

Resumo Geral

A genética da conservação é uma nova abordagem no estudo da biodiversidade e utiliza as análises genéticas moleculares para elucidar aspectos relevantes da biologia das espécies para fins de manejo e conservação. Neste trabalho, foi avaliada a diversidade genética, utilizando marcadores RAPD e STR, de duas espécies de canídeos que ocorrem no Parque Nacional das Emas – GO (PNE), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*). O lobo-guará está classificado pela IUCN (2004) como espécie LR/nt, ou seja, com pequeno risco de extinção, mas próximo a ser considerado vulnerável à extinção, além de estar incluído na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção do IBAMA. Enquanto que, o cachorro-do-mato é o canídeo mais comum e com maior distribuição no Brasil. Os resultados deste estudo foram divididos em quatro capítulos. O capítulo 1, mostrou um grande potencial de transferibilidade de marcadores STR entre espécies evolutivamente mais próximas. No capítulo 2, os resultados obtidos com os marcadores STR e RAPD não indicaram uma significativa redução da variabilidade genética e nem uma endogamia elevada em ambas espécies. No capítulo 3, a associação entre a similaridade genética e a similaridade espacial para a população de lobo-guará mostrou uma estruturação espacial da similaridade genética apenas para os machos, a partir dos dados RAPD. Enquanto que, os dados gerados pelos marcadores STR mostraram uma estruturação espacial da similaridade genética de acordo com o padrão de filopatria feminina. Finalmente, no capítulo 4 a avaliação do tempo de extinção nestas duas espécies, considerando diferentes cenários sócio-econômico-ambiental da região sudoeste de Goiás, no qual o PNE está inserido, mostrou que ambas populações podem persistir por um tempo razoável, mesmo quando considerado o pior cenário. No entanto, sugere-se que estudos posteriores baseados em parâmetros mais realistas da viabilidade destas populações, bem como do cenário de desenvolvimento sócio-econômico-ambiental da região, sejam realizados, afim de se obter avaliações mais precisas da persistência destas populações no PNE e entorno.

Palavras-chave: Genética da Conservação, lobo-guará, Cachorro-do-mato, Parque Nacional das Emas, Cerrado.

Abstract

Conservation Genetics is a new approach concerning biodiversity studies. It uses molecular genetic analysis to uncover relevant biological aspects of the species for its management and conservation. This paper evaluated the genetic diversity using RAPD and STR markers, of two *canid* species from Ema's National Park (Parque Nacional das Emas – GO), Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). The maned wolf was classified as an LR/nt species by IUCN (2004); this means that it has a lower probability of extinction, although susceptible to it. As a matter of fact the Maned wolf is in IBAMA's list of Brazilian species that are threatened by extinction. The Crab-eating fox is the most common *canid* with the widest distribution in Brazil. The results of this study were divided in 4 chapters. Chapter one, showed big transferability potential of STR markers among evolutionary related species. Chapter 2, showed that most results obtained with STR and RAPD markers didn't indicate reduction on the genetic variability neither high endogamy in either species. Chapter 3, the association between genetic and territorial similarities for the Maned wolf population, was present only among males by the usage of RAPD data. The data generated by STR markers showed a special structure according to the female philopatry. Chapter 4, analyzed the extinction time of both species considering different social-economic-environmental sceneries of the southwest region Goiás where the ENP is located. The results showed that both species could resist for a reasonable time even if the worst scenery is considered. New studies using more realistic parameters should be considered to test the viability of these populations. The social economic environmental development of the region should be studied also, so that a more precise evaluation of the persistence of these populations at ENP and region are made.

Key words: Conservation Genetics, Crab-eating fox, Maned wolf, Ema's National Park, Tropical Savanna (Cerrado).

APRESENTAÇÃO

A genética da conservação é uma nova abordagem no estudo da biodiversidade e utiliza as análises genéticas moleculares para elucidar aspectos relevantes da biologia das espécies para fins de manejo e conservação (Frankham *et al.*, 2002). Dentre os vários campos da genética da conservação podemos destacar a detecção dos efeitos deletérios do endocruzamento (depressão endogâmica), a perda da diversidade genética e conseqüentemente da capacidade de respostas a mudanças ambientais, a fragmentação das populações e redução do fluxo gênico, processos estocásticos como a deriva genética, o acúmulo de mutações deletérias, problemas enfrentados pelas populações em cativeiro, sucesso da introdução de novos indivíduos nas populações naturais, a resolução de incertezas taxonômicas, uso das análises genéticas moleculares na área forense e definição de unidades de manejo (Frankham *et al.*, 2002; Hedrick, 2001; DeSalle e Amato, 2004).

Myers *et al.* (2000) definiu *Hotspots* como, “ecossistemas que cobrem uma pequena parcela da superfície da Terra, mas que abrigam uma alta porcentagem da biodiversidade global, com ênfase às florestas tropicais”. O Cerrado é um dos *hotspots* e o segundo maior bioma brasileiro em extensão, ocupando 21% do território brasileiro (Klink e Machado, 2005; Myers *et al.*, 2000). O Cerrado atualmente é o bioma brasileiro que mais tem sofrido com as pressões antrópicas impostas pelo avanço das fronteiras agropecuárias (Klink e Moreira, 2002). As principais ameaças à biodiversidade no Cerrado são fragmentação de habitats, invasões de espécies exóticas, erosão dos solos, poluição de aquíferos, alterações nos regimes de queimadas, desequilíbrios no ciclo do carbono e possivelmente modificações climáticas regionais (Klink e Machado, 2005).

No Cerrado brasileiro ocorrem 38 espécies de mamíferos de médio e grande porte, sendo que destes 45% estão classificadas na ordem Carnívora (Marinho-Fillho *et al.* 2002). A maioria das espécies da ordem Carnívora possui grandes áreas de vida, de forma que a fragmentação do

habitat tem reduzido suas populações a tamanhos que não são viáveis a médio e longo prazo (Costa *et al.*, 2005). Uma outra ameaça comum aos carnívoros é a mortalidade acidental por colisão com veículos nas estradas que atravessam o Cerrado do Brasil Central, principalmente em espécies que percorrem grandes distâncias, como o lobo-guará (Rodrigues *et al.*, 2002). Os carnívoros representam espécies chaves para os ecossistemas, pois ocupam diversos nichos disponíveis no ambiente sendo reguladores de populações de presas animais e importantes dispersores de sementes, e destes uma grande proporção é ameaçada (28%) (IBAMA, 2003; Costa *et al.*, 2005).

A IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza) reconhece a necessidade de se conservar a diversidade genética devido a dois motivos principais. Primeiro, porque as mudanças ambientais são processos contínuos e a diversidade genética é importante para que a população tenha a capacidade de se adaptar a estas mudanças. Segundo, porque a perda da diversidade genética geralmente está associada com o endocruzamento e com a redução nas taxas de reprodução e sobrevivência (*fitness*) (Frankham *et al.*, 2002). No entanto, a falta de informações genéticas para a maioria das espécies nativas constitui uma das limitações para as ações conservacionistas e de manejo.

Neste trabalho foi avaliada a diversidade genética de duas espécies de mamíferos carnívoros (ordem Carnívora) da família Canidae que ocorrem no Parque Nacional das Emas – GO (PNE), o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*). O PNE possui uma alta riqueza de espécies e uma boa preservação dos habitats, que pode permitir a manutenção de populações estáveis de muitas destas espécies. No entanto, a eliminação de habitats naturais, a interrupção de corredores naturais de dispersão, incêndios, caça ilegal, atropelamento dos animais e assoreamento de cursos d'água que atingem a sua fauna ameaçam a sua conservação (Silveira e Jácomo, 1998).

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é o maior canídeo sul americano, e quando adulto pode pesar cerca de 25 kg e medir 90 cm de altura nos ombros, com comprimento total entre 145 a 190 cm, sendo a cauda responsável por 45 cm (Eisenberg e Redford, 1999; Rodden *et al.*, 2004). Vivem em áreas de vegetação aberta, são territoriais, monógamos facultativos e onívoros. Apresenta um número diplóide de 76 cromossomos e é uma das espécies de carnívoros mais populares do cerrado brasileiro. Tem orelhas largas e eretas, membros alongados e caminhar peculiar. Até os três meses apresenta pelo marrom-escuro quase negro, mas após essa idade sua pelagem muda para castanho-avermelhado, pernas e dorso torna-se pretos, coloração negra também na extremidade das patas e no focinho e a ponta da cauda permanece esbranquiçada (Fletcher *et al.*, 2000) (Figura 1).



Figura 1. lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) no Parque Nacional das Emas – GO.

A espécie é onívora, abrangendo uma grande variedade de itens na sua dieta, que varia sazonalmente. Dentre esses itens, a lobeira ou fruta-do-lobo (*Solanum lycocarpum*) é bastante

consumida por este canídeo (Rodden *et al.*, 2004). Além de comer outros tipos de frutos, o animal se alimenta ainda de pequenos mamíferos (roedores, tatus), ovos de aves, insetos e répteis (Rodden *et al.*, 2004; Motta-Junior *et al.*, 1996, 2002; Juarez e Marinho-Filho, 2002)

A área de ocorrência original desta espécie compreende a região central do Brasil, o Paraguai, Bolívia, nordeste da Argentina e Uruguai, sempre em regiões de vegetação aberta, como campos e Cerrados (Figura 2). São animais territorialistas e ocupam grandes áreas de vida, variando entre 25 e 115 km² (Rodden *et al.*, 2004).



Figura 2. Área de distribuição do Lobo-guará. (Fonte: Rodden *et al.*, 2004)

Os Lobos Guará são animais solitários, que formam pares no período de acasalamento. O número de filhotes varia tipicamente de 1 a 5, sendo cuidados geralmente pela mãe, com um período de gestação em torno de 65 dias (Rodden *et al.*, 2004; Eisenberg e Redford, 1999). São animais territorialistas, que ocupam grandes áreas de vida, variando entre 25 a 115 km² e utilizam diversos recursos, como fezes, urina e uma vocalização característica para demarcar seu território diante de outros indivíduos da mesma espécie (Silveira e Jácomo, 1998). Suas populações têm

sofrido um considerável declínio, principalmente devido à perda de habitat, como consequência do avanço das fronteiras agrícolas (Rodden *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 1994; Silveira e Jácomo, 1998). É classificada pela IUCN (2004) como espécie LR/nt, ou seja, com pequeno risco de extinção, mas próximo a ser considerado vulnerável à extinção. A espécie também está incluída na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção do IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis (IBAMA, 2003).

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), vulgarmente também conhecido como ‘raposa’ ou ‘graxaim’, é um canídeo de porte médio e seu peso varia entre 5 e 7 kg, com 70 cm de comprimento na idade adulta e apresenta um número diplóide de 74 cromossomos. Tem a cauda peluda de cor escura, seu focinho é comprido, apresenta uma cabeça relativamente pequena. Há uma grande variação de cor da pelagem, de marrom acinzentado ao cinza escuro e alguns a apresentam áspera e grossa por todo o corpo, as patas podem ser pretas ou cinza escuro, algumas vezes apresenta manchas amarelo-laranja (Courtenay e Mafei, 2004) (Figura 3).



Figura 3. cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) no Parque Nacional das Emas – GO.

Tem hábito preferencialmente noturno e desloca-se solitariamente, aos pares ou mesmo em grupos maiores (Rocha *et al.*, 2004). É onívoro e é o canídeo mais comum e com maior distribuição no Brasil, exceto nas áreas baixas da bacia amazônica (Courtenay e Maffei, 2004; Rocha *et al.*, 2004). Tem uma ampla distribuição geográfica, habita áreas florestais, cerrados, campos e áreas alteradas e habitadas pelo homem. Ocorre também da Colômbia ao Paraguai e Uruguai (Figura 4). Está amplamente distribuído no Pantanal, tanto na planície quanto na área de entorno, na bacia do Alto Paraguai (Courtenay e Maffei, 2004). Podem ser observados nas margens de estradas, onde procuram restos de animais atropelados e, por isso, são também vítimas de atropelamentos (Rocha *et al.*, 2004)



Figura 4. Área de distribuição do cachorro-do-mato(Fonte: Courtenay e Maffei, 2004)

Sua dieta inclui insetos, pequenos mamíferos, frutos, plantas, répteis, anfíbios, aves, ovos e, em regiões litorâneas e no Pantanal, os caranguejos (Juarez and Marinho-Filho, 2002). O acasalamento ocorre nos meses de Novembro e Dezembro e a gestação é de 52 a 59 dias, onde nascem de 3 a 6 filhotes, com 120-160 gramas cada (Courtenay e Maffei, 2004, Rocha *et al.*, 2004). Apesar de ser uma espécie classificada pela IUCN (2004) como espécie LR/lc, ou seja,

com pequeno risco de extinção e não dependente de esforços para sua conservação, merece ser estudada antes que entre na lista de espécies ameaçadas. Os estudos com estas espécies podem ser importantes, pois elas podem funcionar como espécies-chave no monitoramento do nível de degradação dos habitats que elas ocupam.

Assim sendo, neste estudo analisamos a diversidade genética, utilizando marcadores moleculares RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e Microssatélites, ou STR (*Short Tandem Repeats*), nestas duas espécies de canídeos. No Capítulo 1, foi testada a transferibilidade de 29 marcadores STR, desenvolvidos originalmente para bovinos, búfalos, cachorro doméstico e gato doméstico para amostras de lobo-guará e Cachorro-do-mato. Essa avaliação inicial permitiu definir a metodologia básica utilizada nas análises genéticas apresentadas nos Capítulos 2 e 3. Do total de locos testados, 21% foram transferidos com sucesso e observamos então um grande potencial de transferibilidade, principalmente entre espécies evolutivamente mais próximas (i.e. cachorro doméstico).

No Capítulo 2, foi estimada a diversidade genética nestes dois canídeos, utilizando marcadores RAPD e STR, além de correlacionarmos os dados gerados por estes dois marcadores. Os resultados obtidos não indicaram uma significativa redução na variabilidade genética e nem uma endogamia elevada em nenhuma das espécies analisadas. Em relação à associação dos dois marcadores, as baixas correlações encontradas são corroboradas por outros estudos e devem ser explicadas pela base genética diferente entre estes, bem como pelo baixo nível da hierarquia evolutiva analisada (i.e., variabilidade dentro de populações).

No Capítulo 3, foi analisada a associação entre a similaridade genética, baseada nos dados gerados pelos marcadores RAPD e STR, e a similaridade espacial baseada em dados da área de vida do lobo-guará no Parque Nacional das Emas e entorno. Os resultados obtidos com os dados RAPD mostraram uma estruturação espacial da similaridade genética significativa apenas para os machos. Os resultados obtidos com os marcadores STR mostraram uma estruturação espacial da

similaridade genética de acordo com o padrão de filopatria feminina, ou seja, as fêmeas mais próximas geneticamente tendem a ocupar áreas de vida mais próximas. Como os resultados obtidos com os marcadores STR são mais esperados, considerando as informações disponíveis sobre ecologia e história-de-vida da espécie, e os marcadores STR são mais adequados para esse tipo de análise intra-populacional, acredita-se que os resultados obtidos com os marcadores RAPD sejam artefatos.

Finalmente, no Capítulo 4 avaliou-se o tempo de extinção nestas duas espécies de canídeos do PNE, assumindo-se que combinações de efeitos da depressão endogâmica sob estocasticidade ambiental seriam os possíveis fatores que levariam à extinção organismos em populações isoladas. Em média, o tempo de extinção foi afetado pelos três parâmetros analisados e suas interações (taxas de redução da capacidade de suporte, coeficientes de endogamia e flutuação no tamanho da população). Os cenários foram discutidos em relação à realidade sócio-econômico-ambiental da região sudoeste do Estado de Goiás, no qual o PNE está inserido. Uma análise comparativa com base em uma combinação semelhante de parâmetros mostrou que a população de lobo-guará diminui sempre mais rapidamente do que a população de Cachorro-domato. Porém, os resultados mostraram que as duas populações podem persistir por um tempo razoável, mesmo quando considerado o pior cenário, ou seja, uma combinação entre elevada perda de habitat, alta endogamia e grande flutuação populacional. Porém, deve-se levar em consideração que este estudo é apenas um ponto de partida para estudos posteriores. Esses estudos deverão ser baseados em parâmetros mais realistas tanto da viabilidade destas populações quanto do cenário de desenvolvimento sócio-econômico-ambiental da região sudoeste do Estado de Goiás e, portanto, os resultados podem permitir avaliações mais precisas da persistência destas populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Costa LP, Leite YLR, Mendes SL e Ditchfield AD (2005) Conservação de mamíferos no Brasil. Megadiversidade 1: 103-112.
- Courtenay O e Maffei L (2004) Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). In: Sillero-Zubiri C, Hoffmann M e Macdonald DW (eds) Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, pp 32-38.
- DeSalle R e Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. Nature 5: 702-712.
- Eisenberg JF e Redford KH (1999) Mammals of the Neotropics - The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, Chicago, 609pp.
- Fonseca GAB, Rylands AB, Costa CRM, Machado RB e Leite YLR (1994) Livro Vermelho Dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Fletchall NB, Rodden M e Taylor S (2000) Manual de Manejo do lobo-guará(*Chrysocyon brachyurus*). CEPREM, São Paulo, 87pp.
- Frankham R, Ballou JD e Briscoe DA (2002) Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press, 640pp.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? Trends in Ecology & Evolution 16: 629-636.
- IBAMA (2003) Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Anexo à Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003, do Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: www.ibama.gov.br.
- IUCN (2004) 2004 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: www.redlist.org.

- Juarez MJ e Marinho-Filho J (2002) Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in Central Brazil. *Journal of Mammalogy* 83 (4): 925-933.
- Klink CA e Machado RB (2005) A Conservação do Cerrado Brasileiro. *Megadiversidade* 1: 143-155.
- Klink CA e Moreira AG (2002) Past and current human occupation and land-use. In: P.S. Oliveira e R.J. Marquis (eds.). *The Cerrado of Brazil. Ecology and natural history of a neotropical savanna*. Columbia University Press, New York, pp 69-88.
- Marinho-Filho JS, Rodrigues FHG, Juarez KM. (2002) The Cerrado Mammals: diversity, ecology and natural history. In: Oliveira PS e Marquis RJ (eds) *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna*. Columbia University Press, Irvington, NY, USA, pp 266-284.
- Motta-Junior JC (1996) Diet of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*, in central Brazil. *Journal Zoology* 240: 277-284.
- Motta-Junior JC (2002) Fama injusta: novas informações sobre a dieta do lobo-guará podem ajudar a preservá-lo. *Ciência Hoje* 31: 71-73.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB e Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Rocha VJ, Reis NR e Sekiama ML (2004) Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae) em um fragmento florestal no Paraná Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, 21: 871-876.
- Rodden M, Rodrigues F e Bestelmeyer S (2004) Maned wolf *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815). In: Sillero-Zubiri C, Hoffmann M e Macdonald DW (eds) *Canids: Foxes, Wolves, Jackals*

and Dogs: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group, IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK, pp 38-43.

Rodrigues FHG, Silveira L, Jácomo ATA, Bezerra AP, Coelho AMR, Santos DC, Pagnozzi HG e Hass A (2002) Composição e caracterização da fauna de mamíferos do Parque Nacional das Emas, Goiás. *Revista Brasileira de Zoologia* 19: 589-600.

Silveira L e Jácomo ATA (1998) Ecologia e conservação de mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, GO. Relatório Técnico para o IBAMA/DIREC/DEUC.

CAPÍTULO 1

Transferibilidade de Marcadores STR para duas Espécies de Canídeos do Cerrado Brasileiro

FLÁVIA MELO RODRIGUES^{1,5}, MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES², LUCILEIDE VILELA RESENDE², THANNYA NASCIMENTO SOARES², JOSÉ ALEXANDRE FELIZOLA DINIZ-FILHO^{3, 4, 5}, ANAH TEREZA DE ALMEIDA JÁCOMO⁴ E LEANDRO SILVEIRA⁴.

¹Universidade Estadual de Goiás, Departamento de Biologia, Anápolis-GO; ²Universidade Católica de Goiás, Laboratório de Genética e Melhoramento, Departamento de Zootecnia;

³Universidade Federal de Goiás, Departamento de Biologia geral; ⁴Fundo para a Conservação da Onça-Pintada (FCOP); ⁵ Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – UFG.

e-mail: flavia.melo@ueg.br

Resumo

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) são duas espécies de canídeos que ocorrem no cerrado brasileiro. O lobo-guará é uma espécie que está incluída na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção, enquanto o cachorro-do-mato é um canídeo muito comum e abundante nas áreas do cerrado. O objetivo deste trabalho foi testar a amplificação cruzada de 29 locos STR para amostras de lobo-guará e cachorro-do-mato, provenientes do Parque Nacional das Emas. Para testar a transferibilidade foram utilizados dois indivíduos de cada espécie. Em seguida, foram montadas reações de PCR utilizando uma amplitude de variação na temperatura de anelamento dos *primers* entre 45 a 65°C. Os produtos da amplificação foram separados em gel de poliacrilamida 4% e visualizados por coloração com nitrato de prata. Os locos transferidos foram utilizados para uma análise com 38 indivíduos de cada espécie. Do total de locos avaliados, seis foram transferidos com sucesso para as duas espécies (CSSM-038, PEZ-05, PEZ-20, PEZ-12, PEZ-13 e PEZ-15). Para o cachorro-do-mato, foi obtida uma média de 7,8 alelos por locos e para o lobo-guará 4,5 alelos por loco. O loco CSSM-038 foi monomórfico para as duas espécies e os outros cinco locos apresentaram alto polimorfismo, permitindo a estimativa de alguns parâmetros genéticos, incluindo a heterozigosidade média esperada ($H_e = 0.676$ para o cachorro-do-mato e $H_e = 0,533$ para lobo-

guará), e o índice de fixação médio ($f = 0,0326$ para cachorro-do-mato e $f = -0,09078$ para lobo-guará). Com estes resultados, pôde-se confirmar que o potencial de transferibilidade de marcadores STR é maior entre as espécies evolutivamente mais próximas (i.e. cachorro doméstico). Essas informações podem ser úteis para outros pesquisadores que trabalham com estas espécies, pois diminuem os custos e agilizam o processo de obtenção de dados moleculares para o estudo das populações naturais

Palavras-chave: Marcadores STR, Transferibilidade, *Cerdocyon thous*, cachorro-do-mato, *Chrysocyon brachyurus*, lobo-guará

Enviar correspondência para FM Rodrigues. Universidade Estadual de Goiás, Departamento de Biologia, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR 153, Km 3, Campus Anápolis, CEP: 75110-390, Caixa Postal: 459, Anápolis, GO, Brasil. E-mail: flavia.melo@ueg.br

Abstract

The Maned-Wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) are two canid species found in Brazilian Cerrado. Maned-Wolf is the largest canid of South America and is typical of Brazilian Cerrado, whereas Crab-eating fox is a relatively small, abundant and widely distributed species found in many habitats in Brazil. In this note, we tested cross-amplification and transferability of 29 STR loci originally developed for cattle and domestic dogs and cats to these two species, using a total of 38 individuals of each species, collected in Emas National Park, which is the largest National Park in the Cerrado region. Out of the 29 STR primers tested, 6 were successfully transferred (CSSM-038, PEZ-05, PEZ-20, PEZ-12, L-13 and L-15) and 5 showed polymorphism in the population analyzed. The genetic parameters estimated (number of alleles per loci, expected and observed heterosigosity and fixation indices) are within the expectation for other canid population worldwide.

Keywords: STR markers, cross-amplification, transferability, canids, *Cerdocyon thous*, *Chrysocyon brachyurus*, Cerrado

No cerrado brasileiro ocorrem 38 espécies de mamíferos de médio e maior porte e destas, 45% correspondem a ordem Carnívora (Marinho-Filho *et al.* 2002). Apesar de sua representatividade na comunidade faunística do Cerrado, as espécies de Carnívora têm sido pouco estudadas (Alho, 1990; Garcia-Perea, 1994; Silveira & Jácomo, 1998) e a maioria dos trabalhos publicados enfocam apenas aspectos ecológicos de uma única espécie (Dietz, 1984; Dalponte, 1997; Facure, 1996). Dentre os 12 Parques Nacionais no Bioma Cerrado (Brasil), o Parque Nacional das Emas (PNE) é o que apresenta maior riqueza e abundância faunística de médios e grandes mamíferos (Erize, 1977; Eisenberg & Redford, 1999). O lobo-guará, ou simplesmente Guará (*Chrysocyon brachyurus*), uma das espécies que ocorrem no PNE, é o maior representante da família dos canídeos da América do Sul. Esta espécie possui uma grande importância para a manutenção da diversidade do bioma por sua função ecológica de predador de topo de cadeia e dispersor de sementes, sendo, portanto, importante para a estabilidade deste ecossistema. Atualmente está classificado pela IUCN (2004) como espécie LR/nt, ou seja, com pequeno risco de extinção, mas próximo a ser considerado vulnerável à extinção. A espécie também está incluída na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) (IBAMA, 2003). Outra espécie de canídeo encontrada no PNE é o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), que é um mamífero de porte médio, cuja distribuição estende-se do sul da Amazônia até o Paraguai (EMBRAPA, 2005). No Brasil, é o canídeo mais comum e com maior distribuição, ocupando uma grande variedade de habitats. Porém, parece ser mais abundante nas áreas de cerrado do que em áreas de matas fechadas (Rocha *et al.* 2004).

Estudos de conservação de espécies nativas frequentemente requerem o conhecimento da diversidade genética entre as populações e fluxo gênico. Os marcadores microssatélite ou STR (*Short Tandem Repeats*) têm sido frequentemente escolhidos para quantificar a variabilidade genética em populações naturais devido ao seu alto índice informativo, quando comparado a

outras classes de marcadores moleculares, e pela facilidade com que o polimorfismo pode ser detectado (Brondani *et al.* 2003; Wandeler *et al.* 2003; Li *et al.* 2002). Os STR's, estão se tornando cada vez mais a ferramenta escolhida para estudos de genética de população, fluxo gênico e análise de paternidade (Iyengar *et al.* 2005; Klukowska *et al.* 2003; Wright & Bentzen 1994). Entretanto, avanços no uso dos marcadores STR se tornam difíceis devido ao alto custo e ao tempo relativamente grande necessários para o desenvolvimento prévio dos marcadores, que normalmente são desenvolvidos para cada espécie que se pretende estudar. O sucesso na amplificação cruzada ou transferibilidade de regiões de STR entre espécies, pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), tende a estar inversamente relacionada à distância evolutiva entre as duas espécies consideradas (Navani *et al.* 2002; Tong *et al.* 2002; Williamson *et al.* 2002; Zucchi *et al.* 2002). Diversos estudos têm mostrado a possibilidade de se usar alguns marcadores desenvolvidos para uma outra espécie pertencente ao mesmo gênero (Brondani *et al.* 2003; Cipriani *et al.* 1999; Isagi & Suhandono 1997; Zucchi *et al.* 2002), ou até mesmo entre gêneros diferentes (Roa *et al.* 2000; Write & Powell 1997).

Neste estudo foi testada a transferibilidade cruzada de marcadores STR desenvolvidos originalmente para bovinos, búfalos, cachorro doméstico e gato doméstico (Barker *et al.* 1997, Cãnon *et al.* 2001, Denise *et al.* 2004, Fries *et al.* 1993, Halverson *et al.* 1995, Kapes *et al.* 1997, Menotti-Raymond *et al.* 1999, Sunden *et al.* 1993) (Tabela 1), para duas espécies de canídeos do cerrado, o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). O DNA genômico foi extraído do sangue de 38 indivíduos de cada uma das duas espécies capturadas no PNE, Goiás, Brasil. No total foram testados 29 *primers* com dois indivíduos de cada população e destes, 6 pares de *primers* (21%) foram transferidos com sucesso e selecionados para serem utilizados na genotipagem das duas populações (Tabela 2). Para as reações de PCR, o seguinte protocolo foi utilizado: 5 µl de DNA (~3 ng/µl); 2,2 µl do *primers* A (~5 ng/µl); 2,2 µl

do *primers* B (~5 ng/μl); 1,3 μl de BSA (10 mg/ml); 1,5 μl tampão da enzima (10 X); 0,5 μl de MgCl₂ (50 mM); 1,3 μl de d’NTP (2,5 mM); 0,2 μl da enzima Taq- Polimerase (5 unidades/μl) e completando o volume com 0,8 μl de H₂O *Milli-Q*, para um volume final de 15 μl. A amplificação via PCR foi realizada no termociclador MJ, utilizando o seguinte protocolo: 1º) desnaturação inicial do DNA a 94°C por 5 minutos; 2º) 94°C por 1 minuto; 3º) anelamento dos “*primers*” a diferentes temperaturas por 1 minuto; 4º) extensão da molécula pela enzima Taq polimerase (fornecida pela *Amersham Pharmacia Biotech*) a 72°C por 1 minuto; 5º) 30 ciclos seguindo do 2º ao 4º passos; 6º) etapa final da extensão por 7 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados. Para cada *primer* foram utilizadas temperaturas de anelamento que variaram entre 45°C e 65°C (Tabela 1). Os fragmentos amplificados foram separados em cuba de seqüenciamento vertical (BIORAD) em gel de poliacrilamida 4%, utilizando TBE 1X. A eletroforese teve duração de 2 horas com potência de 90W sob corrente elétrica constante, e corados com nitrato de prata (Bassan *et al.* 1991). O padrão de peso molecular, o marcador *Ladder* 10bp (*Amersham Pharmacia Biotech*), foi usado para estimar os tamanhos dos produtos de PCR

Tabela 1- Identificação dos locos, seqüência dos *primers*, temperaturas de anelamento (TA) testadas e fontes dos *primers* utilizados para amplificação cruzada para *Cerdocyon thous* e *Chrysocyon brachyurus*. As siglas (F) e (R) significam *Forward* e *Reverse*, respectivamente.

Locos	Seqüência dos Primers (5'→3')	TA (°C)	Fontes
BOVINOS E BÚFALOS			
BM 2113	(F) GTCCTTCTACCAAATACCC (R) CTCCTGAGAGAAGCAACACC	45, 48, 52, 54, 56, 60	Sunden <i>et al.</i> 1993
MAF	(F) ATTGACACTTCAGTAAGTTAACAATGG (R) CAGACACAACCTGAGCAACTAGCGC	45, 48, 50	Kappes <i>et al.</i> 1997
CSN 032	(F) ATGACACCTTAACCTAATCCC (R) GCACTTTATAAGCACACAGC	48, 52, 54, 56, 60	Barker <i>et al.</i> 1997
INRA 006	(F) AGGAATATCTGTATCAACCTCAGTC (R) CTGAGCTGGGTGGGAGCTATAAATA	45, 48, 50	Cănón <i>et al.</i> 2001
INRA 092	(F) GGTITGACTTCAACTTCAACC (R) GGGAGTATGTGGAGAATGCAAG	45, 48	Cănón <i>et al.</i> 2001
TEXAN 02	(F) ACATTGTCATGTGGTTGCTAAC (R) ACTATGGGTATGTATATGTGCTGCAAG	45, 48	Barker <i>et al.</i> 1997
CSSM 046	(F) TGCACAATCGGAACCTAGAATATT (R) GGCTATTAACCTGTTTCTAGGAAT	45, 48	Barker <i>et al.</i> 1997

Tabela 1 (Continuação)

Locos	Seqüência dos Primers (5'→3')	TA (°C)	Fontes
BOVINOS E BÚFALOS			
CSSM 038	(F) TTCATATAAGCAGTTTATAAACGC (R) ATAGGATCTGGTAACTTACAGATG	45, 48	Barker <i>et al.</i> 1997
BMS 2523	(F) TGAAGTAAGTAAGCACACAAGCA (R) TTGATCATCTTTAGGTCCATCC	48, 52, 54, 56, 60	Cãnón <i>et al.</i> 2001
ETH 225	(F) GATCACCTTCGGACTATTTTCCT (R) ACATGACAGCCACGTGCTACT	45, 48	Fries <i>et al.</i> 1993
CACHORRO DOMÉSTICO			
PEZ-7	(F) ATCCTGGAGACCTGGGATTG (R) GATTGAGTCATCAATAGATG	45, 48, 52, 54, 56, 60	Halverson <i>et al.</i> 1995
PEZ-5	(F) GCTATCTTGTTTCCCACAGC (R) TCACTGTATACAACATTGTC	45, 48, 52, 54, 56, 58, 60	Halverson <i>et al.</i> 1995
PEZ-20	(F) CCTAAATTAGAGGTCTAAACCC (R) TAAGCGGGAATGTGCTCCTC	45, 48, 52, 54, 56, 58, 60	Halverson <i>et al.</i> 1995
Loco-11	(F) CTCAGCACCGAGTCTGCTTG (R) CCTGTTCTAGGAACCCTATG	54, 56, 58, 60, 62	Halverson <i>et al.</i> 1995
PEZ-13	(F) AGTCTGGTGATTTAATTCGG (R) TCTAGTCCCCAGTCTAGTTCACTGCC	54, 62	Halverson <i>et al.</i> 1995
PEZ-15	(F) TGGGGCTTAACTCCAAGTTC (R) GTACAGAGTCTGCTTATC	54, 58, 62	Halverson <i>et al.</i> 1995
PEZ-8	(F) TATCGACTTTATCACTGTGG (R) ATGGAGCCTCATGTCTCATC	50, 54	Halverson <i>et al.</i> 1995
PEZ-12	(F) GTAGATTAGATCTCAGGCAG (R) TAGGTCCTGGTAGGGTGTGG	54, 58	Halverson <i>et al.</i> 1995
PEZ-16	(F) GCTCTTTGTAAAATGACCTG (R) GTGGGAATCGTCCTAAAACCC	50, 52, 54	Halverson <i>et al.</i> 1995
GATO DOMÉSTICO			
FCA 005	(F) CCTAAGGAAACAGTAATCCTGGC (R) TGGAGGCATACCAGGAT	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 026	(F) GGAGCCCTTAGAGTCATGCA (R) TGTACACGCACCAAAAACAA	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 077	(F) GGCACCTATAACTACCAGTGTGA (R) ATCTCTGGGAAATAAATTTTGG	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 090	(F) ATCAAAAAGTCTTGAAGAGCATGG (R) TGTTAGCTCATGTTTCATGTGTC	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 096	(F) CACGCCAAACTCTATGCTGA (R) CAATGTGCCGTCGAAGAAC	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 126	(F) GCCCCTGATACCCTGAATG (R) CTATCCTTGCTGGCTGAAGG	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 193	(F) TATCTGGTAAGCCCCTGGG (R) CCCTGTTTTTATGCCTCTGC	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 211	(F) TGTAGAACATAATGCCTCAGCC (R) TCTTGAACCTATTTCCCACA	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 220	(F) CGATGGAAAATTGTATCCTGG (R) GGAATGAAGGCAGTCACAAACTG	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999
FCA 441	(F) ATCGGTAGGTAGGTAGATATAG (R) GCTTGCTTCAAATTTTCAC	45	Menotti-Raymond <i>et al.</i> 1999

Tabela 2- Locos transferidos para *Cerdocyon thous* (Ct) e *Chrysocyon brachyurus* (Cb), identificando o tipo de repetição, a variação no tamanho dos alelos encontrados, e temperatura de anelamento (TA °C) ideal para cada loco.

Locos	Motivo de Repetição	Variação no tamanho dos alelos (bp)		TA (°C)
		Ct	Cb	Ct e Cb
CSSM-038	CA	162	162	48
PEZ-05	AAAG	112-78	116-100	60
PEZ-20	AAAT	230-202	173-153	60
PEZ-12	AAAG	302-222	265-261	58
PEZ-13	AAAG	312-246	267-235	62
PEZ-15	AAAG	214-190	211-195	62

Todos os *primers* testados foram classificados de acordo com a qualidade dos produtos de PCR obtidos: 48% (14 pares de *primers*) não tiveram nenhuma amplificação, 31% (9 pares de *primers*) exibiram amplificações inespecíficas, e os 21% restantes (6 pares de *primers*) foram transferidos com sucesso para as duas espécies. Os 38 indivíduos de cada uma das populações (lobo-guará e Cachorro de Mato) foram analisados com base em cinco locos altamente polimórficos (83%), gerando uma média de 7,8 alelos por loco no cachorro-do-mato e 4,5 alelos no lobo-guará. A Figura 1 apresenta todos os alelos obtidos nas duas populações para os cinco locos polimórficos, com exceção dos *primers* PEZ-15 e PEZ-13, para os quais faltaram um e dois alelos, respectivamente.

Os parâmetros genéticos para o cachorro-do-mato foram: heterozigosidade média esperada, $H_e = 0,676$; a heterozigosidade média observada, $H_o = 0,654$; e o índice de fixação médio, $f = 0.0326$. Para o lobo-guará, os parâmetros genéticos obtidos foram, $H_e = 0,533$; $H_o = 0,564$; e $f = -0.09078$ (Tabela 3).

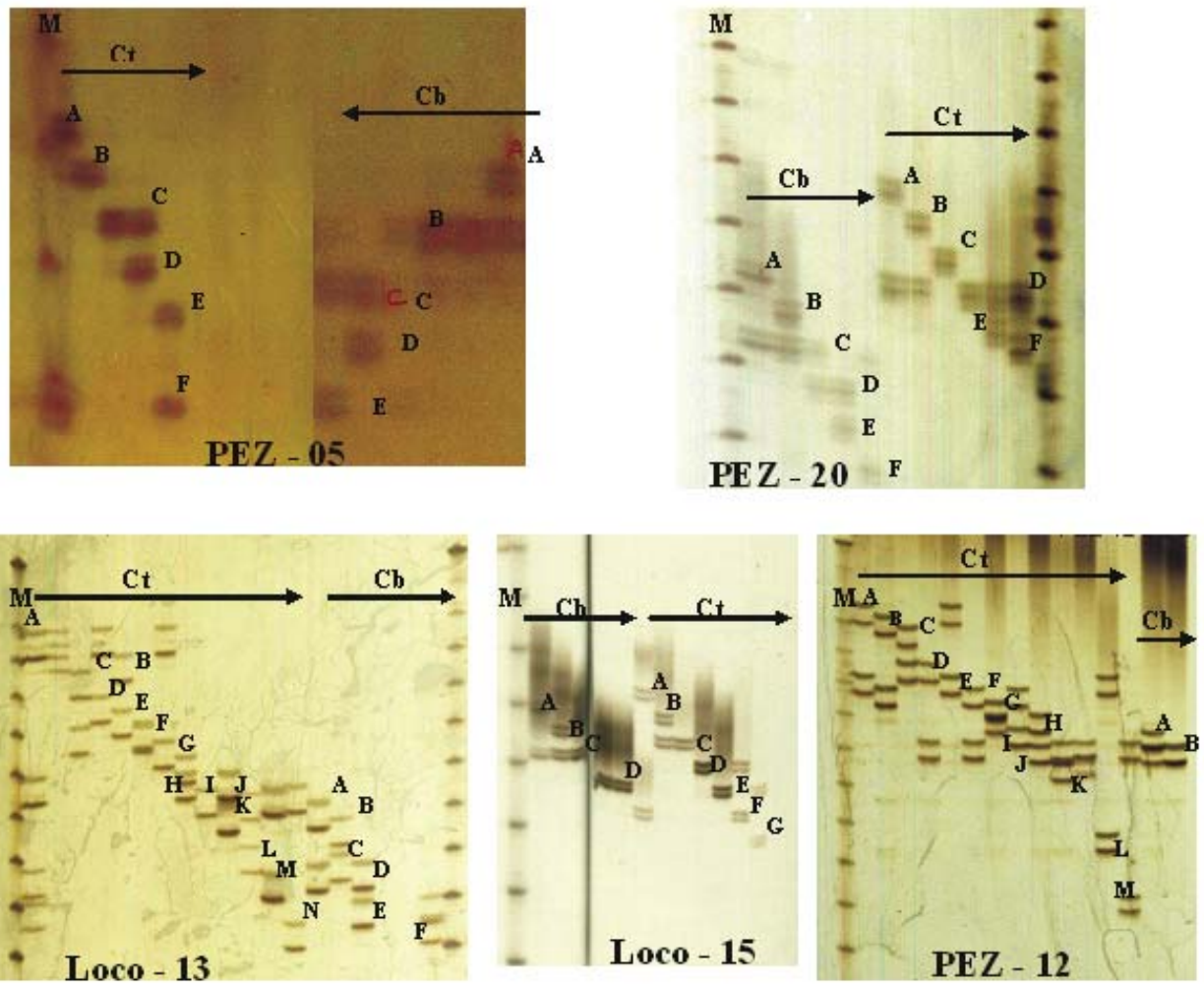


Figura 1- Escada alélica dos cinco locos polimórficos (PEZ-05, PEZ-20, LOCO-13 ou PEZ-13, LOCO-15 ou PEZ-15 e PEZ-12) nas duas espécies analisadas, cachorro-do-mato (Ct) e lobo-guará (Cb). M indica o padrão de peso molecular 10 bp *ladder*, Pharmacia.

Tabela 3- Número de alelos por loco (A), Heterozigosidade esperada (H_e), Hetrozigosidade observada (H_o) nos locos que amplificaram com *Cerdocyon thous* (Ct) e *Chrysocyon brachyurus* (Cb).

Loco STR	A		H_e		H_o	
	Ct	Cb	Ct	Cb	Ct	Cb
CSSM-038	1	1	---	---	---	---
PEZ-05	6	5	0,770	0,627	0,757	0,697
PEZ-20	6	6	0,747	0,712	0,812	0,560
PEZ-12	13	2	0,875	0,478	0,909	0,658
PEZ-13	14	8	0,890	0,817	0,697	0,914
PEZ-15	7	5	0,775	0,564	0,750	0,553

Os resultados obtidos indicam que há um grande potencial de transferibilidade de marcadores STR entre gêneros de canídeos diferentes. Este é um resultado importante, pois o alto custo e um longo período de testes necessários para o desenvolvimento de *primers* específicos de microssatélite dificulta muito os estudos de caracterização da variabilidade genética nas populações.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alho JRC (1990) Distribuição da fauna num gradiente de recursos em mosaico, Em: Cerrado: caracterização, ocupação e perspectiva, Maria N. Pinto (Edit.), Editora UnB.
- Barker JSF, Moore S, Hetzel S, Evan D, Tan SG, Byrne, K (1997) Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and comparison with protein-coding loci. *Animal Genetics*, **28**, 103-115.
- Bassan BJ, Anollés GCE, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *An. Biochem*, **196**, 80-83.
- Brondani C, Rangel PHN, Borba TCO, Brondani RPV (2003) Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. *Hereditas*, **138**, 187-192.
- Cañón, J, Alexandrino P, Bessa I *et al.* (2001) Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genetics Selection and Evolution*, **33**, 311–332.
- Cipriani G, Lot G, Huang WG *et al.* (1999) R. AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus*. *Theoretical Applied Genetics*, **99**, 65-72.
- Daponte, JC (1997) Diet horary fox, *Lycalopex ventulus*, in Mato Grosso, Central Brasil. *Mammalia*, **61**, 537-546.
- Denise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, Mckenna S, Sharp T, Edwards J (2004) Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics*, **35**, 14–17.
- Dietz JM (1984) Ecology and social organization of maned wolf *Chrysocyon brachyurus*. Tese Doctor of Philosophy, Michigan State University, Washington.

- Eisenberg JF, Redford KH (1999) Mammals of the Neotropics - The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, Chicago, 609pp.
- EMBRAPA (2005) Monitoramento por Satélite. Campinas, [S.d.]. Cachorro-do-mato. Disponível em: <http://www.cnpm.embrapa.br/projetos/fauna/mamifero/cac_mato.html>
- Erize F (1977) Brazil's finest National Park. *Oryx*, **13**, 457-462.
- Facure GF (1996) Ecologia alimentar do cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* (Carnivora – Canidae), no Parque Florestal do Itapetinga, município de Atibaia, sudeste do Brasil. Dissertação de Mestrado em Biologia, Universidade Estadual de Campinas.
- Fries R, Eggen A, Womack JE (1993) The bovine genome map. *Mammals Genome*, **4**, 405-428.
- Garcia-Perea, R (1994) The pampas cat group (genus *Lynchailurus* Severtzov, 1858) (Carnivora Felidae): a systematic and biogeographic review. *American Museum Novitates*.
- Halverson J, Dvorak J, Stevenson T (1995) Microsatellite sequences for canine genotyping. US Patent 05874217.
- IBAMA (2003) Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Anexo à Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003, do Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: www.ibama.gov.br.
- Isagi Y, Suhandono S (1997) PCR primers amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology*, **6**, 897-899.
- IUCN (2004) 2004 Red List of Threatened Species. Disponível em: www.redlist.org.
- Iyengar A, Babu VN, Hedges S, Venkataraman AB, Maclean N, Morin PA (2005) Phylogeography, genetic structure, and diversity in dhole (*Cuon alpinus*). *Molecular Ecology*, **14**, 2281-2297.

- Kappes SM, Keele JM, Stone RT, Mc Graw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopes-Corrales NL, Beattie CW (1997) Second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research*, **7** (3), 235-249.
- Klukowska BJ, Strabel, T, Mackowski M, Switonski M (2003) Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *J. Anim. Breed. Genet.*, **120**, 88-94.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A, Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology*, **11**, 2453-2465.
- Marinho-Filho JS, Rodrigues FHG, Juarez KM. (2002). The Cerrado Mammals: diversity, ecology and natural history. In: *The Cerrados of Brazil: Ecology and Natural History of a Neotropical Savanna* (eds Oliveira PS, Marquis RJ) pp. 266-284. Columbia University Press, Irvington, NY, USA.
- Menotti-Raymond MV, David A, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK, O' Brien SJ (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics*, **57**, 9-23.
- Navani N, Jain PK, Gupta S, Sisodia BS, Kumar S (2002) A set of cattle microsatellite DNA markers for genome analysis of riverine buffalo (*Bubalus bubalis*). *Short communication*, **33**, 149-154.
- Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC *et al.* (2000) Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of relationship. *American Journal of Botany*, **87** (11), 1647-1655.
- Rocha VJ, Reis NR, Sekiama ML (2004) Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae) em um fragmento florestal no Paraná Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **21** (4), 871-876.

- Silveira L, Jácomo ATA (1998) Ecologia e conservação de mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, GO. Relatório Técnico para o IBAMA/DIREC/DEUC.
- Sunden SLF, Stone RT, Bishop MD, Kappes SM, Keele JW, Beattie CW (1993) A highly polymorphic bovine microsatellite locus: BM2113. *Animal Genetics*, **24**, 69.
- Tong J, Wang Z, Yu X, Wu Q, Chu KH (2002) Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite *primers* of common carp. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 245-247.
- Wandeler P, Funk SM, Lurgiader CR, Gloor S, Breitenmoser U (2003) The city-fox phenomenon: genetic consequences of a recent colonization of urban habitat. *Molecular Ecology*, **12**, 647-656.
- Williamson KS, Cordes JF, May B (2002) Characterization of microsatellite loci in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 17-19.
- Wright JH, Bentzen P (1994) Microsatellites: genetic markers of the future. Review. *Fish Biology and Fisheries*, **4**, 384-388.
- Write G, Powell W (1997) Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molecular Ecology*, **6**, 1195-1197.
- Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Brondani C, Vencovsky R (2002) Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Molecular Ecology Notes*, **2**, 512-513.

CAPÍTULO 2

Artigo a ser submetido: *Genetics and Molecular Biology*

Diversidade Genética do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) Utilizando Marcadores RAPD e STR

FLÁVIA MELO RODRIGUES^{1, 6}, MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES^{4, 5}, JOSÉ ALEXANDRE FELIZOLA DINIZ FILHO^{2, 3, 5, 6}, LUCILEIDE VILELA RESENDE⁴, ANAH TEREZA DE ALMEIDA JÁCOMO⁵, LEANDRO SILVEIRA⁵ E THANNYA NASCIMENTO SOARES⁴

¹*Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis, GO;*

²*Departamento de Biologia, Universidade Católica de Goiás (UCG);* ³*Departamento de Biologia Geral, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG);* ⁴*Laboratório de Genética e Melhoramento, Departamento de Zootecnia/ITS, Universidade Católica de Goiás (UCG);* ⁵*Fundo para a Conservação da Onça-Pintada (FCOP),* ⁶*Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – UFG.*

e-mail: flavia.melo@ueg.br

Resumo

Quanto maior é a variação genética de uma espécie, maior será a sua chance de sobreviver a mudanças do ambiente e, por isso, maiores são as suas chances de evitar a extinção. Os marcadores moleculares, tais como, RAPD e os STR's, são técnicas da biologia molecular que têm sido amplamente utilizadas no monitoramento da variabilidade genética das populações. O objetivo deste trabalho foi estimar a diversidade genética de populações de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) do Parque Nacional das Emas (PNE), Goiás, utilizando os marcadores STR e marcadores RAPD. Foram coletadas amostras de sangue para as análises genéticas de 38 indivíduos de cada uma das duas espécies estudadas. Para as análises RAPD foram utilizados nove *primers* da OPERON™ e em seguida os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose 1,4%, visualizados por coloração com brometo de etídio. Para as análises com os marcadores STR, foram utilizados seis *primers* nas reações de PCR. Os produtos amplificados foram submetidos a uma eletroforese em gel de acrilamida 4% e

este foi corado com nitrato de prata para a obtenção dos genótipos. Em seguida, foram realizadas as estimativas de diversidade genética. Para estimar a correlação entre os resultados gerados pelos dois marcadores utilizados, os genótipos obtidos com os dados STR foram transformados em dados binários. Em média, o número total de locos e número de locos polimórficos por *primer*, foi maior no cachorro-do-mato do que no lobo-guará. A similaridade genética obtida com os marcadores RAPD foi em média maior na população de lobo-guará (0,75) do que na população de cachorro-do-mato (0,68). Dentre os *primers* STR, 83% foram altamente polimórficos. O índice de fixação médio estimado para cada população foi 0,032 e -0,091 para o cachorro-do-mato e lobo-guará, respectivamente. As correlações matriciais entre as similaridades genéticas obtidas pelos dois marcadores foram significativas pelo teste de Mantel, porém com valores de r baixos, 0,242 ($P = 0,0056$) na população de lobo-guará e 0,2465 ($P = 0,0126$) na população de cachorro-do-mato. A baixa correlação entre os dois marcadores moleculares utilizados corrobora outros estudos o que pode ser explicado pela base genética diferente entre eles. Nossos dados não indicam uma significativa redução na variabilidade genética e nem endogamia elevada em nenhuma das espécies estudadas. Portanto, deve-se pensar em propostas adequadas de conservação e manejo destas espécies, principalmente do lobo-guará, que é uma espécie vulnerável a extinção, a fim de aumentar a viabilidade das mesmas em longo prazo.

Palavras-chave: lobo-guará, cachorro-do-mato, Marcadores STR, Marcadores RAPD, Diversidade Genética.

Enviar correspondência para FM Rodrigues. Universidade Estadual de Goiás, Departamento de Biologia, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR 153, Km 3, Campus Anápolis, CEP: 75110-390, Caixa Postal: 459, Anápolis, GO, Brasil. E-mail: flavia.melo@ueg.br

Abstract

High genetic variability of a species gives it a higher chance of avoiding extinction. Molecular markers RAPD and STR are molecular biology techniques that have been widely used in order to monitor genetic variability of the populations. This research's goal was to estimate the genetic diversity of the Crab-eating fox (*Cerdocyon thous*) population and the Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) population from Ema's National Park in Goiás. Blood samples of 38 individuals of each species were drawn for genetic analysis. For the RAPD analysis, nine OPERONTM primers were used and the amplified fragments were separated in Agaroses gel 1,4%, with bromite etidium coloration. For the STR markers, six primers were used on the PCR reations, the amplified fragments were submitted to eletrphorese in actilamida gel 4%, colored with silver nitrate, to obtain the genotypes. Then the estimates of the genetic diversity were calculated. To estimate correlation between the results found with the markers, the genotypes obtained by STR markers were transformed in binary data. In average, the toral number os locus and the number of polimorph locus for each primer was higher for the Crab-eating fox. The genetic similarity obtained with the RAPD market was in average higher for the Maned Wolf (0,75) and (0,68) for the Crab-eating fox. Comparing primers, 83% of the STR was highly polimorphic. The average fixation iundex estimated for the population was 0.032 for the Crab-eating fox and 0,091 for the Maned wolf. The matricial correlations between genetic similarities were significant with the Mantel test but the values of r were low, $r=0,242$ ($p=0,0056$) for Maned wof population and $r=0,2465$ ($p=0,0126$) for Crab-eating fox population. The low correlation between the two markers agrees with other studies, and can be explained by the different genetic base between them. The data doesn't indicate a reduction in the genetic variability, neither high endogamy in either species. One should think of proper ways to conserve and manage these species, specially the Maner wolf, which is vulnerable to extinction, so that they become viable in the long run.

Key words: Maned Wolf, Crab-eating fox, STR marker, RAPD marker, genetic diversity.

INTRODUÇÃO

Cada vez mais o conhecimento genético e ecológico das espécies se torna importante para sua conservação, porque é na variação de seus genes que está a possibilidade de sobrevivência das espécies. Uma nova abordagem no estudo da biodiversidade, a genética da conservação, surgiu há alguns anos atrás e se tornou importante em programas de conservação (DeSalle e Amato, 2004; Manel *et al.*, 2003; Soulé e Wilcox, 1980; Schonewald-Cox *et al.*, 1998). A genética da conservação prevê o estudo da variabilidade genética das populações naturais e artificiais com fins de determinar o potencial adaptativo e evolutivo de uma espécie (DeSalle e Amato, 2004). A genética da conservação é uma área bastante ampla, abrangendo desde estudos de expressão gênica, adaptações locais, genética quantitativa e de populações, até fatores ecológicos de seleção. Os aspectos ecológicos da genética da conservação são fundamentais, pois deles provêm a paisagem seletiva e demográfica que, combinada com a história evolutiva, produziram os padrões de variação dentro das espécies (Moran, 2002).

Quanto maior é a variação genética de uma espécie, maior será sua chance de sobreviver se adaptando a um novo ambiente e evitando a extinção (Hedrick, 2001). A genética da conservação, bem como os outros campos interessados na conservação biológica, está sendo motivada pela necessidade de se reduzir a atual taxa de extinção e preservar a biodiversidade. Para atingir tal objetivo, são estudados os fatores genéticos que afetam o risco de extinção e o controle genético que é necessário para minimizar esse risco (Frankham *et al.*, 2002).

Os efeitos do tamanho das populações são alguns dos grandes problemas enfrentados na conservação biológica das espécies ameaçadas. Pequenas populações sofrem com o endocruzamento e a perda da variabilidade genética mais rapidamente, resultando em um elevado risco de extinção. Conseqüentemente, o principal objetivo do estudo genético é minimizar esse endocruzamento e a perda da variabilidade genética (DeSalle e Amato, 2004; Frankham *et al.*, 2002; Hedrick, 2001). O endocruzamento reduz a fecundidade, a sobrevivência e acaba

diretamente aumentando o risco de extinção (Frankham *et al.*, 2002). Já a redução da variabilidade genética compromete as espécies na sua habilidade de persistir frente à mudanças ambientais, reduzindo suas chances de sobrevivência e persistência em um dado ambiente. Estudos em genética da conservação tentam identificar as populações onde o endocruzamento e a variabilidade genética podem interferir nas suas perspectivas de sobrevivência em longo prazo (DeSalle e Amato, 2004; Frankham *et al.*, 2002; Manel *et al.*, 2003).

As técnicas moleculares têm sido amplamente utilizadas para monitorar a variabilidade genética das populações (Parker *et al.*, 1998). Os avanços na biologia molecular abriram novas perspectivas para a pesquisa em conservação de espécies e para estudos de biologia populacional como um todo. A partir desses avanços as variações encontradas nas espécies naturais podem ser analisadas em nível de DNA. Vários estudos nesse sentido vem sendo desenvolvidos no Brasil e no mundo (De Mattos *et al.*, 2004; Farrel *et al.*, 2000; Iyengar *et al.*, 2005; Mengoni *et al.*, 2000; Ratnayeke *et al.*, 2002; Zucchi *et al.*, 2002).

Os marcadores moleculares compõem essas técnicas da biologia molecular e existe hoje uma grande variedade de classes de marcadores moleculares (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Em adição as técnicas baseadas em RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Bostein *et al.*, 1980), muitas tecnologias baseadas na reação em cadeia da polimerase, a PCR (*Polymerase Chain Reaction*) (Mullis e Faloona, 1987), que permite a síntese enzimática de milhões de cópias de um segmento específico de DNA, têm sido desenvolvidas. Essa técnica provocou uma verdadeira revolução na genética molecular, facilitando bastante os trabalhos desenvolvidos nos laboratórios. Desde então, várias técnicas baseadas em PCR vêm sendo desenvolvidas e dentre elas se destacam os Microssatélites (Tautz, 1989) e o polimorfismo de DNA amplificado ao acaso, o RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) (Williams *et al.*, 1990; Welsh e McClelland, 1990). A preferência por estas duas técnicas em relação ao RFLP é justificada devido a grande

quantidade de DNA exigida pela técnica de RFLP, bem como pelo elevado tempo e custo despendido pelo desenvolvimento do procedimento (Mengoni *et al.*, 2000)

Marcadores Microsatélite ou STR (*Short Tandem Repeats*), são definidos como seqüências repetidas em *tandem* compostas de números variáveis de motivo com 1 a 6 pares de bases (pb) encontrados no genoma de vertebrados, insetos e outros animais (Charlesworth *et al.*, 1994; Mengoni *et al.*, 2000, Li *et al.*, 2002). São marcadores genéticos codominantes multialélicos e evolutivamente neutros. No entanto, alguns estudos discutem o papel dos marcadores STR em regiões codificantes do genoma tais como, regulação da expressão gênica, regulação da replicação e recombinação do DNA, organização da cromatina, etc (Li *et al.*, 2002). As seqüências que flanqueiam os STR são conservadas, o que permite a seleção de um par de pequenos fragmentos de nucleotídeos iniciadores (*Primers*), compostos de 20 a 30 pares de bases e sua amplificação via PCR.

Os polimorfismos dos marcadores STR são detectados nos comprimentos das seqüências dos fragmentos amplificados, pois o número de repetições em cada microsatélite é altamente variável. Essas regiões possuem taxas elevadas de mutações, geralmente do tipo adição e deleção das repetições, que podem chegar até um a cada 1000 pb (Tautz, 1989). Devido ao alto grau de polimorfismo, os STR's tornaram-se marcadores ideais para estudos de mapeamento genético, discriminação entre acessos e cultivares de bancos de germoplasma, determinação de grau de parentesco entre indivíduos e estrutura genética entre indivíduos, populações e espécies (Denise *et al.*, 2004; Francisco *et al.*, 1996; Neff *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1994). Contudo, todas as facilidades deste marcador dependem da disponibilidade das seqüências de DNA que flanqueiam os STR, os *primers*. Por esta razão, o uso destes marcadores é limitado, pois são escassas as informações sobre seqüências de DNA de espécies naturais e pelo alto custo e trabalho envolvidos na construção de bibliotecas genômicas, clonagens e sequenciamentos necessários para o isolamento de STR e desenvolvimento dos *primers* (Zucchi *et al.*, 2002). No entanto,

diversos estudos têm mostrado a possibilidade de se usar alguns marcadores STR (*primers*) desenvolvidos para uma outra espécie pertencente ao mesmo gênero (Brondani *et al.*, 2003; Cipriani *et al.*, 1999; Isagi e Suhandono 1997; Zucchi *et al.*, 2002), ou até mesmo entre gêneros diferentes (Roa *et al.*, 2000; Write e Powell 1997).

Os marcadores RAPD também têm sido bastante empregados no estudo de populações naturais, pois são tecnicamente mais simples de se obter do que outros marcadores, tais como o RFLP e STR, o que facilita o estudo de um grande número de locos, e fornece uma amostragem aleatória maior do DNA (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Estes marcadores são gerados pela amplificação de segmentos desconhecidos do genoma, utilizando um simples e curto *primer* de seqüência arbitrária, contendo 10 pb. São inúmeras as vantagens dos marcadores RAPD tais como, não utilizar radioatividade, necessita de pequenas quantidades de DNA, não requerem um conhecimento prévio da seqüência alvo a ser amplificada, e ser aplicável a qualquer espécie, etc (Ferreira e Grattapaglia, 1998). Entretanto o uso do RAPD também tem limitações, pois são marcadores de caráter dominante, ou seja, ele não permite a identificação do genótipo heterozigoto, limitando a estimativa de parâmetros genéticos. Alguns trabalhos discutem alguns problemas quanto à sua reprodutibilidade (Karp *et al.*, 1996; Lynch e Milligan, 1994). No entanto, alguns estudos têm demonstrado que os marcadores RAPD tendem a fornecer marcas relativamente específicas de populações, raças e espécies, o que o torna um importante marcador para estudos de populações visando à conservação genética (Powell *et al.*, 1996).

O presente trabalho teve por objetivo utilizar os marcadores STR e marcadores RAPD para estimar a diversidade genética de uma população de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) e uma população de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) do Parque Nacional das Emas (PNE), Goiás. O lobo-guará, ou simplesmente guará (*Chrysocyon brachyurus*), uma das espécies que ocorrem no PNE, é o maior representante da família dos canídeos da América do Sul. Atualmente está classificado pela IUCN (2004) como espécie LR/nt, ou seja, com pequeno risco de extinção,

mas próximo a ser considerado vulnerável à extinção. A espécie também está incluída na lista de espécies brasileiras ameaçadas de extinção do IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis) (IBAMA, 2003). O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), que é um mamífero de porte médio, cuja distribuição estende-se do sul da Amazônia até o Paraguai (EMBRAPA, 2005). No Brasil, é o canídeo mais comum e com maior distribuição, ocupando uma grande variedade de habitats. Porém, parece ser mais abundante nas áreas de cerrado do que em áreas de matas fechadas (Rocha *et al.*, 2004). O conhecimento dos níveis de variabilidade genética nessas espécies é importante a fim de estabelecer estratégias de conservação e manejo na região, que venham a minimizar posteriores riscos de extinção ligado à perda da diversidade em nível genético.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do Material Animal e Extração de DNA

Os indivíduos das duas espécies estudadas, lobo-guará e o cachorro-do-mato, foram capturados no Parque Nacional das Emas (PNE) situado no extremo sudoeste do Estado de Goiás, próximo ao limite com o Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, a 18°19'S e 52°45'E. A maior parte do PNE é pertencente ao município de Mineiros (GO) e o restante, aos municípios de Chapadão do Céu (GO), Costa Rica (MS) e Alto Taquari (MT) (Figura 1).

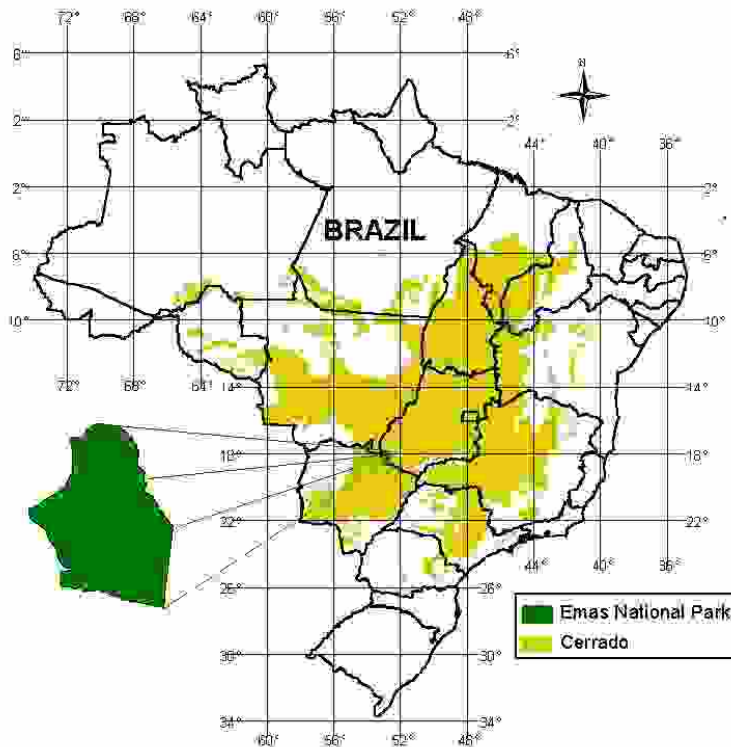


Figura 1- Localização do Parque Nacional das Emas - GO.

No período compreendido entre janeiro de 2001 a junho de 2004 efetuou-se a coleta de 38 indivíduos de cada uma das duas populações estudadas (cachorro-do-mato e lobo-guará) (Tabelas 1 e 2). Esta coleta de dados faz parte de um programa maior de monitoramento populacional destas e de outras espécies realizado pela ONG “Fundo para a Conservação da Onça-Pintada” (FCOP) (ver www.jaguar.org.br).

Tabela 1- Indivíduos amostrados da população de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), indicando o sexo, idade e data da coleta realizada no Parque Nacional das Emas (PNE).

INDIVÍDUO	SEXO	IDADE	DATA
1	Fêmea	Adulto	19/1/2001
2	Macho	Adulto	26/4/2001
3	Macho	Adulto	14/7/2001
4	Fêmea	Adulto	4/1/2002
5	Fêmea	Adulto	8/2/2002
6	Fêmea	Adulto	10/4/2002
7	Fêmea	Adulto	18/4/2002
8	Macho	Sub-adulto	20/4/2002
9	Fêmea	Sub-adulto	21/4/2002
10	Fêmea	Adulto	21/4/2002
11	Fêmea	Sub-adulto	24/4/2002
12	Macho	Adulto	27/4/2002
13	Fêmea	Adulto	29/4/2002
14	Macho	Adulto	30/4/2002
15	Macho	Adulto	1/5/2002
16	Macho	Adulto	1/5/2002
17	Fêmea	Sub-adulto	6/6/2002
18	Macho	Adulto	9/6/2002
19	Fêmea	Sub-adulto	15/6/2002
20	Fêmea	Sub-adulto	17/6/2002
21	Macho	Adulto	21/8/2002
22	Macho	Sub-adulto	24/8/2002
23	Fêmea	Adulto	31/8/2002
24	Macho	Adulto	2/9/2002
25	Fêmea	Sub-adulto	3/9/2002
26	Fêmea	Sub-adulto	5/9/2002
27	Fêmea	Adulto	8/9/2002
28	Fêmea	Adulto	19/9/2002
29	Macho	Adulto	5/3/2003
30	Fêmea	Adulto	22/4/2003
31	Fêmea	Sub-adulto	23/4/2003
32	Macho	Adulto	24/4/2003
33	Macho	Adulto	9/5/2003
34	Macho	Adulto	21/7/2003
35	Macho	Jovem	3/8/2003
36	Fêmea	Adulto	11/8/2003
37	Macho	Adulto	19/4/2004
38	Fêmea	Sub-adulto	29/6/2004

Tabela 2- Indivíduos amostrados da população de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), indicando o sexo, idade e data da coleta realizada no Parque Nacional das Emas (PNE).

INDIVÍDUO	SEXO	IDADE	DATA
1	Fêmea	Adulto	7/7/2001
2	Macho	Adulto	12/7/2001
3	Macho	Sub-adulto	1/4/2002
4	Macho	Adulto	6/4/2002
5	Macho	Adulto	21/7/2002
6	Macho	----	4/9/2002
7	Fêmea	----	10/9/2002
8	Fêmea	----	15/9/2002
9	Fêmea	----	21/9/2002
10	Fêmea	Lactante	21/9/2002
11	Macho	----	22/9/2002
12	Macho	Adulto	1/11/2002
13	Macho	Sub-adulto	17/1/2003
14	Fêmea	Adulto	8/4/2003
15	Fêmea	Adulto	8/4/2003
16	Macho	Adulto	13/4/2003
17	Macho	Adulto	19/4/2003
18	Macho	Adulto	13/5/2003
19	Fêmea	Sub-adulto	15/5/2003
20	Fêmea	Sub-adulto	18/5/2003
21	Macho	Adulto	3/7/2003
22	Macho	Adulto	21/7/2003
23	Macho	Adulto	25/7/2003
24	Fêmea	Adulto	31/7/2003
25	Macho	Adulto	3/8/2003
26	Fêmea	Adulto	15/8/2003
27	Fêmea	Adulto	16/8/2003
28	Macho	Adulto	23/8/2003
29	Fêmea	Adulto	24/8/2003
30	Fêmea	Sub-adulto	24/8/2003
31	Fêmea	Adulto	13/11/2003
32	Macho	Adulto	30/3/2004
33	Fêmea	Adulto	13/6/2004
34	Macho	Adulto	8/6/2004
35	Macho	Adulto	26/3/2004
36	Macho	Adulto	24/3/2004
37	Fêmea	Adulto	27/3/2004
38	Fêmea	Adulto	30/3/2004

---- Dado não informado

Após a imobilização dos animais, utilizando o anestésico Zoletil® (250 mg), as amostras de sangue foram coletadas com *vacutainer* contendo EDTA e conservadas em tampão *Easy blood*

(12,114g de Tris, 37,224g de EDTA e 20g de SDS) a 4°C. Em seguida foi realizada a extração do DNA através do *Kit* de purificação de DNA (GFX) da *Amersham Pharmacia Biotech*TM. Este procedimento pode processar mais de 300µl de sangue, com um rendimento de 4,5 a 7,5µg de DNA, proveniente de 300µl de sangue total (o qual contém aproximadamente 3×10^6 de células nucleadas). As etapas do procedimento de extração do DNA são descritas a seguir:

1- Lise das células

- Adicionou-se 3X do volume da amostra de tampão *RBC Lysis Solution* e misturou-se por inversão;
- Incubou-se a mistura de lise por 5 minutos em temperatura ambiente e em seguida centrifugou (entre 1200 e 16000 rpm) em microcentrífuga por 20 segundos;
- Removeu-se o sobrenadante e o resíduo (aproximadamente 20-50µl) utilizou-se para ressuspender as células antes da extração.

2- Extração

- Ressuspendeu-se as células brancas do sangue, no mesmo tubo de *lise* e adicionou 500µl de tampão de extração (*Extraction Solution*), pré aquecido a 70°C, e misturou com o auxílio de um vortex;
- Incubou-se a mistura de extração por 5 minutos em temperatura ambiente.

3- Recuperação do DNA

- Transferiu-se toda a mistura da extração para uma coluna (*GFX Column*) e em seguida centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto;
- Descartou-se o líquido do tubo coletor e repetiu a etapa de extração.

4- Lavagem

- Descartou-se o líquido do tubo coletor e adicionou-se 500µl de solução de lavagem (*Wash Solution*) e em seguida, centrifugou-se a 12000-16000rpm por 3 minutos;

- Descartou-se o tubo coletor e transferiu a coluna para outro tubo.

5- Eluição

- Adicionou-se 100 µl de tampão de eluição (TE) pré-aquecido a 70°C e incubou a amostra a temperatura ambiente por 1 minuto;

- Centrifugou-se a 8000rpm por 1 minuto para recuperar o DNA purificado.

A quantificação do DNA foi realizada com o auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass*, e diluído para a concentração ideal de uso. O DNA foi utilizado para a realização de diversas reações de PCR utilizando os marcadores RAPD e STR.

Condições de Amplificação dos Marcadores RAPD

Primeiramente, foi realizada uma seleção dos melhores marcadores utilizando o DNA de três indivíduos de cada uma das duas espécies. Os testes de amplificação foram realizados com 119 *primers* das séries OPA, OPB, OPC, OPH, OPM e OPP desenvolvidos pela OPERON®. Destes, um total de nove marcadores apresentaram um melhor padrão de amplificação e foram selecionados para as reações de PCR com os 38 indivíduos de cada espécie.

As reações de PCR foram montadas da seguinte forma: 3 µl de DNA (~3 ng/µl); 2,0 µl de *primer* (~10 ng/µl); 2,6 µl tampão da enzima (10 X); 0,78 µl de MgCl₂ (50 mM); 2,08 µl de dNTP (2,5 mM); 0,2 µl da enzima Taq-Polimerase (5 unidades/µl) e completando o volume com 9,34 µl de H₂O Milli-Q. Foram utilizadas as seguintes condições nas reações de amplificação: (1°) 2' a 94°C; (2°) 1'30'' a 92°C, (3°) 1' a 37°C, (4°) 2'30'' a 72°C, (5°) 40 ciclos (da 2° a 4°) e (6°) 5' a 72°C para a extensão final. Os fragmentos de DNA amplificados foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e em seguida corados com brometo de etídeo. Foi utilizado o marcador de peso molecular ladder 100 bp (Gibco), para estimar o tamanho dos fragmentos. Os fragmentos, nos géis, foram visualizados através de um transluminador de luz ultravioleta e

fotografados com auxílio do fotodocumentador KODAK EDAS – 120, (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Condições de Amplificação dos Marcadores STR

Após a realização dos testes de transferibilidade dos marcadores STR (ver Capítulo 1), os locos selecionados foram utilizados nas reações de PCR. Para as reações de PCR o seguinte protocolo foi utilizado: 5 µl de DNA (~3 ng/µl); 2,2 µl do *primers* A (*forward*) (~5 ng/µl); 2,2 µl do *primers* B (*reverse*) (~5 ng/µl); 1,3 µl de BSA (10 mg/ml); 1,5 µl tampão da enzima (10 X); 0,5 µl de MgCl₂ (50 mM); 1,3 µl de d’NTP (2,5 mM); 0,2 µl da enzima Taq- Polimerase (5 unidades/µl) e completando o volume com 0,8 µl de H₂O *Milli-Q*, para um volume final de 15 µl.

Para cada reação, realizada no termociclador *MJ Research Inc*, utilizou-se o seguinte programa: (1°) desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos e (2°) a 94°C por 1 minuto; (3°) anelamento dos “*primers*” a X°C por 1 minuto; (4°) extensão da molécula pela enzima Taq polimerase (fornecida pela *Amersham Pharmacia Biotech*) a 72°C por 1 minuto; (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passos; (6°) passo final de extensão de 7 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados. Para cada *primer* foram testadas temperaturas de anelamento que variaram entre 45°C e 65°C, pois este é um dos fatores críticos nas análises com estes marcadores (Hillis *et. al*, 1996; Ferreira e Grattapaglia, 1998) e após os resultados dos testes foi utilizado a temperatura de anelamento específica de cada primer (ver cap. 1).

Em uma primeira etapa dos testes de amplificação realizamos uma eletroforese horizontal, utilizando o gel de agarose 4% com tampão de corrida TBE 1X, com o intuito de verificar se houve ou não amplificação de algum fragmento. Os fragmentos foram corados em uma solução contendo brometo de etídeo visualizados no transiluminador de luz ultravioleta e fotografados com o fotodocumentador KODAK EDAS 120.

As amostras que amplificaram foram, em seguida, submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida a 4% em TBE 1X durante 2 horas, mantendo a corrente elétrica em 90W constante. Nesse gel são aplicados 3µl do produto da PCR previamente desnaturado (94°C por 5 min), contendo o tampão de carregamento. O padrão de peso molecular, o marcador *Ladder* 10bp (*Amersham Pharmacia Biotech*) foi usado para estimar os tamanhos dos produtos de PCR. Após a eletroforese, o gel de acrilamida foi corado com nitrato de prata (Bassan *et al.*, 1991). Após a revelação das bandas e a secagem das placas, estas foram colocadas sobre a luz branca para a obtenção dos genótipos.

Análises dos Dados

Dados RAPD e STR

A partir dos produtos amplificados via RAPD, foi construída uma matriz de dados binários obtida pela codificação dos géis em genótipos, no qual o valor 1,0 indica presença de banda no indivíduo e zero a sua ausência. Em seguida, foi realizada uma análise descritiva destes dados, anotando-se o número total de locos e número de locos polimórficos.

As matrizes binárias contendo dados dos nove primers selecionados foram combinadas a fim de se obter uma única matriz, na qual foi estimada a similaridade entre os indivíduos para cada uma das duas populações separadamente e conjuntamente. A similaridade genética entre os pares de indivíduos foi estimada com base no coeficiente de Jaccard (J) (Sneath e Sokal, 1973) que é dado por

$$J = \frac{M}{P}$$

onde M é o número de bandas em comum e P é o número total de bandas, excluindo-se as bandas ausentes nos dois indivíduos comparados. Essas análises foram realizadas utilizando a rotina SIMQUAL (*similarity for qualitative data*) do programa NTSYS-PC, versão 1.8 (Rohlf, 1991).

A partir da interpretação dos genótipos gerados pelos marcadores STR, foram obtidas as frequências alélicas (p) e genotípicas em cada loco para cada espécie. Estas frequências foram submetidas a estatísticas descritivas, tais como número de alelos observados por loco (n_a), número efetivo de alelos (n_e), calculados de acordo com Crow e Kimura (1970), e a proporção de locos polimórficos (l_p) para cada espécie analisada.

Para a verificação da hipótese nula de aderência ao Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) foi feito o Teste Exato de Fisher por meio do método de cadeias de Markov, utilizando 10 *batches* com 1000 permutações por *batch*, utilizando o programa TFPGA 1.3 (Miller, 1997).

Para estimar a diversidade genética foi calculada a heterozigosidade média observada (H_o), obtida pela média aritmética das proporções do número de heterozigotos em relação ao número total de indivíduos entre os locos analisados. A Heterozigosidade esperada por locos (H_e), foi calculada por

$$H_e = 1 - \sum p_i^2$$

onde p é a frequência populacional do i -ésimo alelo de cada loco.

Com base nas estimativas das heterozigosidades esperadas e observadas (H_e e H_o), calculou-se o índice de fixação ou coeficiente de endogamia (F) para cada população, como medida da deficiência ou excesso de heterozigotos, dada pela fórmula $F = \frac{(H_e - H_o)}{H_e}$. Todas essas análises foram realizadas no programa GENEPOP 3.3 (Raymond e Rousset, 1995).

Correlação Matricial

A fim de se verificar a associação entre a similaridade genética obtida a partir dos dois marcadores utilizados para cada espécie, os genótipos gerados pelos marcadores STR foram transformados em uma matriz binária, onde a presença do alelo no genótipo foi indicada por 1 e a

ausência por zero (Kosman e Leonard, 2005). A transformação foi feita de acordo com o exemplo abaixo:

Indivíduos	Genótipos			
	<i>Primer 1</i>	<i>Primer 2</i>	<i>Primer 1</i>	<i>Primer 2</i>
1	A	B	A	A
2	B	B	A	D
3	A	C	B	C

Genótipos gerados pelos locos STR.

↓

Indivíduos	Alelos / Primer 1				Alelos / Primer 2			
	A	B	C	D	A	B	C	D
1	1	1	0	0	1	0	0	0
2	0	1	0	0	1	0	0	1
3	1	0	1	0	0	1	1	0

Genótipos transformados em dados binários para cada loco analisado.

Para avaliar a correlação entre as matrizes de similaridade obtidas a partir dos dados RAPD e STR das espécies foi utilizado o teste de Mantel (Manly, 1991), que é dado por:

$$Z = \sum_i \sum_j (E_{ij} \cdot M_{ij})$$

onde E_{ij} e M_{ij} são o i -ésimo e j -ésimo elementos das matrizes E e M a serem comparadas. A significância da relação entre as matrizes pode ser testada recalculando o valor de Z diversas vezes, permutando aleatoriamente, em cada uma delas, a ordem dos elementos de uma das matrizes. Deste modo, é possível obter uma distribuição de probabilidades à qual o valor de Z observado pode ser comparado (Manly, 1991). O valor de Z não possui amplitude de variação definida, mas de fato ele possui uma relação monotônica com o r de Pearson calculado entre as matrizes. Assim, pode-se utilizar o Z de Mantel para testar a significância da correlação matricial,

que varia entre 1,0 e -1,0. Foram utilizadas 5000 permutações aleatórias para estabelecer a significância de cada correlação matricial. Essas análises foram realizadas utilizando a rotina MXCOMP (*Matrix Comparison-Graphics*) do programa, NTSYS-PC 1.8 (Rohlf, 1991).

RESULTADOS

Dados RAPD

Dentre os 119 *primers* testados foram selecionados nove para as análises posteriores, por apresentarem um melhor padrão de amplificação. Os critérios adotados para seleção dos marcadores foram: 1º) número razoável de locos; 2º) o máximo possível de bandas fortes; 3º) presença de polimorfismo. Estes critérios facilitam o processo de codificação e maximizam a chance de obtenção de dados com maior qualidade, repetibilidade e menor custo. Portanto, com base no padrão de amplificação e da resolução das bandas no gel, foram selecionados os seguintes *primers*: OPH-04, OPH-19, OPP-07, OPP-08, OPP-09, OPC-05, OPC-11, OPA-18, OPP-15 (Figuras 2 e 3). O *primer* OPH-05 não foi selecionado devido a pouca quantidade.

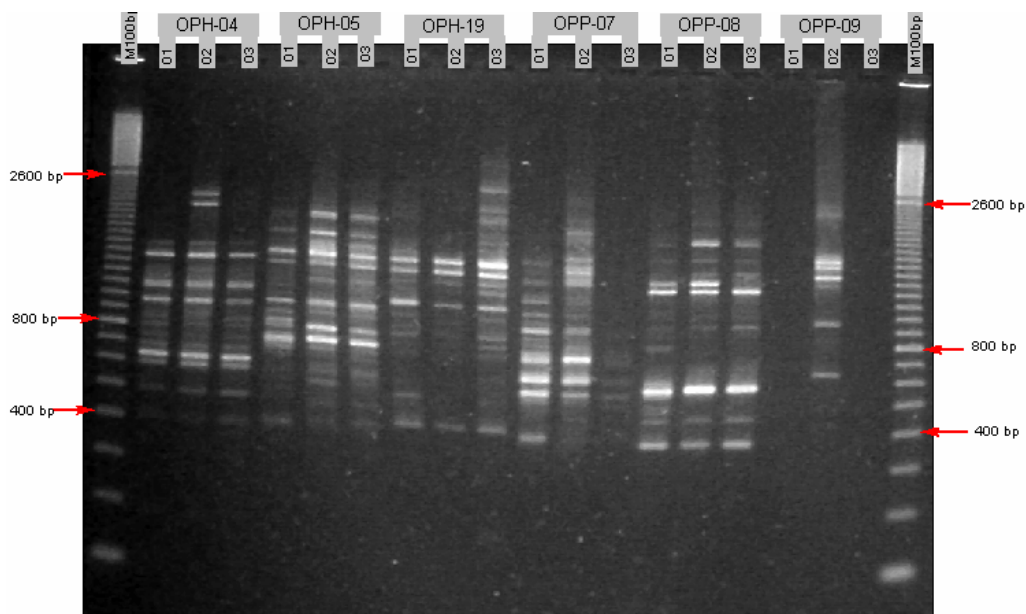


Figura 2- Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados para ilustrar alguns dos *primers* selecionados (OPH-04, OPH-05, OPH-19, OPP-07, OPP-08, OPP-09), exceto OPH-05, utilizando três amostras de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 bp *ladder*, Pharmacia).

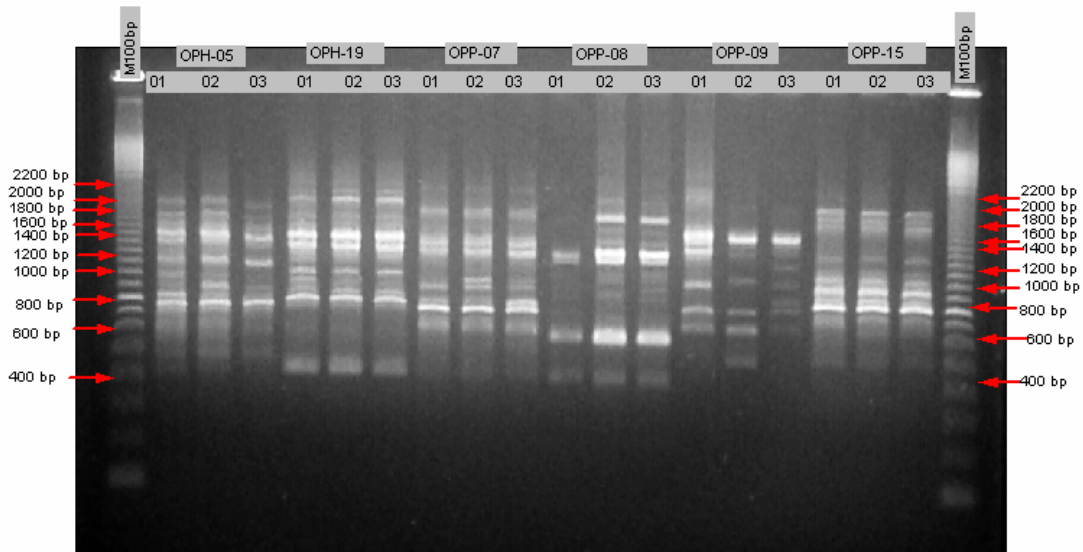


Figura 3- Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados para ilustrar alguns dos *primers* selecionados (OPH-05, OPH-19, OPP-07, OPP-08, OPP-09 e OPP-15), exceto OPH-05, utilizando três amostras de cachorro do Mato (*Cerdocyon thous*). As colunas “M 100bp” indicam o marcador de peso molecular (100 bp *ladder*, Pharmacia).

Nas Figuras 4 e 5 pode se observar um exemplo do perfil de amplificação, usando o *primer* OPC-11 com a população de cachorro-do-mato e OPA-18 com a população de lobo-guará . O número total de locos para o lobo-guará foi 94, variando de 8 a 14 locos por *primer*, e 106 para o cachorro-do-mato, variando de 10 a 15 locos por *primer* (Tabela 3). Entre os 94 locos observados para o lobo-guará , 64% foram polimórficos, e entre os 106 locos para o cachorro-do-mato, 78% foram polimórficos (Tabela 3). Em média, o número total de locos e número de locos polimórficos por *primer* foi maior no cachorro-do-mato do que no lobo-guará (Tabela 3).

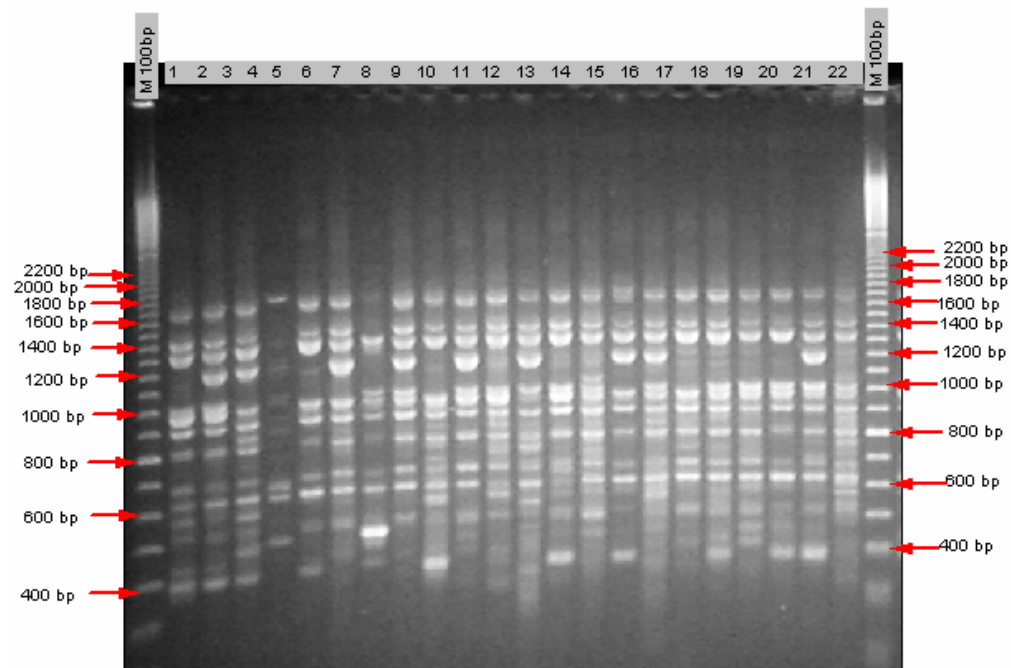


Figura 4- Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados utilizando o *primer* OPC-11 com alguns indivíduos da população de cachorro-do-mato. As colunas M 100bp, indicam o marcador de peso molecular (100 bp *ladder*, Pharmacia).

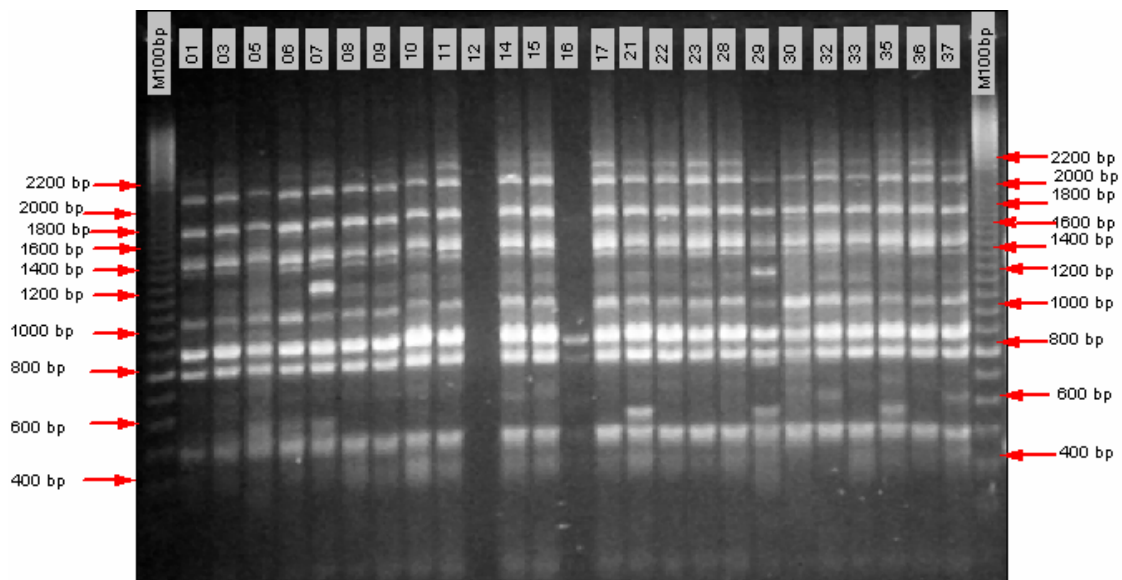


Figura 5- Perfil eletroforético dos fragmentos RAPD amplificados utilizando o *primer* OPA-18 com alguns indivíduos da população de lobo-guará . As colunas M 100bp, indicam o marcador de peso molecular (100 bp *ladder*, Pharmacia).

Tabela 3- Relação do número de locos e do número de locos polimórficos, por *primer*, em amostras de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*).

<i>Primer</i>	Número de Locos		Número de Locos Polimórficos (%)	
	Cb	Ct	Cb	Ct
OPH-04	14	11	12 (86)	10 (91)
OPH-19	8	11	5 (62)	7 (64)
OPP-07	9	10	6 (67)	7 (70)
OPP-08	9	12	6 (67)	10 (83)
OPP-09	8	11	6 (75)	10 (91)
OPP-15	10	12	6 (60)	8 (67)
OPC-11	13	15	5 (38)	14 (93)
OPC-05	12	13	8 (67)	13 (100)
OPA-18	11	11	6 (55)	8 (73)
TOTAL	94	106	60 (64)	78 (74)
Média	10,44	11,77	6,70	9,7
DP	2,18	1,48	2,18	2,5

Cb = *Chrysocyon brachyurus*; *Ct* = *Cerdocyon thous*; *DP* = *Desvio Padrão*.

O índice de similaridade de Jaccard, entre os pares de indivíduos, variou de 0,36 a 0,97 para a população de lobo-guará, e 0,35 a 0,91 para a população de cachorro-do-mato. Em média, a similaridade genética foi ligeiramente maior na população de lobo-guará (0,75) do que na população de cachorro-do-mato (0,68) (Figura 6).

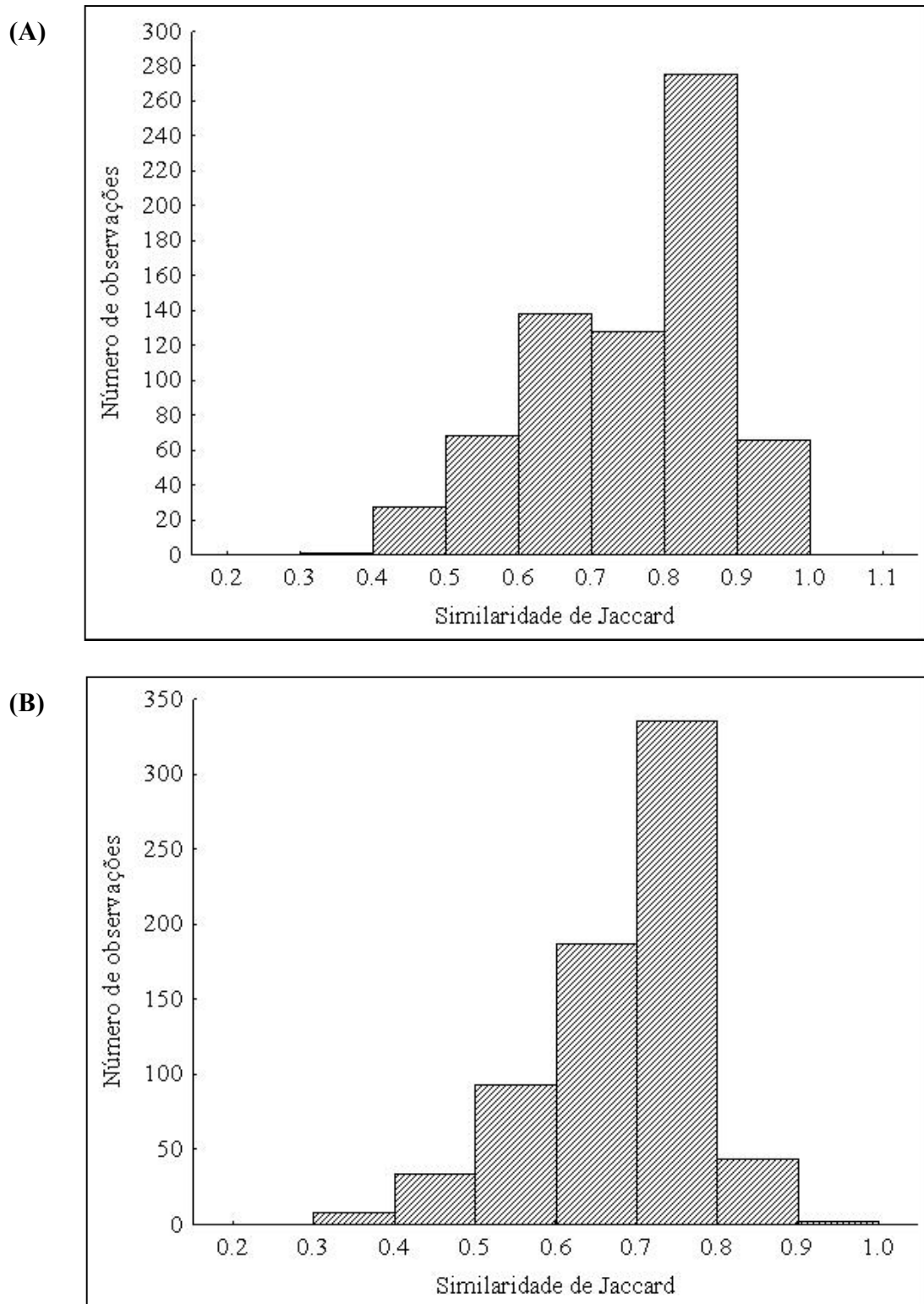


Figura 6- Distribuição das similaridades de Jaccard, obtidas a partir dos dados RAPD para as duas espécies estudadas, lobo-guará (A) e cachorro-do-mato (B).

Dados STR

Um total de 29 marcadores STR desenvolvidos originalmente para búfalos, bovinos, cachorro doméstico e gato doméstico (Barker *et al.*, 1997, Cãnon *et al.*, 2001, Denise *et al.*, 2004, Fries *et al.*, 1993, Halverson *et al.*, 1995, Kapes *et al.*, 1997, Menotti-Raymond *et al.*, 1999, Sunden *et al.*, 1993) foram testados e destes, seis *primers* (21%), amplificaram nas duas espécies estudadas (ver Capítulo 1).

As frequências alélicas estimadas nas duas espécies são apresentadas nas Figuras 7 e 8. O número de alelos encontrados por loco foi semelhante nas duas espécies, com exceção do loco PEZ-12, para o qual a população de cachorro-do-mato apresentou 12 alelos (Figura 7) enquanto que, na população de lobo-guará apenas dois alelos foram observados (Figura 8).

A média do número de alelos por loco foi de 7,8 na população de cachorro-do-mato e 4,5 na população de lobo-guará, sendo o máximo de alelos observados igual a 14 (PEZ-13 no cachorro-do-mato) e o mínimo igual a um (CSSM-038 nas duas populações). Os Locos PEZ-05 e PEZ-12 representam bem a variabilidade alélica existente entre as duas espécies (Figuras 9 e 10). Enquanto que o primeiro loco apresentou uma pequena variação (seis alelos no cachorro-do-mato e cinco alelos no lobo-guará), no segundo loco, a variação foi maior, tendo sido detectados 12 alelos no cachorro-do-mato e apenas dois alelos na população de lobo-guará.

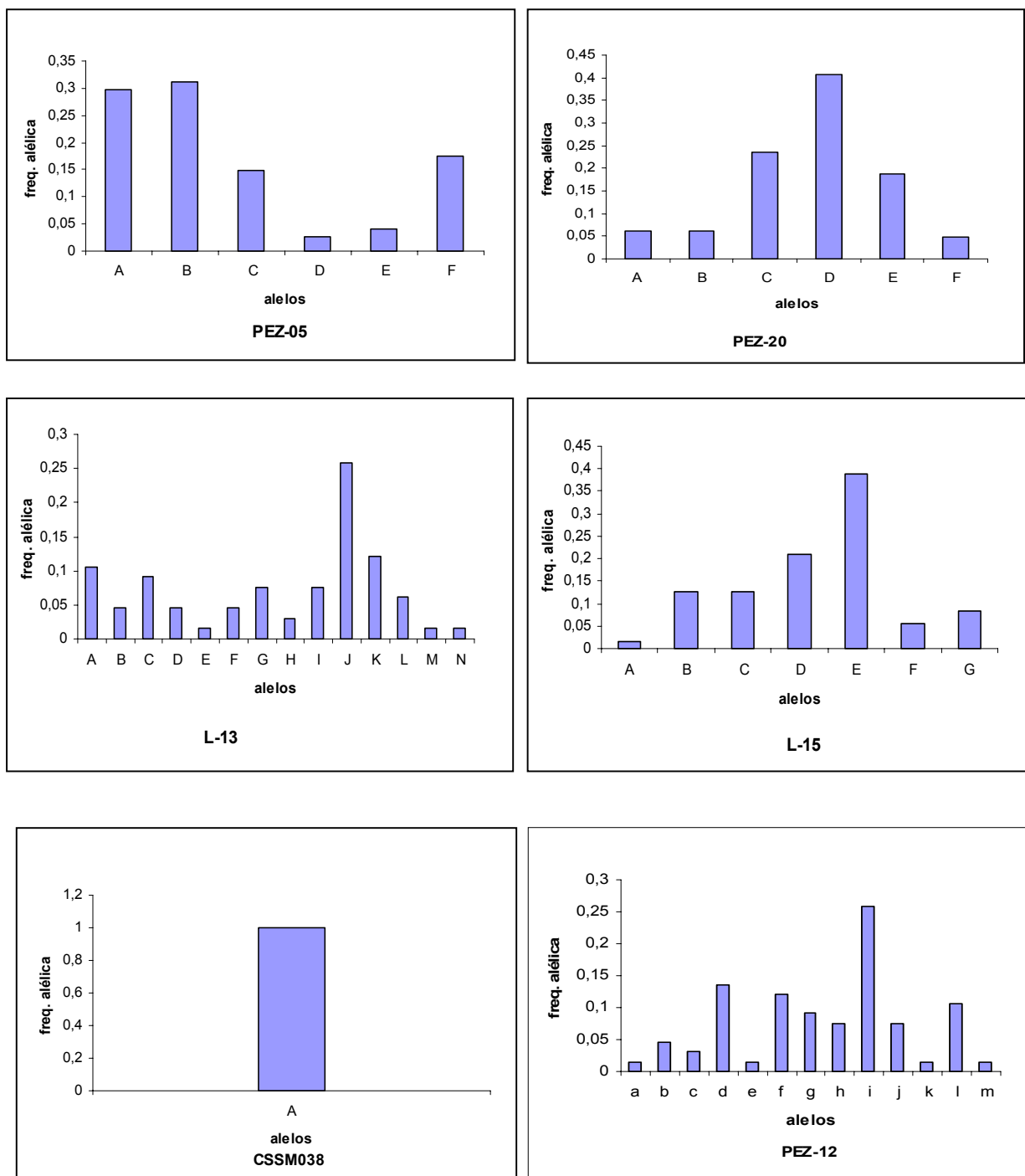


Figura 7- Frequências alélicas dos seis locos STR, PEZ-05, PEZ-20, PEZ-13 (L-13), PEZ-15 (L-15), CSSM-038 e PEZ-12, estimadas a partir de 38 indivíduos da população de cachorro-do-mato.

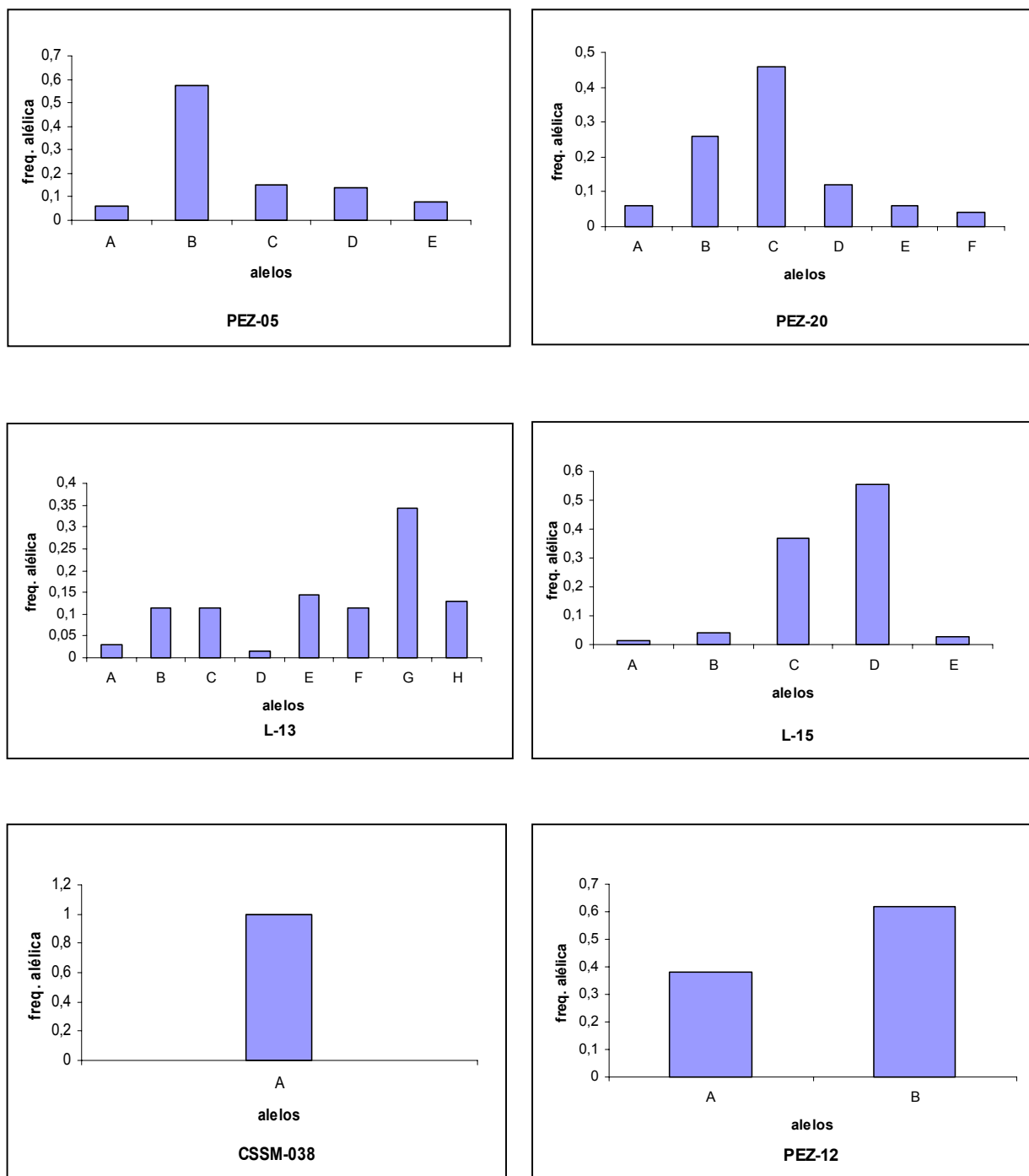


Figura 8- Frequências alélicas dos seis locos STR, PEZ-05, PEZ-20, PEZ-13 (L-13), PEZ-15 (L-15), CSSM-038 e PEZ-12, estimadas a partir de 38 indivíduos da população de lobo-guará .

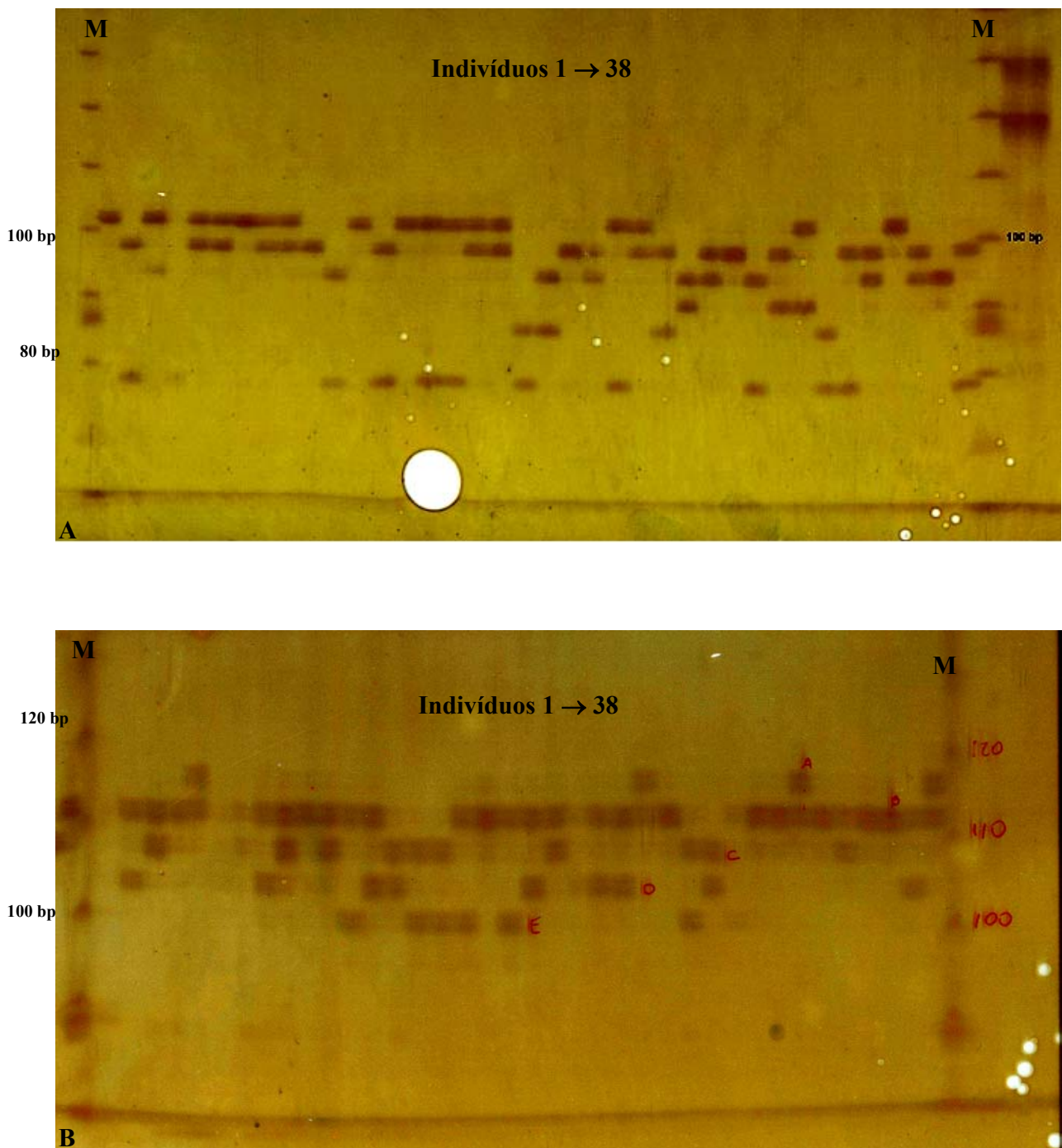


Figura 9- Perfil eletroforético de um gel de poliacrilamida com marcadores STR, utilizando o *primer* PEZ-05 com as duas populações analisadas: A = cachorro-do-mato e B = lobo-guará . M indica o padrão de peso molecular 10 bp *ladder*, Pharmacia.

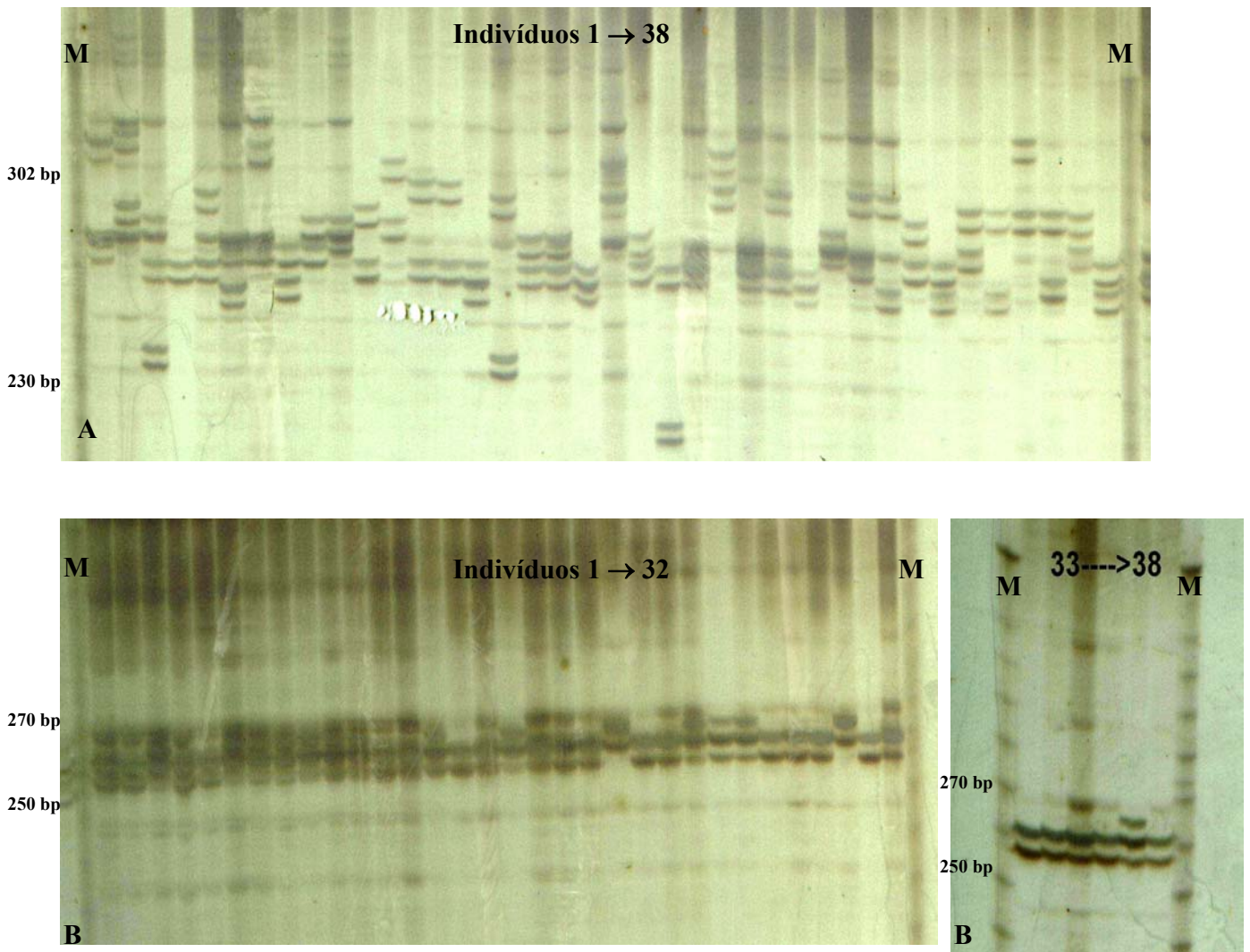


Figura 10- Perfil eletroforético de um gel de poliacrilamida com marcadores STR, utilizando o *primer* PEZ-12 com as duas populações analisadas: A = cachorro-do-mato e B = lobo-guará . M indica o padrão de peso molecular 10 bp *ladder*, Pharmacia.

Os principais índices de diversidade gênica por loco, bem como as heterozigosidades observadas e esperadas e o índice de fixação, são apresentados na Tabela 4. Desconsiderando o *primer* CSSM-038, que foi monomórfico nas duas populações, a heterozigosidade observada variou de 0,697 a 0,909, na população do cachorro-do-mato e de 0,553 a 0,914 na população de lobo-guará . Já para a heterozigosidade esperada, a variação foi de 0,746 a 0,890 e 0,478 a 0,817 nas populações de cachorro-do-mato e lobo-guará , respectivamente. O índice de fixação

estimado em cada espécie através das heterozigosidades (H_o e H_e) em média foi igual a 0,032 no cachorro-do-mato e -0,091 no lobo-guará, mas com grande variação entre os locos (Tabela 4).

Tabela 4- Estimativas de parâmetros de diversidade genética nas duas populações: cachorro-do-mato (Ct) e lobo-guará (Cb), incluindo o Número de alelos observados (N_a), Número efetivo de alelos (N_e), Heterozigosidade observada (H_o), Heterozigosidade esperada (H_e) e o Índice de fixação ou Coeficiente de Endogamia (F).

Locos	Na		Ne		H _o		H _e		F	
	Ct	Cb	Ct	Cb	Ct	Cb	Ct	Cb	Ct	Cb
PEZ-05	6	5	4,2	2,6	0,757	0,697	0,770	0,627	0,004	-0,129
PEZ-20	6	6	3,8	3,3	0,813	0,560	0,746	0,712	-0,011	0,197
PEZ-13	14	8	8,1	5,1	0,697	0,914	0,890	0,817	0,205	-0,135
PEZ-15	7	5	4,2	2,3	0,750	0,553	0,775	0,564	0,018	0,007
CSSM-038	1	1	1	1	0,000	0,000	0,000	0,000	----	----
PEZ-12	13	2	7,2	1,9	0,909	0,658	0,876	0,478	-0,055	-0,394
Média	7,8	4,5	4,7	2,7	0,654	0,564	0,676	0,533	0,032	-0,091
DP	4,9	2,6	2,6	1,4	0,3	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2

DP = Desvio padrão.

Através do Teste Exato de Fisher verificou-se que, para a maioria dos locos estudados, as duas populações se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do PEZ-13 na população de cachorro-do-mato, e do PEZ-12 na população de lobo-guará (Tabela 5). Portanto, na população de cachorro-do-mato existe uma deficiência de heterozigotos em relação ao PEZ-13 e um excesso de heterozigotos na população de lobo-guará, em relação ao PEZ-12.

Tabela 5- Probabilidades do Teste Exato de Fisher para aderência ao equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Locos	Cachorro-do-Mato	Lobo-Guará
PEZ-05	0,4913	0,4422
PEZ-20	0,5534	0,2679
PEZ-13	0,0000	0,8984
PEZ-15	0,6062	0,9376
CSSM-038	----	----
PEZ-12	0,6056	0,0343

Correlação entre as similaridades genéticas obtidas pelo RAPD e STR

O teste de Mantel mostrou que as correlações entre as similaridades genéticas obtidas a partir dos dados RAPD e dos dados STR foram significativas, porém com valores de r de Pearson muito baixos, evidenciando que os dois marcadores avaliam as relações existentes entre os indivíduos de forma diferente (Tabela 6).

Tabela 6- Valores da correlação matricial (r) e o nível de significância (P) obtido a partir do Teste de Mantel, associando a similaridade genética obtida a partir dos dados RAPD e dados STR nas duas populações.

População	r	P
lobo-guará	0,2422	0,0056
cachorro-do-mato	0,2465	0,0126

DISCUSSÃO

Variabilidade Genética nas duas espécies estudadas

A interferência do Homem tem levado a um aumento significativo do isolamento de populações naturais e, conseqüentemente, à perda de diversidade genética (Ceballos e Ehrlich, 2002; Frankhan, 1995). Portanto, a estimativa da diversidade genética em populações naturais, principalmente naquelas que são consideradas vulneráveis à extinção, como o lobo-guará (IUCN, 2004), é essencial no que diz respeito à adoção de estratégias adequadas de manejo e conservação de espécies. Vários estudos utilizando marcadores moleculares, como o RAPD e STR, têm mostrado que estes são ferramentas bastante eficientes para monitorar a variabilidade genética das populações (Klukowska *et al.*, 2003; Parker *et al.*, 1998; Wandeler *et al.*, 2003).

Neste estudo pode-se observar que a amplitude de variação na similaridade genética obtida com os dados RAPD foi muito próxima nas duas espécies estudadas, com valores de similaridade de Jaccard variando de 0,36 a 0,97 no lobo-guará e entre 0,35 a 0,91 no cachorro-do-mato. Porém, mesmo que a diferença tenha sido pequena, um maior número de indivíduos com alto índice de similaridade genética (entre 0,8 e 0,9) foi observado na população de lobo-guará (Figura 6). Este resultado é esperado, uma vez que densidade populacional do lobo-guará é presumivelmente menor do que a do cachorro-do-mato, o que limita o fluxo gênico entre os indivíduos, favorecendo a maior semelhança entre os mesmos. Por outro lado, na população de cachorro-do-mato, que é uma espécie muito comum e abundante em todo o bioma cerrado e no Parque Nacional das Emas, a proporção de indivíduos com alta similaridade foi menor e foram observados índices menores do que na população de lobo-guará (Figura 6).

A diversidade genética obtida com os dados de STR, apresentou um nível relativamente alto de multialelismo nos seis locos analisados, confirmando o elevado conteúdo de informação genética esperado para este tipo de marcador. Para a população de lobo-guará a média foi igual 4,5 alelos por loco e, se desconsiderarmos o loco CSSM-038, (que foi monomórfico), essa média

aumenta para 5,2 alelos por loco. Esse valor foi maior do que o encontrado por De Mattos *et al.*, (2004) em um estudo similar com o lobo-guará, onde a média de alelos por loco foi igual a 1,2, porém utilizando marcadores isoenzimáticos. A média de heterozigosidade observada também foi maior neste estudo, 56,4% do que a encontrada no estudo de De Mattos *et al.*, (2004) que foi igual a 5,7% e bem maior do que a encontrada no estudo de Rodrigues (2002), que foi igual a 1,4%, ambos utilizando marcadores isoenzimáticos. Percebe-se que a escolha do marcador é bastante crítica para avaliar o nível de variabilidade genética pois, os marcadores isoenzimáticos evoluem mais lentamente. Portanto, em estudos em nível de população e/ou indivíduos, é esperada pouca variabilidade e uma saturação de plesimorfias nos dados obtidos com isoenzimas, ou seja, as semelhanças observadas são devidas a ancestralidade dos alelos e não há eventos novos o bastante para discriminar os indivíduos estudados (Sole-Cava, 2001).

Quando se compara as estimativas de diversidade genética obtidas neste estudo com vários estudos com populações de canídeos levantados da literatura, usando diferentes tipos de marcadores moleculares (Microssatélites, M; Isoenzimas, I e Polimorfismos de Simples Nucleotídeos, SNP), percebe-se uma grande semelhança entre estes resultados e os obtidos neste trabalho (Tabela 7). Tanto o número médio de alelos por locos, como as heterozigosidades esperadas e observadas e o coeficiente de endogamia (F) foram próximos, mesmo levando em consideração os dados dos marcadores isoenzimáticos que tendem a diminuir as estimativas. O número médio de alelos por locos obtidos neste estudo foi de 7,8 para o cachorro-do-mato e 4,5 para a população de lobo-guará, valores muito semelhantes aos apresentados na Tabela 7. Quando considera-se os dados apenas dos marcadores STR, a média de alelos por locos será igual a 4,3, valor bem próximo ao encontrado no lobo-guará. O mesmo ocorreu para os resultados das médias das Heterozigosidades esperadas e observadas (H_e e H_o , respectivamente) e do Índice de Fixação médio (F). Portanto, existe uma grande aproximação dos resultados obtidos,

principalmente para a população de lobo-guará , com os resultados de vários outros estudos com canídeos na literatura (Tabela 7).

Em canídeos, a diversidade genética parece estar relacionada com o tamanho do corpo das espécies, ou seja, em espécies menores, (exceto àquelas que estão ameaçadas de extinção), a diversidade genética tende a ser maior do que em espécies maiores (Wayne, 1996). Esse padrão pode ser explicado em função da área de ocupação dos indivíduos, onde espécies maiores terão conseqüentemente uma área de vida mais restrita e portanto, uma menor diversidade genética em decorrência do menor fluxo gênico. Considerando os resultados apresentados na Tabela 7 e também os resultados obtidos neste estudo, percebe-se este padrão. Por exemplo, a espécie *Vulpes vulpes* na qual em média o tamanho do corpo é de 40 cm, a diversidade genética média ($H_e = 0,7$) foi maior que a observada no *Canis lupus* (120 cm) que apresentou $H_e = 0,6$ e bem maior que a diversidade genética ($H_e = 0,3$) obtida para a espécie *Cuon alpinus* (90 cm), todos resultados obtidos com marcadores STR (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004) (Tabela 7). Neste trabalho, o cachorro-do-mato é uma espécie menor (em torno de 66 cm) que o lobo-guará (em torno de 105cm) (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004) e apresentou uma maior diversidade genética ($H_e = 0,7$).

O valor médio obtido de F pode ser considerado nulo ou muito baixo nas duas espécies estudadas, indicando que as freqüências alélicas dessas espécies correspondem ao esperado pelo modelo de equilíbrio de Hardy-Weinberg, neste momento. No entanto, o PEZ-13 e o loco PEZ-12, no cachorro-do-mato e no lobo-guará , respectivamente, sugerem uma certa endogamia na primeira e um excesso de heterozigotos na segunda população, significativos no Teste Exato de Fisher. Como dito anteriormente, o cachorro-do-mato é uma espécie que costuma viver em bandos, o que provavelmente favorece o cruzamento entre indivíduos aparentados e pode explicar a endogamia detectada pelo PEZ-13. Já na população de lobo-guará , mesmo sendo uma espécie vulnerável a extinção, ou seja, com um tamanho populacional mais restrito que a do cachorro-do-mato, o excesso de heterozigotos detectado pelo *primer* PEZ-12 pode ser justificados pelo hábito

solitário da espécie, ou seja, os encontros ocorrem apenas no período reprodutivo e também devido às áreas de vida serem grandes, favorecendo encontros aleatórios e não necessariamente entre indivíduos aparentados geneticamente.

Como pode ser observada na Tabela 7, a maioria dos valores de F das populações de canídeos são próximos de zero, o que corrobora os resultados obtidos neste estudo. Uma exceção foi o *Canis lupus*, cuja população de museu apresentou endogamia elevada ($F = 0,183$). No entanto, esse resultado pode ser devido um artefato do próprio processo de amostragem, uma vez que nas outras populações os valores de F foram próximos de zero (Vilà *et al.*, 2002). E para a espécie *Vulpes vulpes* pode se observar um excesso de heterozigotos ($F = -0,24$) na população urbana do oeste e endogamia ($F = 0,10$) na população urbana do leste (Wandeler *et al.*, 2003). Neste caso, a redução no tamanho das populações devido, por exemplo à fragmentação de habitats, poderia explicar esses resultados.

Tabela 7- Estimativas de diversidade genética de várias populações de canídeos, usando diferentes tipos de Marcadores Moleculares, incluindo o número médio de alelos por locos (N_a), Heterozigosidade esperada (H_e) Heterozigosidade observada (H_o), Índice de Fixação (F), tipo de marcador e fonte.

População	N_a	H_e	H_o	F	Marcador	Fonte
<i>Canis lupus</i>						
Alaska a Quebec	4,5	0,62	----	----	M	Wayne, 1996
México	2,7	0,42	----	----		
<i>Canis lupus</i>						
Escandinávia	----	0,36	0,35	0,027	SNP	Seddon <i>et al.</i> , 2005
Finlândia	----	0,34	0,31	0,088		
<i>Canis lupus</i>						
Escandinávia	3,8	0,55	0,59	-0,072	M	Vilà <i>et al.</i> , 2002
Finlândia e Rússia	8,0	0,77	0,70	0,090		
Amostras de museu	5,7	0,71	0,58	0,183		
<i>Canis latrans</i>						
Alaska	5,9	0,68	----	----	M	Wayne, 1996
<i>Canis rufus</i>						
Cativeiro	5,3	0,55	----	----	M	Wayne, 1996
<i>Canis aureus</i>						
Kenya	4,8	0,52	----	----	M	Wayne, 1996

Tabela 7 (Continuação).

População	Na	H _e	H _o	F	Marcador	Fonte
<i>Canis mesomelas</i>						
Kenya	5,0	0,67	----	----	M	Wayne, 1996
<i>Canis Simensis</i>						
Etiópia	2,4	0,24	----	----	M	Wayne, 1996
<i>Lycaon pictus</i>						
Leste da África	3,3	0,54	----	----	M	Wayne, 1996
Sul da África	3,5	0,56	----	----		
Botswana	3,6	0,59	----	----		
<i>Urocyon littoralis</i>						
San Miguel	1,1	0,01	----	----	I	Wayne, 1996
Santa Rosa	1,2	0,06	----	----		
Santa Cruz	1,1	0,04	----	----		
San Nicolas	1,0	0,00	----	----		
Santa Catalina	1,0	0,00	----	----		
San Clemente	1,1	0,01	----	----		
<i>Urocyon littoralis</i>						
San Miguel	1,8	0,20	----	----	M	Wayne, 1996
Santa Rosa	2,1	0,29	----	----		
Santa Cruz	2,4	0,31	----	----		
San Nicolas	1,0	0,00	----	----		
Santa Catalina	2,6	0,36	----	----		
San Clemente	2,4	0,29	----	----		
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>						
Continente Norte					I	Wayne, 1996
Americano	1,4	0,10	----	----		
<i>Urocyon cinereoargenteus</i>						
Continente Norte					M	Wayne, 1996
Americano	6,1	0,69	----	----		
<i>Cuon alpinus</i>						
Sul da Índia	3,8	0,52	0,54	-0,038	M	Iyengar <i>et al.</i> , 2005
Leste da Indonésia	1,4	0,15	0,14	0,066		
<i>Vulpes vulpes</i>						
Urbana do Leste	6,6	0,70	0,63	0,100	M	Wandeler <i>et al.</i> , 2003
Urbana do Oeste	5,4	0,54	0,67	-0,240		
Rural do Leste	6,9	0,75	0,68	0,093		
Rural do Oeste	7,0	0,75	0,71	0,053		
Rural do Norte	7,2	0,76	0,73	0,039		
<i>Crysocyon brachyurus</i>						
Nordeste de SP	1,2	0,055	0,06	-0,035	I	De Mattos <i>et al.</i> , 2004
Média	3,55	0,40	0,51	0,027		
DP	2,18	0,27	0,22	0,10	----	----

DP = Desvio Padrão; M = Microssatélites; I = Isoenzima; SNP = Polimorfismo de Simples Nucleotídeos.

A alta diversidade genética encontrada nas duas espécies estudadas (lobo-guará e cachorro-do-mato) pode ser função tanto de eventos históricos como de processos evolutivos

recentes. Como pouco se sabe sobre a história evolutiva das espécies aqui estudadas, as explicações para os altos níveis de diversidade genética se assentam em inferências. Por exemplo, uma explicação para a alta diversidade genética tanto no lobo-guará como no cachorro-do-mato é que ambas são espécies altamente dispersivas, com áreas de vida grandes (ver capítulo 3) e portanto, com níveis menores de estruturação populacional do que animais sedentários. Uma outra situação que poderia ser avaliada em estudos futuros nestas duas espécies, principalmente no lobo-guará, é a possibilidade de que o excesso de heterozigotos seja uma consequência do processo de deriva genética recente, ou seja, em uma população recentemente reduzida, cuja diversidade genética observada será maior que a esperada em equilíbrio (Luikart e Cornuet, 1998). É importante a identificação de populações que foram submetidas a uma redução drástica do seu tamanho populacional. Assim sendo, será maior a probabilidade de que os possíveis efeitos deletérios sejam evitados ou minimizados, através de procedimentos mitigadores de manejo, como por exemplo a preservação adequada da área de ocupação da espécie, como a criação de corredores ecológicos favorecendo um maior fluxo gênico entre populações vizinhas (Luikart *et al.*, 1998).

Outro aspecto importante a ser considerado é que esta alta diversidade genética encontrada nas duas espécies foi baseada em marcadores considerados neutros (RAPD e STR). Porém, em termos de variabilidade adaptativa e deletéria, que são difíceis de mensurar, a variabilidade genética nestas espécies pode ser baixa (Hedrick, 2001). No entanto, seria interessante em outros estudos quantificar a extensão do efeito evolutivo que se detecta com marcadores neutros e assim avaliar se é provável que esta alta diversidade tenha consequências biológicas importantes, ou se é devido simplesmente ao alto poder estatístico desses marcadores. Hedrick (2001), descreve alguns estágios possíveis de associação da significância estatística dos marcadores moleculares neutros e a importância biológica detectada por estes. Pode acontecer de não haver diferenças biológicas importantes e não haver significância estatística ou haver uma

diferença estatisticamente significativa entre os indivíduos, refletindo uma diferença biológica importante. Neste caso, as estatísticas baseadas nestes marcadores moleculares resultam em uma apropriada avaliação da real situação biológica das espécies (Hedrick, 2001). Porém, os problemas aparecem quando a significância estatística não reflete a insignificância biológica, ou vice versa. Por exemplo, pode ocorrer do marcador neutro não detectar significância estatística entre indivíduos com uma diferença biológica importante, devido à ocorrência de alto fluxo gênico ou fortes forças seletivas. Portanto, a interpretação dos resultados de marcadores altamente variáveis, como os estudados neste trabalho (STR's), deve ser realizada com algumas precauções, pois as diferenças estatisticamente significantes podem deixar de refletir diferenças biologicamente importantes (Balloux *et al.*, 2000; Hedrick, 2001; Hedrick, 1999).

Comparação entre os Marcadores RAPD e STR

Existem certas dificuldades em adotar as técnicas moleculares mais eficientes, do ponto de vista evolutivo, a fim de mensurar a diversidade genética das espécies. Por exemplo, sabe-se que os marcadores STR e RAPD evoluem rapidamente, portanto são mais úteis para estimativas de diversidade genética em nível de indivíduos, famílias e populações, enquanto que marcadores que evoluem mais lentamente, como as Isoenzimas, são melhores utilizados no estudo de espécies ou táxons supra-específicos. No caso dos marcadores RAPD, em termos de custo, especificidade do *primer*, quantidade de amostra (DNA) e tempo despendido no procedimento, é uma técnica mais simples, o que facilita o estudo. No entanto, o caráter dominante do marcador limita o seu uso na estimativa dos parâmetros genéticos. Há alguns trabalhos que também discutem a baixa repetência do RAPD, devido a sensibilidade da técnica à fatores como qualidade e concentração do DNA (Ellsworth *et al.*, 1993).

Os marcadores STR constituem uma poderosa ferramenta para este nível de estudo, ou seja, a detecção da diversidade genética em nível de populações. No entanto, o alto custo e tempo

gastos no desenvolvimento de *primers* específicos dificultam bastante o uso dos mesmos. Porém, diversos estudos têm mostrado a possibilidade de amplificação cruzada entre diferentes espécies e gêneros (Cipriani *et al.*, 1999; Colevati *et al.*, 1999; Roa *et al.*, 2000; Tong *et al.*, 2002; Williamson *et al.*, 2002; Zucchi *et al.*, 2002, ver capítulo 1). Outro aspecto importante do marcador STR é a alta taxa de mutação quando comparada com outros marcadores dentro do mesmo genoma, que são causadas primariamente por alterações no comprimento das unidades de repetição. Esta alta taxa de mutação constitui, por outro lado, uma limitação do marcador, pois pode aumentar substancialmente o poder estatístico do marcador e superestimar o nível de diversidade genética entre os indivíduos de uma população com baixas diferenças biológicas importantes (Hedrick, 2001). Pode-se, portanto, fazer suposições enganadas de medidas de conservação das espécies estudadas. Por exemplo, no caso de uma população apresentar alta diversidade genética (detectada pelos marcadores RAPD ou STR's) pode-se inferir que esta população num dado momento não necessita de intervenções para fins de manejo e conservação adequados. No entanto, pode existir uma alta proporção de alelos deletérios “escondidos” nos indivíduos heterozigotos ou uma baixa variabilidade adaptativa que não são detectados por estes marcadores. Portanto, esses resultados podem afetar a tomada de decisões a cerca do manejo e conservação das espécies.

Neste estudo, foram utilizados os dois marcadores, RAPD e STR, na análise da variabilidade genética em duas espécies de canídeos do cerrado, para em seguida comparar a informação gerada por cada um destes marcadores. Estudos que realizaram uma comparação direta entre dados gerados por RAPD e STR em espécies animais são limitados. Entretanto, pode ser bastante interessante realizar esta comparação a fim de enriquecer as informações geradas por cada técnica.

Neste estudo, o teste de Mantel mostrou baixas correlações significativas (em torno de 0,24) entre as similaridades genéticas obtidas com RAPD e STR, o que pode ser parcialmente

explicado pela base molecular diferente dos dois marcadores. Alguns eventos genéticos, tais como recombinação e inserção, não influenciam no polimorfismo gerado pelos marcadores STR (Mengoni *et al.*, 2000). Ao contrário, a variação observada por meio do RAPD reside em muitos tipos diferentes de eventos mutacionais, com diferentes implicações evolutivas que ocorrem no local de anelamento do *primer* e entre os dois locais adjacentes responsáveis pela amplificação (Mengoni *et al.*, 2000). Ou seja, os dois marcadores detectaram alta diversidade genética nas duas espécies estudadas, no entanto de maneiras diferentes, ou seja, baseado em informações genéticas de regiões diferentes do genoma e que provavelmente terá implicações evolutivas diferentes. No caso dos marcadores RAPD, as regiões amplificadas são desconhecidas, ou seja, não se sabe se trata de regiões codificantes ou não do genoma, havendo vários estudos que discutem esta questão. Mas, de um modo geral esses marcadores são classificados como neutros (Mengoni *et al.*, 2000). Já para os marcadores STR existem numerosos estudos que demonstram uma significância funcional dos mesmos, como por exemplo regulação da recombinação e replicação do DNA, regulação da atividade gênica e do ciclo celular e organização estrutural dos cromossomos (Gur-Arie *et al.*, 2000; King e Soller, 1999; Li *et al.*, 2002).

Uma outra possível explicação para as diferenças observadas neste estudo está no procedimento de análise dos dados gerados pelos marcadores STR como caracteres simples, não permitindo um tratamento de acordo com o modelo mutacional *stepwise*, usado para estes marcadores, onde a mutação para um novo alelo de um determinado marcador STR ocorre em passos, assim alelos com tamanhos mais próximos são considerados mais similares do que alelos com tamanhos mais distantes (Mengoni *et al.*, 2000).

Vários outros estudos confirmam essa baixa correlação entre os dados gerados por RAPD e STR (Mengoni *et al.*, 2000; Pejic *et al.*, 1998; Powell *et al.*, 1996; Russell *et al.*, 1997). Porém alguns estudos mostram que a combinação dos dois marcadores foi eficiente para demonstrar o relacionamento esperado entre variedades de Alfafa (*Medicago sativa*) (Mengoni *et al.*, 2000).

Portanto, a combinação dessas duas tecnologias pode ser vantajosa para elucidar relacionamentos genéticos entre populações naturais, principalmente em estudos que consideram escalas menores de relacionamento entre indivíduos, como este estudo entre variedades de Alfafa.

Estratégias de Conservação e Manejo

A melhor estratégia para proteção em longo prazo da diversidade biológica é a preservação de populações no ambiente selvagem (preservação *in situ*) (Primack e Rodrigues, 2001). No entanto, para espécies que exigem grandes áreas de vida, como as estudadas aqui, uma maneira alternativa para evitar que estas sejam extintas, são programas de criação em cativeiro, ou ainda o monitoramento intensivo destas espécies em pequenas áreas protegidas conectadas com corredores de dispersão, que são faixas de habitats que ligam dois ou mais fragmentos (Rodrigues, 2002). O lobo-guará é uma espécie de difícil manutenção em cativeiro (Primack e Rodrigues, 2001), de modo que a preservação da área ocupada por esta espécie parece ser a única alternativa eficiente para sua conservação.

As duas espécies aqui estudadas distribuem-se amplamente pelos cerrados brasileiros (Sillero-Zubiri *et al.*, 2004). A principal causa do declínio das populações destas espécies, principalmente do lobo-guará, é a redução drástica do ambiente em que vivem, sendo que na maioria das vezes suas áreas de distribuição já foi ocupada por empreendimentos agropecuários (Fonseca *et al.*, 1994). A fragmentação de habitats é hoje uma das maiores ameaças à diversidade biológica, tanto pela redução dos ambientes naturais como pela divisão dos habitats remanescentes em fragmentos menores (Meffe e Carroll, 1997; Soulé e Kohm, 1989). No caso do lobo-guará, além das ameaças inerentes ao pequeno tamanho populacional, devido a fatores demográficos e genéticos, esta espécie está sujeita a outras ameaças externas, que são importantes causas de mortalidade e conseqüentemente diminuição do tamanho populacional. Essas ameaças

incluem atropelamentos, abates por chacareiros do entorno da área de ocupação da espécie e a introdução de espécies exóticas, patógenos e parasitas.

Os canídeos estão entre os mamíferos que mais sofrem com atropelamentos (Rodrigues, 2002; Silveira, 1999; Vieira, 1996). Vários estudos identificam os atropelamentos como a principal causa de mortalidade de Lobos Guarás, e possivelmente do cachorro-do-mato (Silveira, 1999; Silva *et al.*, 2000; Rocha *et al.*, 2004). A grande mobilidade destas espécies e o comportamento de comer carcaças de outros animais atropelados, aliado ao excesso de velocidade dos motoristas, justifica essa alta suscetibilidade. Rodrigues (2002) encontrou em seu estudo na Estação Ecológica de Águas Emendadas-DF, uma média de 4,5 atropelamentos de Lobos Guarás por ano, sendo que essa média pode estar subestimada, pois alguns indivíduos atropelados podem conseguir sair da estrada e mover para dentro da reserva sem serem detectados. A solução para os problemas de atropelamentos em unidades de conservação envolve vários segmentos da sociedade, desde o governo à própria população. As principais medidas a serem adotadas para a redução das mortes por atropelamentos são: redução do limite de velocidade permitida nos limites com as reservas, instalação de meios de controle desta velocidade, como radares, limpeza periódica da beira da estrada possibilitando uma melhor visibilidade dos animais e dos motoristas e campanhas de educação dos motoristas e da comunidade do entorno, etc (Rodrigues, 2002; Silveira, 1999).

Vários estudos também mostram que os Lobos Guarás são mortos por chacareiros nos limites das reservas, por predarem animais domésticos, porém parece que esta causa de mortalidade é menos importante que os atropelamentos (Rodrigues, 2002; Silveira, 1999). No entanto, é necessário instituir um plano de Educação Ambiental na região a fim de mostrar a importância destas espécies para os ecossistemas e para o ser humano.

A invasão de animais domésticos, principalmente cachorros, é outra fonte de risco de mortalidade destas espécies. Segundo Primack e Rodrigues (2001), a introdução de espécies

exóticas é uma séria ameaça à vida silvestre e tem levado várias espécies nativas a extinção. No caso do cachorro doméstico, ele interage com espécies nativas, como o lobo-guará e o cachorro-do-mato, através da predação, competição por recursos limitados e introdução de doenças (Primack e Rodrigues, 2001; Rodrigues, 2002). Marinho-Filho *et al.*, (1998), relatou vários casos de ataques de matilhas a animais silvestres na Estação Ecológica de Águas Emendadas-DF. Em outros estudos foi observada a competição entre canídeos domésticos e lobos (*Canis lupus*), que poderia estar relacionada a causas de extinção destas populações (Boitani e Ciucci, 1995; Mendelsohn, 1983). Rodrigues (2002), indica que uma possível solução para a minimização dos problemas causados pela introdução de cachorros domésticos em áreas protegidas seria a esterilização em massa desses cães domésticos, mas que provavelmente não seria facilmente aceita pela população humana. Uma outra solução alternativa seria instituir um programa de vacinação e acompanhamento sanitários dos animais, a fim de minimizar os efeitos da transmissão de doenças letais que também ocorrem freqüentemente (Primack e Rodrigues, 2001).

Se levado em consideração os parâmetros genéticos estimados no presente trabalho (alta diversidade genética nas duas espécies estudadas), é interessante considerar a questão da validade e necessidade de se realizar translocações de animais com o objetivo de elevar a diversidade genética. Existem estudos (Campbell, 1980) que mostram os efeitos negativos dos translocações, como por exemplo à impossibilidade de adaptação dos animais ao local que foram introduzidos, a diluição da freqüência de genes adaptados, introdução de doenças, etc (Hedrick, 2001). Rodrigues (2002) testou o translocação de três Lobos Guarás na Estação Ecológica de Águas Emendada-DF e após poucos dias, nenhum dos indivíduos foi registrado na área. Assim sendo, a translocação de animais em função principalmente de seus pontos negativos parece não ser uma ferramenta de manejo efetiva. Como os dados obtidos neste trabalho não indicam uma significativa redução na variabilidade genética e nem endogamia elevada, talvez esta estratégia

não seja necessária para estas espécies no PNE, pelo menos no sentido de ampliar a variabilidade genética existente atualmente.

Contudo, o maior impacto humano nas populações de canídeos silvestres, é a redução e fragmentação de habitats causados principalmente pelo avanço das fronteiras agrícolas que não tem demonstrado uma preocupação como o desenvolvimento sustentável da região. São nítidos os efeitos ecológicos e genéticos da fragmentação de habitats e estes devem ser estudados para serem incorporados em planejamentos de manejos de espécies ameaçadas (ver capítulo 4). Por exemplo, a conectividade entre reservas é um fator importante a ser manejada, pois pequenas populações têm alta probabilidade de extinção. Mas, se este fator for contrabalançado por recolonização de subpopulações existentes em um sistema de áreas protegidas (ligar o Parque Nacional das Emas a outras reservas) a metapopulação poderá existir por muito mais tempo (Meffe e Carroll, 1997). Neste sentido, fica clara a grande necessidade de se desenvolver estudos mais específicos sobre a ecologia e principalmente sobre o padrão de dispersão destas espécies, aliado a uma educação ambiental eficiente das populações do entorno do PNE, para que estratégias de conservação sejam mais bem estabelecidas.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Genética e Melhoramento da Universidade Católica de Goiás – UCG, Gabriela C. Pádua, Nicole C. L. Dutra, Prof. Dr. Breno de Faria e Vasconcellos, Lorena L. de Souza, Luciana M. Bossois e os demais estagiários que nos ajudaram nas análises genéticas. A todo o pessoal do Parque Nacional das Emas - PNE, principalmente os estagiários que realizaram os trabalhos de campo. Ao CNPq pelo financiamento de nossas pesquisas dentro do programa PRONEX para análise de áreas prioritárias para conservação da biodiversidade no Cerrado e em Goiás. (CNPq/SECTEC-GO, Proc. No. 23234156). JAFD-F recebe uma bolsa de Produtividade em Pesquisa nível 1B do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Balloux F, Brunner H, et al., (2000) Microsatellites can be misleading: An empirical and simulation study. *Evolution* 54: 1414-1422.
- Barker JSF, Moore S, Hetzel S, Evan D, Tan SG e Byrne, K (1997) Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and comparison with protein-coding loci. *Animal Genetics* 28: 103-115.
- Bassan BJ, Anollés GCE e Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83.
- Boitani L e Ciucci P (1995) Comparative social ecology of feral dogs and wolves. *Ethology, Ecol. and Evol.* 7: 49-72.
- Bostein D, White RL, Skolnick MH e Davis RW (1980) Construction of genetic map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Human Genet.* 32: 314–331.

- Brondani C, Rangel PHN, Borba TCO e Brondani RPV (2003) Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. *Hereditas* 138: 187-192.
- Campbell S (1980) Is a reintroduction a realistic goal? In: Solé M.E and Wilcox BW (eds) *Conservation Biology: an evolutionary–ecological perspective*. Sinauer Association, Sunderland, 395 pp.
- Cañón J, Alexandrino P, Bessa I *et al.*,(2001) Genetic diversity measures of local European beef cattle breeds for conservation purposes. *Genetics Selection and Evolution* 33: 311–332.
- Ceballos G e Ehrlich PR (2002) Mammal population losses and the extinction crisis. *Science* 296: 904-907.
- Charlesworth B, Sniegowski P e Stephan W (1994) The evolutionary dynamics of repetitive DNA in eukaryotes. *Nature* 371: 215–220
- Cipriani G, Lot G, Huang WG *et al.*,(1999) AC/GT and AG/CT microsatellite repeats in peach [*Prunus persica* (L.) Batsch]: isolation, characterization and cross-species amplification in *Prunus* . *Theoretical Applied Genetics* 99: 65-72.
- Collevatti RG, Brondani RV e Grattapaglia D (1999) Development and characterization of microsatellite markers for genetic analysis of a Brazilian endangered tree species of *Caryocar brasiliense*. *Heredity* 83: 748-756.
- Crow JF e Kimura MA (1970) *An introduction to population genetics theory*. London: Harper Row, 591 pp.
- De Mattos PSR, Del Lama MA, Toppa RH e Schwantes AR (2004) Populational Genetic Structure of free-living maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) determined by proteic markers. *Braz J Biol* 64: 639-644.

- Denise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, Mckenna S, Sharp T e Edwards J (2004) Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. *Animal Genetics* 35: 14–17.
- DeSalle R e Amato G (2004) The expansion of conservation genetics. *Nature* 5: 702-712.
- Ellsworth DL, Rittenhouse KR e Honeycutt RL (1993) Artifactual variation in randomly amplified polymorphic DNA banding patterns. *Biotechniques* 14: 214-217.
- EMBRAPA (2005) Monitoramento por Satélite. Campinas, [S.d.]. Cachorro-do-mato. Disponível em: <http://www.cnpm.embrapa.br/projetos/fauna/mamifero/cac_mato.html>
- Farrel LE, Roman J e Sunquist ME (2000) Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9: 1583-1590.
- Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. EMBRAPA - CENARGEN, Brasília, 220pp.
- Fonseca GAB, Rylands AB, Costa CRM, Machado RB e Leite YLR (1994) Livro Vermelho Dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL e Ostrander EA (1996) A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* 7: 359–62.
- Frankham R (1995) Inbreeding and extinction: a threshold effect. *Conservation Biology* 9: 792-799.
- Frankham R, Ballou JD e Briscoe DA (2002) Introduction to conservation genetics. Cambridge University Press. 640pp.

- Fries R, Eggen A e Womack JE (1993) The bovine genome map. *Mammals Genome* 4: 405-428.
- Gur-Arie R, Cohen CJ, Eitan Y, Shelef L, Hallerman EM e Kashi Y (2000) Simple sequence repeats in *Escherichia coli* : abundance, distribution, composition, and polymorphism. *Gen. Res.* 10: 62-71.
- Halverson J, Dvorak J e Stevenson T (1995) Microsatellite sequences for canine genotyping. US Patent 05874217.
- Hedrick PW (1999) Perspective: Highly variable genetic loci and their interpretation in evolution and conservation. *Evolution* 53: 313-318.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* 16: 629-636.
- Hillis DM, Mable BK e Moritz C (1996) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 655pp.
- IBAMA (2003) Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção. Anexo à Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003, do Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: www.ibama.gov.br.
- Isagi Y e Suhandono S (1997) PCR *primers* amplifying microsatellite loci of *Quercus myrsinifolia* Blume and their conservation between oak species. *Molecular Ecology* 6: 897-899.
- IUCN (2004) 2004 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: www.redlist.org.
- Iyengar A, Babu VN, Hedges S, Venkataraman AB, Maclean N e Morin PA (2005) Phylogeography, genetic structure, and diversity in dhole (*Cuon alpinus*). *Molecular Ecology* 14: 2281-2297.

- Kappes SM, Keele JM, Stone RT, Mc Graw RA, Sonstegard TS, Smith TP, Lopes-Corrales NL e Beattie CW (1997) Second generation linkage map of the bovine genome. *Genome Research* 7: 235-249.
- Karp A, Seberg A e Buiatti M (1996) Molecular techniques in the assessment of botanical diversity. *Annual Botany* 78: 143-149.
- King DG e Soller M (1999) Variation and fidelity: The evolution of simple sequence repeats as functional elements in adjustable genes. In: S.P. Wasser, ed., *Evolutionary Theory and Processes: Modern Perspectives*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, pp. 65-82.
- Klukowska BJ, Strabel, T, Mackowski M e Switonski M (2003) Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *J. Anim. Breed. Genet.* 120: 88-94.
- Kosman E e Leonard KJ (2005) Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Molecular Ecology* 14: 415-424.
- Li YC, Korol AB, Fahima T, Beiles A e Nevo E (2002) Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review. *Molecular Ecology* 11: 2453-2465.
- Luikart G e Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conserv. Biol.* 12: 228-237.
- Luikart G, Allendorf FW, Cornuet JM e Sherwin WB (1998) Distortion of allele frequency distributions provides a test for recent population bottlenecks. *J. Hered.* 89: 238-247.
- Lynch M e Milligan BG (1994) Analysis of population genetic structure with RAPD markers. *Molecular Ecology* 3: 91-99.

- Manel S, Schwartz M, Luikart G e Taberlet P (2003) Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 189–197.
- Manly BFJ (1991) *Randomization and Monte Carlo Methods in Biology*. Chapman and Hall, London.
- Marinho-Filho JS, Rodrigues FHG e Guimarães MM (1998) Mamíferos da Estação Ecológica de Águas Emendadas. 34-63. In: Marinho-Filho, J.S., F.H.G. Rodrigues & M.M. Guimarães (eds.) *Vertebrados da Estação Ecológica de Águas Emendadas*. SEMATEC/IEMA, Brasília, DF.
- McDonald DW e Courtenay O (1996) Enduring social relationship in a population of crab-eating Food habits of two South American canids zorro, *Cerdocyon thous*, in Amazon Brazil. *Journal of Zoology (London)* 239: 329-355.
- Meffe GK e Carroll RC (1997) *Principles of conservation biology*. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- Mendelssohn H (1983) Conservation of the wolf in Israel. *Acta Zoologica Fennica* 174: 281-282.
- Mengoni A, Gori A e Bazzicalupo M (2000) Use of RAPD and microsatellite (SSR) variation to assess genetic relationships among populations of tetraploid alfalfa, *Medicago sativa*. *Plant Breed.* 119: 311–317
- Menotti-Raymond MV, David A, Lyons LA, Schaffer AA, Tomlin JF, Hutton MK e O' Brien SJ (1999) A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57: 9-23.
- Miller MP (1997) Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Disponível em: <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>

- Moran P (2002) Current conservation genetics: building an ecological approach to the synthesis of molecular and quantitative genetic methods. *Northwest Ecology of Freshwater Fish* 11: 30–55.
- Mullis K e Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155: 335-350.
- Neff MW, Broman KW, Mellersh CS, Ray K, Acland GM, Aguirre GD, Ziegler JS, Ostrander EA e Rine J (1999) A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics* 151: 803–820.
- Parker PG, Snow AA, Schug MD, Booton GC e Fuerst PA (1998) What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology* 79: 361–382.
- Peakall R, Gilmore S, Keys W, Morgante M e Rafalski A (1998) Cross species amplification of soybean (*Glycine max*) simple sequence repeats (SSRs) within the genus and other legume genera: implications for the transferability of SSRs in plants. *Molecular Biology and Evolution* 15: 1275–1287.
- Pejic I, Ajmore-Marsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G e Motto M (1998) Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs; RAPDs; SSRs; and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics* 97: 1248-1255.
- Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey P e Rafalsky A (1996) The comparison of RFLP; RAPD; AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Molecular Breeding* 2: 225-238.
- Primack RB e Rodrigues E (2001) *Biologia da conservação*. E. Rodrigues, Londrina, 328 pp.
- Ratnayeke S, Tuskan GA e Pelton MR (2002) Genetic relatedness and female spatial organization in a solitary carnivore, the raccoon, *Procyon lotor*. *Molecular Ecology* 11: 1115-1124.

- Raymond M e Rousset F (1995) Genepop 3.3, population genetics software for exact tests and ecomenicism. *Journal of Heredity* 86: 248–249.
- Roa AC, Chavarriaga-Aguirre P, Duque MC *et al.*,(2000) Cross-species amplification of cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) microsatellites: allelic polymorphism and degree of realtionship. *American Journal of Botany* 87: 1647-1655.
- Rocha VJ, Reis NR e Sekiama ML (2004) Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae) em um fragmento florestal no Paraná Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia* 21: 871-876.
- Rodrigues FHG (2002) Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF. Tese de Doutorado em Ecologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Rohlf FJ (1991) NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Exeter publishing Co., New York.
- Russell RJ, Fuller JD, Macaulay M, Hats BG, Jahoor A, Powell W e Waugh R (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95: 714-722.
- Schonewald-Cox CM, Chambers SM, MacBryde B e Thomas L (1998) Genetics and conservation. Benjamim/Cummings, Menlo Park, California.
- Seddon JM, Parker HG, Ostrander EA e Ellegren H (2005) SNPs in ecological and conservation studies: a test in the Scandinavian wolf population. *Molecular Ecology* 14: 503–511.
- Sillero-Zubiri C, Hoffmann M e Macdonald DW (eds) (2004) Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN/SSC Canid Specialist Group. IUCN, Gland, Switzerland and Cambridge, UK.

- Silva CBX, Nicola PA, Lange RR e Pontes-Filho A (2000) Atropelamentos de Lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) nas rodovias dos Campos Gerais, Palmeira, Ponta Grossa, Paraná. 8º Reunião Anual da SBPN.
- Silveira L (1999) Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, Goiás. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Sneath PHA e Sokal RB (1973) Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. San Francisco: W. H. Freeman.
- Solé-Cava AM (2001) Biodiversidade molecular e Genética da Conservação. In: Matioli, S.R. (ed.) Biologia Molecular e Evolução. Holos Editora, Rio de Janeiro, pp. 172-192.
- Soulé ME e Kohm KA (1989) Research priorities for conservation biology. Island Press, Washington.
- Soulé ME e Wilcox BA (1980) Conservation biology: An evolutionary-ecological perspective. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Sunden SLF, Stone RT, Bishop MD, Kappes SM, Keele JW e Beattie CW (1993) A highly polymorphic bovine microsatellite locus: BM2113. Animal Genetics 24: 69.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. Nucleic Acids Res. 17: 6463-6471.
- Tong J, Wang Z, Yu X, Wu Q, Chu KH (2002) Cross-species amplification in silver carp and bighead carp with microsatellite *primers* of common carp. Molecular Ecology Notes 2: 245-247.
- Vieira EM (1996) Highway mortality of mammals in Central Brazil. Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science 48: 270-272.

- Vilà C, Sundquist AK, Flagstad O, Seddon JM, Bjørnerfeldt S, Kojola I., Sand, H, Wabakken P e Ellegren H (2002) Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 270: 91–97.
- Wandeler P, Funk SM, Lurgiader CR, Gloor S, Breitenmoser U (2003) The city-fox phenomenon: genetic consequences of a recent colonization of urban habitat. *Molecular Ecology* 12: 647-656.
- Wayne RK (1996) Conservation Genetics in the Canidae. In: Avise JC, Hahn JL (eds) Conservation genetics: case histories from nature. Chapman & Hall, New York, pp. 75–118.
- Welsh J e McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Williams JGK, Kubelik A, Livak K, Rafalsski J e Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Williamson KS, Cordes JF e May B (2002) Characterization of microsatellite loci in Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology Notes* 2: 17-19.
- White G e Powell W (1997) Cross-species amplification of SSR loci in the Meliaceae family. *Molecular Ecology* 6: 1195-1197.
- Yang G, Saghai Maroof MA, Xu CG, Zhang Q e Biyashev RM (1994) Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Molecular and General Genetics* 245: 187-194

Zucchi MI, Brondani RPV, Pinheiro JB, Brondani C e Vencovsky R (2002) Transferability of microsatellite markers from *Eucalyptus* spp. to *Eugenia dysenterica* (Myrtaceae family). *Molecular Ecology Notes* 2: 512–513.

CAPÍTULO 3

Artigo a ser submetido: *Genetics and Molecular Biology*

Relacionamento Genético e Organização Espacial em uma População de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815) do Parque Nacional das Emas - Goiás

FLÁVIA MELO RODRIGUES^{1, 8}, JOSÉ ALEXANDRE FELIZOLA DINIZ FILHO^{2, 3, 5, 8}, MARIANA PIRES DE CAMPOS TELLES^{4, 5}, LUCILEIDE VILELA RESENDE⁴, NATÁLIA MUNDIM TÔRRES^{5, 7}, ANAH TEREZA DE ALMEIDA JÁCOMO⁵, LEANDRO SILVEIRA⁵, THANNYA NASCIMENTO SOARES⁴, CYNTIA K. KASHIVAKURA⁵, MARIANA M. FURTADO⁵, CLAUDIA FERRO⁵ E SAMUEL ASTETE⁵

¹*Departamento de Biologia, Universidade Estadual de Goiás (UEG), Anápolis, GO;*

²*Departamento de Biologia, Universidade Católica de Goiás (UCG);* ³*Departamento de Biologia Geral, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG);* ⁴*Laboratório de Genética e Melhoramento, Departamento de Zootecnia/ITS, Universidade Católica de Goiás (UCG);* ⁵*Fundo para a Conservação da Onça-Pintada (FCOP);* ⁷*Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade de Brasília (UnB);* ⁸*Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais – UFG.*

Resumo

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é o maior canídeo sul americano, estando incluído entre as espécies de mamíferos ameaçadas de extinção desta região, principalmente devido à transformação da paisagem natural em áreas de sua ocorrência por atividades de desmatamento, queimadas, agricultura e urbanização. Suas áreas de vida costumam ser grandes e com grandes variações. O objetivo deste trabalho foi analisar a associação entre a similaridade genética, mensurada através de marcadores RAPD e STR, com a sobreposição de áreas de vida da população de lobo-guará do Parque Nacional das Emas, GO (PNE). Entre abril/2002 e novembro/2003, foram capturados 27 Lobos Guarás, colocados os rádio-colares e coletado sangue para as análises genéticas. Após as análises genéticas via PCR, os fragmentos amplificados com os marcadores RAPD foram separados em gel de agarose 1,4% e visualizados por coloração com brometo de etídio, e aqueles fragmentos obtidos com os marcadores STR foram separados em gel de poliacrilamida a 4% e visualizado por coloração com nitrato de prata. Os dados binários foram utilizados para o cálculo do índice de similaridade de Jaccard. Os dados

ecológicos foram coletados a partir do monitoramento destes animais por rádiotelemetria no PNE e as áreas de vida foram estimadas através do método Mínimo Polígono Convexo (MPC), considerando 80, 90 e 100% dos pontos. Para testar a relação entre a similaridade genética e o padrão espacial de dispersão dos indivíduos foi utilizado o teste de Mantel, com 5000 permutações. Os nove *primers* utilizados nas reações RAPD produziram um total de 91 locos, sendo 42 polimórficos. Um total de 27 locos foi obtido com os marcadores STR e destes 89 % foram polimórficos. Em média, o tamanho da área de vida dos Lobos Guarás do PNE foi muito grande, $74,18 \pm 44,18 \text{ km}^2$ ($n = 13$) para os machos e $89,70 \pm 54,11 \text{ km}^2$ ($n = 14$) para as fêmeas. A associação entre as similaridades genéticas e espaciais, medidas pelo teste de Mantel, foi significativa apenas entre os machos ($r = 0,247$, $P = 0,02$ para MPC 80% e $r = 0,23$, $P = 0,02$ para MPC 90%), quando considerados os dados gerados pelos marcadores RAPD. Já a associação entre a similaridade genética, obtida com os marcadores STR, e a similaridade espacial foi significativa entre os indivíduos de ambos os sexos e entre as fêmeas ($r = 0,182$, $P = 0,03$ para MPC 80%, $r = 0,197$, $P = 0,03$ para MPC 90%, $r = 0,248$, $P = 0,002$ para MPC 100% considerando os indivíduos de ambos os sexos e $r = 0,236$, $P = 0,049$ para MPC 100% considerando apenas as fêmeas). Os resultados baseados nos marcadores RAPD, mostraram uma estruturação espacial da similaridade genética apenas para os machos, concordando com a hipótese de que a distribuição espacial entre os machos não é aleatória. Isso sugere que este padrão pode ter sido gerado pela associação da disponibilidade de recursos críticos (i.e. água) com o nível de parentesco genético. Enquanto, que os resultados obtidos com os marcadores STR mostraram uma estruturação espacial da variabilidade genética de acordo com o padrão de filopatria feminina. Como o padrão obtido com os marcadores STR é mais esperado, e possível que os resultados com os marcadores RAPD sejam artefatos.

Palavras-Chave: lobo-guará, Área de vida, Rádiotelemetria, Marcadores RAPD, Marcadores STR.

Enviar correspondência para FM Rodrigues. Universidade Estadual de Goiás, Departamento de Biologia, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR 153, Km 3, Campus Anápolis, CEP: 75110-390, Caixa Postal: 459, Anápolis, GO, Brasil. E-mail: flavia.melo@ueg.br

Abstract

The Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) is the biggest canid of south america included in the mammal species threatened by extinction list in the region. One of the main reasons is the transformation of its natural habitat caused by deforestation, fires, agriculture and urbanization. It's living areas are usually big and varied. The goal of this paper was to analyse the association of genetic similarities measured by RAPD and STR markers with the overlap of areas in the life of the Maned wolves from Ema's National Park (GO). Between April 2002 and November 2003, 27 individuals were captured, radio-collars were placed on them and their blood was drawn for genetic analysis. After the analysis via PCR, the amplified fragments with RAPD were separated in agarosis gel 1.4% and colored with bromite etidium, the fragments obtained with STR were separated in poliacrilamide gel 4% and colored with silver nitrate. The binary data was used to find Jaccard's similarity index. The ecological data was obtained by monitoring these animals through radiotelemetry and its living areas were estimated by the Minimum Convex Poligon (MCP) method, considering, 80, 90 and 100% of the points. To test the relation between genatic similarity and living area deviation standard for the animals, the Mantel test with 5000 permutations was used. The nine primers used in RAPD reactions produced 91 locus, 42 of them polimorphic. A total of 27 locus was obtained with STR markers and 89% of these were polimorphic. In average, the size of the area for the Maned wolf in the ENP was of $78,18 \pm 44,18\text{km}^2$ (n=13) for males and $89,70 \pm 54,11\text{km}^2$ (n=14) for females. The association between the genetic and territorial similarities was significant amongst both genders. Between females ($r=0,182$, $p=0,03$ for MPC 80%; $r=0,197$, $p=0,03$ for MPC 90%; $r=0,248$, $p=0,002$ for MPC 100%). The results using RAPD markers showed a territorial structure based on genetic similarities only for males, which coincided with the hipotesis that territorial distribution od males isn't random. This suggests that this pattern could have been generated by the associaition of critical resourse avalability (i.e. water) with the level of genetic links. The data from the STR presented territorial genetic variability according to the females, as the standard obtained by the STR markers is most expected, it is probable that the results obtained by RAPD are artifacts.

Key words: Maned wolf, living areas, territorial distribution, radiotelemetry, RAPD markers , STR markers.

INTRODUÇÃO

O lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) é o maior canídeo sul americano, e quando adulto pode pesar cerca de 25 Kg e medir 90 cm de altura nos ombros e comprimento total entre 145 a 190 cm, sendo a cauda responsável por 45 cm (Mantovani, 2001; Einsenberg e Redford, 1999). Está incluído entre os mamíferos sul-americanos ameaçados de extinção, principalmente em função da transformação da paisagem natural, em áreas de sua ocorrência por atividades de desmatamento, queimadas, agricultura e urbanização (IBAMA, 2003) e também devido à perseguição dos pecuaristas, principalmente porque acreditam que os Lobos Guarás predam seus animais domésticos (De Mattos *et al.*, 2004; Fonseca *et al.*, 1994; Silva e Talomi, 2004). A área de ocorrência original desta espécie compreende a região central do Brasil, o Paraguai, Bolívia, extremo leste do Peru, nordeste da Argentina e Uruguai, sempre em regiões de vegetação aberta, como campos e Cerrados. (Dietz, 1985). Está extinto no Uruguai e na Argentina ao sul do Rio da Prata (Kimberley, 1998). A alimentação consiste principalmente de pequenos animais (roedores, aves, répteis, etc) e de alguns frutos (fruta do lobo – lobeira e guabiroba) (Motta-Junior, 1996; Lombardi e Motta-Júnior, 1993; Consorte-McCrea, 1994; Maia e Gouveia, 2002; Mota-Junior, 2002; Jácomo *et al.*, 2004). Esta espécie apresenta funções ecológicas imprescindíveis para a estabilidade do ecossistema do cerrado, principalmente por ser topo de cadeia alimentar e pela função como dispersor de sementes, dada a característica onívora de sua dieta (De Mattos, 2003).

O lobo-guará é territorialista, isto é, principalmente na época de reprodução, o casal demarca uma área geográfica onde não admite a presença de outros indivíduos, e portanto delimita o seu território. É monógamo facultativo, sendo comum à manutenção do par reprodutivo, e se apresenta mais ativo ao entardecer e à noite (Dietz, 1984). São animais solitários e interações entre o casal ocorrem apenas no período reprodutivo que, em cativeiro, se concentra nos meses de dezembro a junho (Ginsberg e McDonald, 1990). Espécies solitárias são aquelas que têm encontros raros com adultos co-específicos e estão geralmente sozinhos durante

períodos de atividade, tal como o forrageamento (Ratnayeke *et al.*, 2002; Waser e Jones, 1983). No entanto, um estudo realizado com a população de lobo-guará do Parque Nacional das Emas (PNE) em Goiás, observou alguns casais forrageando juntos, onde sempre era registrado que os machos defecam sobre as fezes das fêmeas para demarcar território (Silveira, 1999).

A área de vida do lobo-guará costuma ser grande, variando de 21 a 30 km² na Serra da Canastra, MG (Dietz, 1984), entre 54 e 115 km², no município de Águas de Santa Bárbara, SP (Carvalho e Vasconcellos, 1995) e de 4,67 a 79 km² no Parque Nacional das Emas, GO (Silveira, 1999). A população do PNE apresenta dois picos de atividade, sendo um entre 8:00 e 10:00h da manhã e outro entre 20:00 e 22:00h. No entanto, observou-se que o período de atividade da espécie é mais dependente da umidade relativa do ar e temperatura do que do horário do dia (Jácomo *et al.*, 2004). Em tempos de clima frio, céu nublado ou após chuva, é possível observar lobos guará forrageando a qualquer hora do dia (Silveira, 1999).

Geralmente, a área de vida de um animal compreende uma área heterogênea, determinada por fatores físicos e biológicos, explicando algumas desproporcionalidades no uso de espaço por algumas espécies (Silva e Talamoni, 2004). A área de uso intensivo tem sido considerada a área central do *home range* do animal, que pode estar altamente relacionada com a disponibilidade de recursos, como o alimento (Silva e Talamoni, 2004). Portanto, são as áreas mais freqüentemente usadas pelo animal, que são baseadas na média harmônica de uma área de distribuição, também definidas como centro de atividade (Dixon e Chapman, 1980; Tanaka, 1980). Identificar estas áreas é de fundamental importância para entendermos a biologia de muitas espécies, incluindo a interação entre os indivíduos e entre estes com o meio ambiente (Silva e Talamoni, 2004). Estudos com outros carnívoros solitários, como o guaxinim (*Procyon lotor*) mostram uma maior dispersão entre os machos e a filopatria feminina foi uma observação comum. Entretanto, dispersão entre fêmeas jovens foi também relatado (Cowan, 1973, Ratnayeke, 1997; Ratnayeke *et al.*, 2002). Para fêmeas de mamíferos que investem muito nos cuidados de seus descendentes,

benefícios ecológicos e sociais são fortes fatores a favor da filopatria feminina (Ratnayeke *et al.*, 2002).

A criação e manutenção de unidades de conservação em áreas de ocorrência do lobo-guará representam uma estratégia para a conservação da espécie. Embora existam unidades de conservação implantadas em áreas de cerrado, a área total destas unidades compreende apenas 2% da área total do bioma em questão (Myers, 2000). Ao mesmo tempo, é importante lembrar que áreas de preservação não oferecem todas as condições necessárias ao estabelecimento de uma população mínima viável e, portanto não garantem a manutenção da mesma em longo prazo. Um problema comum é o isolamento das populações em áreas de preservação, que é agravado na proporção em que estas áreas tornam-se menores e mais distantes entre si, em uma paisagem cujo uso do solo encontra-se bastante modificado e inadequado para as espécies animais existentes. Shaffer (1981) definiu que uma população mínima viável para qualquer espécie em um determinado habitat é a menor população isolada que tenha 99% de chances de continuar existindo por 1000 anos, a despeito dos efeitos previsíveis de estocasticidades genética, ambiental e demográfica, e de catástrofes naturais (Primack e Rodrigues, 2001). No entanto, pouco se sabe a respeito de informações demográficas e genéticas da maioria das espécies, dificultando a definição deste número mínimo viável.

Alguns marcadores moleculares, tais como, RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e Microssatélites, também conhecidos por marcadores STR (*Short Tandem Repeats*), têm sido bastante utilizados para se realizar uma caracterização inicial da variabilidade genética presente nas populações, a fim de monitorar a variabilidade genética nas espécies, objetivando subsidiar estratégias de acasalamento e introdução de novos indivíduos na população (Rodrigues *et al.*, 2004). Assim, a manutenção da diversidade e conseqüentemente o aumento da probabilidade de viabilidade desta população ao longo do tempo são garantidos, uma vez que pequenas populações sujeitas à deriva genética são mais suscetíveis a efeitos genéticos deletérios, tais como depressão

endogâmica, perda de flexibilidade evolucionária e depressão exogâmica (Ellstrand e Elam, 1993; Frankham *et al.*, 2003).

O objetivo deste trabalho foi analisar a associação entre a similaridade genética coma a similaridade espacial (sobreposição de área de vida) e distância espacial (área central) em uma população de lobo-guará do Parque Nacional das Emas-GO. Deste modo, foram levantadas informações da espécie no que diz respeito a sua variabilidade genética e estrutura populacional, fornecendo informações que podem vir a ser relevantes em futuros processos de manejo e preservação da espécie.

MATERIAL E MÉTODOS

Área de estudo

O estudo foi realizado na maior área de cerrado conservado do sistema de Parques Nacionais Brasileiros, o Parque Nacional das Emas (PNE). São 132.000 hectares localizados no sudoeste do Estado de Goiás, próximo ao limite com o Mato Grosso do Sul e Mato Grosso, a 18°19'S e 52°45'E (Figura 1) (Silveira, 1999). Sua altitude varia de 650 a 1000m e possui um clima seco acentuado, de abril a setembro, com temperaturas podendo atingir a marca de 0° C onde, é comum a ocorrência de geadas (IBDF/FBCN, 1981). A vegetação do parque corresponde a aproximadamente 95% de área com predomínio do campo sujo, além de outras vegetações menos comuns como, mata ciliar, campo úmido, vereda, campo limpo, campo cerrado, cerrado “*Strictu sensu*”, cerradão, dentre outras (IBDF/FBCN, 1981).

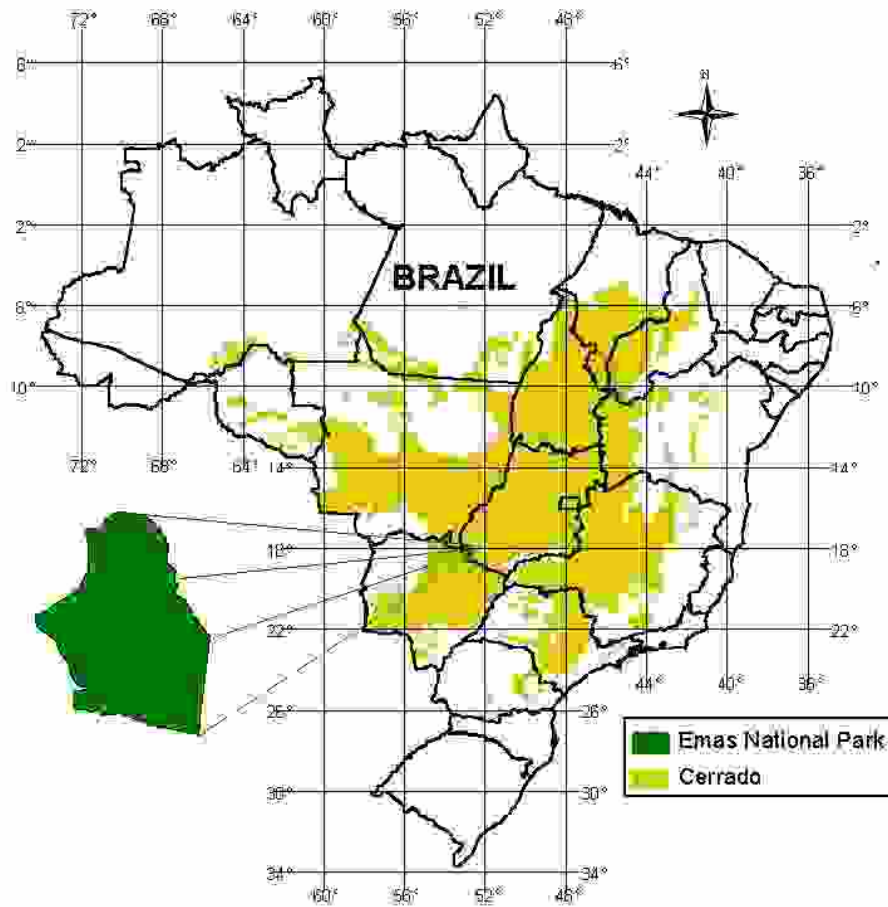


Figura 1. Localização do Parque Nacional das Emas - GO.

Aproximadamente doze espécies de mamíferos ameaçadas de extinção, conforme classificação da IUCN (*International Union for the Conservation of Nature*) e CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species*) (Fonseca *et al.*, 1994) são protegidas no PNE, como por exemplo o tamanduá bandeira (*Myrmecophoga tridactyla*), o veado campeiro (*Ozotocerus bezoarticus*), o cachorro do mato vinagre (*Speothos venaticus*) e o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) (Silveira, 1999). A vegetação nativa do entorno do Parque, devido os programas de incentivo do Governo Federal para a abertura de novas fronteiras agrícolas, deu lugar a extensas lavouras de grãos, como soja e milho, isolando o PNE do contato direto com

outras áreas nativas (Silveira, 1999). Outro problema grave sofrido pelo PNE é o manejo inadequado de agrotóxicos nas lavouras do seu entorno, nas cabeceiras dos Rios Formoso e Jacuba, além do atropelamento de animais do Parque na rodovia GO-341, que margeia 25 quilômetros de seu limite oeste (Silveira e Jácomo, 1998).

Dados da Área de Vida

Entre abril de 2002 e novembro de 2003, foram armadas 71 armadilhas em vários pontos do PNE, sendo 45 do tipo “gaiola” com compartimento para isca viva e 26 do tipo “trampa”. As armadilhas tipo “gaiola” foram dispostas a cada 1,5 km e iscadas com galinhas ou pombos vivos e as “trampas” iscadas com um produto comercial feito de extrato de glândulas de cheiro de carnívoros. Os esforços acumulados foram de 291 armadilhas-noite para as gaiolas e 77 armadilhas-noite para as “trampas”.

Foram capturados 38 Lobos Guarás, dos quais 27 foram considerados nas análises por apresentarem disponibilidade dos dados de área de vida. A contenção química dos animais foi feita através da aplicação intramuscular do anestésico Zoletil® (250 mg), sendo que a dose variou de 0,5 a 1,5 ml, de acordo com o peso do animal. Para cada animal capturado foi feita a biometria, análise clínica, estimativa de idade através de desgaste dentário, coleta de ectoparasitos, urina, esfregaço vaginal, sangue e colocação de rádio-colares. Foi coletado ao menos 10 mL de sangue, utilizando tubos *vacutainer* contendo EDTA, que foram utilizados para análises de doenças, dosagem hormonal e análise genética. Depois de coletado, o sangue foi acondicionado em um volume igual de um tampão denominado *Easy Blood* e armazenado em geladeira, que auxilia na conservação do material até chegar ao laboratório para a extração do DNA.

Os rádio-receptores e colares utilizados (*Advanced Telemetry Systems, Inc.*) nos indivíduos funcionam através de ondas de rádio VHF (faixa de 150 a 152 MHz), com baterias de

duração de 36 a 42 meses. Todos os colares possuem uma frequência individual e emitem sinais (pulso), captados pelo rádio-receptor. Os rádios transmissores utilizados são sensíveis às variações de movimentos dos animais, indicando se o animal está se movimentando (ativo), se está parado (inativo), ou morto. O monitoramento por radiotelemetria foi feito de carro, a pé, ou de avião (Cessna 172), conforme a necessidade e acessibilidade em campo. Foi utilizado o método da triangulação (White e Garrot, 1990), no qual são tomadas pelo menos duas direções (azimute) do sinal do transmissor, cada direção tomada de um ponto diferente no terreno, de modo a formar um triângulo, com o auxílio de uma bússola e GPS (Sistema de Posicionamento Global) permitindo a identificação da localização. O resultado do estudo de área de vida é apresentado na forma numérica, geralmente em km², e na forma geométrica da área sobre um mapa do local de estudo (Jacob e Rudran, 2003). Para estimar as coordenadas finais da triangulação foi usado o programa Locate II, versão 2.82 (Nams, 2001).

O cálculo da área de vida dos animais foi feito através do método do Mínimo Polígono Convexo – MPC (Mohr, 1947), que consiste basicamente na união dos pontos mais extremos da distribuição de localizações, de forma a fechar o menor polígono possível sem admitir concavidades (Jacob e Rudran, 2003). Foram considerados 80, 90 e 100% dos pontos, a fim de estimar o efeito dos outliers, na determinação da área de vida. Foram construídas as matrizes de sobreposição separadas, de tal modo que uma continha a informação de todos os indivíduos simultaneamente e outras duas matrizes separadas por sexo. Para estas análises foi utilizado o programa Ranges6 versão 1.2 (Kenward *et al.*, 2003).

Dados Genéticos

O DNA dos 27 indivíduos foi extraído a partir das amostras de sangue total, utilizando o *kit* de purificação de DNA *GFX* fornecido pela Amersham Pharmacia Biotech. Após a quantificação, com o auxílio do marcador de peso molecular *Low DNA Mass*, e diluição para a

concentração ideal de uso, o DNA foi utilizado para a realização de diversas Reações em Cadeia da Polimerase (PCR), através de reações de amplificação do DNA Polimórfico Amplificado ao Acaso (RAPD) (Welsh e McClelland 1990; Williams *et al.* 1990) e reações de amplificação com os marcadores STR (Tautz, 1989).

As reações de RAPD foram montadas da seguinte forma: 3 µl de DNA (~3 ng/µl); 2,0 µl de *primer* (~10 ng/µl); 2,6 µl tampão da enzima (10 X); 0,78 µl de MgCl₂ (50 mM); 2,08 µl de d’NTP (2,5 mM); 0,2 µl da enzima Taq-Polimerase (5 unidades/µl) e completando o volume com 9,34 µl de H₂O Milli-Q. Foram utilizadas as seguintes condições nas reações de amplificação: primeira etapa 2’ a 94°C; segunda etapa 1’30’’ a 92°C, terceira etapa 1’ a 37°C, quarta etapa 2’30’’ a 72°C, quinta etapa 40 ciclos (de 2 a 4) e sexta etapa 5’ a 72°C para a extensão final. Primeiramente foi realizada uma seleção dos melhores marcadores utilizando o DNA de apenas três indivíduos para a amplificação com 119 primers (desenvolvidos pela OPERON®), seguido de reações RAPD com todos os 27 indivíduos, usando os marcadores selecionados.

Para as reações com os marcadores STR, o seguinte protocolo foi utilizado: 5 µl de DNA (~3 ng/µl); 2,2 µl do *primers* A (*forward*) (~5 ng/µl); 2,2 µl do *primers* B (*reverse*) (~5 ng/µl); 1,3 µl de BSA (10 mg/ml); 1,5 µl tampão da enzima (10 X); 0,5 µl de MgCl₂ (50 mM); 1,3 µl de d’NTP (2,5 mM); 0,2 µl da enzima Taq- Polimerase (5 unidades/µl) e completando o volume com 0,8 µl de H₂O *Milli-Q*, para um volume final de 15 µl. Para cada reação, realizada no termociclador *MJ Research Inc*, utilizamos o seguinte programa: (1°) desnaturação do DNA a 94°C por 5 minutos e (2°) a 94°C por 1 minuto; (3°) anelamento dos “*primers*” a X°C por 1 minuto; (4°) extensão da molécula pela enzima Taq polimerase (fornecida pela *Amersham Pharmacia Biotech*) a 72°C por 1 minuto; (5°) 30 ciclos seguindo do 2° ao 4° passos; (6°) passo final de extensão de 7 minutos a 72°C para finalizar os produtos amplificados. Para cada *primer* foram testadas temperaturas de anelamento que variaram entre 45°C e 65°C, pois este é um dos

fatores críticos nas análises com estes marcadores (Hillis *et. al.*, 1996; Ferreira e Grattapaglia, 1998) e após os resultados dos testes foi utilizado a temperatura de anelamento específica de cada primer (ver capítulo 1).

Os fragmentos de DNA amplificados via marcadores RAPD foram separados através de eletroforese em gel de agarose 1,5% e em seguida corados com brometo de etídeo. Os fragmentos, nos géis, foram visualizados através de um transluminador de luz ultravioleta e fotografados com auxílio do fotodocumentador KODAK EDAS – 120, (Ferreira e Grattapaglia, 1998).

Os produtos de amplificação via marcadores STR foram submetidos à eletroforese em gel de poliácridamida a 4% em TBE 1X durante 2 horas, mantendo a corrente elétrica em 90W constante. Foram aplicados 3µl do produto da PCR, contendo o tampão de carregamento, previamente desnaturado (94°C por 5 min). O padrão de peso molecular, o marcador *Ladder* 10bp (*Amersham Pharmacia Biotech*) foi usado para estimar os tamanhos dos produtos de PCR. Após a eletroforese, o gel de acrilamida foi corado com nitrato de prata (Bassam *et al.*, 1991). Após a revelação das bandas e a secagem das placas, estas foram colocadas sobre a luz branca para a obtenção dos genótipos.

Em seguida foi construída uma matriz de dados binários obtida pela codificação dos géis em genótipos, para cada conjunto de dados gerados (RAPD e STR). No capítulo 2 é apresentado um exemplo de como foram transformados os genótipos gerados pelos marcadores STR em dados binários. Essa matriz binária foi utilizada para estimar a similaridade genética entre os pares de indivíduos com base no coeficiente de Jaccard (J) (Sneath e Sokal, 1973) que é dado por

$$J = \frac{M}{P}$$

onde, M é o número de bandas em comum e P é o número total de bandas, exceto as bandas ausentes nos dois indivíduos comparadas.

Foram obtidas três matrizes de similaridade genética baseadas no índice de Jaccard, para cada marcador molecular separadamente. A primeira contendo os dados de todos os indivíduos, a segunda contendo apenas os dados dos machos e a terceira contendo os dados das fêmeas. Essas matrizes foram construídas utilizando a rotina SIMQUAL (*similarity for qualitative data*) do programa NTSYS-PC, versão 1.8 (Rohlf, 1991).

Correlação Genética e Espacial

O teste de Mantel (Manly, 1991) tem sido bastante utilizado para avaliar a correlação matricial entre duas matrizes simétricas quaisquer E e M comparadas pelo valor de Z, dado por

$$Z = \sum_i \sum_j (E_{ij} \cdot M_{ij})$$

onde E_{ij} e M_{ij} são o i-ésimo e j-ésimo elementos das matrizes E e M a serem comparadas. A significância da relação entre as matrizes pode ser testada recalculando o valor de Z diversas vezes, permutando aleatoriamente, em cada uma delas, a ordem dos elementos de uma das matrizes. Deste modo é possível obter uma distribuição de probabilidades à qual o valor de Z observado pode ser comparado (Manly, 1991). O valor de Z não possui amplitude de variação definida, mas de fato ele possui uma relação monotônica com o r de Pearson calculado entre as matrizes. Assim pode-se utilizar o Z de Mantel para testar a significância da correlação matricial, que varia entre 1,0 e -1,0.

O teste de Mantel requer a construção de duas matrizes de similaridade ou dissimilaridade simétricas a serem comparadas. Neste estudo, este teste foi utilizado para comparar a similaridade genética (matriz de Jaccard) com similaridade espacial (matriz de sobreposição), obtidas a partir dos dados de telemetria para 80, 90 e 100% dos pontos. No entanto, as matrizes de sobreposição geradas eram assimétricas, portanto estas tiveram que ser previamente transformadas em matrizes

simétricas. O modelo é basicamente a estimativa de uma taxa de sobreposição média (O_m), que é dado por

$$O_m = \sqrt{O_1 \cdot O_2}$$

onde O_1 é a medida de sobreposição de área do indivíduo A sobre o indivíduo B e O_2 a sobreposição de área do indivíduo B sobre A (Krebs, 1998).

Ainda a partir dos dados de área de vida dos indivíduos, foram construídas também as matrizes de distâncias espaciais simétricas, usando o índice de distância euclidiana entre os centros de área, e as mesmas foram usadas para a correlação matricial com as similaridades genéticas. O cálculo da distância espacial foi realizada no programa NTSYS-PC, versão 1.8, na rotina SIMINT (*Similarity Interval*) (Rohlf, 1991).

Foram utilizadas 5000 permutações aleatórias para estabelecer a significância de cada correlação matricial. Essas análises foram realizadas utilizando a rotina MXCOMP (*Matrix Comparison-Graphics*) do mesmo programa, NTSYS-PC, versão 1.8 (Rohlf, 1991).

RESULTADOS

Áreas de Vida

Dos 27 animais analisados, 13 eram machos e 14 eram fêmeas e destes apenas três fêmeas e um macho eram sub-adultos, sendo os demais adultos. A quantidade total de radiolocalizações obtidas foi de 2113, com uma média de $78,26 \pm 94,97$ por indivíduo. O número mínimo de localizações foi 10, para a fêmea n° 503 e o máximo foi de 452 localizações para a fêmea n° 501. A área de vida dos indivíduos (machos e fêmeas) calculada com 80% dos pontos variou de 8,8 a 156 km^2 , para 90% dos pontos, variou de 14,6 a $165,7 \text{ km}^2$ e para 100% dos pontos a variação foi de 23 a 561 km^2 . As áreas de vida dos machos foram menores que a das fêmeas (Tabelas 1 e 2). Em média, o tamanho da área de vida dos Lobos Guarás do PNE foi muito grande, $74,18 \pm 44,18$

km² (n=13) para os machos e 89,70 ± 54,11 km² (n=14) para as fêmeas (Tabelas 1 e 2). As áreas de vida dos indivíduos n° 799 e n° 872 (fêmeas) foram muito maiores que as demais, elevando assim a média geral (Tabela 1). Entre os machos, os indivíduos 743, 810 e 762 foram os que apresentaram as maiores áreas de vida (Tabela 2). Entretanto, a variação relativa das áreas de vida média entre os machos e entre as fêmeas foram praticamente da mesma magnitude, com um coeficiente de variação em torno de 60% em ambos os casos.

Tabela 1- Áreas de vida (km²) de 14 fêmeas de lobo-guará do Parque Nacional das Emas, considerando 80, 90 e 100% dos pontos, através do MPC (Mínimo Polígono Convexo).

INDIVÍDUO	80% (km²)	90% (km²)	100% (km²)
170	22.98	35.86	58.57
872	156.48	165.67	495.64
799	127.21	164.48	561.21
852	20.22	23.62	32.75
603	29.06	51.15	53.06
820	8.81	14.59	37.47
783	21.50	33.20	84.35
886	138.29	158.26	280.82
503	15.78	17.61	27.65
316	63.76	70.51	158.73
532	9.90	17.34	23.00
831	32.22	38.42	40.48
501	57.80	66.33	220.63
888	39.42	40.93	51.68
Média ± desvio-padrão	53.10±50.37	64.14±56.06	151.86±178

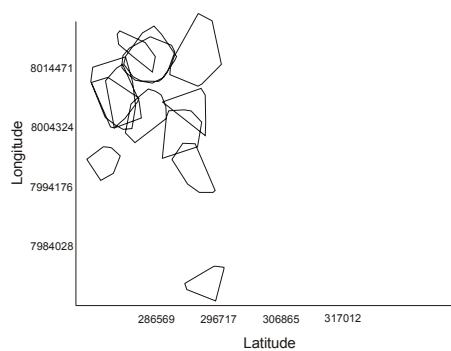
Tabela 2- Áreas de vida (km²) de 13 machos de lobo-guará do Parque Nacional das Emas, considerando 80, 90 e 100% dos pontos, através do MPC (Mínimo Polígono Convexo)..

INDIVÍDUO	80% (km²)	90% (km²)	100% (km²)
743	70.69	72.28	211.92
104	21.61	24.85	134.97
659	24.12	44.43	88.14
772	21.03	23.45	45.42
641	39.80	65.59	114.34
5011	53.43	64.44	94.79
810	58.06	71.67	203.56
8721	43.74	56.02	82.40
762	42.91	57.93	209.80
840	71.32	78.56	183.83
892	43.94	57.25	90.19
202	32.11	34.94	82.08
862	36.87	49.85	90.85
Média ± desvio-padrão	43.05±16.75	53.94±17.74	125.56±57.17

As taxas de sobreposição média (O_m) entre os indivíduos variaram de 0 a 71% para as fêmeas e entre 0 e 88% para os machos (Tabela 3). A Figura 2, mostra a sobreposição de área de vida para os machos, fêmeas e ambos os sexos, baseado nos dados do MPC para 80, 90 e 100% dos pontos, em função das coordenadas (latitude e longitude). A sobreposição entre as fêmeas aumentou à medida que se considerou uma maior proporção de pontos (100%) da área de vida. Entretanto, para os machos a sobreposição foi maior quando se considerou uma menor proporção de pontos (80%) (Tabela 3), confirmando uma maior dispersão entre as fêmeas do que entre os machos.

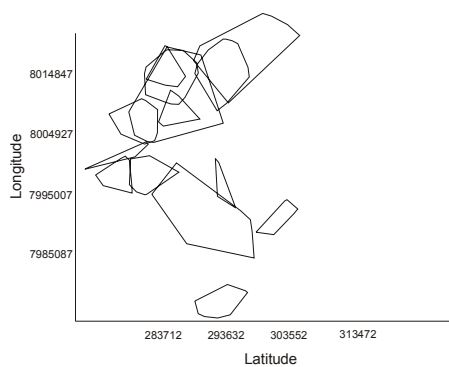
Tabela 3. Taxas de sobreposição média (O_m) entre os indivíduos de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

N° de Pontos (%)	Indivíduos	Varição (%)
	Fêmeas	0 – 61
80	Machos	0 – 88
	Machos e Fêmeas	0 – 88
	Fêmeas	0 – 68
90	Machos	0 – 81
	Machos e Fêmeas	0 – 81
	Fêmeas	0 – 71
100	Machos	0 – 75
	Machos e Fêmeas	0 – 85



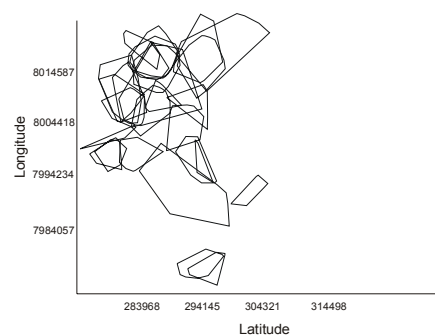
a- Sobreposição de machos

MPC 80%



d- Sobreposição de fêmeas

MPC 80%



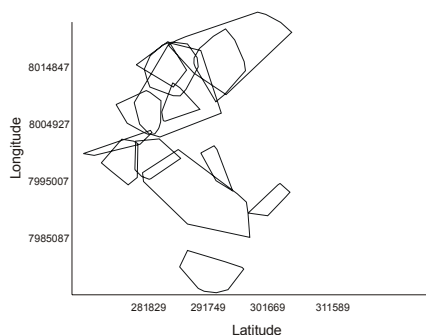
g- Sobreposição de machos e fêmeas

MPC 80%



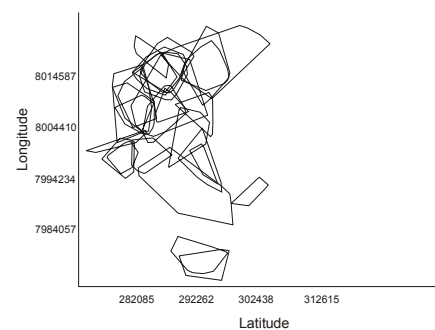
b- Sobreposição de machos

MPC 90%



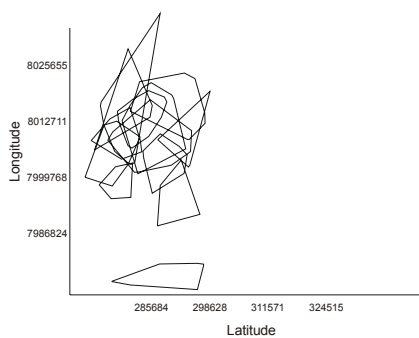
e- Sobreposição de fêmeas

MPC 90%



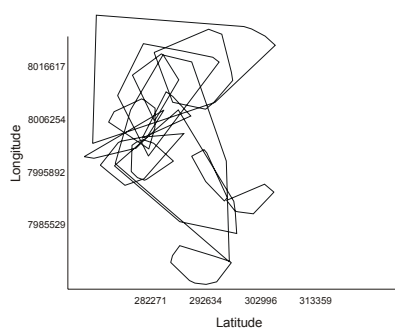
h- Sobreposição de machos e fêmeas

MPC 90%



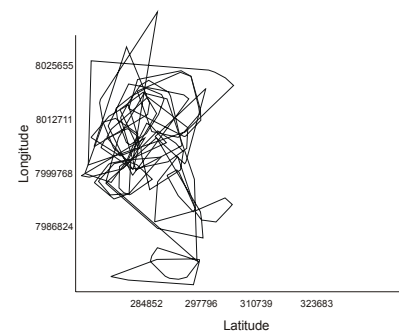
c- Sobreposição de machos

MPC 100%



f- Sobreposição de fêmeas

MPC 100%



i- Sobreposição de machos e fêmeas

MPC 100%

Figura 2. Áreas de vida entre indivíduos de lobo-guará, considerando machos e fêmeas separadamente e todos os indivíduos simultaneamente, para 80, 90 e 100% dos pontos do MPC (Mínimo Polígono Convexo).

Variabilidade Genética e Associação com as Áreas de Vida

Dos 119 *primers* testados nas reações RAPD, nove deles (OPH-04, OPH-19, OPP-07, OPP-08, OPP-09, OPP-15, OPC-11, OPC-05, OPA-18) mostraram um bom padrão de amplificação e apresentaram um total de 91 *locos*, sendo 42 deles polimórficos (46%) (Tabela 4). O índice de similaridade genética (coeficiente de Jaccard), entre os pares de indivíduos, variou de 0,66 a 0,97 entre as fêmeas, de 0,84 a 0,97 entre os machos e 0,66 a 0,99, quando considerado ambos os sexos simultâneamente.

Tabela 4. Relação do número de locos e do número de locos polimórficos, por *primer*, em lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), utilizando marcadores RAPD.

<i>Primer</i>	Número de Locos	Número de Locos Polimórficos
OPH-04	14	7
OPH-19	8	3
OPP-07	9	4
OPP-08	9	5
OPP-09	7	4
OPP-15	11	4
OPC-11	12	5
OPC-05	11	4
OPA-18	10	4
TOTAL	91	42

Dentre 29 *primers* de STR testados (ver capítulo 1), desenvolvidos originalmente para outras espécies, seis (21%) amplificaram com sucesso: PEZ-05, PEZ-20, PEZ-12, LOCO-13,

LOCO-15 e CSSM-038 (Denise *et al.*, 2004; Halverson *et al.*, 1995, Barker *et al.*, 1997). Um total de 27 locos foi obtido e destes 24 (88,88%) foram polimórficos. A similaridade genética entre os pares de indivíduos variou de 0,09 a 0,80 quando considerado ambos os sexos simultaneamente.

A associação entre os centros de áreas de vida (distância espacial) e similaridade genética não foi significativa em nenhuma das condições analisadas (entre machos e fêmeas separadamente e ambos os sexos simultaneamente), baseado nos dados RAPD (Tabela 5). Já a associação entre as similaridades genéticas e espaciais foi significativa, apenas entre os machos quando considerado 80 e 90% dos pontos, com base nos dados RAPD (Tabela 6). Assim, indivíduos do sexo masculino com áreas mais sobrepostas são mais similares geneticamente. Com base nos marcadores STR, observou-se uma associação significativa (para 80, 90 e 100% dos pontos) entre os indivíduos de ambos os sexos simultaneamente e entre as fêmeas (para 100% dos pontos) (Tabela 6). Portanto, indivíduos (ambos os sexos) mais similares geneticamente ocupam áreas de vida mais próximas, sendo que existe uma maior tendência de associação entre as fêmeas, como mostra a Tabela 6.

Tabela 5- Valores da correlação matricial (r) e o nível de significância (P) obtidos a partir do Teste de Mantel, comparando a similaridade genética (RAPD) e distância espacial entre os 27 indivíduos da população de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*).

Indivíduos	R	P
Machos e Fêmeas	-0,00934	0,41
Machos	-0,01514	0,42
Fêmeas	0,05839	0,44

Tabela 6- Valores da correlação matricial (r) e o nível de significância (P) obtidos a partir do Teste de Mantel, comparando a similaridade genética com a sobreposição espacial (80, 90 e 100% dos pontos) do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*), com base nos dados dos marcadores RAPD e STR.

Indivíduos	No de Pontos (%)	RAPD		STR	
		r	P	r	P
Machos e Fêmeas	80	0,015	0,44	0,182	0,003
	90	0,013	0,44	0,197	0,003
	100	0,091	0,20	0,248	0,002
Machos	80	0,247	0,02	-0,109	0,199
	90	0,230	0,02	-0,104	0,224
	100	0,030	0,44	-0,112	0,267
Fêmeas	80	-0,045	0,36	0,172	0,092
	90	-0,011	0,45	0,194	0,061
	100	0,160	0,15	0,236	0,049

DISCUSSÃO

Áreas de vida

Os valores de área de vida obtidos para os Lobos Guará no PNE foram maiores do que os encontrados por Silveira (1999), no mesmo local (PNE) (média de $48,98 \pm 31,75 \text{ km}^2$, $n=5$) e do que os valores obtidos por Rodrigues (2002), na Estação Ecológica de Águas Emendadas - DF (média 57 km^2 , $n=5$) e bem maiores que os dados de área de vida para a população de lobo-guará do parque Nacional da Serra da Canastra (média $25,21 \pm 4,45 \text{ km}^2$, $n=3$). Os valores encontrados

neste estudo se aproximaram mais daqueles encontrados por Carvalho e Vasconcelos (1995), em fragmentos de cerrado de São Paulo (média $75,03 \pm 34,63 \text{ km}^2$, $n=3$).

A variação no tamanho da área de vida de Lobos Guarás pode estar relacionada às diferenças na disponibilidade alimentar, dentre outros fatores. Uma maior heterogeneidade espacial e densidade de arbustos e árvores pode refletir uma maior disponibilidade de alimentos. Como o entorno do Parque Nacional das Emas, área bastante utilizada por esta espécie e muitas outras que habitam o mesmo, apresenta novas oportunidades de disponibilidade de alimentos, visto que tratam-se de áreas de lavoura, pastagem e ainda reservas legais, esta podem ser uma explicação do aumento da área de vida dos indivíduos deste local. Outro fator que poderia explicar a variação no tamanho da área de vida desta espécie seria a densidade populacional, onde locais com densidades maiores forçariam uma redução nas áreas individuais. Assim sendo, grandes reservas são importantes na conservação dos Lobos Guarás, mas estas só serão efetivas quando há conexão com outras reservas, favorecendo um acréscimo de indivíduos nas populações, ou disponibilizando recursos alimentares suficientes para a população.

Alguns trabalhos (Rodrigues, 2002) indicam uma alta sobreposição de área de vida entre indivíduos de diferentes populações de lobo-guará. Os casais de lobo-guará possuem áreas de vida exclusivas, o que permite a participação do macho no cuidado parental (Dietz, 1984). Os resultados deste trabalho corroboram parcialmente esta estruturação, mas foi observado uma maior sobreposição de áreas entre os machos (em média 81%) do que entre as fêmeas (em média 67%). Porém, quando foi estimada a sobreposição considerando os indivíduos de ambos os sexos simultaneamente, esta foi maior (em média 85%) (Tabela 3). Estas altas taxas de sobreposição podem justificar a estruturação em pares, que acarreta vantagem ao casal, pois defendem sua área de outros casais. A troca de parceiros sexuais pode ser facilitada pelas fêmeas por possuírem áreas de vida maiores, fator que favorece a população por gerar um aumento da variabilidade genética.

Correlações genéticas e espaciais

O grau de polimorfismo genético obtido com os marcadores RAPD (46%) e com os marcadores STR (89%) foram razoavelmente altos, se comparados com outros estudos usando marcadores protéicos, como o trabalho de De Mattos *et al.*, (2004), que observou um polimorfismo médio de 20% para a população de lobo-guará da região nordeste de São Paulo. Nos trabalhos de Kennedy *et al.*, (1991) e Waine *et al.*, (1991) com lobos cinzentos (*Canis lupus*), usando marcadores protéicos, a variabilidade genética mensurada foi de 13,5% e 20%, respectivamente. Moreira *et al.*, (1998), usando marcadores protéicos, em uma parcela bastante representativa da população de lobo-guará (Sudeste e Centro-Oeste do Brasil), estimou uma heterozigiosidade média de 1,4 a 8,3%. De Mattos *et al.*, (2004), em seu estudo com 28 Lobos Guarás do Nordeste de São Paulo, usando também marcadores protéicos, mostrou ausência de endocruzamento e de estruturação populacional, como consequência dos baixos valores de distância genética. Estes estudos são corroborados pelos resultados deste trabalho no PNE, no que diz respeito à diversidade genética, que em média foi alta baseando-se no alto polimorfismo encontrado e na grande variação da similaridade genética observada entre os indivíduos, tanto para os marcadores STR quanto para os marcadores RAPD. Isto indica que possivelmente uma medida importante para a conservação do lobo-guará seria a preservação adequada da área que a espécie ocupa, diminuindo a necessidade de introdução de novos animais no local, visto os aspectos negativos das translocações e de densidades populacionais muito elevadas. A introdução de novos animais pode acarretar problemas à população como, por exemplo, a introdução de doenças infecciosas, diluição da frequência de genes adaptados, etc (Campbell, 1980; Hedrick, 2001).

Em muitas espécies de mamíferos, a estrutura espacial da variabilidade genética em pequenas escalas espaciais é determinada pela fidelidade dos indivíduos ao seu local de nascimento ou grupo social, dependendo de alguns fatores, como sexo e idade (Roff e Fairbairn,

2001; Murren *et al.*, 2001; Templeton, 1987; Greenwood, 1980). Em chimpanzés (*Pan troglodytes*), os grupos familiares tendem a ser patrilineares e as fêmeas têm uma maior dispersão (Wrangham, 1979).

Os resultados obtidos neste estudo, com base nos marcadores RAPD, mostraram uma estruturação espacial da similaridade genética apenas para os machos, concordando com a hipótese de que a distribuição espacial entre os machos não é aleatória e está associada com o grau de parentesco genético. Esta estruturação poderia ser explicada pelo baixo padrão de dispersão dos machos em relação às fêmeas nesta população, além da distribuição e disponibilidade de recursos. Portanto, a alta taxa de sobreposição de área de vida entre os machos aparentados pode estar sendo influenciada pela distribuição de recursos críticos, e não necessariamente devido o grau de parentesco genético.

Um outro padrão espacial mais comum em mamíferos sociais é a filopatria natal e a filopatria feminina, que também é um padrão observado em algumas espécies de mamíferos solitários, como o guaxinim (*Procyon lotor*) (Ratnayeke *et al.*, 2002). Os jovens freqüentemente demonstram filopatria natal (Waser e Jones 1983), ou seja, eles permanecem dentro ou próximos da área natal, dividindo espaço e recursos alimentares com os progenitores, e presumivelmente se beneficiam desta maior familiaridade, favorecendo o forrageamento, obtenção de melhores abrigos e maiores chances contra espécies predadoras. Para as fêmeas de mamíferos que investem muito nos cuidados da prole, os benefícios ecológicos e sociais tendem a favorecer fortemente a filopatria feminina (Wrangham, 1980). Este padrão espacial tem vantagens e custos. Ao mesmo tempo em que o grau de parentesco entre as fêmeas aumenta o risco de endogamia, conseqüentemente da redução da variabilidade genética, a consangüinidade pode favorecer a seleção de genes que determinam uma boa adaptação a um determinado habitat.

Os resultados obtidos neste estudo com os marcadores STR corroboram a estruturação espacial da similaridade genética entre os indivíduos de ambos os sexos, com uma maior

tendência entre as fêmeas (filopatria feminina), ou seja, as fêmeas mais similares geneticamente tendem a ocupar a mesma área de vida ou áreas bem próximas. Como esse padrão é mais esperado do que o observado com os dados RAPD, pode-se levantar a possibilidade de que os resultados com os marcadores RAPD sejam artefatos. De fato, algumas estimativas de diversidade genética com marcadores RAPD são questionáveis, devido principalmente a natureza dominante do marcador.

Alguns estudos mostram que a filopatria não necessariamente é influenciada pelo sexo e pode ser direcionada pela idade e, neste caso é mais comum entre machos e fêmeas adultos ocupando a mesma área de vida dos machos (Gompper e Wayne, 1996). No entanto, não está claro, para mamíferos solitários como o lobo-guará, se indivíduos filopátricos que dividem espaço têm uma maior tolerância em consequência do grau de parentesco genético. Ratnayeke (1997) observou em outro estudo que a variação no relacionamento genético foi independente da interação espacial e temporal entre fêmeas de guaxinim. Em algumas espécies, como esquilos (Van Staaden *et al.*, 1994) a filopatria foi mais fortemente determinada pela sobreposição espacial do que pela seleção de sociabilidade entre parentes. Neste trabalho, mesmo tendo sido observada uma associação genética e espacial significativa, entre os indivíduos de ambos os sexos e entre as fêmeas, com base nos marcadores STR e entre os machos com base nos marcadores RAPD, os valores de r obtidos foram baixos, em torno de 0,23. Portanto, deve-se levar em consideração que quando ambos indivíduos são beneficiados com a divisão de espaço, aumenta-se à chance de tolerância entre eles e, neste caso, a estrutura populacional varia muito mais em decorrência da demografia local e distribuição de recursos do que devido ao grau de relacionamento genético entre os indivíduos.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do Laboratório de Genética e Melhoramento da Universidade Católica de Goiás - UCG tais como, Prof^o. Breno de Faria Vasconcellos, Nicole C. L. Dutra, Gabriela C. Pádua, Lorena L. de Souza, Luciana M. Bossois e todos os demais estagiários que nos ajudaram nas análises genéticas. A todo o pessoal do Parque Nacional das Emas - PNE, principalmente os estagiários que realizaram os trabalhos de campo. Ao CNPq pelo financiamento de nossas pesquisas dentro do programa PRONEX para análise de áreas prioritárias para conservação da biodiversidade no Cerrado e em Goiás. (CNPq/SECTEC-GO, Proc. No. 23234156). JAFD-F recebe uma bolsa de Produtividade em Pesquisa nível 1B do CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Barker JSF, Moore S, Hetzel S, Evan D, Tan SG e Byrne, K (1997) Genetic diversity of Asian water buffalo (*Bubalus bubalis*): microsatellite variation and comparison with protein-coding loci. *Animal Genetics* 28: 103-115.
- Bassan BJ, Anollés GCE e Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry* 196: 80-83.
- Campbell S (1980) Is a reintroduction a realistic goal? In: Soulé M.E and Wilcox BW (eds) *Conservation Biology: an evolutionary-ecological perspective*. Sinauer Association, Sunderland, 395 pp.
- Carvalho CT e Vasconcellos LEM (1995) Disease, food and reproduction of the maned wolf *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Carnivora, Canidae) in southeast Brazil. *Rev Bras Zoo* 12: 627-640.
- Consorte-McCrea AG (1994) The maned wolf in captivity. *Canid News* 2. www.canids.org..

- Cowan WF (1973) Ecology and life history of the raccoon (*Procyon lotor hirsutus*, Nelson and Goldman) in the northern part of its range . PhD Thesis, University of North Dakota, Dakota.
- De Mattos PSR, Del Lama M.A, Toppa RH e Schwantes AR (2004) Populational Genetic Structure of free-living maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) determined by proteic markers. Braz J Biol 64: 639-644.
- De Mattos PSR. (2003) Epidemiologia e genética populacional do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (Carnivora, Canidade) na região nordeste do estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Denise S, Johnston E, Halverson J, Marshall K, Rosenfeld D, Mckenna S, Sharp T e Edwards J (2004) Power of exclusion for parentage verification and probability of match for identity in American kennel club breeds using 17 canine microsatellite markers. Animal Genetics 35: 14–17.
- Dietz JM (1984) Ecology and social organization of maned wolf *Chrysocyon brachyurus*. Tese Doctor of Philosophy, Michigan State University, Washington.
- Dietz JM (1985) *Chrysocyon brachyurus*. Mammalia Speices 234: 1-4.
- Dixon KR e Chapman JA (1980) Harmonic mean measure of animal activity areas. Ecology 61: 1040-1044.
- Eisenberg JF e Redford KH (1999) Mammals of the Neotropics - The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. University of Chicago Press, Chicago, 609pp.
- Ellstrand NC e Elam DR (1993) Population genetic consequences os small population size: Implications for plant conservation. Annual Review of Ecology and Systematics 24: 217-242.

- Ferreira ME e Grattapaglia D (1998) *Introdução ao Uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética*. Editora EMBRAPA, Brasília.
- Fonseca GAB, Rylands AB, Costa CRM, Machado RB e Leite YLR (1994) *Livro Vermelho Dos Mamíferos Brasileiros Ameaçados de Extinção*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte.
- Frankham R, Ballou JD e Briscoe DA (2003) *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Ginsberg JR e MacDonald DW (1990) *Foxes, wolves, jackals, and dogs: an action plan for the conservation of canids*. Gland: IUCN/SSC Canid Specialist Group & IUCN/SSC Wolf Specialist Group.
- Gompper ME e Wayne RK (1996) Genetic relationships among individuals within carnivore societies. In: Gittleman JL (ed) *Carnivore Behavior Ecology and Evolution*. Cornell University Press, Ithaca, NY, pp 429-452.
- Greenwood PJ (1980) Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behavior* 28: 1140–1162.
- Halverson J, Dvorak J e Stevenson T (1995) *Microsatellite sequences for canine genotyping*. US Patent 05874217.
- Hedrick, PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *TRENDS in Ecology & Evolution* 16: 629-636.
- Hillis DM, Mable BK e Moritz C (1996) *Molecular systematics*. Sinauer Associates, Sunderland, MA. 655pp.
- IBAMA (2003) *Lista das Espécies da Fauna Brasileira Ameaçadas de Extinção*. Anexo à Instrução Normativa nº 3, de 27 de maio de 2003, do Ministério do Meio Ambiente. Disponível em: www.ibama.gov.br.

- IBDF/FBCN, (1981) Plano de manejo: Parque Nacional das Emas. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- Illiger K (1815) Überlick der Saugerthiere nach ihrer Verteilung über die Welttheile. Akademie der Wissenschaften Berlin Abhandlungen 1804-1811. pp 39-159.
- Jacob AA e Rudran R (2003) Rádotelemetria em estudos populacionais. In: Cullen Jr L, Rudran R and Pádua CV (eds) Métodos de Estudos em Biologia da Conservação & Manejo da Vida Silvestre. Editora da UFPR e Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, pp. 285-341.
- Jácomo ATA (1999) Nicho alimentar do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1811) no Parque Nacional das Emas-GO. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Jácomo ATA, Silveira L e Diniz-Filho JAF (2004) Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in central Brazil. J. Zool. Lond. 262: 99–106.
- Kennedy PK, Kennedy ML, Clarkson PL e Liepins IS (1991) Genetic variability in natural populations of the gray wolf, *Canis lupus*. Can. J. Zool 69: 1183-1188.
- Kenward RE, South AB e Walls SS (2003) Ranges6 vl.2: For the analysis of tracking and locartion data. Online Manual. Anatrack Ltd. Walrehan, UK. ISBN 0-9546327-0-2.
- Kimberley, AN (1998) Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Disponível em: <http://straylight.tamu.edu/bene/esa/raesg/manedwolf.html>.
- Krebs JK (1998) Ecological Methodology. 2nd ed. Benjamin/Cummings imprint. Menlo Park. Califónia, USA.

- Lombardi JA e Motta-Jr JC (1993) Seed Dispersal of *Solanum lycocarpum* St. Hil. (Solanaceae) by the Maned Wolf, *Chrysocyon brachyurus*, Illiger (Mammalia, Canidae). *Ciência e Cultura* 45:126-127.
- Maia OB e Gouveia AMG (2002) Birth and mortality of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) in captivity. *Braz J Biol.* 62:25-32.
- Manly BFJ (1991) *Randomization and Monte Carlo Methods in Biology*. Chapman & Hall, London, 281 pp.
- Mantovani JE (2001) Telemetria convencional e via satélite na determinação das áreas de vida de três espécies de carnívoros da região nordeste do estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Ecologia e Recursos Naturais, Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.
- Mohr CO (1947) Table of equivalent populations of North American small mammals. *American Midland Naturalist* 37:223-249.
- Moreira JR, Guimarães NK, Pilla EJS, Contel EPB e Bem ARD (1998) Estudo preliminar da variabilidade genética do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*). Comunicado técnico EMBRAPA 30:1-10.
- Motta-Jr JC (1996) Diet of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*, in central Brazil. *Journal Zoology* 240: 277-284.
- Motta-Jr JC (2002) Fama injusta: novas informações sobre a dieta do lobo-guará podem ajudar a preservá-lo. *Ciência Hoje* 31: 71-73.
- Murren JC, Julliard R, Schlichting CD e Clobert J (2001) Dispersal, individual phenotype, and phenotypic plasticity. In: Clobert J, Danchin E, Dhondt, AA and Nichols JD (eds) *Dispersal*. Oxford university Press, New York, pp 261-272.

- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB e Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853-858.
- Nams VO (2001) Locate II, (versão 2.82): A program to triangulate radiotelemetry bearings and calculate error ellipses. Disponível em www.nsic.ns.ca/envsci/staff/vnams/Locate.htm.
- Primack RB e Rodrigues E (2001) *Biologia da Conservação*. E. Rodrigues, Londrina, 328 pp.
- Ratnayeke MS (1997) Female philopatry and spatial organization in the raccoon, *Procyon lotor*. PhD Thesis, University of Tennessee, Knoxville.
- Ratnayeke S, Tuskan GA e Pelton MR (2002) Genetic relatedness and female spatial organization in a solitary carnivore, the raccoon, *Procyon lotor*. *Molecular Ecology* 11: 1115-1124.
- Rodrigues FHG (2002) *Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF*. Tese de Doutorado em Ecologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.
- Rodrigues FM, Pádua GCC, Resende LV, Telles MPC, Jácomo ATA, Silveira L e Bossois LM (2004) Levantamento do status da variabilidade genética na população de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus* - Illiger, 1815) do Parque Nacional das Emas. Resumos do 50º Congresso Nacional de Genética, Florianópolis, Brazil.
- Roff DA e Fairbairn, DJ (2001) The genetic basis of dispersal and migration and its consequences for the evolution of correlated traits. In: Clobert J, Danchin E, Dhondt, AA and Nichols JD (eds) *Dispersal*. Oxford university Press, New York, pp 191-202.
- Rohlf FJ (1991) *NTSYS: Numerical taxonomy and multivariate analysis system*. Exeter Publishing Co, New York.
- Shaffer ML (1981) Minimum population sizes for species conservation. *BioScience* 31: 131-134.

- Silva JA e Talamoni AS (2003) Diet adjustments of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Mammalia, Canidae) subjected to supplemental feeding in a private natural reserve, Southeastern Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia* 20: 339-345.
- Silva JA e Talamoni AS (2004) Core area and center of activity of maned wolves *Chrysocyon brachyurus* (Illiger) (Mammalia, Canidae), submitted to supplemental feeding. *Revista Brasileira de Zoologia* 21: 391-395.
- Silveira L (1999) Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, Goiás. Dissertação de Mestrado em Ecologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Silveira L e Jácomo ATA (1998) Ecologia e conservação de mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, GO. Relatório Técnico para o IBAMA/DIREC/DEUC.
- Sneath PHA e Sokal RR (1973) Numerical taxonomy. W. H. and Freeman, San Francisco.
- Tanaka R (1980) Controversial problems in advanced research on estimating population densities of small rodents. *Research Population Ecology Supplement* 2: 1-66.
- Tautz D (1989) Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Res.* 17: 6463-6471.
- Templeton, AR (1987) Inferences on natural population structure from genetic studies on captive mammalian population. In: Chepko-Sade DB and Halpin ZT (eds) *Mammalian dispersal patterns: The effects of social structure on population genetics*. The University of Chicago Press, Chicago e London, pp 257-272.
- Van Staaden MJ, Chesser RK e Michener GR (1994) Genetic correlation and matrilineal structure in a population of *Spermophilus richardsonii*. *Journal of Mammalogy* 75: 573-582.
- Waser PM e Jones WT (1983) Natal philopatry in solitary mammals. *Quarterly Review of Biology* 58: 355-390.

- Wayne RK, Gilbert DA, Lehman N, Hansen K, Eisenhaver A, Girman D, Peterson RO, Mech LD, Gogan PJP, Seal US e Krumeraker RJ (1991) Conservation genetics of endangered Isle Royale gray wolf. *Conservation Biol* 5: 41-51.
- Welsh J e McClelland M (1990) Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7213-7218.
- Whitte GC e Garrot RA (1990) *Analysis of Wildlife Radio-Tracking Data*. Academic, San Diego.
- Williams JGK, Kubelik A, Livak K, Rafalsski J e Tingey SV (1990) DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6531-6535.
- Wrangham RW (1979) On the evolution of ape social systems. *Social Science Information* 18: 334–368.
- Wrangham RW (1980) An ecological model of female-bonded primate groups. *Behaviour* 75: 262–300.

CAPÍTULO 4

Artigo submetido: *Genetics and Molecular Biology*

Extinção por Depressão Endogâmica sob Estocasticidade Ambiental em uma População de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e outra de cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) no Sudoeste do Estado de Goiás: Um Estudo de Simulação

FLÁVIA MELO RODRIGUES^{1,2} E JOSÉ ALEXANDRE FELIZOLA DINIZ-FILHO^{3,4*}

¹Universidade Estadual de Goiás, Departamento de Biologia; Anápolis-GO; ²Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais, UFG; ³Departamento de Biologia Geral, ICB, Universidade Federal de Goiás (UFG); ⁴ Departamento de Biologia, MCAS, Universidade Católica de Goiás (UCG);

Resumo

A perda de variabilidade genética e a depressão endogâmica são os dois principais fatores genéticos que podem levar uma população à extinção. Populações pequenas têm níveis mais baixos de diversidade genética do que populações grandes, devido à ocorrência de deriva genética. A extinção de uma população é uma consequência de um *feedback* positivo entre o declínio do tamanho populacional e aumento de endogamia, sendo este fenômeno conhecido por “vortex” de extinção. Flutuações no tamanho populacional devido a estocasticidade ambiental interagem com a depressão endogâmica e reforçam o vortex de extinção. O Cerrado do sudoeste goiano, no qual está inserido o Parque Nacional das Emas, está extremamente fragmentado e com um intenso processo de ocupação humana, principalmente devido à atividade agrícola, que provoca fortes ameaças à diversidade biológica. O objetivo deste trabalho foi estimar o tempo de extinção em duas populações de canídeos do Parque Nacional das Emas, o lobo-guará e o cachorro-do-mato, utilizando um modelo teórico que assume que a combinação dos efeitos da depressão endogâmica sob estocasticidade ambiental são os possíveis fatores que levam a extinção dos organismos em populações isoladas. As simulações das dinâmicas populacionais das duas espécies se basearam em três equações que avaliam a dinâmica da média da frequência alélica de genes deletérios (q), o coeficiente de endogamia (F) e o tamanho da população (N). A heterozigiosidade média esperada foi calculada partir dos dados de seis locos STR e usada para estimar o tamanho efetivo das populações, com base no processo mutacional passo-a-passo

(*Stepwise*). Assim sendo, as simulações para cada espécie foram realizadas usando 12 combinações de três variáveis, i.e., as taxas de redução da capacidade de suporte do ambiente (K), os coeficientes de endogamia (F) e o desvio-padrão do tamanho da população (s_N). Em seguida, foi realizada uma Análise de Variância Fatorial (ANOVA) para modelar a variação no tempo de extinção em função dos parâmetros usados e suas interações. A média do tempo de extinção foi afetado pelos três parâmetros analisados e suas interações, principalmente K e s_N . Quando considerado um pior cenário, ou seja, maior flutuação populacional, alta endogamia e altas taxas de diminuição da capacidade de suporte, o tempo médio de extinção do lobo-guará foi igual a 363 anos, e para o cachorro-do-mato esse tempo foi igual a 431 anos. Uma análise comparativa, utilizando uma combinação semelhante de parâmetros para as duas espécies, mostrou que a diminuição da população de lobo-guará é sempre mais rápida que a da população de cachorro-do-mato. Este resultado é coerente com expectativas baseadas em parâmetros demográficos e história de vida diferentes nas duas espécies. Estes resultados mostram que as populações podem persistir por um tempo razoável mesmo no pior cenário. Porém, deve-se estar atento para estes resultados, uma vez que este estudo é uma projeção teórica baseada em muitas suposições, e é bastante liberal principalmente quanto ao tamanho efetivo inicial. Sendo assim, este estudo deve ser um ponto de partida para futuras avaliações mais precisas da persistência destas populações, que possam gerar resultados baseados em parâmetros mais realistas da viabilidade destas populações na região sudoeste do Estado de Goiás.

Palavras-chave: Análise de viabilidade populacional, Extinção, Canídeos, Marcadores STR, Parque Nacional das Emas.

Enviar correspondência para FM Rodrigues. Universidade Estadual de Goiás, Departamento de Biologia, Unidade Universitária de Ciências Exatas e Tecnológicas, BR 153, Km 3, Campus Anápolis, CEP: 75110-390, Caixa Postal: 459, Anápolis, GO, Brasil. E-mail: flavia.melo@ueg.br

Abstract

A typical question addressed by modern programs in conservation biology and the basis of the so called population viability analysis (PVA) is what is the chance that a population persists for a given number of years, given certain conditions of habitat and human activities. Modern PVA analysis must combine factors at genetic, demographic and landscape levels to create more realistic and precise models predicting population persistence. In this study, we used Tanaka's (2000) model of extinction in stochastic environments under inbreeding depression to model time to extinction in populations of two canid species living in Emas National Park (ENP) and surroundings, the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). Initial estimation of some genetic parameters in the population were based on 6 STR loci, furnishing estimates of the effective population size, under a stepwise mutation model based on heterozygosity, and of inbreeding levels of the two species. Our simulations were defined using 12 scenarios, allowing variations in variable rates of habitat loss, magnitude of population fluctuation and initial inbreeding levels. ANOVA of simulation results showed that times to extinction were better explained by demographic parameters, and based on large (probably overestimated) population sizes, the variation in these times for the large-bodied maned wolf ranged, on average, from 352 to 844, in the worst and best scenario, respectively. For the small-bodied crab-eating fox, these same estimates are 422 and 974 years. Variations among simulations are within expectation based on knowledge about species' life-history, genetics and demography. Although our simulations show that the populations can persistence through a reasonable time (i.e., more than 100 years), these results are probably sensitive to unrealistic assumption on initial population sizes. Despite this, our analyses are a starting point for a more focused evaluation of persistence in these populations and can drive future research towards obtaining better estimates of parameters that can, in turn, be used to fuel more appropriate and realistic PVA models.

Key words: Population persistence, Population Viability Analysis, Canids, STR markers, Emas National Park

INTRODUÇÃO

A perda de variabilidade genética e a depressão endogâmica são os dois principais fatores genéticos que podem levar uma população à extinção (Lynch e Lande, 1993; Barret e Charlesworth, 1991; Soule, 1986). Possivelmente, a contribuição recente mais importante em relação à genética da conservação seja o reconhecimento da importância da depressão endogâmica quando se trata de espécies ameaçadas, de modo que a redução da endogamia tem se tornado uma prioridade em programas de conservação *in situ* e *ex situ* (Hedrick, 2001). A depressão endogâmica resulta no aumento da homozigosidade de mutações deletérias recessivas em pequenas populações e, portanto, um número menor de descendentes, ou descendentes estéreis são algumas das características da depressão endogâmica (Charlesworth e Charlesworth, 1987; Ralls *et al.*, 1988). Populações pequenas têm níveis mais baixos de diversidade genética do que populações grandes. Isto se deve à ocorrência de deriva genética, onde alguns alelos podem aumentar sua frequência, outros diminuem e alguns alelos podem ser perdidos completamente (Frankham *et al.*, 2002). Alguns mecanismos presentes em grandes populações evitam a endogamia, ou seja, os indivíduos não acasalam com parentes próximos porque eles se dispersam do seu local de nascimento ou o acasalamento entre parentes é inibido por odores ou outras pistas sensoriais (Primack e Rodrigues, 2001). Entretanto, em populações com baixas densidades demográficas, estes mecanismos não conseguem evitar a endogamia. Assim sendo, este fator (endogamia) pode contribuir para um declínio no tamanho da população e conseqüentemente favorecer a probabilidade de extinção (Ellstrand e Elam, 1993).

A extinção de uma população é uma conseqüência de um *feedback* positivo entre o declínio do tamanho populacional e aumento de endogamia, sendo este fenômeno é conhecido por “vortex” de extinção (Frankham *et al.*, 2002; Hedrick, 2001). Vortex de extinção é um sistema de retroalimentação, envolvendo diversos processos genéticos e demográficos. Faz com que o tamanho populacional, uma vez reduzido abaixo de um dado valor crítico, tenda a se

reduzir cada vez mais, levando a população (e, em segundo momento, toda a espécie) à extinção. Porém, as interações entre fatores genéticos, demográficos e ambientais fazem com que seja extremamente difícil identificar as causas imediatas para qualquer evento particular de extinção (Frankham *et al.*, 2002).

Correlações entre aptidão (*fitness*), heterozigosidade e taxa de endogamia estimadas de populações naturais fornecem evidências indiretas de depressão endogâmica na natureza (Britten, 1996; Tanaka, 2000a). Não é muito clara a interpretação das estimativas de heterozigosidades para o processo de extinção. Primeiro, porque existem poucos exemplos de extinção populacional devido à depressão endogâmica, e segundo porque as investigações das propriedades teóricas do vortex de extinção por depressão endogâmica tornam difícil avaliar o risco genético de extinção baseada em dados empíricos (Tanaka, 2000a). Alguns estudos têm considerado o vortex de extinção usando modelos genéticos e populacionais e sugerem que a rápida extinção devido à depressão endogâmica é restrita, porém possível com os parâmetros genéticos observados (Tanaka, 1997, 1998, 2000b).

Se a depressão endogâmica for causada por mutações deletérias recessivas que estão “escondidas” nos heterozigotos, as grandes populações estão mais sujeitas à depressão endogâmica do que as pequenas populações. Isso porque, uma grande população que no passado passou por um efeito “*bottleneck*” e manteve uma alta heterozigosidade conterà mais mutações deletérias do que as populações pequenas (Hedrick, 2001). Em pequenas populações, por outro lado, a maioria das mutações deletérias são rapidamente eliminadas pela seleção, que é mais eficiente em baixas taxas de heterozigosidades (Tanaka, 1997). Sendo assim, a história demográfica de uma população pode ter uma importante relação com a extinção, uma vez que a endogamia pode ser induzida por distúrbios demográficos, genéticos e estocasticidade ambiental (Tanaka, 1997).

As flutuações no tamanho populacional devido a estocasticidade ambiental, tais como temperatura, disponibilidade de alimento, competição, interação com a depressão endogâmica e reforçam o vórtice de extinção (Tanaka, 2000b). Segundo Primack e Rodrigues (2001), as maiores ameaças à diversidade biológica que resultam da atividade humana são: destruição, fragmentação e degradação do habitat, superexploração das espécies para uso humano, introdução de espécies exóticas e aumento de ocorrência de doenças. Dentre as principais causas de ameaças de extinção em mamíferos estão a perda de habitat, responsável por 68%, e a superexploração, que inclui a caça comercial, esportiva e de subsistência, responsável por 54 % (Reid e Miller, 1989).

O Cerrado da região sudoeste do Estado de Goiás, no qual está inserido o Parque Nacional das Emas (PNE), está extremamente fragmentado, e com um intenso processo de ocupação humana. Por exemplo, apenas cerca de 27% do entorno do PNE, em um raio de 30 Km, possui áreas de remanescentes florestais (Figura 1). Fazem parte desta região extensas lavouras de milho, soja e pastagem (Pedroso, 2004). Basicamente, o que impulsionou a inserção dos Cerrados nas áreas produtivas e, conseqüentemente, o desenvolvimento agrícola do Centro-Oeste, foram alguns programas específicos implementados nessa região ainda nos anos 1950-1960. Dentre os principais, destacam-se o Programa de Desenvolvimento dos Cerrados (POLOCENTRO) e o Programa de Cooperação Nipo-Brasileira para Desenvolvimento dos Cerrados (PRODECER) (Bezerra e Cleps-Júnior, 2004).

O sudoeste goiano teve um desenvolvimento diferenciado das demais regiões do Estado por ser uma área agropecuária de ocupação bastante antiga, próxima ao Triângulo Mineiro e São Paulo. Inicialmente, a principal atividade econômica na região era a criação de gado. A partir de 1960, a região passa a vivenciar uma nova fase de desenvolvimento agrícola, incentivada pelo pacote tecnológico da Revolução Verde e principalmente, pela intervenção do Estado por meio de políticas desenvolvimentistas (Pedroso, 2004). Com isto ocorre uma desenfreada ocupação humana no cerrado goiano, em especial na região Sudoeste de Goiás, provocando o

desmatamento, afetando dentre outros processos a infiltração da água fluvial e assim o abastecimento de vários lençóis freáticos, diminui drasticamente. Como consequência, vários rios já secaram nos domínios do cerrado, além de erosões e compactação do solo, devido à pesada mecanização (Pedroso, 2004; Rodrigues *et al.*, 2001).

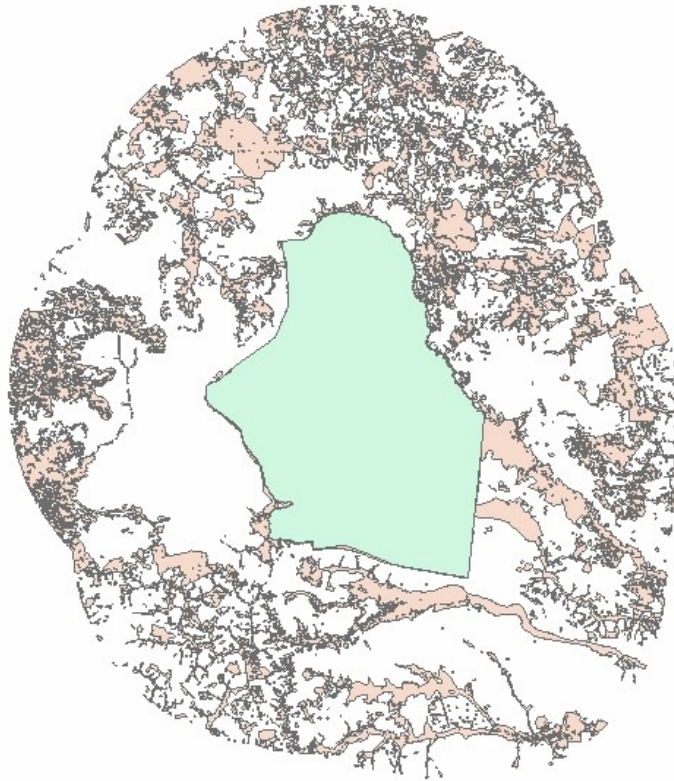


Figura 1. Remanescentes florestais no entorno do Parque Nacional das Emas (Adaptado de Mário Barroso Neto, 2005)

O objetivo deste trabalho foi estimar o tempo de extinção em duas populações de Canídeos do sudoeste do Estado de Goiás, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), utilizando o modelo de Tanaka (2000a), que considera a depressão endogâmica e estocasticidade ambiental como possíveis fatores que levam a extinção dos organismos. O cenário ecológico começou com uma análise genética de populações de cada uma dessas duas espécies, situadas no Parque Nacional de Emas e usando dados de marcadores

moleculares Microssatélites ou STR (*Short Tandem Repeats*) (Rodrigues *et al.*, 2005; ver capítulo 2). O valor da heterozigosidade esperada (H_e) foi utilizado para estimar o tamanho efetivo da população, sob um modelo mutacional *stepwise* e os marcadores STR foram utilizados para uma estimativa inicial dos coeficientes de endogamia (F) nas populações. Para a realização das simulações, foram obtidos outros parâmetros, utilizando abordagens macroecológicas, e os resultados foram discutidos segundo o conhecimento global da região estudada e a história de vida das espécies. Nas simulações, assumiu-se que a combinação dos efeitos de isolamento, perda de hábitat (redução na capacidade de suporte da região) e estocasticidade ambiental podem levar as populações à extinção.

MATERIAL E MÉTODOS

O modelo genético

As simulações da dinâmica populacional das duas espécies estudadas se basearam em Tanaka (2000a), que descreve um modelo de extinção por depressão endogâmica sob estocasticidade ambiental. Assume-se, portanto, que a depressão endogâmica envolve genes deletérios recessivos, distribuídos entre os n locos autossômicos bi-alélicos, com taxas de mutação, coeficientes de seleção e dominância semelhantes. O modelo também assumiu que os efeitos do desequilíbrio de ligação e interações epistáticas são desprezíveis. Os genótipos AA, Aa e aa, em cada loco, têm um *fitness* médio igual a 1, 1 e $1 - s$, respectivamente, onde s é o coeficiente de seleção.

O modelo de Tanaka (2000a) se baseia em três equações dinâmicas recorrentes, para a média da frequência alélica q de genes deletérios, o coeficiente de endogamia F e o tamanho da população N . Estas equações são

$$q_{t+1} = q_t - s[q^2 + F_t q (1 - q)] + \mu + \gamma \quad (\text{eq. 1})$$

$$F_{t+1} = (1/2N_t + (1 - 1/2N_t)F_t) (1 - 2\mu) (1 - sq_t) \quad (eq. 2)$$

$$N_{t+2} = N_{t+1} \exp[r_{max} (1 - (N_{t+1}/K_{t+1}) + \varepsilon] \delta \quad (eq. 3)$$

Na equação (1), μ é a taxa de mutação e γ é uma variável aleatória com média 0 e desvio padrão igual a $(q(1-q)/2nN)^{1/2}$, onde n é o número de locos. A equação (3) mostra que o tamanho da população N cresce de acordo com um modelo logístico discreto no tempo t , com capacidade de suporte K e uma flutuação em torno da média de N com o desvio padrão ε . O parâmetro Maltusiano (taxa de crescimento intrínseca) é dado por r_{max} , assim sendo um aumento discreto de N por geração, λ , é determinado por

$$\lambda = \exp [(r_{max})(1 - N_t/K_t)] \quad (eq. 4)$$

Porém, a população também está sofrendo efeitos de eventos externos, e assim pressupõe-se que a capacidade de suporte K varia com o tempo e está sendo reduzida com uma taxa h por unidade de tempo t (em anos, que é a escala da taxa de crescimento λ). Assim, temos que

$$K_{t+1} = Kt - hK_t \quad (eq. 5)$$

O modelo original de Tanaka (2000a) assume uma diminuição exponencial, mas neste estudo assumiu-se uma diminuição linear e constante através do tempo, gerando uma diminuição mais rápida em K . Devido os intervalos relativamente pequenos de N (veja abaixo), esta pequena mudança fará pouca diferença em relação ao modelo original. Além disso, o tamanho da população é reduzido pelo fator δ , que é uma função das frequências alélicas q e de como os genes deletérios afetam a taxa de crescimento da população. Assim, o crescimento da população está relacionado com a carga genética L e é dado como $\lambda\delta$, onde

$$\delta = (1 - L) = 1 - nsq^2 \quad (eq. 6)$$

Os cálculos descritos acima foram implementados no programa GLOADRUN, escrito em linguagem Q-BASIC e que será disponibilizado aos interessados mediante solicitação (Apêndice 1).

Contexto ecológico e Parametrização do Modelo

O modelo descrito acima foi utilizado para avaliar a dinâmica populacional dentro da população de lobo-guará e de cachorro-do-mato do Parque Nacional das Emas - GO e regiões do entorno (Figura 2). A partir das análises de variabilidade genética, utilizando seis locos STR (Rodrigues *et al.*, 2005; ver capítulo 2) obteve-se a heterozigosidade média esperada para cada população, iguais a 0,533 e 0,676 para lobo-guará e cachorro-do-mato, respectivamente. Para o processo mutacional, foi utilizado o modelo *Stepwise* (SMM – *Stepwise Mutation Model*, Nei e Kumar, 2000) a fim de se estimar o tamanho efetivo da população, com base na seguinte equação

$$He = 1 - [1/(1 + 8Nu)^{1/2}] \quad (eq. 7)$$

onde He é a heterozigosidade esperada, N é o tamanho efetivo, u é a taxa de mutação por geração.

O modelo SMM é o mais aceito para marcadores STR e admite que a mutação nos alelos resultam da perda ou ganho de uma única unidade de repetição, de modo que os alelos poderiam variar apenas através de estados alélicos anteriormente presentes na população. Assim sendo, pode-se então aproximar o tamanho efetivo da população de lobo-guará e cachorro-do-mato de toda região (não necessariamente dentro do PNE) como sendo $Ne \approx 500$ e $Ne \approx 1000$, respectivamente. Multiplicando-se estes valores por um fator conservador igual a 2 (Morris & Doak, 2002), obtem-se uma estimativa inicial razoável do tamanho da população N na região, na ausência de estimativas empíricas melhores.

O desvio padrão do tamanho da população (s_N) foi fixados em 5 ou 10 indivíduos, e assim este parâmetro pode causar pequenos efeitos em densidades populacionais altas, mas grandes efeitos em pequenas densidades populacionais, promovendo um vortex de extinção.

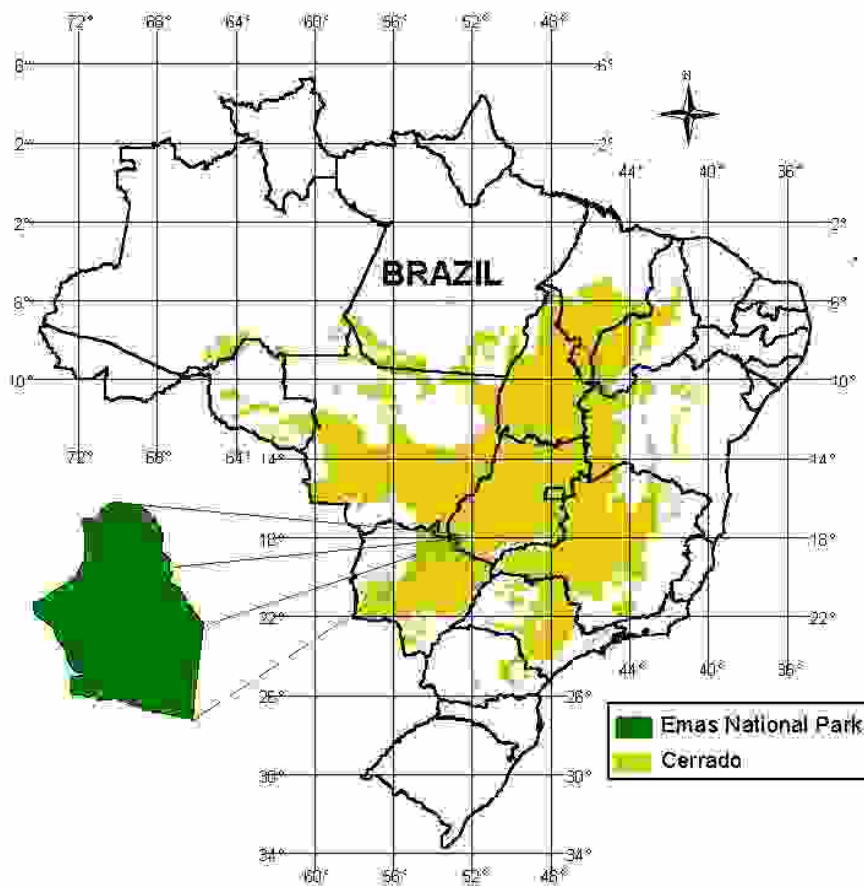


Figura 2. Localização do Parque Nacional das Emas - GO.

Uma vez que, estamos simulando processos dinâmicos populacionais em uma unidade de reserva relativamente grande (o PNE), as simulações foram rodadas com duas taxas de diminuição da capacidade de suporte K relativamente baixas, igual a 0.005 e 0.01 indivíduos por ano. Note-se que isto indica que mesmo que a área global do PNE seja mantida ao longo do tempo, a capacidade de suporte da população estará reduzida, assumindo efeitos de borda indiretos, tais como redução no tamanho das populações de presas, poluição ou perda de habitats satisfatórios dentro do parque.

Como não há nenhum dado disponível para se estimar a taxa de crescimento das duas espécies, foi utilizada a seguinte equação empírica (Alroy, 2001)

$$r_{max} = \exp[1.4967 - 0.37 (\log M)] \quad (\text{eq. } 8)$$

Onde $\log M$ é o logaritmo natural da massa corpórea das espécies, definido como sendo igual a 24 Kg para o lobo-guará e 6 Kg para o cachorro-do-mato (Einsenberg e Redford, 1999). Assim, a taxa de crescimento intrínseca máxima para as duas espécies foi igual a 0,10 e 0,17 para o lobo-guará e cachorro-do-mato, respectivamente.

Devido à grande variação nos coeficientes de endogamia (F) calculados por loco para as duas espécies (ver capítulo 2) usando os seis locos STR, que variaram de -0,394 a 0,197 (média igual a -0,091) para o lobo-guará e -0,055 a 0,205 (média igual a 0,032) no cachorro-do-mato, decidiu-se correr as simulações com três valores iniciais baixos de F , iguais a 0.01, 0.05 e 0.10. Os outros parâmetros de carga genética foram iguais àqueles utilizados por Tanaka (2000a), de tal forma que $\mu = 10^{-6}$, $n = 15000$ locos e coeficiente de seleção s igual a 1.

Assim sendo, as simulações para cada espécie foram realizadas usando 12 combinações dos três parâmetros: “baixa” e “alta” taxas de redução da capacidade de suporte K (0.005 e 0.01); “baixos” “médios” e “altos” coeficientes de endogamia F (0.01, 0.05 e 0.10) e “baixo” e “alto” desvio padrão do tamanho da população s_N (5 e 10 indivíduos) (Tabela 1). Para cada combinação de parâmetros, foram executadas 500 simulações e o tempo de extinção Te foi obtido.

Para avaliar como a combinação dos parâmetros utilizados afetam Te , uma análise de variância fatorial (ANOVA) (Sokal & Rohlf, 1985) foi usada para modelar a variação em Te como uma função dos parâmetros usados e suas interações.

Tabela 1- Identificação dos 12 cenários simulados, a partir das combinações dos três parâmetros utilizados, que incluem variações na capacidade de suporte (K), no desvio padrão no tamanho das populações (s_N) e no coeficiente de endogamia (F).

Cenários	Combinações
1	$K = 0,005; s_N = 5; F = 0,01$
2	$K = 0,005; s_N = 5; F = 0,05$
3	$K = 0,005; s_N = 5; F = 0,10$
4	$K = 0,005; s_N = 10; F = 0,01$
5	$K = 0,005; s_N = 10; F = 0,05$
6	$K = 0,005; s_N = 10; F = 0,10$
7	$K = 0,01; s_N = 5; F = 0,01$
8	$K = 0,01; s_N = 5; F = 0,05$
9	$K = 0,01; s_N = 5; F = 0,10$
10	$K = 0,01; s_N = 10; F = 0,01$
11	$K = 0,01; s_N = 10; F = 0,05$
12	$K = 0,01; s_N = 10; F = 0,10$

RESULTADOS

De acordo com a Análise de Variância (ANOVA), a média do tempo de extinção, Te , para as duas espécies (Tabela 2) foi afetada pelos três parâmetros analisados e suas interações, principalmente pela taxa da redução na capacidade de suporte e pelo desvio padrão do tamanho da população.

Tabela 2- Valores de F e nível de significância (P), obtidos a partir da Análise de Variância (ANOVA), dos três parâmetros analisados: redução na capacidade de suporte (K); desvio padrão no tamanho das populações (s_N) e coeficiente de endogamia (F) e suas interações, em relação ao tempo de extinção (Te) nas duas espécies estudadas.

Fontes de Variação	F e (P)	
	lobo-guará	cachorro-do-mato
K	271470 (0.000)	353855 (0.000)
s_N	21113 (0.000)	19756 (0.000)
F	0.680 (0.507)	0.912 (0.402)
$K * s_N$	2241 (0.000)	2128 (0.000)
$K * F$	0.574 (0.563)	3.239 (0.039)
$s_N * F$	1.586 (0.205)	1.548 (0.213)
$K * s_N * F$	0.299 (0.742)	3.732 (0.024)

Como esperado, os piores cenários (i.e., Te mais curto) ocorreram para ambas as espécies quando as populações flutuaram mais e apresentaram alta endogamia, vivendo em ambientes com alta taxa de diminuição na capacidade de suporte (Tabelas 3 e 4).

Para o lobo-guará, os valores de Te variaram de 413 a 291 anos, quando considerado o pior cenário (cenário 12), e entre 932 a 756 anos, quando considerado o melhor cenário (cenário 1) (Tabela 3). Os principais fatores que afetaram o Te nesta espécie foram a redução na

capacidade de suporte e o desvio padrão do tamanho da população, e a ANOVA explicou 98% da variância total em T_e (Tabela 2).

Para o cachorro-do-mato, os valores de T_e variaram de 486 a 359 anos, quando considerado o pior cenário, e entre 1099 a 849 anos, quando considerado o melhor cenário (Tabela 4). Para esta espécie, os três fatores analisados afetaram significativamente o T_e , mas o efeito do coeficiente de endogamia só foi significativo quando considerado a interação com K e com K^*_{SN} . O modelo da ANOVA também explicou 98% da variância total em T_e (Tabela 2).

Tabela 3- Tempo de extinção para o lobo-guará, considerando todos os cenários analisados.

Cenário	Máximo	Mínimo	Médio	Desvio Padrão
1	932	756	848	34
2	947	688	846	36
3	939	754	850	33
4	799	594	707	36
5	805	570	709	33
6	812	591	708	34
7	492	362	435	20
8	493	378	435	19
9	487	370	436	21
10	428	296	364	20
11	412	313	364	19
12	413	291	363	20

Tabela 4- Tempo de extinção para o cachorro-do-mato, considerando todos os cenários analisados.

Cenário	Máximo	Mínimo	Médio	Desvio Padrão
1	1099	849	981	37
2	1060	856	979	37
3	1078	880	985	35
4	925	718	839	34
5	934	726	843	35
6	934	726	842	35
7	552	442	502	20
8	559	434	501	21
9	575	435	500	21
10	482	369	431	20
11	494	366	430	21
12	486	359	431	20

A realização de uma única simulação, usando o pior e o melhor cenário (cenário 1 e cenário 12, respectivamente) para cada espécie, é mostrada nas Figuras 3 e 4 para efeito de comparação e visualização dos padrões em N e F . É possível ver que, quando utilizado uma combinação semelhante de parâmetros, a diminuição da população de lobo-guará é sempre mais rápida que a da população de Cachorro do mato. As diminuições no tamanho das populações, em ambas espécies, são devidas à redução da capacidade de suporte, além dos efeitos da depressão endogâmica.

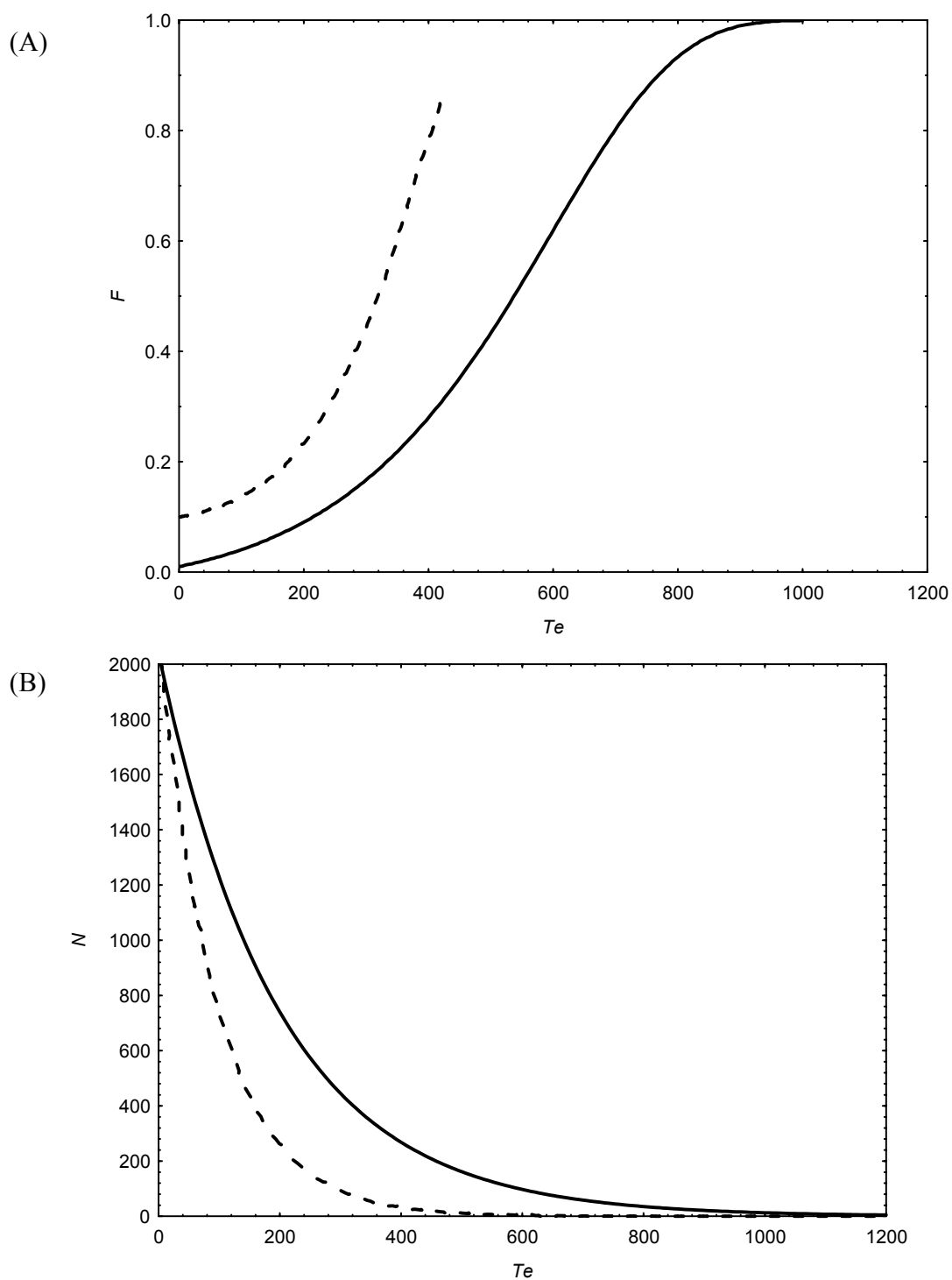


Figura 3. Resultado de uma simulação para a variação nos valores de F (A) e no tamanho populacional (B) ao longo do tempo, para a população de cachorro-do-mato, nos dois cenários extremos. A linha sólida mostra a trajetória do melhor cenário (1) e a linha tracejada indica a trajetória do pior cenário (12).

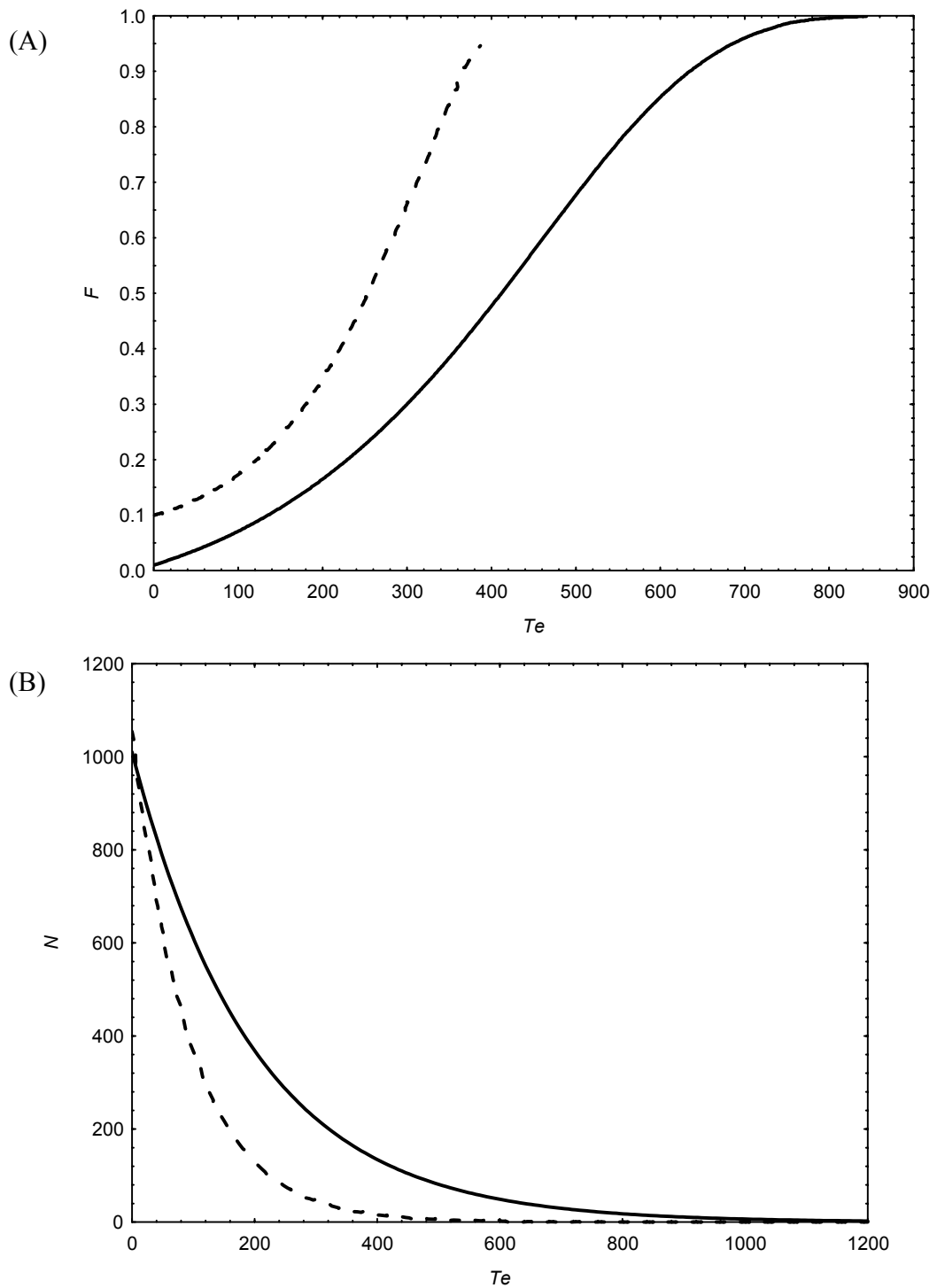


Figura 4. Resultado de uma simulação para a variação nos valores de F (A) e no tamanho populacional (B) ao longo do tempo, para a população de lobo-guará, nos dois cenários extremos. A linha sólida mostra a trajetória do melhor cenário (1) e a linha tracejada indica a trajetória do pior cenário (12).

DISCUSSÃO

Há um tempo atrás, considerava-se que a contribuição de fatores genéticos para o destino de espécies em extinção era um fator secundário. Sugeria-se que flutuações demográficas e estocasticidade ambiental causariam extinção antes que a deterioração genética se tornasse uma séria ameaça as populações naturais. Porém, as respostas evolutivas de populações frente à estocasticidade ambiental e demográfica não são independentes da endogamia e da diversidade genética. A endogamia, em média, reduz as taxas de natalidade e aumentam os índices de mortalidade e pode influenciar nas relações sexuais entre os indivíduos (Frankham *et al.*, 2002)

Neste estudo, os principais fatores analisados que afetaram o tempo de extinção (T_e) nas duas espécies foram a taxa de redução na capacidade de suporte (K) e o desvio padrão no tamanho da população (s_N). Porém, para a população de cachorro-do-mato, o coeficiente de endogamia (F) foi um fator importante quando considerado a interação com K e com s_N . No entanto, é importante salientar que a ausência de significância estatística do coeficiente de endogamia nas análises de extinção para a população de lobo-guará observada neste estudo não significa que este fator não é importante, e sim que o intervalo de variação utilizado aqui talvez não tenha sido o bastante para gerar variação no T_e final, especialmente considerando uma variação estocástica ao redor de N . Além disso, alguns estudos com grandes mamíferos mostram que estas espécies podem não estar sujeitas à depressão endogâmica por conterem baixas taxas de heterozigidade, provavelmente devido a um antigo “*bottleneck*” (Vilà *et al.*, 2002; Merola, 1994; O’Brien *et al.*, 1983; Sage e Wolff, 1986).

Segundo Tanaka (1997), populações muito pequenas provavelmente sofrem grande risco de extinção devido outros fatores. Alguns estudos mostram que a estocasticidade ambiental e demográfica colocam em grande risco as populações muito pequenas (Leigh, 1981; Goodman, 1987, Iwasa e Mochizuki, 1988; Lande, 1993). Assim sendo, provavelmente estes efeitos estocásticos interagem com a depressão endogâmica no estágio final da extinção (Tanaka, 1997).

Existem algumas evidências empíricas de que a depressão endogâmica é reforçada em função da deterioração ambiental, ou seja, o risco de extinção devido à endogamia é mais acelerado em ambientes deteriorados (habitats fragmentados, devido extensas lavouras, como no PNE) do que em ambientes ideais (Liberg *et al.* 2005; Templeton e Read, 1983; Soule e Kohn, 1989; Pray *et al.*, 1994).

A análise comparativa dos fatores nas duas populações são coerentes com expectativas baseadas em parâmetros demográficos e história de vida diferentes nas duas espécies (Wayne, 1996). O lobo-guará é uma espécie com o tamanho do corpo maior do que o cachorro-do-mato, ou seja, ocupam grandes áreas de vida, assim sendo as taxas de crescimento são mais baixas e estas espécies são mais rapidamente extintas em escalas regionais do que as espécies de pequeno porte (Henle *et al.*, 2004). Por outro lado, em espécies de porte menor, tais como o cachorro-do-mato, as taxas de crescimento demográfico são mais elevadas, embora essas sejam usualmente mais variáveis e estejam mais sujeitas a extinções locais. Entretanto, a extinção total é difícil em função dos eventos constantes de recolonização (Rocha *et al.*, 2004; Rodrigues *et al.*, 2002; Beissinger, 2000; Raup, 1991; Silveira e Jácomo, 1998).

Espécies mais generalistas e abundantes, como o cachorro-do-mato, geralmente são beneficiadas pela fragmentação de habitats, tal como a induzida, por exemplo, pela expansão agrícola, pois frequentemente estes animais possuem grande mobilidade, são hábeis para o uso de diversos habitats e itens alimentares, sendo capazes de explorar também as bordas (Gehring e Swihart, 2003). Por outro lado, espécies, como o lobo-guará, com alto requerimento individual de área de vida, baixa abundância, alta flutuação populacional, baixo potencial reprodutivo e certa especialização de habitat, mostram-se mais sensíveis à fragmentação (Henle *et al.*, 2004).

É claro que as simulações executadas neste estudo só devem ser vistas como avaliações muito preliminares dos riscos de extinção e viabilidade dessas populações, devido a muitos fatores. Primeiro, as simulações foram baseadas em algumas suposições que podem ser, em

primeira instância, irreais. Por exemplo, não há nenhuma informação detalhada sobre a carga genética destas populações e como esta pode afetar alguns parâmetros populacionais básicos, tais como a taxa de mortalidade e fecundidade. Até mesmo uma boa descrição dos parâmetros populacionais, como taxa de crescimento e flutuação de populacional, não foi realizada. Outra questão é que foram utilizados diferentes valores de F nas simulações. No entanto, mesmo que estas estimativas sejam instáveis (mas, normalmente baixas), de um modo geral são obtidos de fato baixos níveis de endogamia nas duas espécies e em outras espécies de canídeos em condições semelhantes (De Mattos *et al.*, 2004; Wayne, 1996).

Para este trabalho, nós estimamos o tamanho inicial das populações N com base nas heterozigosidades esperadas (H_e), calculadas a partir dos dados de STR. No entanto, a relação entre o tamanho observado e o tamanho efetivo das espécies é desconhecida. Assumir uma população de 1000 indivíduos para o lobo-guará e 2000 indivíduos para o cachorro-do-mato em toda a região (não necessariamente apenas no PNE) não é irrealista, e estas estimativas seriam muito menores se utilizássemos equações alométricas baseadas na massa corpórea das espécies (Alroy, 2001, Diniz-Filho, 2004). Mesmo assim, estas estimativas iniciais de 1000 e 2000 indivíduos para as duas espécies podem estar muito superestimadas. Essas estimativas seriam mais adequadas como um valor inicial da população reprodutiva antes da ocupação humana acentuada, em equilíbrio genético. Esse valor pode ter sido consideravelmente reduzido nos últimos 50 anos, especialmente considerando o alto nível de perda de hábitat e ocupação humana na região sudoeste do Estado de Goiás (apesar da presença do PNE). O modelo utilizado aqui não assumiu diretamente a fragmentação de hábitat, um componente importante na paisagem da região, embora este componente possa ser indiretamente capturado pela taxa global de perda de hábitat (capacidade de suporte).

Uma análise considerando valores mais reais do tamanho destas populações (Leandro Silveira, comunicação pessoal) no PNE e regiões do entorno foi realizada. Foi estimada uma

população com 80 indivíduos para o lobo-guará e 150 indivíduos para o cachorro-do-mato. Obviamente, o T_e foi bem menor neste cenário do que nas análises considerando 1000 e 2000 indivíduos. Para estas estimativas empíricas do tamanho populacional, em média o tempo de extinção considerando o pior cenário (12) para o lobo-guará foi igual a 116 anos (desvio padrão = 18), com um máximo de 157 anos e mínimo igual a 57 anos, enquanto que para o cachorro-do-mato o T_e médio foi igual a 172 anos (desvio padrão = 19), com um máximo de 231 anos e um mínimo igual a 106 anos. Quando foi analisado o melhor cenário (1) as estimativas do T_e médio foi igual a 346 anos (desvio padrão = 36), para o lobo-guará e 465 anos (desvio padrão = 35), para o cachorro-do-mato.

Tanaka (1997), sugere que o tamanho efetivo de uma população pode não reduzir-se rapidamente, se a heterozigosidade é alta e a taxa intrínseca de crescimento populacional é suficientemente alta para compensar a endogamia. Uma rápida diminuição no tamanho efetivo da população pode induzir o vortex de extinção, devido à depressão endogâmica. Vários fatores podem diminuir o tamanho efetivo de uma população. Alguns estudos mostram que, se a população está geograficamente subdividida, com restrição na migração entre as subpopulações, o tamanho efetivo da população pode diminuir rapidamente, sem alterar o tamanho atual da população (Blanco *et al.*, 2005; Crow e Aoki, 1984).

Assim sendo, os resultados das simulações realizadas aqui mostram que estas populações podem persistir por um tempo razoável no pior cenário (12), em média 363 anos o lobo-guará e 431 anos o cachorro-do-mato (assumindo 1000 indivíduos de lobo-guará e 2000 indivíduos de cachorro-do-mato) (Tabelas 3 e 4). Porém, deve-se estar atento para estes resultados, uma vez que este estudo é uma projeção teórica baseada em muitas suposições, possivelmente irreais dos processos populacionais que dirigem as populações para a extinção. Sendo assim, este estudo é um ponto de partida para futuras avaliações mais precisas da persistência destas populações, onde melhores estimativas dos parâmetros devem ser avaliadas, a fim de se obter resultados mais

adequados e modelos mais realistas da viabilidade destas populações na região sudoeste do Estado de Goiás.

AGRADECIMENTOS

Nós agradecemos a Mariana Pires de Campos Telles, Leandro Silveira e Anah T. A. Jácomo pelas valiosas discussões sobre a genética de populações e conservação de canídeos do Parque Nacional das Emas - GO. Ao CNPq pelo financiamento de nossas pesquisas dentro do programa PRONEX para análise de áreas prioritárias para conservação da biodiversidade no Cerrado e em Goiás. (CNPq/SECTEC-GO, Proc. No. 23234156).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alroy J (2001) A multi-species overkill simulation of the end-Pleistocene megafaunal mass extinction. *Science* 292: 1893-1896.
- Barrett SCH e Charlesworth D (1991) Effects of a change in the level of inbreeding on the genetic load. *Nature* 352: 522-524.
- Beissinger SR (2000) Ecological mechanisms of extinction. *Proceedings of National Academy of Science USA* 97: 11688-11689.
- Bezerra LMC e Cleps Júnior J (2004) O desenvolvimento agrícola da região Centro-Oeste e as transformações no espaço agrário do estado de Goiás. *Caminhos da Geografia*: 29-49.
- Blanco JC, Cortés Y e Virgós E (2005) Wolf response to two kinds of barriers in an agricultural habitat in Spain. *Can. J. Zool.* 83: 312–323.
- Britten HB (1996) Meta analyses of the association between multi locus heterozygosity and fitness. *Evolution* 50: 2158-2164.
- Charlesworth D e Charlesworth B (1987) Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology and Systematics* 18: 237–268.

- Crow JF e AOKI K (1984) Group selection for polygenic behavioral trait: estimating the degree of population subdivision. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 81:6073-6077.
- De Mattos PSR, Del Lama MA, Toppa RH e Schwantes AR (2004) Populational Genetic Structure of free-living maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) determined by proteic markers. *Braz J Biol* 64: 639-644.
- Diniz Filho JAF (2004) Macroecological Analyses Support the Overkill Scenario for the Late Pleistocene Extinctions. *Revista Brasileira de Biologia* 64: 407-414.
- Eisenberg JF e Redford KH (1999) *Mammals of the Neotropics - The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. University of Chicago Press, Chicago, 609pp.
- Ellstrand NC e Elam DR (1993) Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics* 24: 217-242.
- Frankham R, Ballou JD e Briscoe DA (2002) *Introduction to conservation genetics*. Cambridge University Press. 640pp.
- Gehring TM e Swihart RK (2003) Body size, niche breadth, and ecologically scaled responses to habitat fragmentation: mammalian predators in an agricultural landscape. *Biological Conservation* 109: 283-295.
- Goodman D (1987) The demography of chance extinction. In: Soulé ME (ed.) *Viable Populations for Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge, pp 11-34.
- Hedrick PW (2001) Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology & Evolution* 16: 629-636.
- Henle K, Lindemayer DB, Margules CR, Saunders DA e Wissel C (2004) Species survival in fragmented landscapes: where are we now? *Biodiversity and Conservation* 13: 1-8.

- Iwasa Y e Mochizuki H (1988) Probability of population extinction accompanying a temporary decrease of population size. *Res. Popul. Ecol.* 30: 145–164.
- Lande R (1993) Risks of population extinction from demographic and environmental stochasticity and random catastrophes. *Am. Nat.* 142: 911–927.
- Leigh EG (1981) The average lifetime of a population in a varying environment. *Journal of Theoretical Biology* 90: 213-239.
- Liberg O, Andrén H, Pedersen HC, Sand H, Sejberg D, Wabakken P, Åkesson M e Bensch S (2005) Severe inbreeding depression in a wild wolf *Canis lupus* population. *Biology Letters* 1: 17-20.
- Lynch M e Lande R (1993) Evolution and extinction in response to environmental change. In: P Kareiva, J Kingsolver e R Huey (eds.) *Biotic Interactions and Global Change*. Sinauer Assocs., Inc. Sunderland, MA, pp 234-250.
- Merola M (1994) A reassessment of homozygosity and the case for inbreeding depression in the cheetah, *Acinonyx jubatus*: implications for conservation. *Conservation Biology* 8: 961–971.
- Morris WF e Doak DF (2002) *Quantitative Conservation Biology: the Theory and Practice of Population Viability Analysis*. Sinauer Associates, Sunderland, MA, 480 pp.
- Nei M e Kumar S (2000) *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Oxford University Press, Oxford, 333 pp.
- O'Brien SJ, Wildt DE, Goldmann D, Merrill CR, e Bush M (1983) The cheetah is depauperate in genetic variation. *Science* 221: 459–462.
- Pedroso ILPB (2004) Meio ambiente, agroindústria e ocupação dos cerrados: o caso do município do Rio Verde no sudoeste de Goiás. *Revista Urutágua* (6): 1-10.

- Pray LA, Schwartz JM, Goodnight GJ e Stevens L (1994) Environmental dependency of inbreeding depression: implications for conservation biology. *Conservation Biology* 8: 562–568.
- Primack RB e Rodrigues E (2001) *Biologia da conservação*. E. Rodrigues, Londrina, 328 pp.
- Ralls KJ, Ballou D e Templeton A (1988) Estimates of lethal equivalents and the cost of inbreeding in mammals. *Conserv. Biol.* 2: 185-193.
- Raup D (1991) *Extinction – bad genes or bad luck?* W.W. Norton & Company, New York, 210 pp.
- Reid WV e Miller KR (1989) *Keeping options alive: the scientific basis for conserving biodiversity*. World Resources Institute, Washington, D.C, 185pp.
- Rocha VJ, Reis NR e Sekiama ML (2004) Dieta e dispersão de sementes por *Cerdocyon thous* (Linnaeus) (Carnívora, Canidae) em um fragmento florestal no Paraná Brasil. *Revista Brasileira de Zoologia*, **21** (4), 871-876.
- Rodrigues FHG, Silveira L, Jácomo ATA, Bezerra AP, Coelho AMR, Santos DC, Pagnozzi HG e Hass A (2002) Composição e caracterização da fauna de mamíferos do Parque Nacional das Emas, Goiás. *Revista Brasileira de Zoologia* 19: 589-600.
- Rodrigues FM, Telles MPC, Resende LV, Soares TN, Diniz-Filho JAF, Jácomo ATA e Silveira L (2005) Transferibilidade de Marcadores Microsatélite para duas Espécies de Mamíferos Canídeos do Cerrado Brasileiro. Resumos do 51^o Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia-SP, Brazil.
- Rodrigues W, Nogueira J e Imbroisi D (2001) Avaliação Econômica da Agricultura Sustentável: O Caso dos Cerrados Brasileiros. *Cadernos de Ciência & Tecnologia* 18: 103-130.

- Sage RD e Wolff JO (1986) Pleistocene glaciations, fluctuating ranges, and low genetic variability in a large mammal (*Ovis dalli*). *Evolution* 40: 1092–1095.
- Silveira L e Jácomo ATA (1998) Ecologia e conservação de mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, GO. Relatório Técnico para o IBAMA/DIREC/DEUC.
- Sokal R e Rohlf F (1985) *Biometry*. W. H. Freeman and Company, USA, 395pp.
- Soulé ME (1986) *Conservation Biology: The Science of Scarcity and Diversity*. Sinauer Associates, Sunderland, Mass.
- Soulé ME e Kohn KA (1989) *Research priorities for conservation biology*. Washington, DC.
- Tanaka Y (1997) Extinction of Populations Due to Inbreeding Depression with Demographic Disturbances. *Researches on Population Ecology* 39: 57-66.
- Tanaka Y (1998) Theoretical aspects of extinction by inbreeding depression. *Researches on Population Ecology* 40: 279–286.
- Tanaka Y (2000a) Theoretical Properties of Extinction by Inbreeding Depression Under Stochastic Environments. In: Ferson S and Burgman M (eds) *Quantitative Methods for Conservation Biology*, Springer-Verlag, New York, pp. 274-290.
- Tanaka Y (2000b) Extinction of populations by inbreeding depression under stochastic environments. *Population Ecology* 42: 55-62
- Templeton AR e Read B (1983) The elimination of inbreeding depression in a captive herd of Speke's gazelle. In: Schonewald-Cox, CM, SM. Chambers, B MacBryde e L Thomas (eds.) *Genetics and Conservation: A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations*. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California, pp. 241-261.

- Vilà C, Sundquist AK, Flagstad O, Seddon JM, Bjørnerfeldt S, Kojola I., Sand, H, Wabakken P e Ellegren H (2002) Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. Proc. R. Soc. Lond B Biol. Sci. 270: 91–97.
- Wayne RK (1996) Conservation Genetics in the Canidae. In: Avise JC, Hahn JL (eds) Conservation genetics: case histories from nature. New York NY: Chapman & Hall. p 75–118.

APÊNDICE 1

```

CLS
PRINT "GLOADRUN - Program for simulating extinction vortex"
PRINT "by inbreeding depression (see Tanaka 2000)"
PRINT
PRINT
PRINT "DEMOGRAPHIC PARAMETERS"
INPUT "1. Initial population size (K)"; n1
LET k1 = n1
REM INPUT "2. Carrying capacity (K)"; k1
INPUT "2. Rate of decreasing carrying capacity K"; rk
INPUT "3. Maximum growth rate (r max)"; rmax
INPUT "4. Standard deviation of time variation in population size"; dp2

PRINT
PRINT "GENETIC PARAMETERS"
REM INPUT "5. Effect of inbreeding on growth rate (INB)"; inb
INPUT "5. Initial F value"; F1
REM INPUT "6. Average allele frequency (q)"; q1
REM INPUT "7. Number of loci (nl)"; nl
REM INPUT "8. Mutation rate (u)"; mu
REM INPUT "9. Selection coeficient (s)"; s
LET q1 = .001
LET nl = 15000
LET mu = .000001
LET s = 1

PRINT
PRINT "SIMULATION PARAMETERS"
INPUT "6. Maximum number of generations (t)"; tm
LET sim = 1000
INPUT "7. Number of simulations"; sim
INPUT "8. Output file (final step)"; out$
REM INPUT "15. Detailed output file"; outsim$
LET outsim$ = "out"

OPEN out$ FOR OUTPUT AS #1
OPEN outsim$ FOR OUTPUT AS #2
PRINT

CLS
PRINT
PRINT "*****"
PRINT
PRINT "SIMULATING...(1000 times)"
PRINT
PRINT "*****"
PRINT

PRINT
PRINT
PRINT #1, "      Simulation      time      q      F      N
K "
PRINT #2, "      Simulation      time      q      F      N
K "

```

APÊNDICE 1 (Continuação)

```

FOR j = 1 TO sim

    LET K = k1
    LET N = n1
    LET q = q1
    LET F = F1

CONST pi = 3.14159265359#
RANDOMIZE (TIMER)

FOR i = 1 TO tm

    IF q > 1 THEN LET q = .999999
    md = 0
    dp1 = ((q * (1 - q)) / (2 * N * n1)) ^ (1 / 2)
    u1 = RND
    u2 = RND

    x1 = md + SQR(-2 * LOG(u1)) * COS(2 * pi * u2) * dp1
    x2 = md + SQR(-2 * LOG(u1)) * COS(2 * pi * u2) * dp2

    load = 1 - (q * q * s * n1)

    LET q = q - (s * ((q * q) + (F * q * (1 - q)))) + mu + x1
    IF q < 0 THEN LET q = .00001
    LET F = ((1 / (2 * N)) + ((1 - (1 / (2 * N))) * F)) * (1 - (2 * mu)) *
(1 - (s * q))
    K = (1 - rk) * K
    REM mort = inb * F
    IF i >= 2 THEN N = N + (N * (EXP(rmax) * load) * (1 - ((N - 1) / K)))
+ x2

    PRINT #2, USING " #####.### "; j; i; q; F; N; K
    REM PRINT USING " #####.### "; i; q; F; N; K
    IF N = 0 THEN GOTO xf:
    IF N < 0 THEN GOTO xf:

NEXT i
xf:
IF N < 0 THEN LET N = 0
PRINT #1, USING " #####.### "; j; (i - 1); q; F; N; K

NEXT j
CLS
PRINT
PRINT "End of simulations"
PRINT
PRINT "Final simulation, time, q, F, N and K in the file "; out$
PRINT "(Detailed simulation results in the file "; outsim$; ")"
CLOSE #1
CLOSE #2
PRINT
PRINT
PRINT

```

APÊNDICE 1 (Continuação)

```
PRINT
INPUT "Do you wish a new simulation? (Y/N)"; g$
IF g$ = "Y" OR g$ = "y" THEN RUN
PRINT
PRINT "End of data processing..."
STOP
```

CONCLUSÕES

- Os marcadores STR (*Short Tandem Repeats*), são freqüentemente escolhidos para estimar a variabilidade genética em populações naturais por serem altamente informativos. No entanto, o uso destes marcadores é limitado, devido, o alto custo e elevado tempo necessário para o desenvolvimento prévio dos marcadores. Neste estudo, constatou-se um elevado potencial de transferibilidade de marcadores STR entre canídeos. Do total de 29 locos testados, 21% (6 pares de *primers*) foram transferidos com sucesso, sendo que 83% (cinco pares de *primers*) foram altamente polimórficos. Estes resultados são importantes uma vez que, permite a caracterização da variabilidade genética destas populações e conseqüentemente subsidia estratégias de manejo em populações naturais;

- Utilizando marcadores STR e RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) estimou-se a diversidade genética das populações de lobo-guará e de cachorro-do-mato do Parque Nacional das Emas (PNE). Em média, a similaridade genética estabelecida com base no RAPD foi maior entre os indivíduos da população de lobo-guará do que entre indivíduos da população de cachorro-do-mato. No entanto, de um modo geral, os resultados do STR não indicaram uma significativa redução na variabilidade genética e nem endogamia elevada, em nenhuma das duas populações estudadas, e os parâmetros estão dentro da faixa de variação observada em populações de canídeos no mundo. Portanto, deve-se pensar em propostas adequadas de conservação e manejo destas espécies, principalmente do lobo-guará, que é uma espécie ameaçada de extinção, a fim de aumentar a viabilidade das mesmas em longo prazo. Assim sendo, considerando que as principais ameaças a estas espécies são a redução drástica do habitat, devido principalmente a ocupação agropecuária, além dos atropelamentos, abates por chacareiros do entorno do PNE, introdução de

espécies exóticas, etc, torna-se necessário uma educação ambiental mais eficiente para que estratégias de conservação sejam mais bem estabelecidas.

- A associação entre a similaridade genética com a similaridade espacial, baseada nos dados de área de vida do lobo-guará, permitiu constatar que a estruturação espacial da similaridade genética foi significativa para os machos, quando considerado os dados obtidos com os marcadores RAPD. Essa estruturação possivelmente seria explicada pelo baixo padrão de dispersão entre os machos em relação às fêmeas nesta população. No entanto, os resultados obtidos com os marcadores STR mostraram uma estruturação espacial da similaridade genética entre as fêmeas, de acordo com um padrão de filopatria feminina. Uma vez que este padrão é mais comum nestas espécies, pois para as fêmeas de mamíferos que investem muito no cuidado da prole os benefícios ecológicos e sociais tendem a favorecer a filopatria feminina, acredita-se que os resultados obtidos com os marcadores RAPD sejam artefatos. Entretanto, de um modo geral como os valores das associações foram baixos (correlações matriciais em torno de 0,23), desse modo acredita-se que quando ambos os indivíduos são beneficiados com a divisão de espaço, aumenta-se a tolerância entre eles e assim sendo, a estruturação espacial varia muito mais devido a demografia local e distribuição de recursos do que devido o grau de parentesco genético entre os indivíduos.

- Quando foi avaliado o tempo de extinção (Te) nestas duas espécies de canídeos do PNE, assumindo um modelo teórico que combinou os efeitos da depressão endogâmica sob estocasticidade ambiental, constatou-se que os três parâmetros analisados e suas interações (taxas de redução da capacidade de suporte, coeficientes de endogamia e flutuação no tamanho da população), afetaram o Te médio. Uma combinação semelhante de parâmetros para as duas espécies mostrou que a diminuição da população de lobo-guará é sempre mais rápida que a da

população de cachorro-do-mato. Este resultado, é coerente com expectativas baseadas em parâmetros demográficos e história de vida das duas espécies. Como o lobo-guará ocupa grandes áreas de vida, possui baixa abundância populacional e certa especialização de habitat em relação ao cachorro-do-mato, é esperado que esta espécie seja mais sensível a estes parâmetros, principalmente a fragmentação de habitats. Porém, este estudo é apenas um ponto de partida para estudos futuros que considerem parâmetros mais realistas da viabilidade destas populações e do cenário sócio-econômico-ambiental da região sudoeste de Goiás, permitindo assim avaliações mais precisas da persistência destas populações no PNE e entorno.