 2005) *package* que permite a visualização espacial das variantes genéticas.

Foi estimado o conteúdo de informação polimórfica de cada loco (PIC) no programa CERVUS 3.0 (KALINOWSKI S.T, 2006). Segundo Botstein et al. (1980) os locos com valores de $PIC > 0,5$ são altamente informativos, PIC entre 0,25 e 0,5 são razoavelmente informativos e $PIC < 0,25$ são pouco informativos.

4.3.2.2 Análises de estrutura populacional

As análises populacionais foram criadas matrizes de genótipos geradas pelos locos microssatélites heterólogos e suas respectivas frequências alélicas, para cada um dos 25 indivíduos de vida livre e 13 de cativo. Tais matrizes foram, então, submetidas



aos diferentes programas de estruturação dentro das populações estabelecidas *a priori*, estimando o número de k correto para análises posteriores. Foi usado o Structure (PRITCHARD, 2000), software que estima número de populações através de reamostragem pela MCMC (Cadeia de Markov Monte Carlo) e usa o método Bayesiano de agrupamento com 10.000 passos de *burn-in* e 100.000 MCMC e com dez réplicas de cada simulação, variando o k entre 1-5.

Para essa análise foram adotados os seguintes modelos a) modelo *admixture*; no qual todos os indivíduos são misturados supondo que podem ter frações de genótipos de diferentes populações; b) modelo de frequências alélicas correlacionadas; o qual pressupõe que a população pode ter frequências similares por ter um ancestral comum recente (PRITCHARD, 2000). Depois de o programa gerar os resultados, foi verificado o k , a partir do programa online Structure Haverster (D. EARL e VONHOLDT, 2012) que estima o número de populações, usando o método de Pritchard (2000) e Evanno et al., 2005

Para realizar uma análise mais detalhada da matriz de dados da natureza, foi feita uma análise multivariada de componentes principais (PCA), verificando o número de variações não correlacionadas, mas, significativas, para explicar a máxima quantidade de variância com um número menor de componentes, mas, mais informativos. A análise de componentes principais foi feita no *package* adegenet (JOMBART T., 2008), no software R.

O adegenet contém um conjunto de ferramentas para identificação de estrutura populacional, analisados a partir da contagem de alelos (CA) ou frequências alélicas (PCA, PCoA), geralmente aplicado para populações, mas também altamente eficaz para indivíduos (PETTERSON et al., 2006). Para realização da análise foi feito o teste de componentes principais por loco, devido ao número de variáveis (número de alelos) ser maior que o número de indivíduos. Determinando o número de componentes (locos), cujas variáveis (alelos) eram mais informativas, foi feita a correlação entre os dois principais componentes, para todos os indivíduos capturados em locais vizinhos. Não foram incluídos indivíduos coletados em locais afastados por possíveis atribuições à uma população errônea. Uma análise fatorial foi feita a partir do programa Genetix 4.05



(BELKHIR et al, 2004), para verificar a atribuição feita pela análise de componentes principais e análise bayesiana, além de observar o comportamento espacial dos genótipos correspondente aos indivíduos da natureza.

Foi calculado o índice de fixação (F_{ST}) no Hierfstat (GOUDET, J, 2005) para verificar a diferenciação genética entre as populações definidas *a priori*, considerando que o F_{ST} é um índice que define a correlação entre gametas tiradas ao acaso da mesma subpopulação em relação ao total (WRIGHT, 1965). Um F_{ST} pequeno indica baixa variação em uma população local em relação à população total, enquanto que um F_{ST} grande indica muita variação local em relação à população total (TEMPLETON, 2006).

4.4 Análises de Parentesco

Com a existência de uma variedade de estimadores para realizar análises de parentesco foi realizada uma simulação utilizando as frequências alélicas no programa Coancestry (WAGNE, 2007). A comparação dos valores simulados de cada estimador, com o valor real facilitou a seleção do melhor estimador e permitiu ter um intervalo de confiança de 95%. O programa Coancestry 1.0.1.2, comparou os sete estimadores, sendo cinco de momentum: (1) Li, Weeks e Chakravarti (1993); (2) Lynch e Ritland (1999); (3) Queller e Goodnight (1989); (4) Ritland (1996) e (5) Wang (2002); e dois de verossimilhança: (6) verossimilhança triádico (TML) (WANG, 2009); (7) método diádico (MILLIGAN, 2003). As simulações e as análises de parentesco, foram feitas utilizando a abordagem de valores de cortes gerados por simulação no mesmo programa (BLOUIN et al., 1996).

Os coeficientes de parentesco (r) estimados foram analisados, utilizando somente a matriz de dados dos indivíduos de vida livre. Os valores de r obtido par a par não foram incluídos indivíduos coletados em locais afastados. Foi estimado o valor médio de r , entre fêmeas e machos objetivando inferir dispersão para ambos os sexos.



4.4.1 Paternidade e maternidade

O teste de paternidade foi feito pelo programa Cervus 3.0 (KALINOWSKI, S. T, 2006) que utiliza um método para marcadores codominantes herdados independentemente. O software calcula a frequência de cada alelo, para cada loco na população, juntamente com uma gama de estatísticas que incluem ensaios de DHW, presença de alelos nulos, *mistyped* e testes que adéquam os locos para a análise final.

Inicialmente, para cada tipo de análise foi feita uma simulação, que determinou os valores críticos da razão de verossimilhança usados para atribuição de progenitores. Essa simulação usa dados das frequências alélicas observadas, considerando 1000 rodadas, 5% de erro e 95% de genótipos obtidos corretamente. A percentagem de exclusão também foi calculada para cada loco com dados de probabilidade combinada de exclusão e confiabilidade da análise. Também foi calculado para cada loco a probabilidade de exclusão conhecendo um dos parentais (EXCL1) e conhecendo os dois parentais (EXCL2).

Os testes de Paternidade requeriam conhecimento prévio dos genótipos de pelo menos um parental e as possibilidades dos possíveis progenitores candidatos na população. A atribuição de parentais foi considerada com um intervalo de confiança para atribuir um pai ou mãe, que varia entre 80 e 95%. Esses testes de atribuição parental, foram feitos das seguintes três maneiras:

- 1) por famílias: utilizando somente as famílias onde os dois progenitores eram conhecidos;
- 2) população: considerando que não existe estruturação dentro da população, entretanto ponderando informações familiares;
- 3) espaço e tempo: Neste caso, foram considerados todos os indivíduos da população, considerando idade e local de coleta.

A confiança de atribuição dos parentais foi determinada pelo valor estatístico de LOD (logaritmo de verossimilhança), no qual valores negativos de LOD indicavam menor probabilidade de atribuição parental.



Foi realizada também a análise “*Parent pair*” que atribui os ambos possíveis parentais, tendo conhecimento somente do sexo correspondente para cada indivíduo candidato (SLATE et al., 2000). A análise foi realizada com a finalidade de determinar possíveis pais e mães não atribuídos pelos testes de maternidade e paternidade, considerando possivelmente a não inclusão de informação genotípica de cada parental no teste.

4.5 Informações *a priori*

4.5.1 População de vida livre

As análises de parentesco foram rodadas com os grupos familiares determinados previamente em campo. Indivíduos que foram capturados sem grupo social (bSve 302, bSve PUC, bSve 309, bSve 331), não estão incluídos nos heredogramas, já que para esses foi determinado arbitrariamente um grupo, para facilitar as posteriores análises (Anexo 1). Os heredogramas de cada grupo familiar da natureza são mostrados no Anexo 7.

4.5.2 População cativa *ex situ*

A população cativa no Brasil é proveniente de um único casal, constituído por um macho 383 (1966-1971) e uma fêmea 7 (1966-1973), capturados no Paraguai e translocados para Frankfurt em 1968, dando origem aos primeiros indivíduos cativos de cachorro vinagre. Das proles geradas por este casal, uma fêmea 53 (1976-1979) foi translocada para NZP-CRC (Smithsonian Conservation Biology Inst.), que se reproduziu com o macho 46 (1971-1980) capturado na Colômbia e translocado para o NZP-CRC, dando origem à fêmea 82 (1978-1988) que se reproduziu com macho 54 (1976-1987) capturado na Sul-américa. Esse último casal foi translocado para o Brasil, gerando os indivíduos nascidos em cativeiro no Brasil até o ano de 2011. (Figura 7).

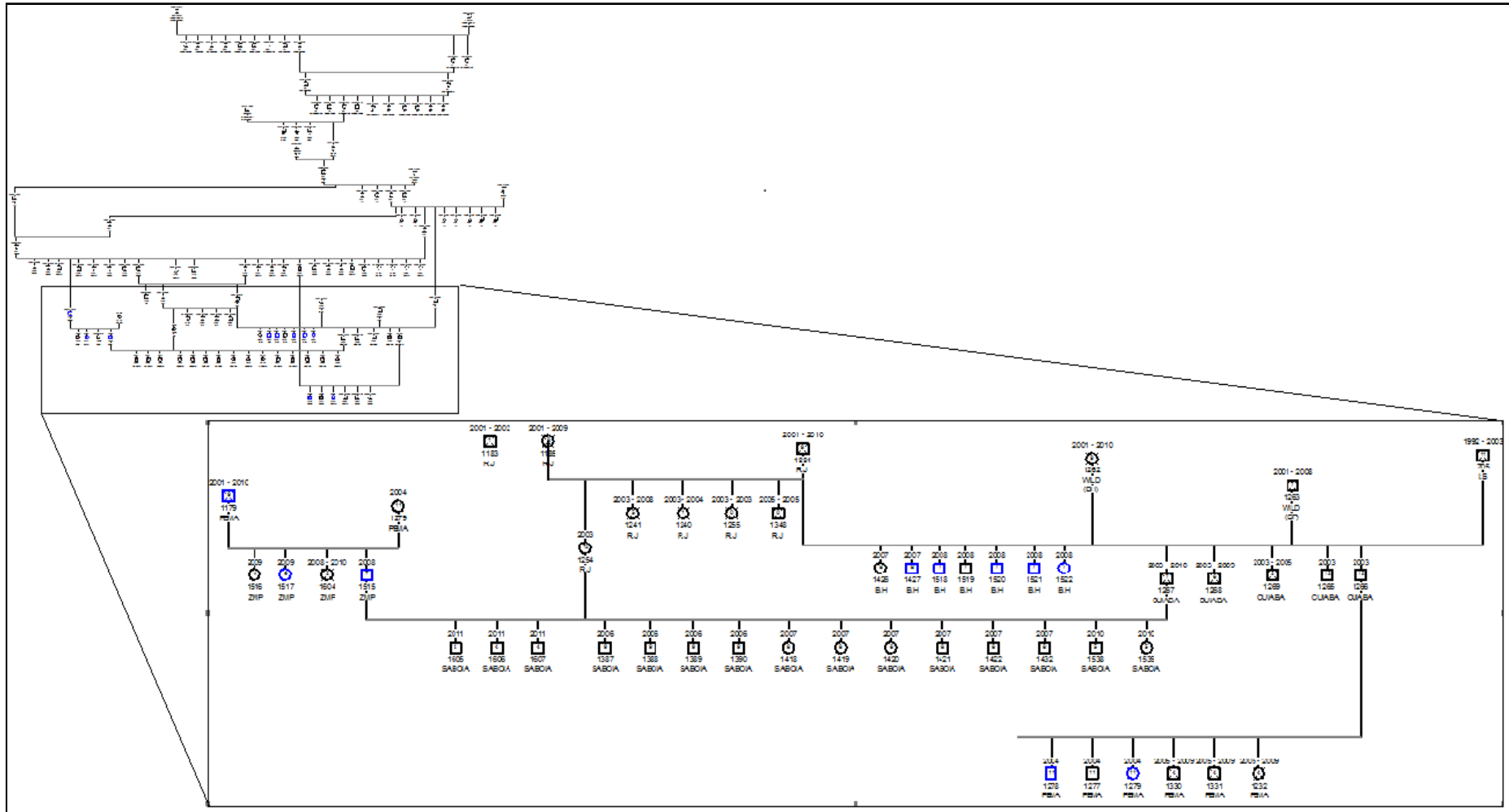
De acordo com a última atualização do *studbook*, no ano de 2011, deveriam existir 33 representantes cativos vivos de cachorro vinagre no Brasil, número registrado



em cinco recintos (PEMA, ZMP, JPESP, BH, SABIOA) em três estados do Brasil, como mostra a Figura 6.



- 1 **Figura 3:** Heredograma da população cativa de cachorro vinagre, baseado no *studbook*, última atualização 2011. Indica-se em azul os indivíduos coletados.
- 2 Cada indivíduo possui informações de ano de nascimento, ano da morte, ID segundo o registro do *studbook* e local de cativoeiro.



3



5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.2 Extração e quantificação de DNA

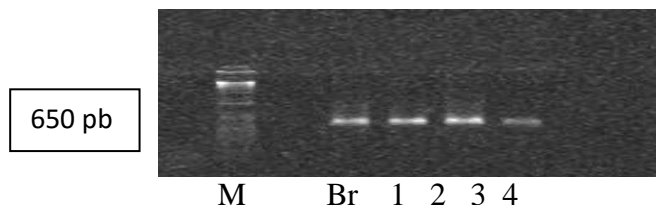
O DNA extraído das amostras conservadas na solução TES (Tris+EDTA+SDS), apresentou alta fragmentação do material genético, que foi observada em gel de agarose 1%. A quantidade de DNA obtida ao realizar a extração, foi pouca, obtendo, aproximadamente, entre 1-20 ng/ μ L. Em torno de 90% das amostras obtidas, do banco de amostras do CENAP, encontravam-se conservadas em TES.

5.3 Caracterização dos locos microssatélite e mitocondriais

5.3.1. Mitocondrial *d-loop*.

Foram amplificados e sequenciados fragmentos da região *D-loop* de 500 *pb* (Figura 7) de um total de 35 indivíduos, sendo 10 indivíduos cativos e 25 de vida livre (considerando bSve 309, bSve 331 e bSve PUC). A composição nucleotídica obtida foi de: 16,63% de Citosina; 25,87% de Guanina; 27,94% de Timina e 29,56% de Adenina. Não houve nenhuma inserção, deleção ou códon de terminação, nos fragmentos sequenciados, o que reduz a possibilidade de amplificação de pseudogenes de origens mitocondriais.

Figura 4: Amplificação da CR-Dloop. Gel de agarose 2%. **M:** Marcador de peso molecular *1 Kb Plus DNA Ladder* (Life Technologies Inc., Carlsbad, Califórnia). **Br:** Controle negativo.



As sequências geradas apresentaram um total de cinco sítios polimórficos e seis mutações, para todos os indivíduos (Tabela 2). Esses haplótipos diferiram entre si, em média, por 1,7~2,0 nucleotídeos (Tabela 4).

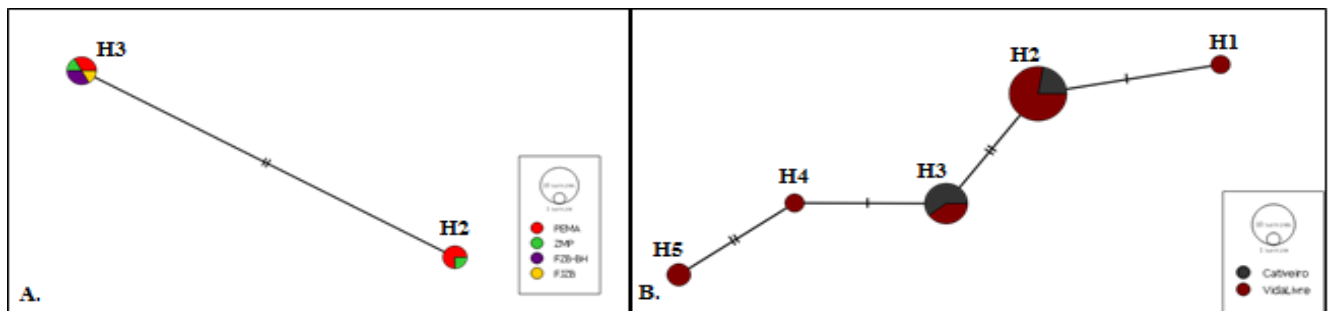


Tabela 2. Sitios polimórficos dos cinco haplótipos encontrados nas duas populações. As linhas representam cada haplótipo.

Haplótipos	402	412	422	438	481
H1	C	G	G	G	T
H2	-	-	A	A	-
H3	-	-	A	A	C
H4	T	A	A	A	A
H5	T	A	A	A	C

Os haplótipos H2 e H3, são compartilhados pelos indivíduos pertencentes às duas populações (cativeiro e vida livre). Os haplótipos H1, H4 e H5 são privados, para a população de vida livre, com número máximo de passos mutacionais igual a dois. (Figura 8. B). Dentro da população cativa, é mostrada a predominância do H3 (60%), que é compartilhado por seis indivíduos

Figura 5. Rede de haplótipos dos indivíduos cativos. A. Note-se os dois haplótipos representantes, dos grupos cativos; subdivisão por cores dos indivíduos, por local. B. Indica-se haplótipos compartilhados com a população *in situ*.



Fonte: Popart 4.8.4



Tabela 3. Distribuição haplotípica por família. Indica-se o ID: Identidade do indivíduo; S.I: sexo informado; família correspondente de cada indivíduo; H: haplótipos ao que pertence.

ID	S.I	Família	H
bSve 302	M	Indep	3
bSve 303	F	1	2
bSve 304	M	1	5
bSve 305	M	1	1
bSve 306	M	1	2
bSve 307	M	2	5
bSve 308	F	2	1
bSve 309	M	9	3
bSve M05	M	3	4
bSve 310	M	3	4
bSve 311	F	3	4
bSve 312	F	3	4
bSve 313	F	3	3
bSve 314	F	3	4
bSve 315	M	3	4
bSve 316	M	5	4
bSve 331	M	9	2
bSve 333P	M	3	2
bSve 334P	M	3	4
bSve 337	M	5	4
bSve 338	M	5	4
bSve 339	F	5	4
bSve 341	M	7	1
bSve 340	F	7	4
bSve PUC	M	8	4

Como é mostrada na Tabela 3, o haplótipo dois é o mais compartilhado entre as famílias. 14 indivíduos são atribuídos a esse haplótipo, no entanto, existem haplótipos que são atribuídos a menos de dois indivíduos na população como é de se observar com o haplótipo um.

A diversidade haplotípica e nucleotídica, encontrada para ambas as populações conjuntamente (todos os indivíduos) foi, de $Hd = 0,659 \pm 0,000380$, valor semelhante quando comparado com cada população independentemente e $\pi = 0,00318 \pm 0,00047$



(Tabela 4). Sendo assim, provavelmente, as duas populações estão contribuindo igualmente para manter as diversidades haplotípicas e nucleotídicas.

Os valores médios de Hd , de ambas as populações, não são significativamente diferentes, já que poderia se considerar que os dados são proporcionais ao número amostral. Em 25 indivíduos de vida livre, foram estimados cinco haplótipos, os quais dois são compartilhados por indivíduos de cativeiro.

Tabela 4. Índices de diversidade haplotípica para as populações de vida livre e cativeiro, determinadas para *d-loop*.

Natureza				
N	n	k	Hd	π
25	5	1.944	0,6601±0,091	0,00448±0,00065
Cativeiro	n	k	Hd	π
10	2	1.067	0,533±0,00896	0,00247±0,00044

*N= número de indivíduos; n=número de haplótipos; k=número médio de diferenças nucleotídica; Hd = Diversidade haplotípica; π =Diversidade nucleotídica

A análise da diversidade haplotípica, revelou que os valores médios de Hd , de ambas as populações, não é significativamente diferente, já que poderia considerar-se dados proporcionais ao número amostral. Em 25 indivíduos de vida livre, foram estimados cinco haplótipos, onde dois são compartilhados por indivíduos de cativeiro. Uma diversidade haplotípica maior a 0,5, é tida como alta para diversas populações de mamíferos (LOWE et al.,2006).

5.3.1.1 Análises de Neutralidade

Segundo Ramos-Onsins (2002), a eficácia dos testes analisados em diversas situações, mostrou que o R_2 e FS, foram aqueles que se mostraram estatisticamente mais significativos. Um dos parâmetros que demonstrou ser de fato o mais importante na



significância de ambos testes, foi o número amostral trabalhado. O R_2 , se mostra mais informativo ao se testar com tamanhos amostrais pequenos e menos sítios polimórficos, enquanto que, o FS teve um poder estatístico maior ao ser testado com um número maior de amostras e número mais alto de sítios polimórficos.

Considerando isto, os dados obtidos indicaram que o teste que se mostrou significativamente estatístico para o pool de dados trabalhados, conforme o citado pelo Ramos-Onsins, foi o R_2

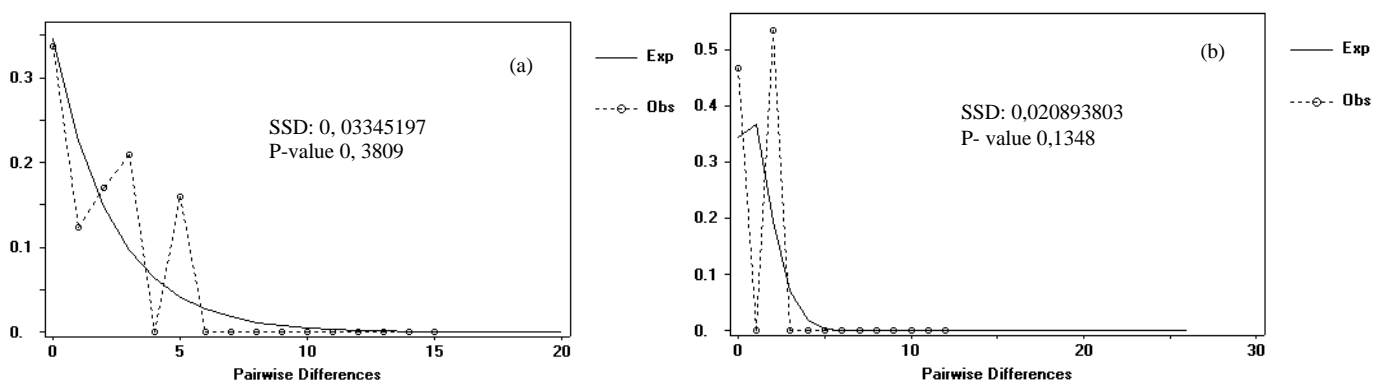
Tabela 5. Testes de neutralidade feitos para *d-loop*, em ambas populações independentemente.

Pop.	D	p-value	FS	p-value	R_2	p-value	C.I
Natureza	1.902	1.21902	0,83337	0,692	0,189*	0,91	0,03-0,13
Cativeiro	1.828	0,9769	2.5004	0,87	0,267*	0,87	0,07-0,21

D= *Tajima's test*; FS= *Fu's test*, R_2 = *Ramos-Onsins and Rozas's test* (*) *p-value* signitvativos; C.I: Índices de confiabilidade.

Se o teste de R_2 , não tivesse se mostrado significativo, as estimativas obtidas pelo D e FS, poderiam indicar, que o polimorfismo pode ser explicado pela hipótese de mutações neutras, porém foi feito o teste de *mismatch distribution* para as duas populações independentemente, conhecendo as frequências de mutação observadas e esperadas para cada população (Figura 10). Sendo assim, ao analisar o valor de R_2 (significativo), considerando os valores de SSD e Raggedness, foi possível demonstrar um processo de expansão populacional para a espécie.

Figura 6: Gráfico de *mismatch distribution* gerado pela simulação das frequências de mutação para cada população. (a). População da natureza, com Raggedness index: 0.13409735 p-value: 0.38110000. (b). População cativa, com Raggedness index:





5.3.2 Marcadores Microsatélites

Nas duas populações, foram testados 12 locos microsatélite, dos quais nove foram heterólogos com tamanhos $< 300pb$, e três específicos (speothos3, speothos7, speothos9). Desses últimos, todos apresentaram-se monomórficos para a população de vida livre e cativo, assim como também o loco 2159 que tinha se apresentado polimórfico para os indivíduos da natureza, resulto sendo monomórfico para a população cativa. Foram encontrados alelos nulos nos locos 2001, 2004 e 2159, para ambas populações. O loco 2006 não teve sucesso de amplificação na população cativa, resultando somente com sete loci microsatélites para as análises (Tabela 6).

A população de vida livre, apresentou entre três e oito alelos por loco, com um total de 53 alelos, e uma riqueza alélica média de 5,12 alelos por locos, enquanto a população cativa, apresentou entre dois e sete alelos por loco, com um total de 33 alelos e uma riqueza alélica média de 3,75 alelos por locos. A H_e encontrada para a população de vida livre, vario entre 0,335-0,803 e a H_o entre 0,000-0,950, enquanto para a população cativa foi obtido uma H_e entre 0,413-0,685 e uma H_o entre 0,000-1,000. Em dois, dos locos analisados para a população de vida livre, encontrou-se desvio significativos do P_{HW} , com $0,005 < \alpha < 0,05$. Os valores de F_{IS} encontrados para as populações de vida livre e cativo foram de 0,505 e 0,051, respectivamente.

Não foi encontrado desequilíbrio de ligação para os pares de locos analisados, em nenhuma das duas populações, indicando que a frequência esperada da combinação dos pares é similar a frequência observada. O PIC calculado para ambas as populações mostrou que os locos 2001 e 2004, foram razoavelmente informativos e os locos 2010,2132, 2137,2140 e CXX20 foram altamente informativos (Tabela 6).

A diversidade de alelos, encontrada na população de vida livre, foi maior que a encontrada para a população cativa. Essa perda de diversidade alélica, pode ser a resposta de forças evolutivas responsáveis por mudanças aleatórias na frequência de alelos em populações finitas, resultando no aumento da frequência de alguns alelos e na perda de outros (TEMPLETON, 2006). Essas mudanças em cativo, também podem ser o resultado da reprodução de alguns poucos indivíduos fundadores, estimando que o



número populacional da espécie é bastante reduzido, obtendo uma representação de indivíduos cativos no Brasil menor ao 40% da espécie em total.

Tabela 6. Parâmetros de variação genética nas populações de cativo e vida livre, a partir dos dados microssatélite.

Local	Locos									Média
	2001	2004	2006	2010	2132	2137	2140	2159	CXX20	
Vida livre										
N	22	20	12	18	20	21	21	21	20	
Na	3.000	3.000	5.000	5.000	6.000	8.000	5.000	8.000	5.000	5.333
Ne	2.638	1.504	3.512	3.975	3.756	5.069	3.041	4.009	3.704	3.468
A	3.000	2.844	5.000	4.983	5.424	7.014	6.215	4.768	4.593	5.120
PIC	0,549	0,307	0,658	0,740	0,717	0,792	0,643	0,763	0,660	---
Ho	0,318	0,000	0,500	0,722	0,950	0,857	0,000	0,905	0,550	0,533
He	0,621	0,335	0,715	0,748	0,734	0,803	0,671	0,751	0,730	0,678
P_{HW}	0,001*	0,000*	0,025	0,404	0,018	0,307	0,954	1,000	0,040	---
F_{IS}	0,505+	1,000+	0,340+	0,064	-0,271	-0,043	1,000	-0,182+	0,271	0,505
pL	0,006	0,006	0,033	0,356	1,000	0,778	0,984	0,006	0,061	---
pS	1,000	1,000	1,000	0,772	0,017	0,439	0,1056	1,000	0,989	---
Cativo										
N	13	12	0	11	12	10	12	13	13	
Na	3.000	2.000	N.A	4.000	5.000	6.000	5.000	1.000	7.000	3.667
Ne	2.024	1.704	N.A	3.103	2.692	3.175	2.304	1.000	3.130	2.126
A	2.992	2.000	N.A	3.909	4.645	6.000	4.79	1.000	6.215	3.758
PIC	0,448	0,328	N.A	0,615	0,565	0,650	0,531	0,000	0,644	---
Ho	0,231	0,417	N.A	1,000	0,833	0,600	0,500	0,000	0,538	0,457
He	0,506	0,413	N.A	0,678	0,628	0,685	0,566	0,000	0,680	0,461



P_{HW}	0,0244	0,707	N.A	0,021	0,907	0,262	0,251	N.A	0,168	---
F_{IS}	0,571+	0,035+	N.A	-0,438	-0,287	0,176	0,159	N.A+	0,247	0,051
pL	0,018	0,756	N.A	1.000	0,975	0,262	0,287	N.A	0,094	---
pS	1.000	0,818	N.A	0,050	0,132	0,931	0,887	N.A	0,975	---

Note-se os 9 locos microssatélite trabalhados, nos quais para cada loco é apresentado valores de: (N) número de indivíduos analisados por loco, (Na) número de alelos, (A) riqueza alélica, (*H_o*) heterozigosidade observada, (*H_e*) heterozigosidade esperada, (*P_{HW}*) desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com $0,005 < \alpha < 0,05$ (ajustado com a correção sequencial de Bonferroni); (*F_{is}*) índice de endogamia, (*PIC*) conteúdo de informação polimórfica, pL, valores de *p* para o déficit de heterozigotos; os, valores de *p* para o excesso de heterozigotos. *valores significativos. N.A dados não informados. + presença de alelos nulos.

A presença de desvios do equilíbrio de Hardy Weinberg pode ser explicada por cinco circunstâncias, segundo PEREIRA et al., (2009). a) erros de amostragem que menosprezam o número de alelos encontrado por loco; b) ocorrência de alelos nulos, *dropout* ou *stuttering*; c) seleção de alelos; d) efeito Wahlund (excesso de homozigotos por causa da sobreposição de populações; e) endocruzamento.

Sendo assim, para os nossos dados, foi possível descartar a opção do efeito de Wahlund, pois não foi encontrada sobreposição de populações ao realizar a análise bayesiana, mesmo considerando um excesso de homozigotos para alguns locos, assim como também, o efeito de endogamia já que se os desvios fossem causados por endocruzamento, seria esperado que todos os locos estivessem em desequilíbrio, pois a depressão endogâmica atuaria sobre todos eles.

Já para que os desvios fossem causados pela seleção, deveria se esperar que os locos em desequilíbrio não fossem, necessariamente, os mesmo em cada população, dado corroborado nas análises, considerando que a seleção como possível fator, conhecendo que é esperado que atue de jeito diferente para cada população. Entretanto,



possivelmente, a ocorrência de alelos nulos também pode ser uma provável causa do desvio de Hardy Weinberg, encontrado aqui.

Sendo assim, é possível afirmar que as características dos marcadores e estimadores são essenciais para análises populacionais. Características determinadas pelo número de alelos por loco, polimorfismo dos marcadores e erros de genotipagem, que devem ser levadas em consideração, já que ao se trabalhar com populações finitas e espécies sem informações já descritas, o número de variáveis é altamente limitado, assumindo que muitos dos pressupostos matemáticos requerem de um alto desempenho dos marcadores utilizados e que para espécies como a trabalhada a abundância de marcadores é baixa, conseguindo utilizar sequências descritas para outras espécies o que leva a uma maior probabilidade de incidência de fenômenos de erro.

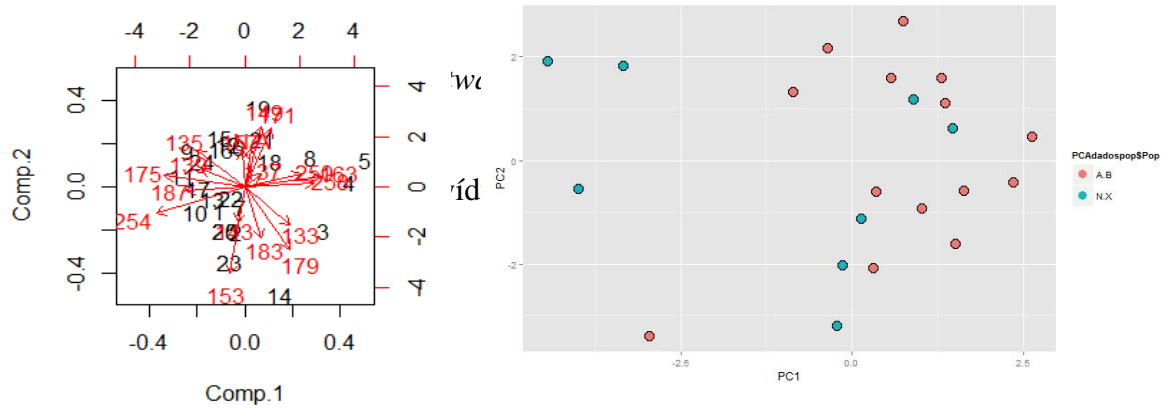
5.4 Estruturação populacional

A análise multivariada de componentes principais, desenvolvida com os componentes que demonstraram ser mais significativos para explicar a estruturação por distancia na população de vida livre. (Figura 9), foi descartada para a população de cativeiro, partindo do pressuposto que os representantes cativos são provenientes de casais reprodutivos comuns, esperando assim encontrar uma alta similaridade entre todos, quando analisada para a matriz de dados de indivíduos de vida livre, não identificou uma estruturação entre famílias como era esperado ao interior da população.

Sabendo o anterior e considerando que não houve estruturação entre grupos familiares dentro da população, foram classificados os indivíduos por locais de coleta, com o objetivo de mostrar uma possível movimentação entre municípios. (Figura 11).

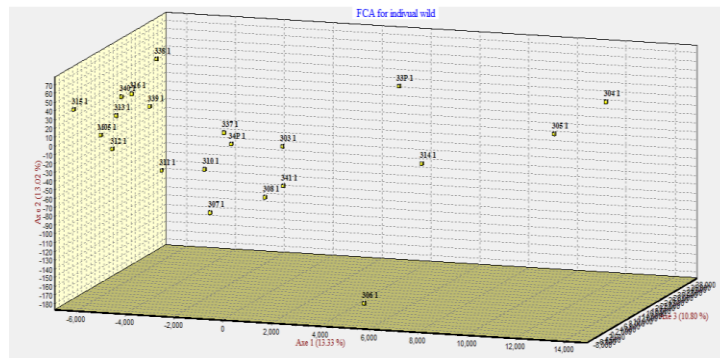


Figura 7: Figura mostrando os componentes significativos estatisticamente, usados na análise de componentes principais multivariadas (PCA) dos indivíduos de vida livre, por local de coleta. A.B (Água Boa-MT), N.X (N. Xavantina-MT).



Genetix 4.05 (Figura 9), foi semelhante ao encontrado pela PCA realizada, mostrando o agrupamento das diferentes famílias, sem diferenciação significativa, nem sobreposição de subpopulações.

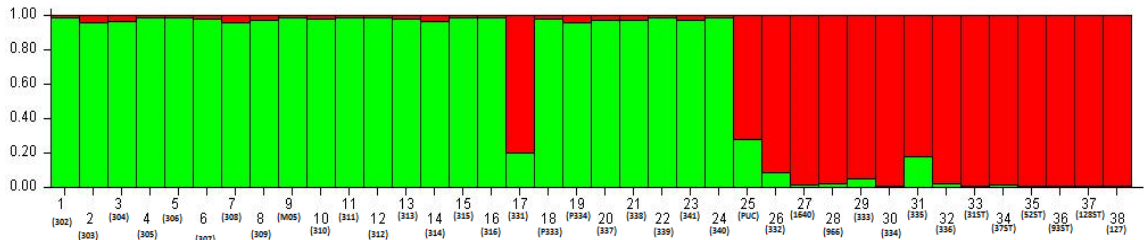
Figura 8: Padrão de distribuição espacial dos indivíduos da natureza de *S. venaticus*.



Fonte: Software Genetix versão 4.05

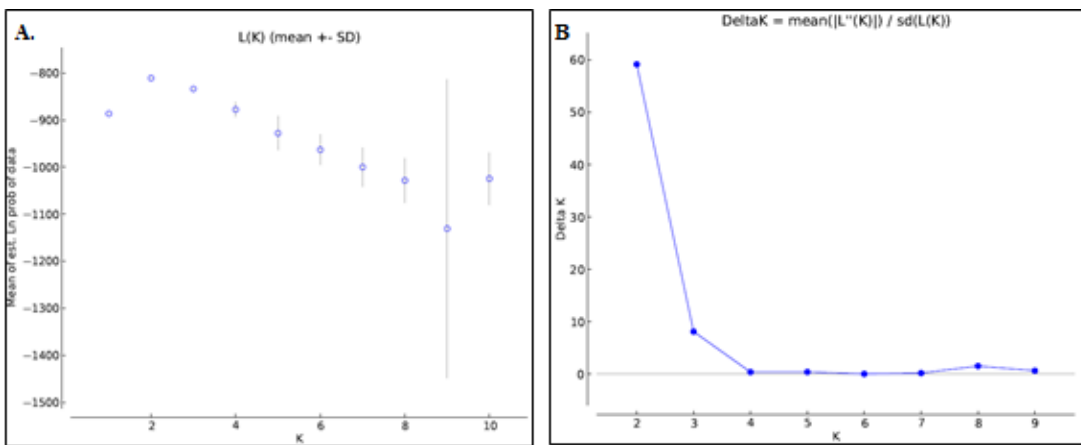
As análises bayesianas, realizadas à atribuição dos indivíduos de cativoiro, a única população de vida livre, indicaram um $k=2$ (Figura 13), resultado corroborado pelo método de Evano et al., (2005) e Pritchard (2000) (Figura 14 A, B)

Figura 9: Análise bayesiana com $k=2$ (Vida livre e cativoiro). Cada indivíduo é representado por uma barra enumerada do número 1-38, atribuídos a populações encontradas em diferentes cores (verde=vida livre; vermelho=cativoiro).



Fonte: Software Structure 3.3

Figura 10: A. Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Evano et al., (2005). B. Estimativa do número mais provável de populações por meio do método de Pritchard (2000).



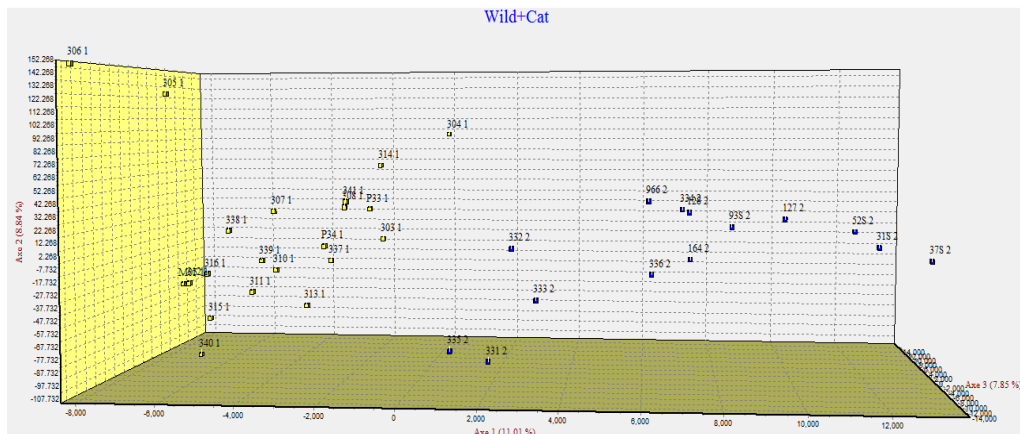
Fonte: Structure Harvester. Site: <http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>

De acordo com os resultados da análise bayesiana, o indivíduo bSve 331, foi atribuído à população de cativeiro. Sendo que esse indivíduo foi introduzido no cativeiro no ano de 2006, porém, capturado da natureza no estado de Rondônia, características replicadas igualmente para o indivíduo bSve 309, o qual a diferença do anterior continuo sendo atribuído a população de vida livre. Essa possível atribuição, pode ser aceita, pensando na possibilidade de que os indivíduos de cativeiro, são descendentes de fundadores consanguíneos do bSve 331.

O padrão de distribuição espacial (Figura 15) gerado pela análise fatorial conseguiu explicar melhor o agrupamento dos indivíduos das duas populações, assim como identificar a distância espacial entre os indivíduos atribuídos a ambas populações.



Figura 11: Padrão de distribuição espacial, das duas populações (vida livre e cativo) geradas pela análise bayesiana. Em amarelo vida livre e em azul cativo.



Fonte: *Genetix versão 4.05*

As análises de estruturação populacional e atribuição de indivíduos cativos indicaram que: 1). Não existe uma diferenciação genética entre si sem sobreposição de subpopulações; 2). As análises Bayesianas se mostraram significativas ao trabalhar com um número amostral maior, sem estabelecimento de populações *a priori* 3). Indivíduos cativos não foram atribuídos à população *ex situ*, indicando uma forte diferenciação entre as duas populações 4) Análises multivariadas de componentes principais são uma ferramenta altamente informativa ao se trabalhar com números amostrais pequenos e número de variáveis maiores, indicando o número de alelos como as variáveis que determinam os eixos para a análise multivariada.

Considerando marcadores codominantes, o resultado do F_{ST} foi de 0,165 com $p > 0,005$, mostrando-se apenas significativo após correção de Bonferroni, o que sugere que a diferenciação interpopulacional é mais alta do que a intrapopulacional. Diante dos resultados, a hipótese de que existe estruturação populacional entre as famílias, considerando indivíduos amostrados na natureza, é rejeitada. Pois a estruturação populacional encontrada, foi somente, entre indivíduos da natureza e os de cativo.

Considerando marcadores mitocondriais, o resultado do Φ_{ST} obtido, foi de 0,02775, com $p > 0,05$, resultado significativo como estimativa de estruturação entre populações. A estimativa do teste de distância genética entre populações, considerando os marcadores mitocondriais, demonstrou que existe um valor de distância de 0,003



(0,3%) entre as duas populações e que a média da distância intrapopulacional é maior dentro da população da natureza do que do cativoiro (Tabela 7).

Tabela 7. Índices de distâncias genéticas médias, entre e dentro das populações de *S. venaticus*.

	Cativoiro	Natureza	d (média)
Cativoiro			0,002
Natureza	0,003		0,004

*O valor de d (média), corresponde à distância intrapopulacional.

Ponderando os dados de estruturação encontrados nesse trabalho, poderia se dizer que existe fluxo gênico entre as famílias pertencentes aos diferentes municípios amostrados ou também, que a restrição ao fluxo pode não ser forte o suficiente para promover estruturação genética entre famílias; uma vez que a espécie possui uma grande área de vida, indicando assim que os laços monogâmicos descritos para a espécie não estão sendo refletidos na estruturação populacional.

5.5 Análises de parentesco

Uma análise do desempenho dos estimadores de parentesco genético, em situações em que o número e/ou grau de polimorfismo dos marcadores genéticos é limitado, se torna importante para ajudar na classificação do melhor estimador de acordo com as características reais da população (BLOUIN, 2003). Dos sete estimadores de parentesco utilizados pelo programa Coancestry (WANG, 2011) o estimador TrioML (estimador de verossimilhança triádico) (WANG, 2007) e DyadML (estimador de verossimilhança diádico) (MILLIGAN, 2003) apontaram-se mais significativos e, portanto, mais adequados para a matriz de genótipos reais (Anexo 5).

A matriz de similaridade gerada por ambos estimadores, correspondente a população de vida livre, indicou que 23,8% da população possui um valor de r maior a 0,25 e, correspondentemente, mais de 75% das combinações par-a-par resultaram em valores para indivíduos não relacionados (Anexo 6), dados que conforme BLOUIN



(2003), são gerados com significância estatística, testada para várias situações como a trabalhada aqui.

Na população de vida livre, foram classificados 50 dos 210 pares de estimativas analisadas. Desses 50 pares de estimativas, 41 pares tinham um valor de r entre 0,25 – 0,49 e 9 pares tinham um valor de $r > 0,50$. O valor médio de parentesco entre indivíduos da mesma família (construída *a priori*), não foi calculado pela diferença de N entre famílias, o que poderia dar uma inferência errada sobre o comportamento da espécie. Embora, menos do 30% da população seja relacionada, as análises dos valores de r par a par, suportam a ideia de que provavelmente existam vários migrantes de outros grupos sociais, diminuindo consideravelmente os índices de parentesco entre os indivíduos pertencentes a população ou, a formação dos grupos pode ser uma alternativa a: 1) tolerar indivíduos não aparentados, por baixo custo e ganho na manutenção de recursos ao interior do grupo, quando esses recursos são abundantes; 2) retenção ou aquisição de territórios de alta qualidade (SILLERO-ZUBIRI E GOTTELLI, 1995b) comportamentos descritos para lobos sociais da etiópia.

O valor médio de parentesco entre os sexos, foi estimado, com valor de r para machos de 0,11654 com uma variância de 0,01617 e fêmeas de 0,11189 com variância de 0,01909, comportamentos pouco replicados por outros mamíferos, onde geralmente apresentam um padrão de dispersão sexo assimétrica, com os machos apresentando uma dispersão maior e menor coeficiente de parentesco em relação às fêmeas (GREENWOOD, 1980 e DOBSON, 1982).

Dados obtidos nesse trabalho, sobre dispersão igualitária entre machos e fêmeas de cachorro vinagre, encontrando valores de r próximos para ambos os sexos, foram semelhantes aos reportados para outros canídeos sociais, como adultos de *Lycaon pictus* (cães selvagens africanos) por Girman et al, 1997, o qual sugere por observações de campo, diferentes causas: 1). Aliança entre um ou mais machos, com uma migrante fêmea ou vice-versa 2). Ascendência de uma fêmea subordinada após a morte da alfa. Considerando o anterior, é possível discernir que qualquer um dos mecanismos



reportados para cães selvagens, podem estar sendo replicados pelos grupos sociais de cachorro vinagre, pelo que o valor de r encontrado foi similar. Entretanto, evidências de padrões de agrupamento de parentes e dispersão enviesada entre sexos, tem sido reportada para onça parda (*Puma concolor*) (MIOTTO et al., 2012) e urso pardo (*Ursus arctos*) (STOEN et al., 2006, MOYER et al., 2006, COSTELLO et al., 2008), que embora sejam espécies bastante diferentes e solitárias, possuem um padrão de comportamento notável para a maioria dos mamíferos carnívoros, considerando-se uma alta probabilidade de replicação comportamental por coancestria.

Apesar de existir possíveis evidências de comportamento monogâmico para cachorros vinagre, este trabalho não apresentou suporte estatístico baseado nos dados moleculares, que confirme tal comportamento. Assim, considerando a classificação dos pares gerados, pode-se inferir que há, de fato, ocorrência de pares fortemente relacionados fora dos grupos familiares e pares não relacionados dentro dos grupos familiares. Esse dado, comparado com a distribuição dos haplótipos dos indivíduos, resulta na rejeição da hipótese apresentada no trabalho, onde as análises de parentesco entre indivíduos de cada grupo explicariam os pares socialmente monogâmicos, assim como a dominância social de algumas fêmeas.

Apesar da monogamia não ser comum em nenhum grupo de seres vivos, esse sistema de acasalamento é excepcionalmente raro em mamíferos, linhagem notável pelo tamanho do investimento parental das fêmeas na prole. Porém, existem exceções à regra que são úteis para testar hipóteses alternativas sobre a monogamia dos machos nesse grupo. (ALCOCK, 2012). Assim sendo, estariam esses dados refletindo o padrão dos sistemas de acasalamento da espécie ou refletindo o comportamento dos grupos familiares? A quantificação dos dados pode ter sido distorcida pelas limitações do número de marcadores, além de possuir um número pequeno de indivíduos representantes da natureza, levando em consideração que as coletas são oportunistas, sem evidência confiável de colhimento do número total dos indivíduos do grupo social.



O valor de r encontrado na análise de parentesco par-a-par, foi comparado com atribuições obtidas na análise de paternidade, na qual, valores de r indicando relação de primer grau, eram analisadas com parentais candidatos ou já atribuídos pela análise, sendo assim, um 60% das atribuições feitas, foram validadas ao comparar-se os valores de r entre os possíveis parentais e *offspring*. As famílias que tinham um número maior a três indivíduos e também era conhecido o haplótipo da mãe, foram usadas para validação de dados de parentesco, entretanto, é de considerar-se que a correlação feita conferindo somente haplótipos não resulto em dados coerentes par a par, para a população.

5.5.1 Paternidade

Inicialmente foi feita uma simulação para cada caso (1,2 e 3), obtendo a probabilidade de exclusão ao conhecer um parental (EXCL1) e a probabilidade de exclusão ao conhecer ambos os pais (EXCL2), obtendo dados confiáveis baseados nas frequências e 5% de erro. (Tabela 8). A probabilidade combinada de exclusão média para todos os locos conhecendo um pai foi de 0,03778 (3.7%) e a probabilidade combinada de exclusão para todos os locos conhecendo um dos pais foi de 0,00005 (0,005%),

Tabela 8. Probabilidades de exclusão por loco na população *in situ*

Loco	Caso 1		Caso 2		Caso 3	
	EXCL1	EXCL2	EXCL1	EXCL2	EXCL1	EXCL2
2001	0,8156	0,5196	0,8091	0,5169	0,8091	0,5169
2004	0,9931	0,8988	0,9221	0,6898	0,9439	0,7209
2006	0,8204	0,5439	0,7358	0,3922	0,7625	0,4336
2010	0,6228	0,2642	0,5721	0,2111	0,6176	0,2543
2132	0,7089	0,3553	0,6761	0,3191	0,6694	0,3092
2137	0,5466	0,1863	0,5622	0,1987	0,5476	0,1885
2159	0,7922	0,4465	0,6742	0,3078	0,7285	0,3753
2140	0,6775	0,3126	0,6371	0,2685	0,6735	0,3137
CXX20	0,7286	0,3788	0,7361	0,3806	0,7193	0,3616



0,7451 0,43400 0,7028 0,36497 0,7190 0,38600

Caso 1; por famílias, caso 2; população (considerando estrutura social), caso 3; espaço e tempo.

Conhecendo as informações anteriores, foram feitos os testes de paternidade. Nos quais, foi necessário utilizar informações das famílias *a priori* para atribuir progenitores e parentais candidatos. Nesse teste foram obtidos dez *offsprings*, com informações prévias dos progenitores em, pelo menos, sete locos, com valores dos limites críticos de delta gerados pela simulação e níveis de confiança entre 80% e 95% (Tabela 9). Os indivíduos bSve 337 e bSve 338, não foram incluídos nas análises de paternidade quando conhecido um progenitor, por ausência de informação familiar.

As informações geradas ao realizar os testes nos casos 1 e 2, foram validadas pelo caso 3, no qual informação de local de coleta e idade dos indivíduos, foram mais relevantes, para realizar a atribuição parental. Dentro das atribuições feitas pela análise de verossimilhança, para atribuição do pai, 50% dos resultados fez a atribuição correspondente ao pai indicado, com dados familiares, com um 40%, atribuído com nível de confiança de 80%, enquanto o outro 50% dos resultados realizou a atribuição a outro pai, com 20% atribuídos com nível de confiança de 80%. Já para maternidade, 70% foi atribuído à mãe indicada, com dados familiares, com 20% atribuído com nível de confiança de 80% e somente 30% a outra mãe (Tabela 9).

Com tudo, é preciso dizer que os estimadores de parentesco vêm sendo avaliados independentemente por vários autores, utilizando organismos com diversos sistemas de acasalamento e estruturas sociais, assim como diversos conjunto de dados (simulações computacionais e dados empíricos) (LYNCH e RITLAND, 1999; BLOUIN 2003; MILLIGAN, 2003; VAN DE CASTEELE et al.,2001), encontrando que os níveis de confiabilidade estimados, validam os resultados das análises. Sendo assim, é de fato considerável dizer, que os dados obtidos nesse trabalho, possuem confiabilidade estatística gerada por métodos testados em outras espécies com problemáticas semelhantes ao estipuladas para *S. venaticus*.



Tabela 9. Estimativa de atribuição de pais/mães, por médio de parâmetros de verossimilhança gerados pelo programa Cervus.

Paternidade									
ID Offspring	Par-Loço comparado	ID Mãe	Pai Candidato	Atribuição Cervus	Par-LOD Score	Par-DELTA Score	Trio-LOD Score	Trio-DELTA Score	NC
304	9	303	305	305	-9.90E-01	0,00E+00	6.09E-01	6.09E-01	*
306	9	303	305	307	-3.61E+00	0,00E+00	-4.32E+00	0,00E+00	
310	9	313	315	341	1.69E+00	1.69E+00	1.06E+00	1.06E+00	*
311	9	313	315	315	-1.03E+00	0,00E+00	4.31E+00	4.31E+00	*
312	9	313	315	315	1.05E+00	1.05E+00	1.83E+00	1.83E+00	+*
314	9	313	315	341	-3.64E+00	0,00E+00	-3.49E-01	0,00E+00	
316	9	313	315	315	5.11E+00	5.11E+00	4.33E+00	4.33E+00	*
M05	9	313	315	337	5.22E-01	5.22E-01	1.53E-01	1.53E-01	+*
P334	9	313	315	341	-4.02E+00	0,00E+00	-1.44E+00	0,00E+00	
P333	9	313	315	315	-3.91E+00	0,00E+00	-9.37E-01	0,00E+00	
Maternidade									
ID Offspring	Par-Loço comparado	ID Pai	Mãe Candidata	Atribuição Cervus	Par-LOD Score	Par-DELTA Score	Trio-LOD Score	Trio-DELTA Score	NC
304	9	305	303	303	-5.81E+00	0,00E+00	-4.21E+00	0,00E+00	



306	9	305	303	308	-2.02E+00	0,00E+00	-1.35E+00	0,00E+00	
310	9	315	313	313	-2.51E+00	0,00E+00	1.42E+00	1.42E+00	*
311	9	315	313	313	-1.31E+00	0,00E+00	4.03E+00	4.03E+00	*
312	9	315	313	313	-1.47E+00	0,00E+00	-6.89E-01	0,00E+00	
314	8	315	313	313	-4.77E+00	0,00E+00	-5.21E-01	0,00E+00	
316	9	315	313	303	-1.42E+00	0,00E+00	-1.61E+00	0,00E+00	
M05	9	315	313	313	-2.10E+00	0,00E+00	8.25E-01	8.25E-01	*
P334	7	315	313	313	-2.32E+00	0,00E+00	-1.92E+00	0,00E+00	
P333	9	315	313	339	-3.86E+00	0,00E+00	7.92E-01	7.92E-01	+

***ID**: Identificação da progênie; **Par-Locos comparados**: Número de locos comparados para a atribuição; **ID Mãe/Pai**: Identificação da mãe/pai, atribuído pelas observações; **Pai/Mãe Candidato**: ID do pai/mãe atribuído pelas observações ecológicas; **Atribuição Cervus**: Mãe/pai atribuído pelo programa; **Par-LOD Score**: logaritmo natural de razão de verossimilhança; **Par-DELTA score**: Diferença da pontuação LOD entre os dois pais mais prováveis; **Trio-LOD Score**: Logaritmo natural de razão de verossimilhança. Das relações progenitor=progênie entre o pai atribuído pelo programa e descendência dada uma mãe/pai conhecido; **Trio-DELTA score**: Diferença da pontuação LOD entre os dois pais/mães mais prováveis e a descendência dada uma mãe/ pai conhecido. **NC**: Nível de confiança da atribuição (*)95% (+) 80%.



Cogitando as atribuições realizadas pela análise de verossimilhança atribuindo um progenitor, foi realizada a análise de *parente pair*, no qual foram incluídos todos os indivíduos, além daqueles se tinha ausência de informação familiar, considerando escalas de tempo e espaço (Anexo 1).

Na Tabela 10, são mostradas as informações de atribuição para ambos progenitores. Nesse teste foram obtidos 11 *offspring*, sem informações prévias dos progenitores, através de comparações realizadas em pelo menos sete locos, com conhecimento dos limites críticos de delta gerados pela simulação e níveis de confiança restrito de 95% e relaxado 80%. Somente para o indivíduo bSve 337, foi realizada uma atribuição materna com nível de confiança de 80%, enquanto que, para a atribuição paterna no total, foram feitas quatro com nível de confiança de 80%.

Considerando as famílias, determinadas *a priori*, houve 70% de concordância com as atribuições feitas pela análise de verossimilhança (paternidade e maternidade), em que se possuía informações de um dos parentais, enquanto, a concordância diminuiu ao se considerar níveis de confiança altos para atribuição de ambos parentais. Embora os dados não demonstrem nível de confiabilidade alto, os resultados do teste validam algumas das informações e constituições familiares das observações ecológicas.

Os métodos de verossimilhança usados nas análises, compensaram as possíveis deficiências do conjunto de dados disponível para a espécie. Modificações recentes e melhoras nas equações, para o cálculo dos estimadores de parentesco e das probabilidades de relacionamentos, foram incorporadas nos programas de análises utilizados neste estudo, assim como as abordagens por simulação foram essenciais para estabelecer significâncias estatísticas nas análises de parentesco e na atribuição de paternidade (QUELLER e GOODNIGHT, 1989)



Tabela 10. Estimativa de atribuição de pais/mães, por meio do teste “*Parent pair*”, para a população de vida livre, com parâmetros de verossimilhança gerados pelo programa Cervus.

ID Offspring	Par-Locos comparados	Atribuição Cervus Mãe	Par-LOD Score	Par-DELTA Score	NC	Atribuição Cervus Pai	Par-Locos comparados	Trio-LOD Score	Trio-DELTA Score	NC
304	9	303	-5.81E+00	0,00E+00		305	9	-5.20E+00	0,00E+00	
306	9	308	-2.02E+00	0,00E+00		307	9	-5.70E+00	0,00E+00	
314	8	340	-4.03E+00	0,00E+00		341	8	-5.00E+00	0,00E+00	
312	9	313	-2.35E+00	0,00E+00		315	9	3.12E-01	3.12E-01	*
310	9	308	-4.36E-01	0,00E+00		341	8	1.37E+00	1.37E+00	*
311	9	313	-1.31E+00	0,00E+00		315	9	3.00E+00	3.00E+00	*
P334	7	313	-2.32E+00	0,00E+00		341	6	-3.76E+00	0,00E+00	
P333	9	339	-3.86E+00	0,00E+00		315	9	-3.12E+00	0,00E+00	
316	9	303	-1.42E+00	0,00E+00		315	9	3.50E+00	3.50E+00	*
337	8	339	3.70E+00	3.57E+00	*	341	8	5.92E-01	5.92E-01	
338	9	339	-1.21E+00	0,00E+00		307	9	-3.20E+00	0,00E+00	

***ID:** Identificação da progênie; **Par-Locos comparados:** Número de locos comparados para a atribuição; **Atribuição Cervus (Mãe-Pai):** Mãe/pai atribuído pelo programa; **Par-LOD Score:** logaritmo natural de razão de verossimilhança; **Par-DELTA score:** Diferença da pontuação LOD entre os dois pais mais prováveis; **Trio-LOD Score:** Logaritmo natural de razão de verossimilhança. Das relações progenitor=progênie entre o pai atribuído pelo programa e descendência dada uma mãe/pai conhecido; **Trio-DELTA score:** Diferença da pontuação LOD entre os dois pais/mães mais prováveis e a descendência dada uma mãe/ pai conhecido. **NC:** Nível de confiança da atribuição (*)95% (+) 80%.



6. CONCLUSÕES

As estimativas obtidas das análises moleculares, feitas para duas populações de cachorro vinagre, permitiram através de marcadores moleculares mitocondriais e nucleares:

- ▲ Estimar parâmetros de diversidade genética em indivíduos pertencentes a uma população da natureza, assim como, para indivíduos representantes de uma população cativa. Determinando uma possível expansão populacional para ambas as populações.
- ▲ Evidenciar o valor médio de parentesco, por sexo, na população de vida livre, determinando uma possível dispersão equivalente entre machos e fêmeas, mostrando assim que a dispersão não tendenciosa para algum sexo, pode ser uma vantagem adaptativa para acasalamento.
- ▲ Conhecer que, mais de 70% dos indivíduos em vida livre não possuem algum grau de parentesco, fatores que causam desvios na composição social esperada para *Speothos*, com base nas observações de campo.
- ▲ Evidenciar que os representantes cativos de cachorro vinagre não são unidades populacionais independentes, uma vez que todos os indivíduos possuem um alto grau de parentesco, e como tal, deve-se considerar um planejamento de programas de conservação baseadas na genética da espécie, ajudando também a preservar a diversidade genética da população.
- ▲ Ressaltar a importância de uma análise cuidadosa dos parâmetros genético-populacionais da espécie, assim como o desempenho do conjunto de marcadores genéticos usados, para conhecer aspectos importantes da biologia da espécie.
- ▲ Identificar que comportamentos sociais, como monogamia, descritos para a espécie, podem eventualmente ser explicados pelo laço da união monogâmica “social” entre os parceiros maduros do grupo, mas, não pelos fatores genéticos. Característica que é replicada para diversas espécies de mamíferos.
- ▲ Fornecer informações, que podem ser um avanço importante no conhecimento da composição genético-social dos grupos da espécie na natureza e da diversidade genética na área de estudo. No entanto, apontando também, a necessidade de



ampliar o número de indivíduos amostrados e realizar um acompanhamento em campo, visando elucidar as questões que surgiram a partir deste estudo.



BIBLIOGRAFIA

ALCOCK, J. *Comportamento Animal-Uma Abordagem Evolutiva*. Artmed Editora: 4-11p. 2011, 2012.

AVISE, J. C. *Molecular markers, natural history and evolution*. 2nd edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2004.

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

BIBEN, M. Urine marking during agonistic encounters in the bush dog (*Speothos venaticus*). *Zoo Biol*, 1: pp 359-362, 1982.

BLOUIN, M.S. *et al.* Use of microsat *loci* to classify individuals by relatedness. *Molecular Ecology*, 5: pp 393-491, 1996.

BLOUIN, M. S. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology & Evolution*, v. 18, n. 10, pp 503-511, 2003.

BOTSTEIN, D., WHITE, R.L., SKOLNICK, M. E DAVIS. O.W. Construction of a Genetic Linkage Map in Man Using Restriction Fragment Length Polymorphisms. *Am JHum Genet*, pp 314-331, 1980.

COSTELLO, C. M., *et al.* Sex-biased natal dispersal and inbreeding avoidance in American black bears as revealed by spatial genetic analyses. *Molecular Ecology* 17: pp 4713-4723, 2008.

DENT A. EARL *et al.* STRUCTURE HARVESTER: a web site and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Technical note*. 4: pp 359-361, 2012.



DALPONTE, J.C. Diet of hoary fox, *Lycalopex vetulus*, in Mato Grosso, Central Brazil, *Mammalia* 61: pp 537-546, 1997.

DEFLER, T.R. A bush dog (*Speothos venaticus*) pack in the eastern llanos of Colombia. *Journal of Mammalogy*, 67: pp 421-422, 1986.

DEMATTEO K. E LOISELLE B.A. New data on the status and distribution of the bush dog (*Speothos venaticus*): evaluating its quality of protection and directing research efforts. *Biological Conservation*, 141: pp 2494-2505. 2008.

DEMATTEO, K.E. *An examination of the reproductive physiology of the bush dog (Speothos venaticus)*. Ph.D. Dissertation, Saint Louis University. 2004.

DEUTSCH, L. Na encounter between bush dog (*Speothos venaticus*) and paca (*Agouti paca*). *J. Mammal*, 64: pp 532-533, 1983.

DOBSON, F.S. Competition for mated and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Animal Behaviour*, 30: pp 1183-1192, 1982.

EISENBERG JF. *The Mammalian Radiations An Analises of Trends in Evolution*, The university of Chicago Press, Chicago, pp 278, 1981.

EVANO, 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: pp 2611-2620, 2005.

FERREIRA ME. Técnicas e Estratégias para a caracterização molecular e uso de recursos genéticos. In GARAY B.I (ed) *Conservação da Biodiversidade em Ecossistemas Tropicais*. Vozes, pp 430, 2001.

FLOWER, W.H. On the Bush Dog (*Icticyon venaticus*). *Proc. Zool. Soc. Lond.* pp 70-76, 1880.



FONTOURA-RODRIGUES *et al.* Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of neotropical canids. *Molecular Ecology Resources* 3: pp 619–622, 2008.

FRANCISCO, L. V.; *et al.* A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*. 5: pp 359-362, DOI: 10.1007/s00335990010, 1996.

FRANKHAM R, BALLOU J, BRISCOE. Introduction to conservation genetics. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2002.

FREEMAN S., HERRON J.C. Análise Evolutiva, Edição 4, n 848, pp 349-352, 2009.

FU YX. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147: pp 915-925, 1997.

GOUDET, J. Hierfstat, a package for R to compute and test hierarchical F-statistics. *Molecular Ecology Notes*, 5: pp 184-186, 2005.

GINSBERG JR, MACDONALD DW. Foxes, Wolves, Jackals, and Dogs: An Action Plan for the Conservation of Canids. *IUCN Publications*, Gland, Switzerland, pp 196, 1990.

GIRMAN DJ, MILLS MGL, GEFFEN E, WAYNE RK. A molecular genetic analysis of the social structure, dispersal, and interpack relationships of the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Behav Ecol Sociobiol*. 40: pp 187–198, 1997.

GRAU D E LI W. Fundamental of Molecular Evolution, Sinauer Associations, pp 389, 2000.

GREENWOOD, P.J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour*, 28: pp 1140-1162, 1980.



HEBERT, P. D. N. et al. Identification of Birds through DNA Barcodes. *PLoS Biology*, v. 2, n. 10: pp 1657-1663, 2004.

KALINOWSKI, S. T. *et al.* Blackwell Publishing Ltd Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*. 16: pp 1099–1106, 2006.

KIMURA, M. A Simple Method for Estimating Evolutionary Rates of Base Substitutions Through Comparative Studies of Nucleotide Sequences. *J. Mol. Evol*, v. 16, pp 111-120, 1980.

KLEIMAN, D.G. Social behavior of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and bush dog (*Speothos venaticus*): a study in contrast. *Journal of Mammalogy*, 53: pp 791-806, 1992.

LANGGUTH, A. Ecology and Evolution in the South American canids. In: (M,W, Fox, ed.) *O The wild canids*. Van Nostrand Reinhold, *New York*. pp 102-206, 1975.

LIBRADO, P.; ROZAS, J., DnaSP v5: a software of comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, v. 25: pp 1451-1452, 2009.

LI, C.; WEEKS, D.; CHAKRAVARTI, A. Similarity of DNA fingerprints due to chance and relatedness. *Human Heredity*, v. 43: pp. 45–52, 1993.

LINARES, O.J. El perro del monte, *Speothos venaticus*, (Lund, 1948) en el Norte de Venezuela (Canidae). *Memorias de la Sociedad de Ciencias Naturales. “La Salle”*, *Caracas*, 27: pp 83-86, 1967.

LIMA, E.S. *et al.* Habitat use and diet of bush dog, *Speothos venaticus*, in the Northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil, 2009.



Lima, E. S., Jorge, R. S. P., and Dalponte, J. C. Habitat use and diet of bush dogs, *Speothos venaticus*, in the northern Pantanal, Mato Grosso, Brazil. *Mammalia* **73**: pp 13–19. doi:10.1515/MAMM.2009.002, 2009.

LIMA, E.S *et al.* First telemetry study of bush dog: home range, activity and habitat selection, 2012.

LOWE, A.; HARRIS, S.; ASHTON, P. *Ecological Genetics: Design, Analysis, and Application*. Blackwell Publishing Ltd. Oxford. 2006.

Lund, P.W. Fortsatte bernaerkninger over Brasiliens uddøde dirskabning. Lagoa Santa d. 27 de Marts 1840 Kongelige Danske Videnskabernes Selskab Afhandling 9: pp 1–16, 1842.

LYNCH, M.; RITLAND, K. Estimation of pairwise relatedness with molecular markers. *Genetics*, v. 152, n. 4: pp 1753-1766, 1999.

MATOCQ, M. D. E LACEY, E. A. Philopatry, kin clusters, and genetic relatedness in a population of woodrats (*Neotoma macrotis*). *Behavioral Ecology*, v. 15: pp 647–653, 2004.

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

MIOTTO, R. A., *et al.* Monitoring a Puma (*Puma concolor*) population in a fragmented landscape in Southeast Brazil. *Biotropica*, 44: pp 98-104, 2012.

MOYER, M. A., *et al.* Does genetic relatedness influence space use pattern? A test on Florida black bears. *Journal of Mammalogy*, 87: pp 255-261, 2006.

NOWAK, R.M. *Walker's mammals of the world*. 5^a edição. Baltimore. The Johns Hopkins University Press, 1991.



LIMOLSEN, J. S. Early Domestic Dogs in North America and their origins.

Journal of Field Archeology, 1: pp 343-34, 1974.

OLIVEIRA, T.G. Carnívoros do Maranhão; preliminares sobre a distribuição, composição das comunidades e conservação no meio-norte do Brasil. In *Diversidade Biológica, Uso e Conservação de Recursos Naturais no Maranhão* (eds A.C. da Silva & J.L.O. Fortes), pp 347-366. Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, Brazil, 2007.

OLIVEIRA TG & Dalponte J.C. *Speothos venaticus* (Lund, 1842). In: Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP (eds). *Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção*. Volume II. Brasília, DF: MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, pp 783-784. Orr HÁ. Fitness and its role in evolutionary genetics. *Nat Rev Genet* 10: pp 531-539, 2009.

OSTRANDER, E. A., *et. al.* Identification and Characterization of Dinucleotide Repeat (CA)_n Markers for Genetic Mapping in Dog. *Genomics*, 16: pp 207-213, 1993.

PEREIRA SL. Mitochondrial Genome Organization and Vertebrate Phylogenetics. *Genetics and Molecular Biology*, 23: pp745-752, 2000.

PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory atfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecology of freshwater Fish*, v. 18, n. 2: pp 215-225, 2009.

PERES, C.A. Observations on hunting by small-eared dog (*Atelocynus microtis*) and bush dog (*Speothos venaticus*) in central-western Amazonia. *Mammalia*, 55: pp 635-639, 1991.

PRITCHARD, J. K.; MATTHEW, S. & DONNELLY, P. Inference of population structure using multiloci genotype data. *Genetics*. 155: pp 945-959, 2000.

QUELLER, D. C.; GOODNIGHT, K. F. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution*, v. 43, n. 2: pp 258-275, 1989.



QUELLER, D. C.; STRASSMANN, J. E.; HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 8, n. 8: pp 285-&, 1993.

RAYMOND, M. E ROUSSET, F. Genepop: population genetics software for exact testsand ecumenicism. *Journal of Heredity*. 86: pp 248-249, 1995.

RITLAND, K. Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research*, v. 67, n. 2: pp 175-185, 1996.

ROGERS AR, E HARPENDING H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic difference. *Molecular Biology and Evolution*, 9: pp 552-569, 1992.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. Molecular cloning : A laboratory manual. 2nd ed. *New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press*, 1989.

Sillero-Zubiri C, Gottelli D. Diet and feeding behavior of Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *J Mamm*. 76:pp 531–541. 1995a.

SILLERO-ZURUBI C, *et al*. Canids: foxes, wolves, jackals and dog: status survey and conservation action plan, second edition. Fland, Switzerland and Cambridge, UK, IUCN *Canid Specialist Group*, pp 308, 2004.

STOEN, O.G., *et al*. Inversely density-dependent natal dispersal in brown bears *Ursus arctos*. *Ecologia* 148: pp 356-364, 2006.

SLATE, J. et al. Inbreeding depression influences lifetime breeding success in a wild population of red deer (*Cervus elaphus*). *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, v. 267, n. 1453: pp 1657–1662, 2000.

TAJIMA, F. Simple methods for testing the molecular evolutionary clock hypothesis. *Genetics*, v. 135: pp 599-607, 1993.



TAMURA, K. et al. Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Molecular Biology and Evolution*, v. 28: pp 2731-2739, 2011.

TCHAICKA, L. Abordagens filogenéticas, filogeográficas e populacionais em canídeos sul-americanos. Tese de doutorado, 2006.

TEMPLETON, A. R. Population genetics and microevolutionary theory. USA: Wiley-Liss. pp 705, 2006.

VAN DE CASTEELE, T.; GALBUSERA, P.; MATTHYSEN, E. A comparison of microsatellite-based pairwise relatedness estimators. *Molecular Ecology*, v. 10, n. 6: pp 1539-1549, 2001.

VAN OOSTERHOUT, C. *et al.* MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, v. 4: pp 535-53, 2004.

VAN HUMBECK, J. & PÉREZ N. Estudios del Jagua Yvyguy, *Speothos venaticus*, en el Centro de Investigación de Animales Silvestres de Itaipu. CIASI. Super intendencia de medio ambiente de la Itaipu Binacional, Ciudad del Este,Paraguay, 1998.

VILA C, LEONARD JA, IRIARTE A, O'BIREN SJ, JOHNSON WE, WAYNE RK. Detecting the vanishing populations of the highly endangered Darwin's fox, *Pseudalopex fulvipes*. *Animal conservation* 7: pp 147-143, 2004.

WAGNE J. *Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness*. *Genet. Res.* 89: pp 135-153, 2007.

WANG, J. An estimator for pairwise relatedness using molecular markers. *Genetics*, v. 160, n. 3: pp 1203-1215, 2002.



- WANG, J. Triadic IBD coefficients and applications to estimating pairwise relatedness. *Genetics Research*, v. 89: pp 135-153, 2007.
- WANG, J.; SANTURE, A. Parentage and sibship inference from multilocus genotype data under polygamy. *Genetics*, v. 181: pp 1–16, 2009.
- WANG, J. COANCESTRY: A program for simulating, estimating and analyzing relatedness and inbreeding coefficients. *Molecular Ecology Resources*, v.11: pp 141-145, 2011.
- WASER, P.M. E JONES W.T. Natal philopatry among solitary mammals. *The Quarterly Review of Biology* 58: pp 355-390, 1983.
- WAYNE RK. Conservation genetics in the Canidae. In Avise JC and Hamrick JL (eds) *Conservation Genetics.*, Chapman & Hall, New York, pp 75-113, 1996.
- WAYNE RK, GEFFEN E, GORMAN DJ, KOEPFLI KP, LAU LM, MARSHALL CR. Molecular systematics of the Canidae. *Systematic Biology*, 46: pp 622-653, 1997.
- WRIGHT, S. The Interpretation of population structure by F-statistics with special regard to system of mating. *Evolution*, v.19, n. 3: pp 395-420, 1965.
- ZANE, L.; BARGELLONI, L.; PATARNELLO, T. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, v. 11, n. 1: pp 1-16, 2002.
- ZUERCHER, G.L *et al.* Bush Dog *Speothos venaticus*. In *Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs-Status Survey and Conservation Action Plan*, 2004.



ANEXOS



Anexo 1. Informação das amostras doadas pelo CENAP. Indica-se: Código do Indivíduo (banco de dados do CENAP), sexo, data de coleta, procedência, Local da coleta (município), coordenadas de ponto e grupo familiar estabelecido por observações de campo, nos 23 indivíduos de vida livre.

Indivíduo	Sexo	Data de Coleta	Procedência	Local	Coordenadas (Sad 69”)	G. Familiar
bSve 302	Macho	02-Agosto-2006	Natureza	Barão de Melgaço	540559/8189115	0
bSve 303	Fêmea	27-Julho-2004	Natureza	Nova Xavantina	346290/ 8406905	1
bSve 304	Macho	27-Julho-2004	Natureza	Nova Xavantina	346290/ 8406905	1
bSve 305	Macho	30-Julho-2004	Natureza	Nova Xavantina	346695/8407998	1
bSve 306	Macho	12-Julho-2005	Natureza	Nova Xavantina	338608/8397576	1
bSve 307	Macho	24-Julho-2007	Natureza	Nova Xavantina	350691/8394384	2
bSve 308	Fêmea	24-Julho-2007	Natureza	Nova Xavantina	350691/8394384	2
bSve M05	Macho	14-Julho-2008	Natureza	Nova Xavantina	357793/8462326	3
bSve 310	Macho	25-Maio-2008	Natureza	Água Boa	357793/8462326	3
bSve 311	Fêmea	25-Maio-2008	Natureza	Água Boa	357793/8462326	3
bSve 312	Fêmea	26-Maio-2008	Natureza	Água Boa	352616/8459964	3
bSve 313	Fêmea	26-Maio-2008	Natureza	Água Boa	352616/8459964	3
bSve 314	Fêmea	26-Maio-2008	Natureza	Água Boa	352616/8459964	3
bSve 315	Macho	27-Maio-2008	Natureza	Água Boa	352616/8459964	3
bSve 316	Macho	17-Dezembro-2008	Natureza	Águas Boa	357793/8462326	3



bSve 333P	Macho	22-Setembro-2008	Natureza	Água Boa	358142/8459010	3
bSve 334P	Macho	27-Julho-2008	Natureza	Água Boa	345785/8458452	3
bSve 337	Macho	17-Fevereiro-2012	Natureza	Água Boa	351153/8420704	5
bSve 338	Macho	17-Fevereiro-2012	Natureza	Água Boa	351153/8420704	5
bSve 339	Fêmea	17-Fevereiro-2012	Natureza	Água Boa	351153/8420704	5
bSve 341	Macho	17-Janeiro-2014	Natureza	Nova Xavantina	3050583/84061602	7
bSve 340	Fêmea	11-Março-2014	Natureza	Nova Xavantina	354811/8405871	7
bSve PUC	Macho	13-Dezembro-2014	PUC	Januária		8

Anexo 2. Informações dos indivíduos cativos de cachorro vinagre (*Speothos venaticus*). (RL) registro de laboratório, (SI) Sexo informado pelo zoológico, (DC) data de coleta, (SI) sigla do zoológico.

RL	SI	DC	Si	Instituição	Origem	Micro-Chip
bSve 309	Macho	07-outubro-2007	FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	Wild-Rondônia	N.I
bSve 309 (RECAP)	Macho	26-junho-08	FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	Wild-Rondônia	N.I
bSve 331	Macho	26-junho-08	FPZSP	Fundação Parque Zoológico de São Paulo	Wild-Rondônia	N.I



bSve 332	Macho	20-novembro-08	PEMA	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	963000000163082
bSve 333	Fêmea	11-dezembro-08	ZMP	Zoológico Municipal de Piracicaba	PEMA	134951/ Transportador
bSve 334	Macho	11-dezembro-08	ZMP	Zoológico Municipal de Piracicaba	PEMA	2127/08
bSve 335	Macho	11-dezembro-08	ZMP	Zoológico Municipal de Piracicaba	ZMP	985121004871956
bSve 336	Fêmea	11-dezembro-08	ZMP	Zoológico Municipal de Piracicaba	ZMP	985121005530033
bSve 966	Fêmea	08-dezembro-2014	PEMA	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	963008000000966
bSve 1674	Fêmea	08-dezembro-2014	PEMA	Parque Ecológico Municipal de Americana	PEMA	963008000001674
bSve 128ST	Macho	27-setembro-2012	FZB-BH	Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte	FZB-BH	12CN0128ST
bSve 137ST	Fêmea	06-novembro-2013	FZB-BH	Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte	FZB-BH	13CN0137ST
bSve 93ST	Macho	22-julho-2014	FZB-BH	Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte	FZB-BH	14CN0093ST
bSve 52ST	Macho	16-abril-2015	FZB-BH	Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte	FZB-BH	15CN0052ST
bSve 31ST	Macho	16-março-2015	FZB-BH	Fundação Zoo-Botânica de Belo Horizonte	FZB-BH	15CN0031ST
bSve 1277	Macho	14-abril-2015	FJZB	Fundação Jardim Zoológico de Brasília	PEMA	134979



Anexo 3. Primers microssatélites específicos e heterólogos testados nas populações. Para cada um é informado (*F*= forward; *R*= reverse), (*Tt*) temperatura teórica, (*Te*) temperatura de amplificação na população atual, (*S.A*) sucesso de amplificação.

Específicos	Tamanho do fragmento (pb)	Repetição do motivo	Sequência do Primer (5´-3´)	<i>Tt</i> (°C)	<i>Te</i> (°C)	S.A	FONTE
Speothos1	108–112	(TG)17	F: CAAAAGCTGATTTGGGGGATG R: M13-TTTCACATAGAAGAGCTGTATTT	58	-	N	DeMatteo, 2009
Speothos2	121–129	(CA)3T(AC)16	F: GCAAGCTAAAAGCCTGTGGT R: M13-AAAAAGCTACACAGGAGAATTTCA	56	-	N	DeMatteo, 2009
Speothos3	159–169	(AC)15	F: M13-CTTATAACTTCAACTGTCAG R: TTCTGCCACGTATTCTTGTCT	60	54	Y	DeMatteo, 2009
Speothos4	161–165	(ATTT)8 AT(CA)15	F: M13-GTCTACTCGATGGAACATTTGT R: GAGCCTGCTTCTCCCTCTG	60	-	N	DeMatteo, 2009
Speothos5	127–139	(AC)15	F: M13-CACTGATGAATGGATAAGGAAG R: TGATTGGCAAGATTTTCATCTTTT	60	54	Y	DeMatteo, 2009
Speothos6	195–201	(CT)5 AA(AC)16	F: M13-TGGGTTGTGAGATCAAATGC R: AATCATGCTTGCAATTAAGAAAGA	60	60	Y	DeMatteo, 2009
Speothos7	94–100	(AC)12(A)18	F: M13-TCTCCACCCAAATCTCTTG R: GCCTGTAGACTTTTTAGTCCCG	59	59	Y	DeMatteo, 2009



Speothos8	121–129	(CT)16(CA)11	F: M13-CAGCCTGGACTACAATTCTCTTT R: CCCCAAGTCTTTTTGTCCAGA	59	59	Y	DeMatteo, 2009
Heterólogos							
2001	131	(GATA)8	F: TCCTCCTCTTCTTTCCATTGG R: TGAACAGAGTTAAGGATAGACACG	58	54	Y	Fontoura, 2008
2004	237	(GAAA) 13	F: CTAAGTGGGGAGCCTCCT R: ACTGTGACCTACTGAGGTTGCA	58	56	Y	Fontoura, 2008
2006	191	(GAAT)7	F: TGGGGGCGTTAAGAGTAATG R: CTAGGCCTAAACCCCTGAGC	58	57	Y	Fontoura, 2008
2010	228	(ATGA) 10	F: AAATGGAACAGTTGAGCATGC R: CCCCTTACAGCTTCATTTTCC	58	54	Y	Fontoura, 2008
2018	149	(ATGA)7(ATTA)7	F: TTGCTTTACCGCTTCATTTATT R: GAGCCTGCTTCTCCCTCTG	58	-	N	Fontoura, 2008
2054	151	(GATA)16	F: GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG R: ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC	58	54	Y	Fontoura, 2008
2088	117	(TITA) 10(TTCA)4	F: CCCTCTGCCTACATCTCTGC R: TAGGGCATGCATATAACCAGC	58	-	N	Fontoura, 2008
2159	182	(GAAA) I7	F: GAATCCCACATCGGGC R: ATTAAGTTTTGAAAGCCAGGTAAG	60	60	Y	Fontoura, 2008
2132	271	(GAAA)35	F: CACTGGGAGTGGAGACTGCT	58	54	Y	Fontoura, 2008



2137	185	(GAAA)21	R: TGCACAGCCAACTAGAGGTG F: GCAGTCCCTTATTCCAACATG R: CCCCAAGTTTTGCATCTGTT	58	54	Y	Fontoura, 2008
2140	146	(GAAA)18	F: GGGGAAGCCATTTTTAAAGC R: TGACCCTCTGGCATCTAGGA	58	58	Y	Fontoura, 2008
CXX20	130-180	(CA)21	F: AGCAACCCCTCCCATTTACT R: TTGATCTGAATAGTCCTCTGCG	-	54	Y	Ostrander, 1993
				TOTAL =		15	



Anexo 4. Indicação da presença de alelos nulos. Considerando todos os indivíduos como uma população só.

Locus	Null Present	Oosterhout	Chakraborty	Brookfield 1	Brookfield 2
2001	YES	0,2446	0,3582	0,2013	0,2013
2004	YES	0,3532	1	0,2622	0,3441
2006	YES	0,1947	0,2437	0,1667	0,4073
2010	NO	0,0041	0	0	0,1058
2132	NO	-0,1662	-0,1277	-0,1246	0
2137	NO	-0,0434	-0,0413	-0,0383	0,077
2159	YES	0,4438	1	0,3965	0,4959
2140	NO	-0,0717	-0,0549	-0,0497	0
CXX20	NO	0,0445	0,052	0,0405	0,0405



Anexo 5. Estimativa do melhor estimador para realizar análises de parentesco.

N=499500	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML	TrueValue
Mean	0,12554	0,00294	0,00275	-0,00103	-0,00101	-0,00123	0,14735	0,00033
Variance	0,02109	0,04965	0,05069	0,02843	0,03108	0,04323	0,0268	0,00013
MSE	0,03667	0,04952	0,05056	0,0283	0,03095	0,04311	0,0483	
Correlation Coef	TrioML	Wang	LynchLi	LynchRd	Ritland	QuellerGt	DyadML	TrueValue
TrioML	1							
Wang	0,69572	1						
LynchLi	0,70897	0,97844	1					
LynchRd	0,79866	0,76958	0,7619	1				
Ritland	0,7161	0,65358	0,69456	0,88606	1			
QuellerGt	0,78685	0,88239	0,91652	0,81717	0,76701	1		
DyadML	0,97051	0,70686	0,71676	0,81027	0,71953	0,78833	1	
TrueValue	0,07047*	0,0528	0,05204	0,06893	0,06476	0,05528	0,06624*	1

*valores mais significativos, segundo a correlação dos coeficientes de similaridade, gerados pela simulação de genótipos no Coancestry.

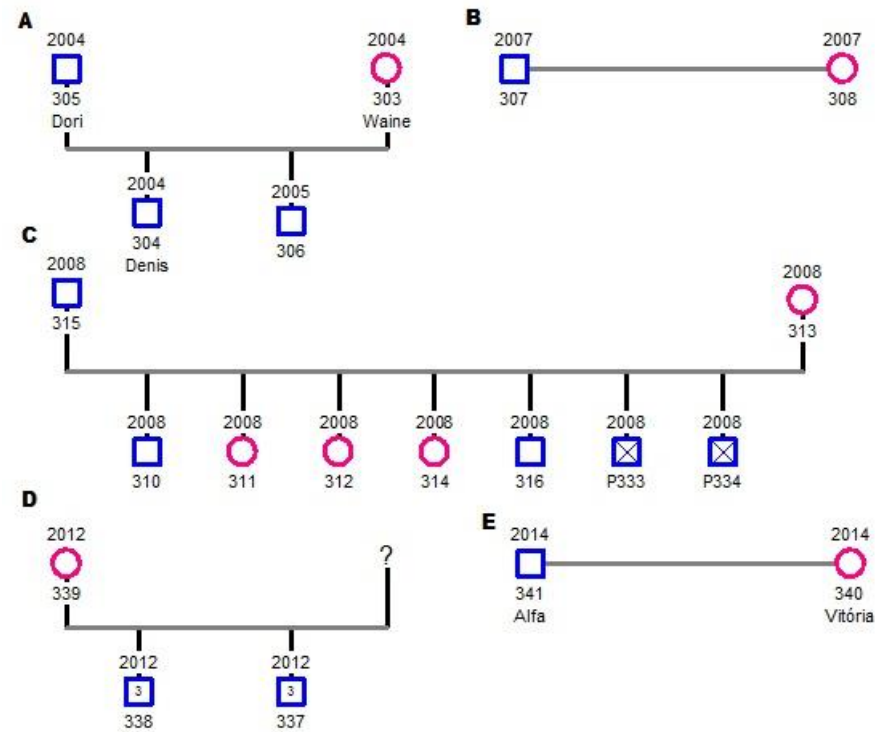


Anexo 6. Tabela indicando o coeficiente r par a par gerado pelo programa Coancestry.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1 bSve 303																				
2 bSve 304	0,3198																			
3 bSve 305	0,1837	0,493																		
4 bSve 306	0,109	0,000	0,180																	
5 bSve 307	0,128	0,000	0,000	0,213																
6 bSve 308	0,464	0,030	0,035	0,259	0,377															
7 bSve M05	0,126	0,000	0,094	0,296	0,098	0,000														
8 bSve 310	0,000	0,000	0,158	0,112	0,171	0,261	0,090													
9 bSve 311	0,000	0,000	0,158	0,112	0,180	0,229	0,234	0,753												
10 bSve 312	0,226	0,000	0,000	0,161	0,187	0,000	0,439	0,128	0,186											
11 bSve 313	0,231	0,000	0,000	0,094	0,111	0,000	0,401	0,094	0,211	0,235										
12 bSve 314	0,094	0,664	0,160	0,000	0,283	0,000	0,000	0,140	0,074	0,074	0,160									
13 bSve 315	0,051	0,000	0,000	0,001	0,000	0,000	0,333	0,000	0,211	0,514	0,412	0,000								
14 bSve 316	0,181	0,098	0,081	0,000	0,000	0,000	0,290	0,000	0,081	0,337	0,338	121	0,681							
15 bSve 333P	0,000	0,433	0,275	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,050	0,338	0,094	0,333	0,178						
16 bSve 334P	0,035	0,190	0,000	0,266	0,151	0,184	0,223	0,000	0,453	0,343	0,352	0,002	0,000	0,078	0,596					
17 bSve 337	0,434	0,136	0,022	0,000	0,000	0,043	0,400	0,071	0,000	0,085	0,491	0,157	0,156	0,016	0,105	0,190				
18 bSve 338	0,000	0,142	0,154	0,286	0,202	0,000	0,275	0,000	0,000	0,000	0,085	0,027	0,218	0,223	0,219	0,000	0,085			
19 bSve 339	0,599	0,046	0,110	0,000	0,067	0,000	0,408	0,118	0,000	0,089	0,539	0,000	0,389	0,153	0,271	0,016	0,726	0,423		
20 bSve 341	0,412	0,033	0,181	0,268	0,354	0,605	0,000	0,651	0,305	0,023	0,008	0,285	0,000	0,000	0,000	0,000	0,139	0,000	0,279	
21 bSve 340	0,060	0,000	0,000	0,000	0,000	0,103	0,162	0,000	0,082	0,144	0,202	0,000	0,416	0,140	0,191	0,178	0,156	0,034	0,089	0,000



Anexo 7: Heredogramas das famílias constituídas *a priori*, por informações ecológicas; as datas encontradas acima de cada indivíduo, são as datas de captura e coleta biológica; indivíduos mortos são indicados com um “X” no centro. A. Grupo familiar um B. Grupo familiar dois C. Grupo familiar três D. Grupo familiar cinco E. Grupo familiar sete.



Fonte: Gráfico gerado pelo *Genepro*.