

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA

**DIVERSIDADE GENÉTICA E
CONSERVAÇÃO DO LOBO-GUARÁ,
Chrysocyon brachyurus, EM ÁREAS
PROTEGIDAS DO DISTRITO FEDERAL**

Marília Bruzzi Lion

Orientador: Jader Marinho Filho

Brasília

2007

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE ECOLOGIA

DIVERSIDADE GENÉTICA E
CONSERVAÇÃO DO LOBO-GUARÁ,
Chrysocyon brachyurus, EM ÁREAS
PROTEGIDAS DO DISTRITO FEDERAL

Marília Bruzzi Lion

Orientador: Dr. Jader Soares Marinho-Filho

Dissertação apresentada ao Instituto de
Ciências Biológicas da Universidade de Brasília
como parte dos requisitos para a obtenção do
Título de Mestre em Ecologia

Brasília-DF

2007

AGRADECIMENTOS

Este trabalho foi possível graças ao auxílio de diversas pessoas que colaboraram e me apoiaram em diferentes partes de sua execução.

Agradeço em primeiro lugar a minha família por todo incentivo, pela liberdade e o amor sem tamanho que sempre recebi. Mãe e pai, obrigada por me mostrarem o mundo como ele deve ser e pela vontade de deixar isso também para meus filhos.

Um muito obrigada a todos os amigos! Vocês fazem tudo ficar mais divertido!

Gilvan, braço direito no campo!! Sem sua força este trabalho não seria o que é. Muito obrigada!

Adrian, Ana, Fred Vet, Guilherme e Thiago, muito obrigada também pela força em campo. Agradeço muito à Laila, querida médica dos lobos.

Agradeço a todos no Zoológico de Brasília, especialmente ao Rafael Ajuz por toda atenção.

Valdir, muitíssimo obrigada pelo auxílio com o Arcview e por todo material cartográfico.

Agradeço muito ao Professor Flávio Rodrigues, à professora Nazaré Klautau e à Daniela Salim pelas amostras cedidas.

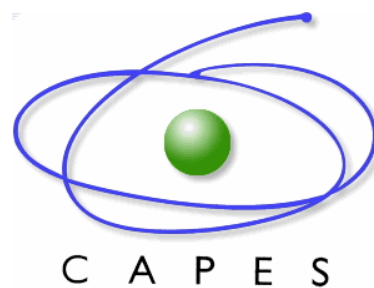
Agradeço a todos no laboratório onde realizei o trabalho, obrigada pelo acolhimento! Manoel, Cristine e Gabi, muito obrigada pelo auxílio na compreensão dos programas para realizar as análises. Ao Manoel, especialmente obrigada por todo material da Serra da Canastra. Obrigada Paulinho pelas valiosas informações sobre os lobos!

Obrigada Duda por me receber em seu laboratório, por toda a liberdade que tive e pelas contribuições inestimáveis no trabalho.

Obrigada Jader não só pela orientação, apoio e ajuda no trabalho, mas também pela amizade e confiança que depositou em mim.

Adrian, você mais do que ninguém acompanhou de perto todas as etapas e em todas elas me ajudou muito. Obrigada meu amor, tudo faz mais sentido quando você está olhando.

INSTITUIÇÕES FINANCIADORAS



Universidade de Brasília
Decanato de Pesquisa e Pós-Graduação

Dedico este trabalho aos lobos,
lindos pernaltas, fugidios e
espertos, que firmes e fortes vêm
suportando nossos maltratos.

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar a diversidade genética da população de lobos-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Carnivora - Canidae), no Distrito Federal - DF. O lobo-guará tem sua distribuição geográfica intimamente relacionada com a do bioma Cerrado e sofre severamente os efeitos da perda de habitat, sendo considerado uma espécie vulnerável ao risco de extinção (IBAMA, 2003). Atualmente a espécie está presente nos arredores da cidade de Brasília porque, dentro do DF, existem fragmentos de cerrado preservados protegidos por Unidades de Conservação (UCs) de Proteção Integral. Porém, estas Unidades podem ter tamanho insuficiente para impedir a endogamia em populações de lobos, além de estarem isoladas umas das outras por uma matriz urbana, o que compromete o fluxo de indivíduos entre as áreas. As UCs abordadas pela coleta de amostras não-invasivas foram: a Estação Ecológica de Águas Emendadas - ESECAE, o Parque Nacional de Brasília - PARNA e a Fazenda Água Limpa - FAL, que faz parte da Área de Proteção Ambiental (APA) Gama Cabeça de Veado. Na amostragem dos animais utilizei um método não-invasivo, a partir de DNA fecal, e o método invasivo, com capturas de lobos em armadilhas na ESECAE, com a coleta de tecido de animais atropelados e pela retirada de sangue de animais resgatados na cidade. Para a avaliação do quadro genético dos lobos no DF amplifiquei cinco marcadores microsatélites. A amostragem da população atual do DF contou, no total, com 23 lobos. Destes, dez amostrados pelo método não-invasivo, três por capturas, seis mortos em atropelamentos e quatro resgates em meio a malha urbana. Para a ESECAE analisei também amostras de seis indivíduos coletadas entre 1997 e 1998 por Rodrigues (2002). Na discussão, pude utilizar dados gerados para os mesmos locos na população de lobos do Parque Nacional Serra da Canastra/MG (Rodrigues e Eizirik, dados não publicados). Com a abordagem não-invasiva obtive 15,7% de sucesso de genotipagem. Não foram detectados desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg e a diversidade genética no DF não sugere níveis altos de endogamia. Na ESECAE não houve uma redução da variabilidade nos últimos 9 anos. A população do DF não apresenta uma estruturação geográfica em relação às três UCs e também não apresenta estruturação quando comparada com a população da Serra da Canastra.

ABSTRACT

I evaluated the genetic diversity of a maned wolf population (Carnivora, Canidae, *Chrysocyon brachyurus*) in the Distrito Federal – DF, Brazil. The maned wolf distribution is intimately associated with the distribution of the Cerrado biome. The species suffers the effects of habitat lost and is considered vulnerable to extinction in the Brazilian species red list (IBAMA, 2003). It is present within the urban mesh in the vicinities of Brasília, associated with preserved cerrado fragments protected in conservation units (CUs). Nevertheless, these units might have insufficient size to avoid endogamy, and are also isolated by an urban matrix that compromises exchanges of individuals between areas. Three CUs within the DF, separated by highly urbanized areas, were chosen in order to evaluate their effectiveness in maintaining viable maned wolf populations in the vicinities of Brasília. I used both invasive (tissue and blood) and non-invasive (DNA extracted from stool samples) techniques to obtain DNA samples that were later amplified for five microsatellite markers. The CUs sampled with the non-invasive method were: the Estação Ecológica de Águas Emendadas - ESECAE, the Parque Nacional de Brasília - PARNA and the Fazenda Água Limpa - FAL (which lies within the Área de Proteção Ambiental Gama Cabeça de Veado). In total, I sampled 23 wolves: ten with the non-invasive method, three captured in traps, six from road killed animals, and four from individuals rescued in urban areas. In ESECAE I also used samples from six specimens captured between 1997 and 1998. Furthermore, I compared my results with data from the same loci generated for 19 wolves captured in the Parque Nacional Serra da Canastra, Minas Gerais, Brazil. The non-invasive method had a genotyping success of 15.7%. Neither deviations from Hardy-Weinberg expectations nor indications of inbreeding depression were found. In ESECAE, there was no reduction in the genetic diversity during the last nine years. Within the DF, maned wolves do not present a genetic structure correlated with the three CUs sampled. Also, no genetic structuring was found between wolves sampled in the DF and the population of the Parque Nacional Serra da Canastra.

ÍNDICE

1.INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Biologia da conservação e genética da conservação.....	03
1.2. Marcadores microssatélites.....	08
1.3. Amostragem não-invasiva.....	08
1.4. O lobo-guará.....	09
1.5. Justificativa.....	12
2.OBJETIVOS.....	14
3.MATERIAIS E MÉTODOS.....	15
3.1. Área de estudo.....	15
3.2. Coleta de amostras.....	19
3.3. Extração das fezes e teste de presença de DNA mitocondrial.....	20
3.4. Extração dos tecidos.....	21
3.5. PCR genotipagem.....	21
3.6. Análise dos resultados.....	23
4.RESULTADOS.....	26
4.1. Genotipagem não-invasiva.....	26
4.2. Genotipagem invasiva.....	29
4.3. Amostras não-invasivas e presença de DNA mitocondrial.....	33
4.4. Teste de ligação.....	33
4.5. Taxa de erro de amplificação.....	33
4.6. Diversidade genética e estruturação geográfica no DF.....	33
4.7. Comparação temporal na ESECAE.....	36
5.DISCUSSÃO.....	38
5.1. Método não-invasivo.....	38
5.2. Estado da amostra e sucesso de amplificação.....	38
5.3. Eficiência da captura em relação ao método não-invasivo.....	39
5.4. Comparação temporal na ESECAE.....	39
5.5. Comparação do DF com o Parque Nacional Serra da Canastra.....	41
5.8. Diversidade genética e conservação da espécie no DF.....	43
6. CONCLUSÕES.....	47
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	48

1.INTRODUÇÃO

O Cerrado é um dos biomas com maior biodiversidade de todo o planeta e é considerado um *hotspot* para conservação (Myers et al. 2000). Porém, sob muitos pontos de vista - qualidade de vida da população, recursos hídricos, solo, fauna e flora - o Cerrado vem sendo degradado. Estimativas recentes calculam que restam apenas 34% da cobertura original do bioma (Machado et al. 2004). O estudo de Machado e colaboradores (2004) elaborou um mapa que ilustra o processo de devastação da cobertura nativa do Cerrado (Figura 1).

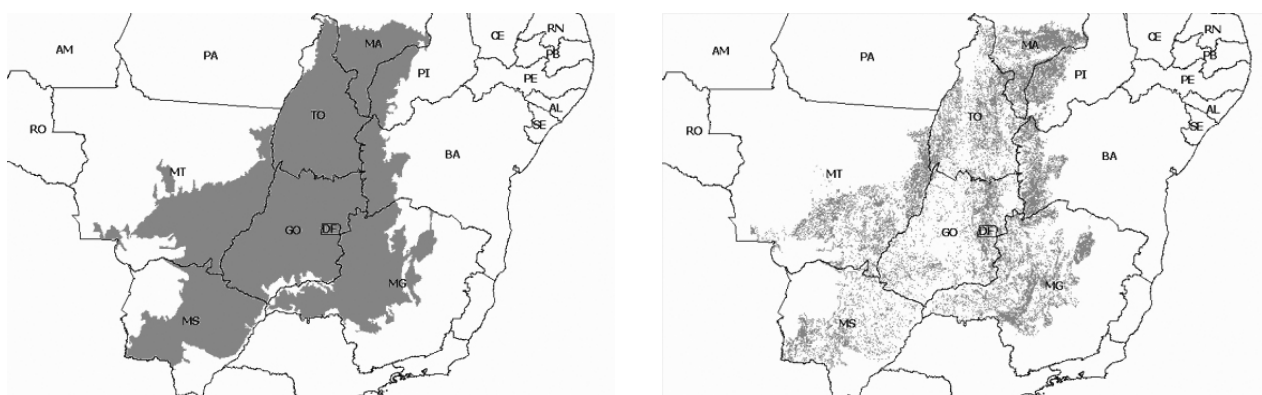


Figura 1. À esquerda a distribuição original do Cerrado, e à direita, os remanescentes naturais do bioma em 2004 (Machado et al. 2004). É possível a visualização do Distrito Federal-DF, no interior do Estado de Goiás-GO.

No Brasil, existe atualmente um esforço político voltado para a conservação da biodiversidade e, portanto, para a criação e gestão de áreas protegidas. A Lei de Fauna (Lei 5.197, de três de Janeiro de 1967), a Lei de Crimes Ambientais (Lei 9.605, de 12 de fevereiro de 1998) e os decretos que definem a lista de espécies ameaçadas e as áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade (MMA 2002) representam importantes marcos legais para a conservação. Em 2000 foi instituído por lei o Sistema Nacional de Unidades de Conservação/SNUC (Lei 9.985, de 18 de julho de 2000), que define e regulamenta as categorias de Unidades de Conservação brasileiras. Em julho de 2005, aconteceu em Brasília o Encontro Anual da Sociedade de Biologia da Conservação, onde reconheceu-se que no Brasil as necessidades de proteção da natureza são mais críticas que em qualquer outro lugar (Lovejoy 2005).

Apesar deste esforço, no Cerrado apenas 2,2% da sua área total está incluída em Unidades de Conservação de Proteção Integral (Klink & Machado 2005). E, além disso, muitas vezes o que observamos na prática são Unidades de Conservação com fronteiras pouco preservadas e ameaçadas pela expansão humana desordenada (Sá & Ferreira 2000).

O Distrito Federal está localizado na parte mais central da distribuição do Cerrado (Figura 1). A inauguração da cidade de Brasília, em 1960, originou uma onda ocupacional no centro-oeste que foi responsável por grande parte da devastação deste bioma (Oliveira & Marquis 2002). Além do aspecto da ocupação urbana, o modelo de desenvolvimento da região do Brasil Central está baseado na agricultura mecanizada, onde a soja, o milho, o arroz, o algodão, a cana de açúcar e o sorgo são os principais cultivos que substituem as paisagens naturais (IBGE 2007b). Isto sem contar com a extensão de pastos cobertos com gramíneas africanas, que chegam a cobrir mais de 500.000 km² (Klink & Machado 2005). Portanto, o bioma Cerrado está em constante mudança pela ação do homem. Isto afeta diretamente a fauna associada à ele. No que tange à biologia da conservação, este alto índice de remoção de cobertura vegetal torna urgente a preservação de áreas nativas remanescentes e demanda um planejamento ambiental bem elaborado das áreas já protegidas.

A criação de Unidades de Conservação e o manejo adequado destas são cruciais na conservação de grandes carnívoros, como é o caso do lobo-guará. Isto porque, aspectos intrínsecos da biologia destes animais (como grandes áreas de vida e baixas taxas reprodutivas), somam-se à relação conflituosa que, muitas vezes, estas espécies têm com a sociedade humana.

Muitas das Unidades de Conservação são de tamanho pequeno para garantir a viabilidade populacional de carnívoros a longo prazo (Hanski 1994; Wikramanayake et al. 2004; Woodroffe 2001; Young & Clarke 2000). Ademais, as espécies de grandes carnívoros, especialmente as que são listadas em alguma categoria de ameaça de extinção, são difíceis de se estudar por causa de suas baixas densidades e de seus hábitos evasivos (Taberlet et al. 2001). Dessa forma, para garantir a persistência destas populações torna-se necessário o monitoramento e, possivelmente, a realização de ações de manejo (Gittleman et al. 2001).

Avanços recentes em estudos de genética populacional proporcionam informações importantes acerca de parâmetros populacionais críticos no delineamento de programas de conservação. Dentre estes avanços está o uso de metodologias não-invasivas na amostragem populacional (Reed et al. 1997). Além disso, o desenvolvimento de marcadores moleculares microssatélites (Litt & Luty 1989; Tautz 1989) e de métodos estatísticos envolvidos na análise destes marcadores, permitem o esclarecimento de importantes fatores genéticos e demográficos (Luikart & England 1999).

1.1. Biologia da Conservação e Genética da conservação

Nossa espécie não é única a consumir e poluir o meio ambiente, porém, certamente, é a única a usar o fogo, combustíveis fósseis e fusão nuclear para fornecer energia de trabalho. Esta produção e consumo de energia tem conseqüências de amplo-espectro tanto no solo, como nos ecossistemas aquáticos e na atmosfera, com repercussões drásticas no clima global (Begon et al. 2005). Atualmente, a sociedade humana consome cerca de 40% de toda a produção primária terrestre (Frankham et al. 2002). Como consequência, causamos uma série de modificações ambientais que estão provocando um processo de extinção em massa. Existiram outros eventos desta natureza ao longo das eras geológicas da Terra, porém, o que vivenciamos hoje possui um ritmo mais acelerado que todos anteriores já enfrentados pelo planeta (Frankham et al. 2002).

A importância de se conservar a biodiversidade está intimamente relacionada com a manutenção de nossa sociedade na forma como a conhecemos. Existem produtos e serviços essenciais à existência humana que são fornecidos pelo meio ambiente sadio. Há uma infinidade de recursos naturais que utilizamos, água, alimentos, remédios e roupas são alguns deles. Dentre os serviços estão: a produção de oxigênio, o controle do clima pelas florestas, a ciclagem de nutrientes, o controle natural de pragas e a polinização de cultivos (Frankham et al. 2002). Tudo isso, sem levar em conta questões éticas extremamente relevantes e o bem estar que ambientes preservados e o contato com a natureza trazem às pessoas. As reservas naturais e os zoológicos são locais procurados por muitos de nós em todo mundo, em busca do prazer que este tipo de experiência traz.

Os estudos de conservação biológica têm percorrido um caminho de desenvolvimento desde 1933, com o trabalho de Aldo Leopoldo, intitulado “*The Conservation Ethic*”. Para ele, a conservação biológica seria a extensão do pensamento ético para a forma de uso da terra. Já neste artigo o autor indica que a solução para superar obstáculos econômicos impostos pelo melhor aproveitamento dos recursos naturais estaria na ecologia. Mas, apenas a partir da década de 80, com os artigos e livros publicados por Michael Soulé, a biologia da conservação começa a tomar corpo, intitulada como uma “disciplina da crise” (Frankel & Soulé 1981; Soulé 1984, 1987; Soulé et al. 1986; Soulé & Lease 1989; Soulé & Wilcox 1980). Além de frisar sua utilidade na solução de problemas relacionados ao uso da terra, o autor, assim como Leopoldo, cita a necessidade do respeito a normas éticas relacionadas à nossa relação com o meio ambiente. Nos trabalhos de Soulé, a genética já é citada como parte deste novo ramo da ciência, a biologia da conservação (Soulé 1985; Soulé & Simberloff 1986).

A biologia da conservação aborda três níveis hierárquicos interdependentes: os ecossistemas, as espécies e os genes (Soulé 1984). A conservação de espécies ameaçadas, que é o foco deste estudo, requer o conhecimento da dinâmica de populações pequenas (Figura 2). Para se chegar a uma visão acurada desta dinâmica diversas disciplinas precisam ser integradas. A ecologia, a genética, a ciência do manejo de recursos, a sociologia, a matemática e até a ciência política são algumas das áreas que devem compor a natureza multidisciplinar na biologia da conservação.

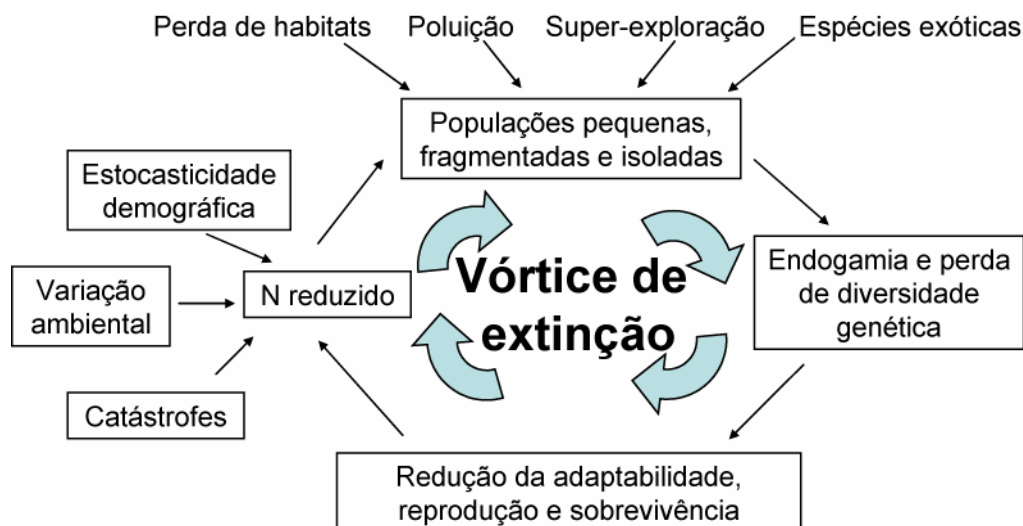


Figura 2. Esquema mostrando o vórtice de extinção. Ele descreve as interações possíveis entre os impactos humanos, endogamia, perda de diversidade genética e instabilidade demográfica em um espiral que segue em direção à extinção (Frankham et al. 2002).

A análise genética é uma importante ferramenta na avaliação do comportamento de populações ameaçadas. De acordo com o descrito na literatura, índices de variabilidade genética reduzidos sugerem maior vulnerabilidade da população frente às variações ambientais do habitat (Charlesworth & Charlesworth 1987; Frankham 1995; Reed & Frankham 2003; Soulé & Simberloff 1986). A endogamia e baixa diversidade genética podem ser encontradas em populações que apresentam número reduzido de indivíduos, ou seja, populações de espécies ameaçadas que estão em declínio, com baixa densidade de indivíduos (Avise 2004; Frankham et al. 2002).

Em populações pequenas e fragmentadas a estocasticidade demográfica é aumentada, assim como as taxas de endogamia, a perda de variabilidade genética e a fixação de alelos deletérios (Gilpin & Soulé 1986; Soulé & Wilcox 1980). Consequentemente, o potencial evolutivo é reduzido e a probabilidade de extinção aumenta. A identificação destas populações, que enfrentam ou enfrentaram recentemente gargalos populacionais e/ou mostram sinais de endogamia, é importante para a sugestão de medidas de conservação (Luikart & Cornuet 1998).

Em 1908 Godfrey Hardy e Wilhelm Weinberg descreveram, independentemente, um modelo populacional onde as frequências

genotípicas podem ser calculadas a partir de frequências alélicas obtidas (Halliburton 2004; Hartl & Clark 1997). Este modelo, chamado de Equilíbrio de Hardy-Weinberg – EHW, prevê que as frequências genotípicas de uma população (de tamanho infinito, onde os acasalamentos ocorram aleatoriamente) se mantêm constantes ao longo das gerações, caso não haja migração, mutação, seleção e deriva. Portanto, sob as condições do modelo de EHW, as populações não estariam submetidas a nenhum dos mecanismos causadores da evolução e, assim, as frequências gênicas permanecem inalteradas nas gerações subsequentes (Conner & Hartl 2004). A grande maioria das populações naturais se desvia do EHW por violar alguma(s) premissa(s) do modelo. A partir da integração com estudos que incluam aspectos demográficos e comportamentais, este modelo permite explicações acerca de quais motivos (quais das premissas) estariam influenciando mais o comportamento genético de determinada população, (Halliburton 2004).

Um marco para a aplicação da genética em estudos voltados para a conservação é o trabalho de Lewontin e Hubby, publicado em 1966. Os autores introduzem o uso da eletroforese de proteínas na biologia de populações. A partir daí, com os avanços tecnológicos das ferramentas moleculares, as publicações voltadas para o assunto se multiplicaram. Hoje existem revistas científicas dedicadas exclusivamente a este assunto, como é o caso da *Conservation Genetics* (Editora Kluwer), criada em 2000 e centrada em questões filogeográficas, de variação genética e conservação.

Assim, atualmente, a biologia da conservação é tema de diversas publicações voltadas em diferentes frentes de ação, nas áreas de ciências naturais e sociais. Dentro das ciências naturais, existem três disciplinas da genética, a sistemática molecular, a filogeografia e a genética de populações, que foram organizadas em uma nova área de investigação científica aplicada, a genética da conservação. A partir de estudos dessa natureza é possível responder questões acerca do **que** conservar, **onde** conservar e **como** conservar (Frankham et al. 2002).

A sistemática molecular trabalha no sentido de esclarecer os limites que definem espécies e, dentro de espécies, se existem populações ou grupos de populações com diferenciação genética suficiente para serem

tratados como grupos distintos em estratégias de manejo (Unidades Evolutivamente Significativas/UESs, ou Unidades de Manejo/MUs). Dessa forma, é possível responder perguntas acerca de **qual unidade** deve ser conservada. Já a filogeografia revela o comportamento histórico da distribuição geográfica de uma espécie, o que mostra possíveis rompimentos históricos e locais de maior diversidade. Com este tipo de abordagem é possível saber quais populações dentro de uma espécie são prioritárias para a conservação, ou seja, **onde** focalizar os esforços para preservar espécies ou populações. A genética de populações procura esclarecer a estrutura populacional de espécies e quais seriam os fatores determinantes desta estruturação, como tamanho efetivo, sistemas de acasalamento, fluxo gênico ou migração. Com este tipo de abordagem, é possível delinear medidas que procurem evitar a endogamia (em populações naturalmente não-endogâmicas), a despeito de uma fragmentação que estas populações possam apresentar. Assim, a genética de populações pode responder perguntas acerca de **como** conservar espécies ou populações ameaçadas.

A genética da conservação trabalha com a análise do potencial evolutivo de uma espécie ou população, principalmente, através de marcadores moleculares neutros (Frankham et al. 2002). A meta da genética de populações aplicada à conservação em longo prazo é evitar a endogamia e permitir que populações mantenham alta diversidade, ainda que apresentem uma distribuição fragmentada (Cullen Jr. et al. 2003). Este procedimento é possível graças à identificação da estrutura genética nas populações em questão e dos fatores que afetam a mesma, como tamanho efetivo da população, fluxo gênico e sistemas de acasalamento (Avice 2004).

Dentro da abordagem da genética de populações, medidas como número de alelos por loco, conteúdo de informação polimórfica (PIC) e heterozigosidade (H) são indicadores do comportamento da diversidade genética de populações. Pela comparação destes indicadores entre diferentes populações é possível esclarecer a estrutura populacional de espécies e avaliar o grau de erosão genética que populações enfrentam. Assim, torna-se possível sugerir estratégias de manejo eficientes para evitar as conseqüências danosas da erosão genética (Perez-Sweeney et al. 2003).

1.2. Marcadores microssatélites

Microssatélites são regiões de repetições de sequências curtas (de 1 a 4 nucleotídeos) interpoladas em todo o genoma. A grande maioria destas regiões não sofre pressão seletiva, sendo consideradas, portanto, como marcadores neutros (Goldstein & Schlötterer 1999). Os microssatélites são ferramentas poderosas na investigação de aspectos genéticos, tais como: parentescos, sistemas de acasalamento, estrutura populacional e identificação de indivíduos, como revisado por Balloux & Lugon-Moulin (2002) e Taberlet et al (2001).

Estes marcadores estão dentre as regiões genômicas com maior taxa de evolução (Goldstein & Schlötterer 1999). Isto faz com que microssatélites tenham vários alelos em cada loco, o que permite uma identificação individual acurada e estimativas populacionais precisas. Além disso, por apresentarem tamanho pequeno, estes marcadores podem ser recuperados de amostras com DNA degradado, como fósseis, indivíduos taxidermizados em museus e amostras não-invasivas (pêlos e fezes) (Taberlet et al. 2001).

Para a família Canidae, alguns marcadores microssatélites foram já caracterizados (Francisco et al. 1996; Griffin et al. 2001; Ichikawa et al. 2002; Parra et al. 2003) e utilizados em estudos mais específicos, como os de fluxo gênico, diversidade e estruturação genética (Girman et al. 2001; Iyengar et al. 2005; Klukowska et al. 2003; Koskinen & Bredbacka 2000; Leonard et al. 2005; Prugh et al. 2005; Smith et al. 2006) e de identificação de espécies/indivíduos (Banks et al. 2003).

1.3. Amostragem não invasiva

Métodos não-invasivos de amostragem genética de populações trazem muitas vantagens no estudo de espécies ameaçadas (Frantzen et al. 1998; Kohn & Wayne 1997; Paxinos et al. 1997; Reed et al. 1997). Além do custo envolvido no procedimento de captura ser desproporcionalmente maior, os indivíduos destas populações são raros, o que compromete a eficiência amostral por armadilhagem (Kohn & Wayne 1997). Tal abordagem pode aumentar a eficiência de amostragem e ainda evitar o estresse que as capturas causam aos animais (Palomares et al. 2002).

Uma alternativa para a obtenção de DNA em estudos de campo é a coleta de fezes. Diversos estudos tratam do aperfeiçoamento da genotipagem de microssatélites obtidos de amostras de fezes (Bonin et al. 2004; McKelvey & Schwartz 2004; Taberlet et al. 1996; Wasser et al. 1997). Recentemente, este método foi aplicado em diferentes espécies de mamíferos (Adams et al. 2003; Goossens et al. 2000; Palomares et al. 2002; Piggott et al. 2006; Prugh et al. 2005; Reed et al. 2004; Smith et al. 2006).

Muitos mamíferos, como é o caso dos lobos guará, utilizam a deposição de fezes e urina como marcação de território (Dietz 1984). Isto facilita a coleta deste tipo de material, que é frequentemente observado em campo demarcando locais conspícuos.

1.4. Lobo-guará

O lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, é o maior canídeo sul-americano, pesando entre 20 e 30 kg (Dietz 1984). A espécie possui patas longas e finas, pêlos longos laranja-avermelhados e orelhas grandes. Possui uma crina negra no dorso, mesma cor do focinho, das patas dianteiras e mais da metade distal das patas traseiras. Ainda possui a região interna do pescoço, a parte interna das orelhas e parte da cauda (na maioria das vezes a ponta) brancas (Figura 3). É um animal onívoro, alimentando-se de pequenos mamíferos e frutas, principalmente do fruto da lobeira, *Solanum lycocarpum* (Dietz 1984; Juarez & Marinho-Filho 2002; Rodrigues 2002). Aparentemente a espécie é monogâmica facultativa, sendo que pares são vistos separados frequentemente (Rodden et al. 2004). As fêmeas são monoéstricas, com gestação de aproximadamente 65 dias, com tamanho médio de ninhada igual a 3 filhotes (Dietz 1984; Maia & Gouveia 2002). Sua atividade de forrageamento ocorre nas horas do crepúsculo e durante toda a noite (Bestelmeyer 2000).

A espécie é característica do bioma Cerrado e se distribui no Brasil Central, no norte boliviano e sudeste paraguaio, e ainda através do nordeste argentino (Figura 4).



Figura 3. O lobo-guará. Foto Rogério Cunha.



Figura 4. Distribuição geográfica atual estimada para a espécie (Rodden et al. 2004).

A espécie utiliza preferencialmente áreas de cerrado, porém ela também aparece em locais sazonalmente alagáveis (Pantanal), e no Chaco paraguaio e argentino. Além disso, existem registros da espécie utilizando plantações e descansando durante o dia em matas ciliares (Rodden et al. 2004).

Atualmente, os trabalhos de radiotelemetria realizados com a espécie descrevem áreas de vida com amplas variações: de 21,7 a 30 km², média de 25,2 ± 4,4 km², com n = 3 pares na Serra da canastra-MG (Dietz, 1984); 31 a 132 km², n = 6 e média de 63,7 ± 37,4 km² na Estação Ecológica de Jataí-SP (Mantovani 2001); 15,6 a 104,9 km², média de 57,0 ± 34,3 km², com n = 5 na Estação Ecológica de Águas Emendadas-DF (Rodrigues, 2002); 4,7 a 79,5 km², média de 49,0 ± 31,8 km², com n = 5 no Parque Nacional de Emas-GO (Silveira 1999); e 50,1 a 69,1 km², média de 59,6 ± 13,44 km², com n = 2 na Reserva Particular do Patrimônio Natural Estação Ambiental de Galheiro – MG (Melo et al. 2007).

A espécie foi originalmente incluída no gênero *Canis*, pois apresenta número de cromossomos (2n = 76) bastante próximo ao deste gênero (2n = 78). Porém, atualmente é reconhecido como gênero distinto, *Chrysocyon* (Rodden et al. 2004). Dentre os canídeos, estudos filogenéticos classificam o cachorro vinagre, *Speothos venaticus*, como a espécie mais próxima de *Chrysocyon* (Wayne et al. 1997; Zrzavý & Ricánková 2004). Apesar das

diferenças morfológicas e comportamentais, esta hipótese foi confirmada por análises filogenéticas que incluíram caracteres morfológicos, comportamentais e genéticos combinados (Zrzavý & Ricánková 2004).

Apesar de vários estudos atuais tratarem da investigação genética entre canídeos, são poucos os estudos com este tipo de abordagem realizados para o lobo-guará (Moreira et al. 1998; Rodrigues 2002; Salim 2005). Moreira et al. (1998) utilizaram a análise de polimorfismos protéicos no esclarecimento da variabilidade encontrada em populações distribuídas no Brasil. Salim (2005) investigou a variabilidade de marcadores microsatélites nas mesmas amostras. Rodrigues (2002) utilizou microsatélites para avaliar a diversidade encontrada em uma população natural da espécie, na Estação Ecológica de Águas Emendadas-DF.

1.4.1. Conservação do lobo

A espécie possui hábitos solitários e grandes áreas de vida e, conseqüentemente, apresenta baixas densidades por toda sua distribuição. Assim, pela demanda de grandes áreas em suas atividades de reprodução e forrageamento, esta espécie sofre os efeitos da perda de habitats. Tal fato a fez ser considerada como espécie vulnerável ao risco de extinção na lista de espécies ameaçadas produzidas para a fauna brasileira (IBAMA 2003). Também por causa das ameaças que a espécie enfrenta, ela é considerada como “quase ameaçada” (*near threatened*) pela lista vermelha produzida pela *World Conservation Union* (IUCN 2006).

A principal questão que compromete a viabilidade de populações de lobos é a perda de habitats naturais. A substituição de ambientes naturais por áreas de uso humano agrava todas as demais ameaças que a espécie enfrenta, como atropelamentos, a caça e doenças. Os indivíduos que conseguem sobreviver ficam isolados em fragmentos naturais insularizados. Desta forma, muitos lobos são mortos por atropelamentos em estradas que margeiam estes fragmentos. Além disso, existe o perigo do conflito direto com humanos. Apesar de estudos de dieta indicarem que animais domésticos não contribuem significativamente para a alimentação deste animal (Juarez & Marinho-Filho 2002; Santos et al. 2003), muitas pessoas temem lobos, e carnívoros em geral, e os perseguem (Gittleman et al. 2001).

Estudos em cativeiro mostram que lobos são suscetíveis às viroses caninas típicas, incluindo cinomose, parvovirose, raiva e adenovirose. Doenças infecciosas e disfunções digestivas estão entre as principais causas da mortalidade entre filhotes (Maia & Gouveia 2002). Reservas em áreas urbanas, como é o caso das Unidades de Conservação do Distrito Federal, têm problemas com cachorros domésticos. Estes podem trazer doenças para as populações de lobos, para as quais eles não possuem resistência.

1.5. Justificativa

Em termos de áreas protegidas, a manutenção e a conectividade das diferentes fitofisionomias do cerrado são fundamentais para a preservação da fauna. O lobo-guará, além de animal símbolo do cerrado, é um caçador de grande porte. Reservas abrangendo pequenas áreas, incluídas em matrizes de uso fortemente antrópico, são inadequadas para manter, a longo prazo, populações viáveis de grandes vertebrados. Isto porque, além de não comportarem o número mínimo de indivíduos necessário para permitir o fluxo gênico entre não-aparentados (endogamia), estas reservas pequenas impedem a migração entre fragmentos preservados (Hanski 1994; Noss et al. 1996; Wikramanayake et al. 2004).

Na verdade, mesmo com todas as medidas políticas nacionais e internacionais, pouco se tem feito para a conservação genética de populações. Atualmente, no Brasil, existem apenas alguns esforços ligados a esta área, como é o caso da onça-pintada (Eizirik et al. 2001) e dos micos-leões (Seuánez et al. 2002). A carência de estudos genéticos na conservação de espécies brasileiras é reconhecida:

“(…), a pesquisa genética foi raramente utilizada em estudos com espécies ameaçadas no Brasil. O estudo da genética de populações é vital para as iniciativas de manejo e deveria ser uma prioridade em qualquer programa com espécies ameaçadas.”
(Costa et al. 2005).

As populações de lobos nos arredores de Brasília enfrentam todas as ameaças anteriormente citadas, já descritas para a espécie. Por se tratar de uma matriz extremamente urbanizada, o conflito com os interesses humanos pode levar estas populações à extinção. Assim, este estudo baseia-se na necessidade do esclarecimento da funcionalidade de três Unidades de Conservação do DF na manutenção de populações destes animais; e visa à proteção desta espécie chave, topo de cadeia trófica, o lobo-guará.

2.OBJETIVOS

O presente estudo teve por objetivo avaliar a diversidade genética e o *status* de conservação das populações de lobos-guará, *Chrysocyon brachyurus* (Carnivora/Canidae), nas principais Unidades de Conservação (UCs) do Distrito Federal/DF.

Pela análise de genótipos microsatélites individuais gerados para cinco locos pretendo:

1. Aprimorar o método não-invasivo na genotipagem de marcadores microsatélites em lobos guará;
2. Comparar a eficiência amostral pelo método invasivo (capturas) e não-invasivo (coleta de fezes) em Águas Emendadas;
3. Avaliar a diversidade genética da população de lobos guará no DF;
4. Verificar se existe uma estruturação genética em relação as três UCs abordadas;
5. Comparar a diversidade genética atual da ESECAE com a das amostras obtidas no mesmo local por Rodrigues entre 1997 e 1998.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Área de estudo

3.1.1. O Distrito Federal

Desde sua criação, Brasília atrai pessoas de diversas partes do país, que buscam na cidade moradia e oportunidades de trabalho. Em 2005, o Distrito Federal teve sua população estimada em 2.333.108 habitantes nos seus 5.822,1 km² (IBGE 2007a). Apesar de sua urbanização planejada e de ter sido considerada pela UNESCO como Patrimônio Cultural de Humanidade, Brasília sofre diversos problemas em relação ao uso da terra. As principais causas são a ausência de técnicas adequadas no manejo do solo utilizado na agricultura e pecuária e a implantação de loteamentos em locais inadequados, tanto do ponto de vista social como ambiental (Goulart 2006).

Formalmente, cerca de 40% do Distrito Federal está protegido por alguma categoria de Unidade de Conservação, principalmente Áreas de Preservação Ambiental – APAs. Apesar disso, muitos dos loteamentos irregulares na cidade situam-se em áreas públicas e têm seus limites inseridos dentro dessas APAs. Loteamentos e condomínios irregulares surgem ano a ano na capital do país. A maior parte desses assentamentos são implantados e obtém documentação legal sem o planejamento adequado ou a realização de Estudos de Impactos Ambientais – EIAs, exigidos por lei. Tudo isso fomenta a grilagem e a ocupação desordenada.

O Distrito Federal está localizado na região mais central do bioma Cerrado, sendo considerado parte do núcleo (*core*) do bioma (Figura 1). A localização central e o longo tempo desde sua formação fazem da região do Distrito Federal um local de extrema importância em termos de biodiversidade (Oliveira & Marquis 2002). Assim, a utilização indevida do solo e dos recursos hídricos têm consequências desastrosas no que tange à biologia da conservação. E isto implica não apenas na perda de espécies nativas, já adaptadas às condições locais, como também na redução da qualidade de vida de nossa sociedade.

3.1.2. Unidades de Conservação e arredores

A amostragem de populações naturais foi realizada em três UCs que existem atualmente nos arredores de Brasília: a Estação Ecológica de Águas Emendadas - ESECAE, com 10.547 ha; o Parque Nacional de Brasília - PARNA/Brasília, com 30.000 ha; e a Fazenda Água Limpa – FAL, com 4.040 ha (Figura 3). Estas áreas estão inseridas na malha de cidades satélites que unidas formam o Distrito Federal/DF.

A Estação Ecológica de Águas Emendadas localiza-se cerca de 50 km da cidade de Brasília. Esta é uma Unidade de Conservação de Proteção Integral. A maior parte das fronteiras desta Unidade é delimitada por estradas, exceto na região da Lagoa Bonita. A leste o limite é definido pela DF-345, que separa a Estação de fazendas de cultivo de soja e outras propriedades rurais. Ao sul o limite é a BR-020, que faz a fronteira entre a Unidade e a cidade de Planaltina. A oeste, a DF-130 separa Águas Emendadas de plantações de soja e cana-de-açúcar e de comunidades rurais da Região Administrativa de Planaltina. Ao norte, a DF-205 é que separa a ESECAE desta mesma comunidade rural. Portanto, o entorno da Estação é marcadamente caracterizado pela ocupação humana, onde predominam comunidades rurais e urbanas (Planaltina) e extensas plantações, principalmente de soja.

O Parque Nacional de Brasília, pela classificação do Sistema Nacional de Unidades de Conservação – SNUC, também é uma Unidade de Proteção Integral. Com uma área de cerca de 30.000 ha o Parque está a apenas 10 km do centro de Brasília. Devido ao seu tamanho, a Unidade representa uma boa amostra do ecossistema natural. Apesar de sua importância, o Parque encontra-se isolado de outras manchas de vegetação nativa, pois se encontra inserido numa matriz de habitats alterados e áreas urbanizadas. Agências ambientais caracterizaram o PARNA/Brasília como o mais ameaçado pela pressão urbana no país (Sá & Ferreira 2000).

A terceira área amostrada foi a fazenda experimental da Universidade de Brasília - UnB, que está a cerca de 30 km do centro da cidade. A área faz parte da Área de Proteção Ambiental - APA das Bacias do Gama e Cabeça do Veado, criada em 1986 pelo Decreto Distrital no 9.417. Esta APA, com cerca de 25000 ha, comporta também o Jardim Botânico de Brasília (5000

ha) e a Reserva Ecológica do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (1360 ha).

O limite sul da Fazenda é a BR-251, que por sua vez também delimita a fronteira do Núcleo Rural Córrego da Onça, da Área Alfa da Marinha e algumas fazendas particulares. Ao leste a fronteira é a reserva do IBGE. A oeste limita-se com a Área de Proteção de Mananciais do Catetinho, com o Museu do Catetinho e o Country Club de Brasília. A fronteira norte é o Ribeirão do Gama, que separa a Fazenda do Setor de Mansões Park Way (Quadras 17 e 24) e o Núcleo Rural da Vargem Bonita, ambos na Região Administrativa do Park Way.

Apenas metade da área total da FAL é destinada à preservação do cerrado nativo (cerca de 2000 ha), esta área é também denominada Estação Ecológica da Universidade de Brasília - EEUnB. No restante da Fazenda são realizados cultivos agrícolas, criação de gado e experimentos práticos dos cursos de engenharia florestal, agronomia e veterinária da UnB.

O Jardim Zoológico de Brasília - JZB foi um dos locais visitados para a amostragem do presente estudo. Este Zoológico abriga lobos-guarás em cativeiro que possuem procedência conhecida. Animais mortos em atropelamentos são também encaminhados para lá e eventualmente taxidermizados. Além disso, animais que aparecem em meio a malha urbana do DF, frequentemente, são levados à veterinária do JZB para uma avaliação, antes de serem translocados.

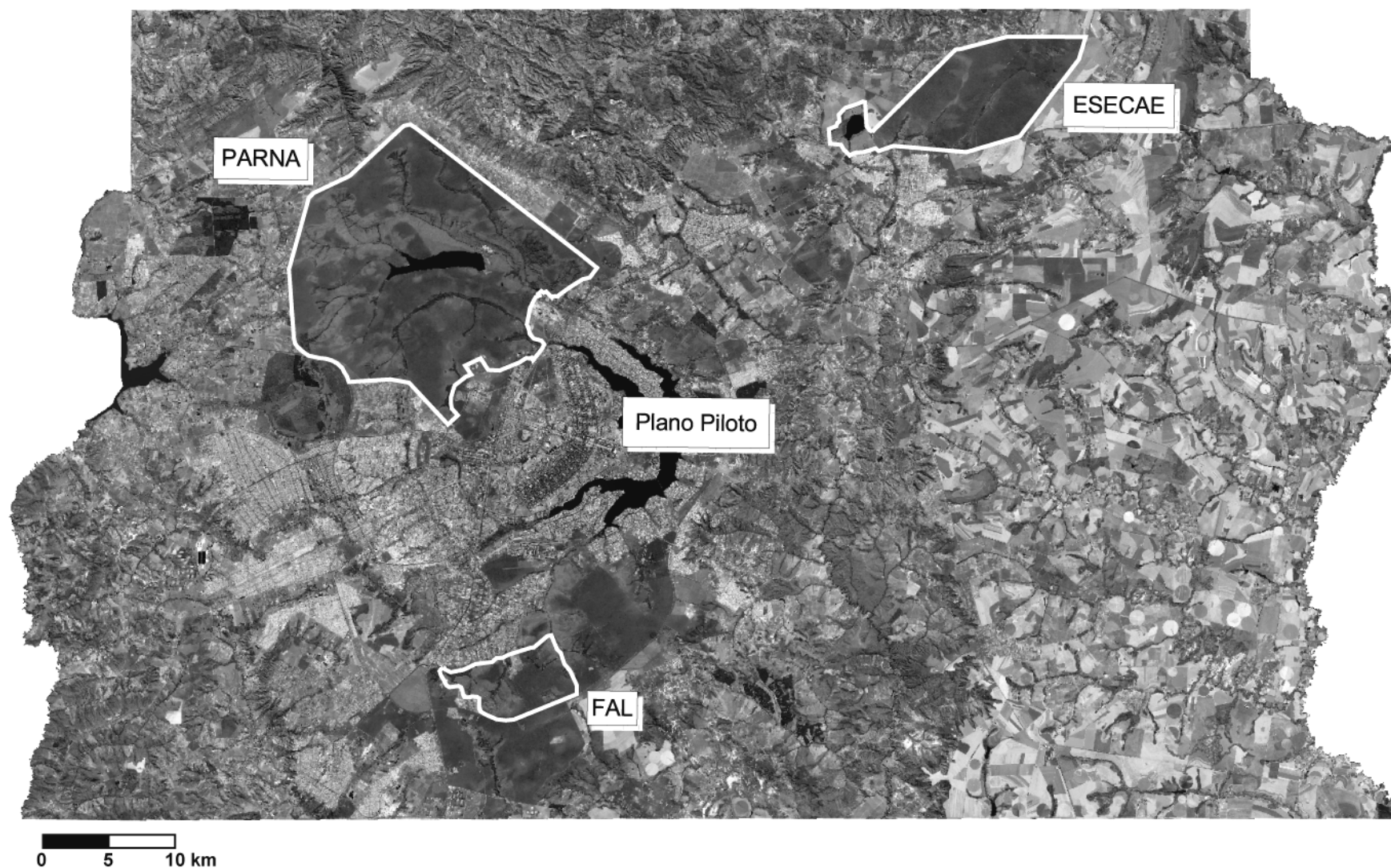


Figura 3. Imagem de satélite mostrando o Distrito Federal e o contorno das três Unidades de Conservação abordadas no presente estudo. É possível também a visualização do Plano Piloto, a parte central da cidade de Brasília. Imagem SPOT 2003, gentilmente cedida pela Secretaria de Meio Ambiente e Recursos Hídricos – SEMARH.

3.2. Coleta de amostras

3.2.1. Amostragem não-invasiva

A coleta de amostras de fezes foi realizada de janeiro a agosto de 2006. Cada uma das Unidades foi visitada pelo menos uma vez por semana durante este período. Durante as visitas eu percorria de carro uma média de 50 km nas estradas não pavimentadas de cada Unidade.

A localização de cada amostra foi georreferenciada usando um GPS (Sistema de Posicionamento Global) Garmin® e posteriormente plotada em uma imagem SPOT do Distrito Federal, cedida pela Secretaria do Meio Ambiente e Recursos Hídricos - SEMARH. Utilizei os Programas ArcView GIS 3.2 e TrackMaker 13.0 para a visualização dos pontos na imagem obtida.

As amostras foram coletadas em sacos de papel e, posteriormente, ainda no mesmo dia, levadas para o laboratório, colocadas em tubos estéreis de 50 ml contendo etanol absoluto e guardadas a -20°C. Como, pela literatura, amostras mais frescas rendem maior quantidade de DNA (Prugh *et al.*, 2005), cada amostra foi classificada de acordo com seu tempo de deposição em uma escala relativa com cinco níveis: até um dia; até dois dias; três dias a uma semana; mais de uma semana e lavada (amostras molhadas pelas chuvas).

3.2.2 Amostragem invasiva

Em Águas Emendadas realizei a captura de animais de fevereiro a outubro de 2006. Utilizei sete armadilhas do tipo “gaiolas de desarme independente”, com porta de guilhotina (Rodrigues, 2002). A largura das armadilhas é de 0,7 m, altura de 1 m e comprimento de 1,6 m. Estas foram dispostas em locais adequados, iscadas com frangos cozidos, ou codornas vivas, e revisadas (sempre que iscadas) com acompanhamento de funcionários da Estação. Para este trabalho, o esforço foi de 1541 armadilhas x noite.

Nas capturas, a médica veterinária Laila Maftoum Proença, CRMV/DF 1440, anestesiou os animais capturados com Tiletamina associada a Zolazepan (5 mg por quilo do animal). Foram utilizadas seringas estéreis para retirar 5 ml de sangue para as análises genéticas. Este volume foi colocado em volume igual de tampão *easy blood* (100 mM Tris HCl; 100 mM EDTA;

2% SDS) em tubos de 15 ml. Com o término da manipulação dos animais, eles foram reintroduzidos nas armadilhas e só libertados após a recuperação completa da anestesia. Em seguida, o sangue foi armazenado a -4°C .

A manipulação e o procedimento de coleta de sangue dos animais no JZB foram feitas por profissionais destacados do quadro de funcionários desta Unidade. As amostras de sangue também foram armazenadas em solução *easy blood*.

Para os animais que foram encontrados atropelados, a coleta de amostras foi feita pela retirada de um fragmento de tecido. O tecido retirado foi o músculo encontrado em melhor estado, que foi colocado em tubo estéril contendo etanol absoluto.

3.3. Extração das fezes e teste de presença de DNA mitocondrial

Para a extração do DNA das fezes utilizei o kit comercial da marca QIAGEN, QIAamp[®] DNA Stool Mini Kit, específico para a purificação de DNA presente em fezes. Segui o protocolo sugerido pelo fabricante.

Para evitar contaminações, as extrações foram realizadas em capela de fluxo laminar previamente esterelizada com luz ultra-violeta. Além disso, utilizei um conjunto de pipetas exclusivamente destinado à extração do DNA de fezes, e ponteiras (tips) com barreira (filtro).

Após a extração, cada amostra foi testada quanto a presença de DNA mitocondrial na Reação em Cadeia da Polimerase - PCR. Utilizei *Primers* desenhados para a região interna do gene ATP-8, específica de canídeos (Eduardo Eizirik, dados não publicados). A reação teve volume final de 10 μl com 0,25 U de TaqDNA polimerase, 2 mM MgCl_2 , tampão de reação 1X, 200 μM de cada dNTP, e 0,2 μM de cada *primer*. O volume de DNA adicionado foi de 0,5 μl . O programa usado no termociclador foi:

1. 94°C por três minutos;
2. 94°C por 45 segundos;
3. 60°C por 45 segundos -1°C a cada ciclo (*touch down*);
4. 72°C por um minuto e 30 segundos
5. vai para o passo dois por 10 vezes
6. 94°C por 45 segundos
7. 50°C por 45 segundos

8. 72°C um minuto e 30 segundos
9. vai para o passo seis por 29 vezes
10. 72°C por três minutos

Para checar o sucesso de amplificação do DNA mitocondrial 3 µl do produto de PCR foi aplicado em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio. Apenas as amostras que mostraram boa amplificação foram selecionadas para as genotipagens.

3.4. Extração dos tecidos

Para as amostras de tecido, tanto as de sangue como as de músculo, o DNA foi extraído através do protocolo de SDS 1% (Tampão de lise: 50 mM tris-HCl (PH 8,0), 20 mM EDTA (PH 8,0), 1% SDS, 200 mM NaCl e 1% β mercapto-etanol) (Sambrook et al. 1989).

3.5. PCR genotipagem

Para as análises de estrutura populacional e individualização dos animais amostrados pelas fezes usei cinco conjuntos de primers para locos microssatélites tetranucleotídicos (Tabela 1), originalmente desenvolvidos para o cachorro doméstico, *Canis familiaris*, (Francisco et al. 1996). Estes locos foram escolhidos por apresentar uma baixa probabilidade de identidade (P_{ID} ; probabilidade de dois indivíduos compartilharem randomicamente genótipos idênticos) (Paetkau et al. 1998), que foi estimado a partir de uma população de lobos-guará amostrados na Serra da Canastra-MG (Manoel Rodrigues e Eduardo Eizirik, dados não publicados).

Tabela 1. Primers utilizados na amplificação dos locos microssatélites (Francisco et al. 1996)

Loco	F 5'-3'	R 5'-3'
2004	CTAAGTGGGGAGCCTCCTCT	ACTGTGACCTACTGAGGTTGCA
2010	AAATGGAACAGTTGAGCATGC	CCCCTTACAGCTTCATTTTCC
2054	GCCTTATTCATTGCAGTTAGGG	ATGCTGAGTTTTGAACTTTCCC
2088	CCCTCTGCCTACATCTCTGC	TAGGGCATGCATATAACCAGC
2132	CACTGGGAGTGGGAGACTGCT	TGCACAGCCAACTAGAGGTG

Nas reações de amplificação do PCR utilizei o procedimento proposto por Schuelke (2000). Os *primers forward* são acrescentados de uma extensão de 18 pares de bases (TGT AAA ACG ACG GCC AGT) na extremidade 5'. Essa extensão ocorre no ciclos iniciais da reação. Um terceiro *primer*, ligado à fluorescência, possui sequência complementar àquela extensão do *primer forward* (ACA TTT TGC TGC CGG TCA) e anela com os produtos gerados nos primeiros ciclos da reação. Assim, o produto amplificado é ligado ao fluoróforo. Isto diminui o custo de obtenção da fluorescência, que originalmente era ligada a cada um dos *primers* da reação. Este fluoróforo, é detectado pelo sequenciador automático e revela os tamanhos dos fragmentos microssatélites amplificados.

Na reação de PCR, executei alguns testes para checar se a eficiência de amplificação dos alelos era melhorada. Testei diferentes concentrações de BSA (*Bovine Serum Albumina*); 0,1 µg/µl (como sugerido pelo kit de extração utilizado) e 1,7 µg/µl (como sugerido por Smith e colaboradores em 2006). O volume do DNA extraído utilizado na reação de PCR variou entre 1 e 6 µl. O volume final da reação de PCR foi testado em 10, 20 e 25 µl. Testei dois tipos de enzima *Taq* polimerase da marca INVITROGENTM; a enzima comum, e a *Platinum® Taq DNA polymerase*. A concentração dos primers foi testada em 0,2 µM e 1 µM. Além disso, testei o reagente da INVITROGENTM PCRX *Enhancer system*.

Após os testes a maioria das amplificações foi realizada em volume final de 10 µl com 0,25 U de TaqDNA polimerase (comum), 2,5 mM MgCl₂, tampão de reação 1X, 200 µM de cada dNTP, 2 µl de DNA e 0,2 µM dos *primers* reverso e fluorescente, sendo que o *primer forward*, ligado à extensão, foi adicionado à uma concentração de 1:15 de 0,2 µM. Dois fluoróforos foram utilizados na identificação dos fragmentos dos cinco locos utilizados: FAM e NED. Todas reações possuíram controles negativos para checar possíveis contaminações.

O programa de PCR utilizado para as genotipagens foi:

1. 94°C por três minutos;
2. 94°C por 45 segundos;
3. 60°C por 45 segundos -1°C a cada ciclo (*touch down*);
4. 72°C por um minuto e 30 segundos

5. vai para o passo dois por 10 vezes
6. 94°C por 45 segundos
7. 50°C por 45 segundos
8. 72°C um minuto e 30 segundos
9. vai para o passo seis por 33 vezes
10. 72°C por trinta minutos
11. 4°C por uma hora

Para evitar possíveis erros no processo de genotipagem dos alelos (*allele dropout* e alelos falsos), cada amostra heterozigota foi amplificada no mínimo duas vezes e cada amostra homozigotas oito vezes (Goossens et al. 2000; Smith et al. 2006; Taberlet et al. 1996). Pela baixa qualidade do DNA extraído das fezes algumas das repetições falharam. Portanto, para as análises, selecionei apenas aquelas amostras que tinham o mínimo de três repetições confiáveis para locos homozigotos (Frantz et al. 2003).

No total 1615 reações de PCR foram realizadas para amostras de fezes. Os produtos de PCR foram então encaminhados para o sequenciador automático *MegaBACE ET-550R Size Standard* (Amersham Biosciences) e posteriormete analisados no programa *Genetic Profiler 2.2*.

3.6. Análise dos resultados

3.6.1. Estado da amostra e sucesso de amplificação

Para testar a hipótese de que o estado da amostra influencia o sucesso de amplificação do DNA mitocondrial utilizei o teste do qui-quadrado com uma tabela de contingência 2 x 5 (Zar 1999). Considerei as duas categorias amplificado e não amplificado e as cinco categorias de estado da amostra (até um dia, até dois dias, três dias a uma semana, mais de uma semana e lavada), conforme Zar (1999).

3.6.2. Taxa de erro de amplificação

A taxa de erro de amplificação e de não-detecção alélica foi estimada para cada loco dividindo-se o número de erros encontrados pelo número total de genótipos lidos. Neste cálculo, utilizei apenas as amostras que foram genotipadas confiavelmente para os cinco locos.

3.6.3. Teste de ligação

Utilizei o programa GENEPOP 3.2 (Raymond & Rousset 1995) para testar se os locos escolhidos se comportam como marcadores independentes; pelo teste de desequilíbrio de ligação entre pares de locos. No programa realizei o teste exato de Fisher, usando o método de cadeia de Markov. Os seguintes parâmetros foram adotados: 10000 dememorizações, 1000 processamentos e 10000 iterações por processamento.

3.6.4. Probabilidade de identidade

Para definir a eficiência dos cinco locos utilizados na distinção os indivíduos amostrados, estimei o P_{ID} através da fórmula desenvolvida por Paetkau e colaboradores (1998):

$$P_{ID} = \frac{n^3 (2a_2^2 - a_4) - 2n^2 (a_3 + 2a_2) + n (9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)}$$

Onde n é o tamanho da amostra, e a_i é igual a:

$$\sum_j p_j^i$$

E p_j é a frequência do j ésimo alelo. Assim, estimei esta probabilidade para cada loco, e multiplicando os valores encontrados para todos locos, estimei o P_{ID} total. O P_{ID} entre irmãos foi estimado no programa CERVUS 3.1 (Kalinowski et al, no prelo).

3.6.5. Diversidade genética e estrutura populacional

Para o cálculo das frequências alélicas e estimativas de heterozigozidade utilizei o programa CERVUS 3.1. Para detectar desvios do equilíbrio de Hardy Weinberg (HWE) e estimar o coeficiente de endogamia (F_{IS}) utilizei o programa ARLEQUIN 3.01 (Excoffier et al. 2005), que usa um teste exato, onde os valores de p são estimados usando o método de cadeia de Markov, seguindo o algoritmo proposto por Guo & Thompson (1992). Neste programa, realizei também uma análise hierárquica de variância molecular (AMOVA) para estimar a variação genética intra e inter-populacional nos dois cortes temporais das populações amostradas na

ESECAE. Para estas abordagens utilizei os mesmos cinco locos microssatélites.

Nas análises de estrutura populacional do DF e estimativas do número de populações amostradas (K) utilizei o programa STRUCTURE 2.0 (Falush et al. 2003; Pritchard et al. 2000). Este programa trabalha com método Bayesiano de agrupamento para encontrar grupos dentro de populações que minimizem desequilíbrios de ligação e de Hardy-Weinberg, ao mesmo tempo em que calcula as frequências alélicas populacionais. Apenas as informações genéticas foram fornecidas e os parâmetros utilizados foram: modo de ancestralidade *admixture*, frequência alélica independente ($\lambda = 1$), e três comprimentos de corrida (*burnin lenght*) foram testados 1º - 10000 iterações seguidos de 10000 repetições de Monte Carlo Cadeia de Markov (MCMC), 2º - 100000 iterações e 100000 MCMC e 3º - 500000 iterações e 500000 MCMC. Realizei cinco repetições para cada uma das três condições citadas.

4.RESULTADOS

4.1. Genotipagem de amostras não-invasivas

Obtive 426 amostras de fezes, sendo 216 da ESECAE, 162 do PARNA/Brasília e 48 da FAL. Do total de amostras de fezes extraí DNA de 94 amostras da ESECAE, 94 do PARNA/Brasília e 47 da FAL.

Uma vez que na ESECAE havia também o objetivo da comparação temporal e da comparação dos métodos de obtenção de amostras pela captura e pelas fezes, o investimento em genotipagens nessa área foi maior. Das 94 amostras extraídas 76 obtiveram produto visível em gel de agarose para a região interna do gene mitocondrial ATP-8 (80,9%). Todas essas amostras foram testadas quanto a amplificação de alelos no cinco locos escolhidos. No total, dez dessas amostras foram genotipadas para todos locos (13,3%).

No PARNA, das 94 amostras extraídas, 81 obtiveram produto visível do gene mitocondrial (86,2%). Entre as 81, onze foram escolhidas para serem genotipadas, sendo que, três resultaram em genótipos confiáveis para os cinco locos (27,3%).

Na FAL, das 47 amostras extraídas, 45 demonstraram produto para o gene mitocondrial (95,7%). Entre estas, 21 foram testadas para as genotipagens, sendo que quatro apresentaram genótipos confiáveis para os cinco locos (15,7%). No total obtive 17 amostras de fezes genotipadas para os cinco locos e dez indivíduos diferentes foram amostrados por este método (Tabela 2; Figuras 5, 6 e 7).

Na Tabela 2 é possível notar que para os indivíduos ESECAE09, ESECAE12 e FAL02 duas amostras diferentes (de fezes), geraram o mesmo genótipo nos cinco locos abordados, ou seja, cada um deles foi “capturado” duas vezes pelo método não-invasivo. Da mesma forma, para o indivíduo ESECAE11 cinco amostras diferentes foram genotipadas.

Tabela 2. Amostras de fezes genotipadas no trabalho. A primeira coluna refere-se à amostra coletada em campo e a segunda coluna ao animal identificado pela genotipagem dos cinco locos microssatélites.

<i>Amostra</i>	<i>Indivíduo</i>	<i>Data</i>	<i>Local de coleta</i>	<i>Ponto*</i>
ES51	ESECAE09	26/1/2006	ESECAE	219804 8274662
ES98	ESECAE09	12/4/2006	ESECAE	219781 8280297
ES109	ESECAE10	18/5/2006	ESECAE	213239 8274690
ES129	ESECAE11	2/6/2006	ESECAE	212127 8276121
ES131	ESECAE11	2/6/2006	ESECAE	212100 8275842
ES186	ESECAE11	28/6/2006	ESECAE	212133 8276097
ES187	ESECAE11	28/6/2006	ESECAE	211886 8275456
ES193	ESECAE11	2/6/2006	ESECAE	210317 8275153
ES167	ESECAE12	21/6/2006	ESECAE	212195 8275534
ES208	ESECAE12	16/7/2006	ESECAE	210907 8274693
FAL20	FAL02	7/6/2006	FAL	190737 8233481
FAL24	FAL02	9/6/2006	FAL	186629 8233981
FAL38	FAL03	20/6/2006	FAL	186394 8232984
FAL46	FAL04	20/6/2006	FAL	187635 8233970
PN85	PARNA05	8/6/2006	PARNA/Brasília	185181 8263987
PN96	PARNA06	8/6/2006	PARNA/Brasília	817128 8270106 [†]
PN131	PARNA07	11/6/2006	PARNA/Brasília	186155 8269185

* UTM; Datum SAD69; Zona 23L

[†] Zona 22L

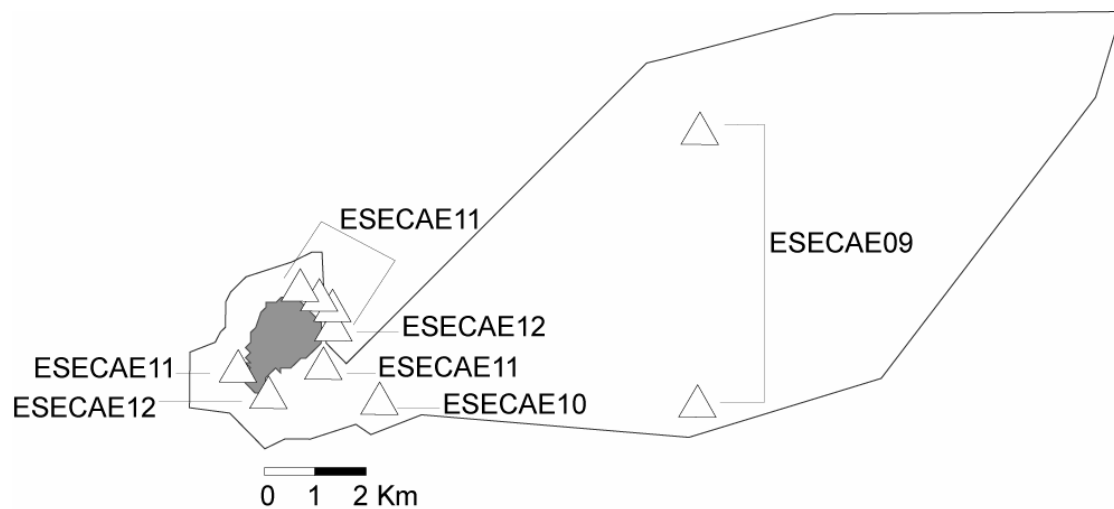


Figura 5. Localização das amostras de fezes coletadas na ESECAE e genotipadas no trabalho. Quatro indivíduos diferentes foram genotipados para este local utilizando o método não-invasivo.

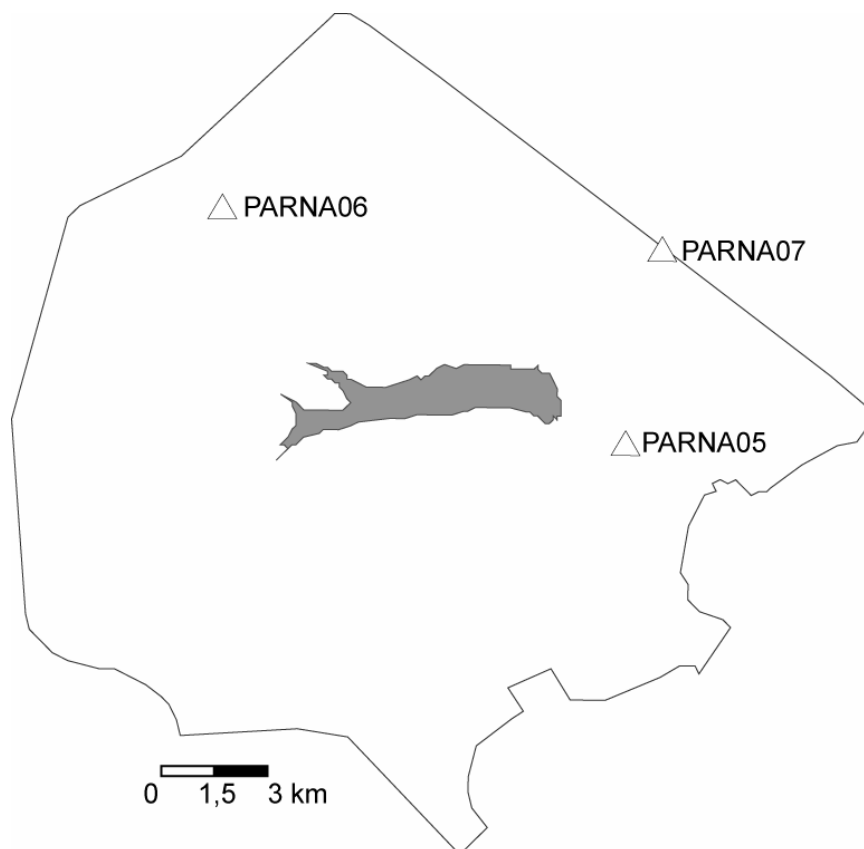


Figura 6. Localização das amostras de fezes coletadas no Parque Nacional de Brasília e genotipadas no trabalho. Três indivíduos diferentes foram genotipados para este local utilizando o método não-invasivo.

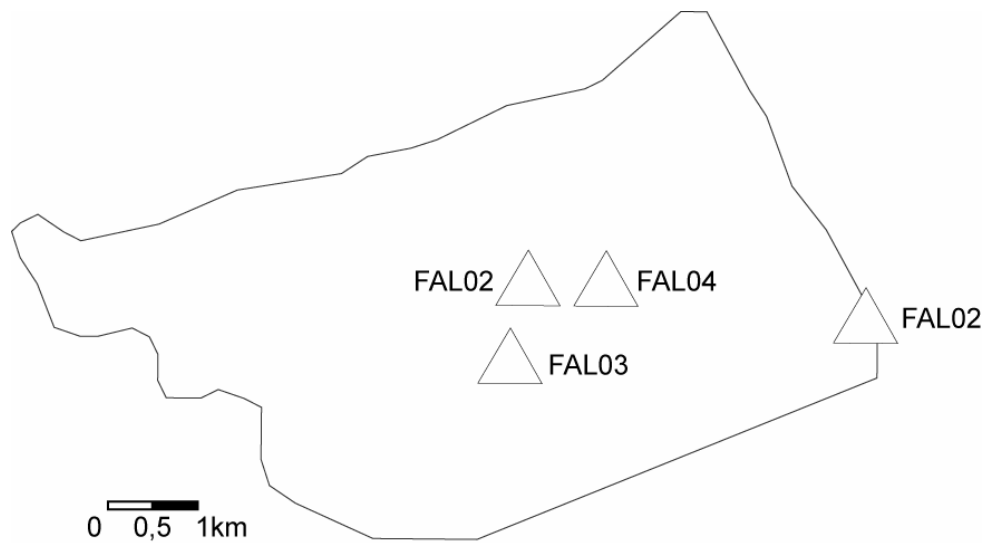


Figura 7. Localização das amostras de fezes coletadas na FAL e genotipadas no trabalho. Três indivíduos diferentes foram genotipados para este local utilizando o método não-invasivo.

4.2. Genotipagem das amostras invasivas

Durante o funcionamento das armadilhas na ESECAE foram capturados três indivíduos adultos de lobos guarás, dois machos e uma fêmea. Um dos machos, o mais jovem, foi recapturado quatro vezes, enquanto que, o outro apenas uma vez (Figura 8). Foram capturados também nove cachorros-do-mato (*Cerdocyon thous*) e seis cachorros domésticos (*Canis familiaris*).

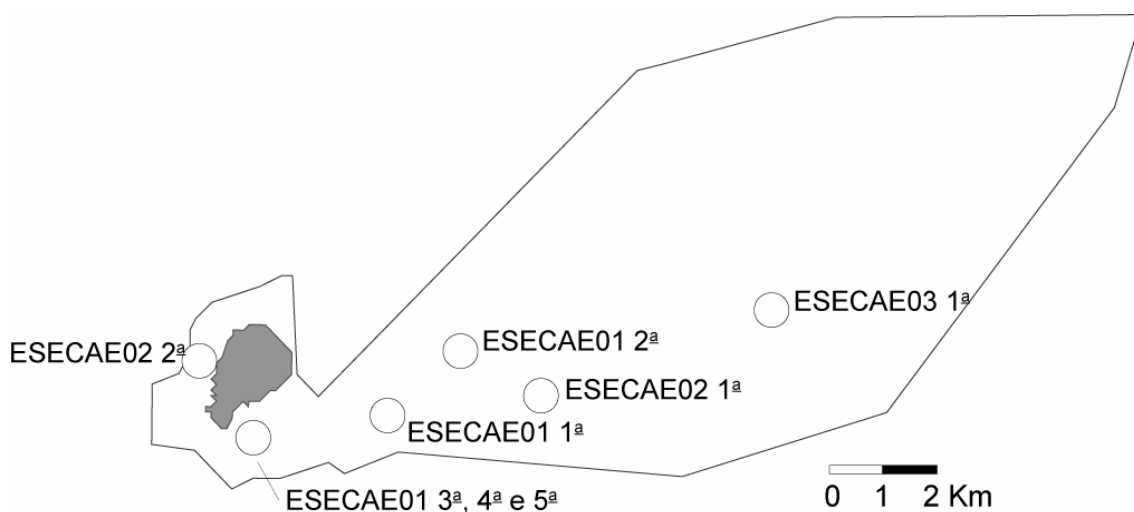


Figura 8. Pontos de capturas de lobos-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas.

No Zoológico de Brasília obtive: quatro amostras de sangue de animais resgatados em meio à malha urbana do DF; uma amostra de um animal que foi atropelado na BR-060, próximo à Região Administrativa de Samambaia; e outra de um lobo atropelado na BR-020, nos arredores da Estação de Águas Emendadas. Além destes animais que haviam sido encaminhados ao JZB, obtive amostras de quatro animais atropelados na BR-020. Na amostragem por coleta de tecido, tive acesso a seis amostras provenientes do estudo de Rodrigues (2002).

Assim, a amostragem da população atual do Distrito Federal contou, no total, com 23 indivíduos de lobos guará. Destes, 10 foram amostrados pelo método não-invasivo e 13 pela coleta invasiva (Figura 9)

Tabela 3. Amostras de tecidos genotipadas no trabalho.

<i>Amostra</i>	<i>Origem</i>	<i>Data</i>	<i>Sexo</i>	<i>Local de coleta</i>	<i>Ponto*</i>
AE75	Captura	6/4/1997	F	ESECAE	224556
	Rodrigues 2002				8278645
AE81	Captura	7/12/1997	F	ESECAE	220378
	Rodrigues 2002				8276213
AE82	Captura	27/8/98	F	ESECAE	-
	Rodrigues 2002				
AE89	Captura	8/10/1997	M	ESECAE	223563
	Rodrigues 2002				8279962
AE92	Captura	2/7/1998	M	ESECAE	-
	Rodrigues 2002				
AE94	Captura	2/12/1997	M	ESECAE	220378
	Rodrigues 2002				8276213
ESECAE01	Captura	24/2/2006	M	ESECAE	214066
					8275197
ESECAE02	Captura	23/4/2006	M	ESECAE	216922
					8275550
ESECAE03	Captura	25/9/2006	F	ESECAE	221339
					8277281
ESECAE04	Atropelamento	12/9/2005	F	BR-020 arredores ESECAE	-
ESECAE05	Atropelamento	18/8/2006	M	BR-020 entre Sobradinho e Planaltina	205092 8269096
ESECAE06	Atropelamento	5/9/2006	F	BR-020 entre Sobradinho e Planaltina	-
ESECAE07	Atropelamento	29/9/2006	M	BR-020 arredores ESECAE	218344 8273871
ESECAE08	Resgate	7/12/2006	M	DF-130 Planaltina	-
FAL01	Resgate	2/10/2006	M	Valparaíso	-
PARNA01	Atropelamento	16/7/2006	F	BR-060 Samambaia	-
PARNA02	Resgate	18/8/2006	M	Octogonal	-
PARNA03	Atropelamento	5/10/2006	F	BR-020 Posto Colorado	-
PARNA04	Resgate	5/12/2006	M	Setor Comercial Sul	-

* UTM; Datum SAD69; Zona 23L

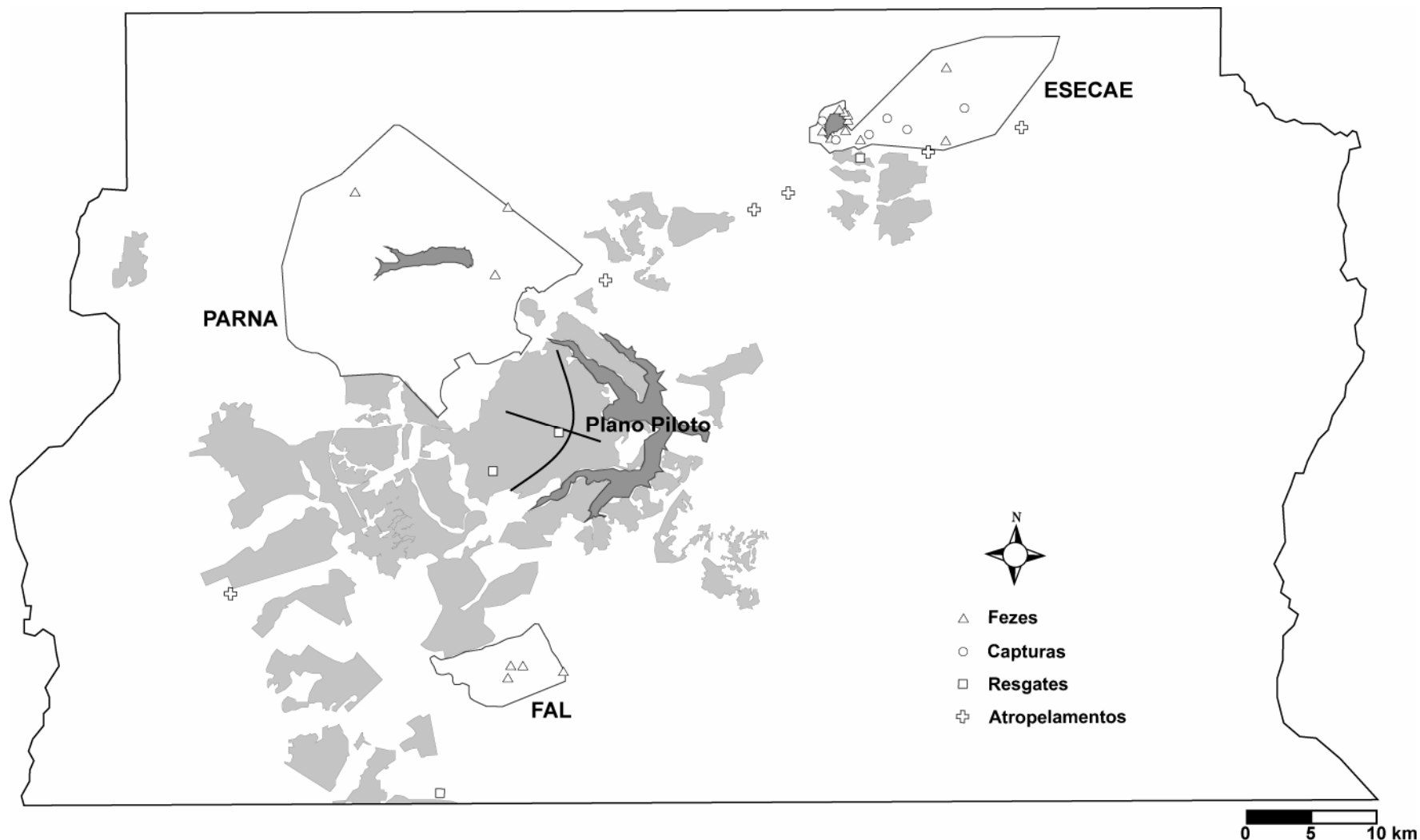


Figura 9. Contorno do Distrito Federal e das Unidades de Conservação mostrando os pontos onde as amostras de lobos-guará foram obtidas. Em cinza claro está representada a urbanização dentro do DF, registrada em 2003 (Steinke 2004). Alguns animais foram capturados mais de uma vez e os pontos referem-se tanto a capturas quanto a recapturas. Da mesma forma, alguns animais foram genotipados em mais de uma amostra de fezes. Para os indivíduos que não possuem coordenadas geográficas na Tabela 3 a localização no mapa foi aproximada.

4.3. Estado da amostra não-invasiva e sucesso de amplificação de DNA mitocondrial

O teste do qui-quadrado na análise da tabela de contingência mostrou uma relação significativa entre as diferentes categorias de estado da amostra e o sucesso de amplificação de DNA mitocondrial ($\chi^2_{0.05, 4} = 16,38$; $p = 0,003$). A categoria que mostrou menor sucesso de amplificação foi a de amostras “lavadas” (50%). Ao retirar esta categoria da correlação ela deixou de ser significativa ($\chi^2_{0.05, 3} = 4,47$; $p = 0,215$).

4.4. Teste de ligação

Nenhum dos dez pares de locos analisados apresentou desequilíbrio de ligação no teste exato de Fisher (Tabela 4).

Tabela 4. Teste exato de Fisher utilizando o método de cadeia de Markov, para checar desequilíbrios de ligação em cada par de locos na população de lobos no DF.

<i>Pares de locos</i>	χ^2	<i>valor de p</i>
2004 x 2010	4,421	0,352
2004 x 2054	2,185	0,702
2010 x 2054	5,286	0,508
2004 x 2088	1,298	0,862
2010 x 2088	2,883	0,823
2054 x 2088	2,102	0,910
2004 x 2132	0	1,000
2010 x 2132	0	1,000
2054 x 2132	7,804	0,099
2088 x 2132	5,626	0,229

4.5. Taxa de erro de amplificação

A taxa de erro de amplificação e de não-deteção alélica obteve valor médio de 8%. Os valores específicos para cada loco estão listados na Tabela 5.

4.6. Diversidade genética e estruturação geográfica da população atual no DF

Todos os cinco locos utilizados no trabalho mostraram-se polimórficos e dentro do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 5). Os tamanhos de cada

um dos alelos (em pares de base) encontrados em cada loco e suas frequências estão apresentados na Figura 10. O número de alelos encontrados, conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) segundo EHW estão listados na Tabela 5. Nenhum destes valores encontrados sugere níveis altos de endogamia. Também nesta tabela estão as taxas de erro de amplificação encontradas em cada loco. Os valores de probabilidade de identidade (P_{ID}) estão listados na Tabela 6.

O coeficiente de endogamia F_{IS} (calculado para toda a população) foi negativo, igual a -0,047 ($p = 0,840$). Como o valor de p não foi significativo, isto sugere que os cruzamentos estão sendo realizados aleatoriamente na população de lobos do DF. Os valores do coeficiente de endogamia estimados para cada um dos locos são mostrados na Tabela 5.

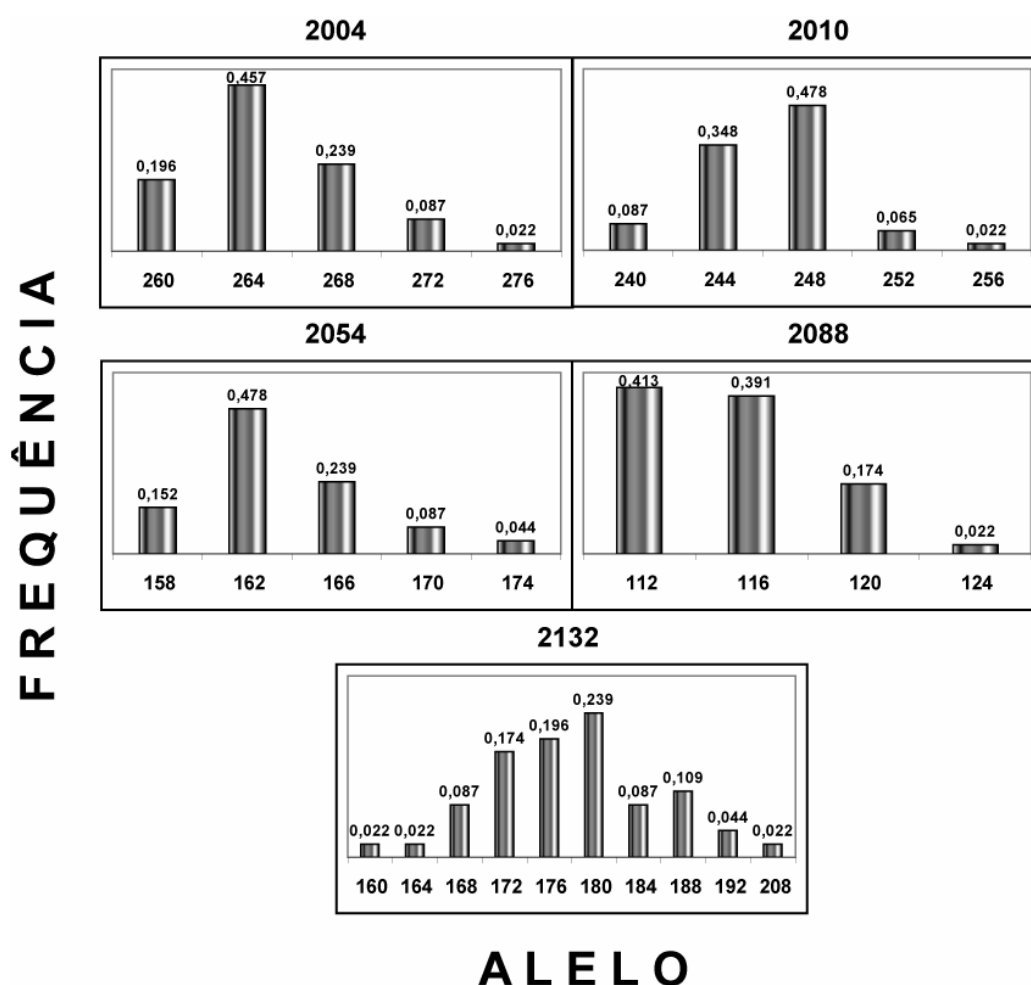


Figura 10. Distribuição das frequências alélicas encontradas para cada um dos cinco locos estudados na população atual de lobos guará no DF.

Tabela 5. Número de alelos, heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), valor de p do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e conteúdo de informação polimórfica para os cinco locos avaliados na população atual de lobos no DF.

<i>Loco</i>	<i>Número de alelos</i>	H_O	H_E	<i>EHW Valor de p</i>	PIC	F_{IS}	F_{IS} valor de p	<i>Taxa de erro (%)</i>
2004	5	0,739	0,703	1,000	0,639	- 0,052	0,741	5
2010	5	0,652	0,652	0,572	0,574	0,000	0,597	14
2054	5	0,696	0,697	0,947	0,636	0,001	0,581	7
2088	4	0,739	0,660	0,276	0,573	-0,123	0,855	0
2132	10	0,913	0,863	0,487	0,826	-0,060	0,860	14
<i>Média</i>	5,8	0,748	0,715	-	0,650	-0,047	0,840	8

Tabela 6. Probabilidade de identidade P_{ID} e de identidade entre irmãos $P_{ID \text{ irmãos}}$ calculados para a população atual de lobos no DF.

<i>Loco</i>	P_{ID}	$P_{ID \text{ irmãos}}$
2004	0,146	0,443
2010	0,195	0,480
2054	0,147	0,446
2088	0,198	0,477
2132	0,043	0,339
<i>Total</i>	$3,5 \cdot 10^{-6}$	$1,5 \cdot 10^{-2}$

As análises de estrutura populacional revelaram que a população do DF não está estruturada geograficamente em relação às três UCs amostradas. O resultado da análise do programa STRUCTURE mostrou que a probabilidade do número de populações (K) ser igual a “um” foi maior que a de serem três populações ($K = 3$). A média encontrada nas cinco repetições foi: para $K = 1$: Ln Prob = -339,8; para $K = 2$: Ln Prob = -343,5; para $K = 3$: Ln Prob = -348,1. Isto indica não haver estruturação geográfica significativa na população atual de lobos no DF.

4.7. Comparação temporal ESECAE

A comparação da amostragem atual na ESECAE com aquela realizada entre 1997 e 1998 mostrou que existe uma maior riqueza de alelos hoje que no passado (Tabelas 7 e 8). As heterozigosidades médias observada e esperada também aparentam ser maiores hoje que na população anteriormente amostrada (Tabelas 7 e 8). A análise de variância gerou um $F_{ST} = 0,07$ com $p = 0,03$, o que sugere uma estruturação temporal moderada ($0,05 < F_{ST} < 0,15$) e significativa entre as populações.

Tabela 7. Número de alelos, conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) e o valor de “ p ” no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para a população amostrada entre 1997 e 1998 na ESECAE ($N = 6$).

<i>Loco</i>	<i>Número de alelos</i>	<i>PIC</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>EHW</i> <i>valor de p</i>
2004	3	0,272	0,167	0,456	0,088
2010	3	0,460	0,833	0,591	0,638
2054	3	0,579	1,000	0,712	0,585
2088	3	0,424	0,667	0,530	1,000
2132	3	0,477	0,500	0,682	0,660
<i>Média</i>	3	0,442	0,633	0,594	-

Tabela 8. Número de alelos, conteúdo de informação polimórfica (PIC), heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E) e o valor de “ p ” no teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para a ESECAE atualmente ($N = 12$).

<i>Loco</i>	<i>Número de alelos</i>	<i>PIC</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>EHW</i> <i>valor de p</i>
2004	5	0,630	0,833	0,746	0,564
2010	5	0,632	0,500	0,710	0,204
2054	5	0,627	0,750	0,739	0,314
2088	3	0,516	0,667	0,663	1,000
2132	8	0,797	1,000	0,855	0,983
<i>Média</i>	5.200	0,640	0,750	0,743	-

Para compensar o efeito dos tamanhos amostrais distintos na comparação com a população de Rodrigues (2002) realizei dez sorteios escolhendo randomicamente seis indivíduos da população atual. Os resultados dos sorteios continuam a indicar que as heterozigosidades médias observada e esperada apresentam valores maiores hoje que na população

anteriormente amostrada (Tabelas 9). Na maior parte dos sorteios, a análise de variância também sugere uma estruturação temporal moderada e significativa entre as populações (Tabelas 10).

Tabela 9. Sorteios randômicos de seis indivíduos da população atual para corrigir o efeito das diferenças numéricas amostrais. (H_O) e (H_E) correspondem, respectivamente, às médias calculadas para os cinco locos das heterozigosidades observadas e esperadas.

<i>População ESECAE</i>	<i>H_O Média</i>	<i>H_E Média</i>
Antes	0,633	0,594
Hoje sorteio 1	0,764	0,776
Hoje sorteio 2	0,667	0,724
Hoje sorteio 3	0,667	0,764
Hoje sorteio 4	0,700	0,752
Hoje sorteio 5	0,633 [†]	0,703
Hoje sorteio 6	0,733	0,782
Hoje sorteio 7	0,733	0,770
Hoje sorteio 8	0,700	0,718
Hoje sorteio 9	0,667	0,739
Hoje sorteio 10	0,700	0,706

[†] Único valor de Heterosigozidade observada com valor igual na população atual e anterior.

Tabela 10. O F_{ST} encontrado e seus respectivos valores de “ p ” para as comparações entre a população atual e anterior. A população atual é representada por cada um dos dez sorteios.

<i>População ESECAE</i>	<i>F_{ST}</i>	<i>F_{ST} Valor de p</i>
Antes	0,07	0,03*
Hoje sorteio 1	0,12	0,03*
Hoje sorteio 2	0,12	0,02*
Hoje sorteio 3	0,10	0,04*
Hoje sorteio 4	0,11	0,04*
Hoje sorteio 5	0,10	0,04*
Hoje sorteio 6	0,08	0,08
Hoje sorteio 7	0,08	0,10
Hoje sorteio 8	0,09	0,06
Hoje sorteio 9	0,07	0,12
Hoje sorteio 10	0,12	0,02*

* Varores de p que determinam diferença significativa ($p < 0,05$).

5.DISSCUSSÃO

5.1. Método não-invasivo

A eficiência da amplificação do DNA mitocondrial nas amostras não-invasivas foi alta (média de 87,6%). Para estudos que utilizam preferencialmente este tipo de marcador, como as abordagens filogenéticas, filogeográficas e de identificação de espécies, o método não-invasivo se mostra altamente eficiente.

A média de amplificação dos marcadores microsatélites nas amostras de fezes foi de 15,7%, enquanto que nas amostras de tecido essa taxa foi 100%. Assim, o custo em reagentes e tempo de laboratório foi aumentado em cerca de 80% em relação a amplificação de genótipos a partir de amostras invasivas. Porém, tendo em vista o número de amostras não-invasivas obtidas, o valor final de amostras genotipadas pelas fezes foi de 17 (10 indivíduos), enquanto que as amostras invasivas somam 13 indivíduos. Estes números demonstram o poder amostral do método não-invasivo.

As estimativas de erro obtidas para cada um dos locos (Tabela 5) revelam que dois dos locos escolhidos estão mais sujeitos a apresentar erros: loco 2010 e 2132. Ambos obtiveram uma taxa de 14% de erro. Maior atenção no processo de genotipagem deve ser dada a estes locos, procurando-se efetuar o maior número de repetições possíveis para os mesmos. Da mesma forma, os locos 2004 e 2054, com 5 e 7% de taxa de erro respectivamente, apresentaram valores moderados de erro e devem ser repedidos sistematicamente. Já o loco 2088, não teve nenhum erro detectado no estudo e pode exigir um número menor de repetições para que seus genótipos homozigotos possam ser aceitos como confiáveis.

5.2. Estado da amostra e sucesso de amplificação

A análise estatística que relacionou as classes de estado da amostra não-invasiva com a eficiência de amplificação de DNA mitocondrial mostrou que o fato da amostra ter sido molhada é mais importante que o tempo de deposição. As amostras que pegaram chuva obtiveram um sucesso de amplificação significativamente menor. Entre todas as outras categorias não houve diferença significativa no sucesso de amplificação.

Portanto, futuras coletas de material fecal de lobos guará, com fins de análises genéticas, devem ser realizados, preferencialmente, entre os meses de maio a setembro, correspondente ao período de seca no clima sazonal do Cerrado.

5.3. Eficiência da captura dos animais em relação ao método não-invasivo

Durante cerca de 7 meses de coleta de fezes pude obter mais de 400 amostras de fezes. Isto reflete a facilidade de obtenção deste material, em se tratando de lobos-guará. A partir deste material não-invasivo, dez indivíduos diferentes de lobos foram amostrados. Já o tempo de funcionamento das armadilhas foi de cerca de 10 meses, sendo que elas estiveram ativas durante boa parte deste período (1541 armadilhas x noite). Durante este esforço capturei apenas três lobos.

Assim, apesar da eficiência de genotipagem do material não-invasivo ser menor (15,7%) que a de genotipagem de material invasivo (100%), identifiquei cerca de três vezes mais indivíduos utilizando amostras não-invasivas que a partir das invasivas, oriundas apenas de capturas.

Somando todo material de tecido que obtive no esforço amostral invasivo (atropelamentos, resgates e capturas) obtive 13 indivíduos de lobos. A partir das fezes, obtive dez indivíduos diferentes destes. Isso demonstra o poder do método não-invasivo de, no mínimo, aumentar significativamente a robustez da amostragem de populações naturais de grandes carnívoros ameaçados.

5.4. Comparação temporal ESECAE

A análise de variância molecular classificou de maneira significativa as populações anterior e atual como “moderadamente diferenciadas” (Conner & Hartl 2004), com $F_{ST} = 0,07$ e $p = 0,03$.

Estes resultados sugerem que ainda existe uma conexão entre a população da ESECAE e áreas circunvizinhas. Porém, devido às diferenças dos números amostrais, isso pode apenas refletir o baixo número de indivíduos genotipados para a população amostrada anteriormente.

Ao realizar a correção para o número amostral (com os dez sorteios de seis indivíduos da população atual) a diversidade genética atual continua sendo maior e a estruturação temporal continua moderada e significativa.

Tendo em vista que a intensificação da ocupação urbana nos arredores da ESECAE, nos últimos dez anos, é um fato comprovado por números do IBGE e que esta urbanização traz apenas ameaças para a viabilidade de populações de lobos no DF, então, dificilmente, a população de lobos estaria aumentando de tamanho neste local. Dessa forma, duas hipóteses poderiam justificar o quadro genético encontrado na comparação temporal da população da Estação:

1. Com o aumento da ocupação urbana do Distrito Federal, indivíduos de lobos que estariam ainda ocupando áreas naturais fora de UCs, nos arredores da cidade de Brasília, teriam sido forçados a procurar outras áreas. Os únicos remanescentes de cerrado que eles poderiam recorrer seriam os inseridos dentro das UCs. Portanto, há cerca de dez anos atrás, quando a população da Estação foi amostrada, haveria uma distribuição de indivíduos estabelecidos há mais tempo na área da ESECAE, sendo composta, principalmente, de grupos familiares (mais aparentados e menos diversos geneticamente). Atualmente, a população teria passado por um processo onde indivíduos teriam migrado para dentro da área da Estação, trazendo novos alelos e aumentando a diversidade genética no local.

2. Em uma população natural de lobos guará podem existir indivíduos mais propensos que outros a caírem em armadilhas. Como a amostragem anterior contou apenas com indivíduos amostrados pelo método da captura em armadilhas, os animais capturados no passado poderiam ser apenas uma sub-amostra da população total. Além disso, esta sub-amostra poderia ser mais relacionada entre si que com o restante da população.

Já na amostragem atual corrigida (sorteio), obtive indivíduos capturados em armadilhas, atropelados, resgatados e “capturados” por material não-invasivo. Assim, com este tipo de amostragem integrada, poderíamos estar incluindo animais que não seriam abordados se apenas o método de captura fosse utilizado. Dessa forma, a maior diversidade genética amostrada seria justificada.

5.5. Comparação DF e Parque Nacional Serra da Canastra

No trabalho tive acesso a dados ainda não publicados (Manoel Rodrigues e Eduardo Eizirik, dados não publicados) acerca da variabilidade genética da espécie na população amostrada no Parque Nacional Serra da Canastra-MG. A amostragem desta população foi realizada pela captura de animais em armadilhas entre os anos de 2004 e 2006 em apenas uma parcela do Parque, e contou no total com 19 indivíduos utilizando o mesmo método de genotipagem, para os mesmos locos. A partir dos dados cedidos para esta localidade, pude fazer comparações acerca da diversidade genética e estruturação geográfica desta população com a do Distrito Federal.

Nesta análise pude observar que, para três locos (2054, 2088 e 2132), existem mais alelos na população amostrada atualmente no DF ($N = 23$) que na população amostrada na Serra da Canastra ($N = 19$). Para os locos 2054 e 2088 existe um alelo a mais no Distrito Federal (174 e 124 pb, respectivamente), diferente dos encontrados na Serra da Canastra. Para o 2132, existem três alelos exclusivos do DF (188, 192 e 208 pb).

A AMOVA realizada com os mesmos cinco locos microssatélites determinou um $F_{ST} = 0,01$ com $p = 0,41$. O resultado indica não haver estruturação geográfica significativa entre estas duas populações ($0 < F_{ST} < 0,05$ e $p > 0,05$). Uma vez que a maior parte dos microssatélites evolui seguindo um modelo de mutação por passos (Slatkin 1995; Valdes et al. 1993), a diferenciação genética entre as populações foi avaliada também pelo valor do R_{ST} (Slatkin 1995) estimado pelo programa FSTAT 2.9.3 (Goudet 1995), seguindo Rousset (1996). Neste programa, realizei um teste de significância de diferenciação pela randomização dos genótipos entre as amostras e obtive o valor de p pela estatística G log-likelihood (Goudet et al. 1996). O Valor de R_{ST} estimado no programa FSTAT obteve valor igual a -0,0086 ($p = 0.137$), também indicando não haver estruturação geográfica significativa entre as populações de lobos na Serra da Canastra de no DF.

Na Tabela 11 estão listadas a heterozigosidade observada (H_O) e esperada (H_E), a média do número de alelos em cada loco e a média do conteúdo de informação polimórfica encontrada para os cinco locos (PIC) nas duas populações.

Tabela 11. Comparação de medidas de diversidade genética entre as populações da Serra da Canastra e do Distrito Federal.

<i>População</i>	<i>Média de alelos por loco</i>	<i>H_O</i>	<i>H_E</i>	<i>PIC</i>
Serra da Canastra	4,8	0,700	0,714	0,642
Distrito Federal	5,8	0,748	0,715	0,650

Diferente da comparação entre as duas populações amostradas ao longo do tempo na ESECAE, as populações da Serra da Canastra e a do DF não estão estruturadas geneticamente. Isto mostra que a variabilidade encontrada em cada uma destas áreas é maior que a variabilidade encontrada entre estas áreas. O valor de F_{ST} encontrado sugere que 99% da variabilidade genética das duas populações está representada dentro das mesmas, enquanto apenas 1% desta variabilidade estaria entre elas.

A despeito da falta de estruturação genética encontrada entre as duas populações, a riqueza de alelos encontrada no DF foi maior que a encontrada na Canastra (existem 5 alelos exclusivos do DF). Isto é um resultado inesperado, uma vez que a Serra da Canastra é um Parque Nacional, com área total maior (71.525 ha) que a soma das áreas das três Unidades abordadas no presente estudo (cerca de 48.000 ha).

O fato do número de alelos ser maior na região do DF pode refletir o comportamento histórico da distribuição desta espécie. O trabalho de Salim (2005) utilizou cinco locos microssatélites na avaliação da estrutura populacional de lobos em sua distribuição nacional. Neste estudo, a distribuição da espécie foi dividida em quatro regiões: Distrito Federal e Goiás, Triângulo Mineiro, Belo Horizonte e São Paulo, mas, não foi encontrada estruturação geográfica significativa entre estas regiões. Apesar disso, o trabalho de Salim revela que a região que inclui o DF foi a única que apresentou alelos exclusivos.

Existe um outro estudo em andamento que utiliza marcadores moleculares mais conservados (DNA mitocondrial) na análise da biogeografia do lobo-guará (Paulo Prates e Sandro Bonatto, dados não publicados). Este trabalho revela que a população de lobos em toda sua distribuição apresenta níveis de variabilidade excepcionalmente baixos quando comparados com outros canídeos sul-americanos. As análises revelam que esta espécie teria enfrentado um gargalo populacional severo por volta de 15.000 anos atrás

(Paulo Prates, com. pes.), o que corresponde ao final do período pleistoceno. Entretanto, não é fácil correlacionar este gargalo com eventos climáticos, por exemplo, que poderiam ser responsáveis por transformações importantes da paisagem em escala de biomas. Neste período, a área tropical da América do Sul passava por temperaturas consideravelmente mais baixas, com a correspondente baixa também na umidade. Neste período, portanto, o que observamos é a expansão das formações savânicas, i.e., cerrados em áreas anteriormente dominadas pela floresta tropical úmida em amplas porções do que é hoje a Colômbia, Guiana, Suriname e Rondônia (Bigarella & Ferreira 1985).

Os únicos fósseis já encontrados para o lobo-guará são descritos para a região do Planalto Central brasileiro e estes são datados do pleistoceno (Langguth 1975). Se as populações de lobos que sobreviveram a este gargalo populacional estavam localizadas na região do DF e arredores, a distribuição atual da espécie teria se formado a partir de uma expansão populacional destes núcleos remanescentes. Desta forma, grande parte da diversidade genética da espécie estaria representada nas populações dos arredores de Brasília e no restante do *core* do Cerrado. Se levarmos isso em consideração a população da Serra da Canastra seria uma sub-amostra da população do DF, o que justificaria sua menor riqueza de alelos.

Alternativamente, esta diferença poderia também ser explicada pelas diferenças metodológicas utilizadas (hipótese 2 citada anteriormente). Na Serra da Canastra, apenas a metodologia invasiva foi utilizada (capturas com armadilhas), o que pode ter levado a uma amostragem menos representativa.

5.8. Diversidade genética e conservação da espécie no DF

O estudo mostrou que ainda não há estruturação genética entre as três UCs do DF. Apesar disso, por causa da matriz urbana em que essas áreas naturais estão inseridas, é de se esperar que os acasalamentos ocorram preferencialmente entre os indivíduos dentro de cada uma dessas áreas que entre os indivíduos de diferentes UCs. Isto, em um futuro próximo, pode levar à estruturação genética nas três áreas e, conseqüentemente, à endogamia. Assim, seria uma questão de tempo até que pudéssemos detectar uma estruturação.

Há sessenta anos atrás Brasília começava a ser construída e, desde então, o processo de urbanização tem se desenvolvido rapidamente. A construção levou cerca de 4 anos, sendo inaugurada em 1960, com a transferência da capital do país da cidade do Rio de Janeiro para lá. Com isso, a população do Cerrado cresceu 73% entre 1950 e 1960 (Klink & Moreira 2002). Portanto, o aporte de pessoas para a região do Distrito Federal foi intenso durante este período. Além dos impactos diretos da construção, este grande número de pessoas, que veio em busca das oportunidades que a nova cidade tinha a oferecer, tinha diversos requerimentos para sua instalação. Dentre os mais imediatos estão os de alimentação e moradia. Assim, estas necessidades humanas foram supridas às custas do uso do solo, anteriormente ocupado por flora e fauna nativas.

Em termos de fauna, populações de grandes carnívoros, como o lobo-guará, sofrem consequências severas quando em contato direto com a intensificação da ocupação humana (Gittleman et al. 2001). Isto se dá tanto por conta de características biológicas da espécie (como a utilização de grandes áreas de vida, o longo tempo para o amadurecimento sexual e as baixas taxas reprodutivas), como também pelos conflitos diretos com humanos, gerados em consequência dos hábitos predatórios destas espécies (Taberlet et al. 2001). Além disso, o lobo-guará é suscetível a diversas doenças transmitidas por cachorros domésticos (Rodden et al. 2004).

A diversidade genética encontrada na população de lobos do DF aparenta estar dentro do esperado para populações estáveis de canídeos. Entretanto, as ameaças que cercam esta população têm uma origem relativamente recente, relacionada à criação de Brasília há cerca de 50 anos atrás. Até então, a ocupação humana na região do DF era irrisória. O tempo decorrido até o momento pode ter sido insuficiente para que sinais de endogamia possam ser observados. Além disso, esta população está localizada no centro da distribuição da espécie e, aparentemente, detém a maior parte da variabilidade encontrada em toda sua distribuição nacional (Salim 2005). Isto poderia explicar por que, apesar das altas taxas de mortalidade, esta população ainda retém uma variabilidade adequada de populações não-endogâmicas. Por esse motivo, o presente estudo destaca a

importância genética destas populações do Distrito Federal, fragmentadas e ameaçadas.

Dos 23 animais amostrados no estudo 10 mostraram consequências diretas do impacto humano. Seis destes animais foram mortos em atropelamentos, enquanto os quatro lobos resgatados na malha urbana apresentavam machucados, queimaduras e/ou sinais de envenenamento. Portanto, dos animais amostrados, apenas 13 refletem a população sobrevivente e, em consequência, a variabilidade remanescente na região.

O alto índice de atropelamentos de lobos já havia sido relatado antes para o Distrito Federal (Rodrigues 2002), e para sua distribuição ampla (Rodden et al. 2004) sendo reafirmada no presente trabalho. Outro fator que ameaça as populações de lobos no DF é a presença de cachorros domésticos (Lacerda 2002). Eles trazem doenças e podem competir com as populações de canídeos nativos (Rodden et al. 2004). Durante o processo de coleta de amostras, foi possível observar cachorros domésticos frequentando as três UCs amostradas. O grande número destes animais utilizando a área da ESECAE foi comprovado pelo fato das capturas apresentarem o dobro do número de cachorros domésticos (6) em relação aos de lobos (3).

Este estudo ressalta a importância do estabelecimento de medidas preventivas para o atropelamento de animais silvestres nos arredores das Unidades de Conservação do DF. Barreiras eletrônicas na BR-020 poderiam diminuir os altos índices de atropelamentos, encontrados neste estudo e no estudo de Rodrigues (2002). Além disso, medidas educativas, relacionadas aos cuidados na manutenção dos animais domésticos, poderiam colaborar com a redução da presença de animais domésticos dentro das áreas protegidas. Programas de esterilização de cachorros domésticos seriam também de grande importância para o controle populacional destes animais.

Além destas ameaças, existe o risco do conflito direto com humanos. A perseguição humana que os carnívoros enfrentam é baseada, principalmente, no medo que as pessoas têm da perda de suas criações domésticas (como galinhas), somado ao receio de possíveis ataques diretos (Gittleman et al. 2001).

Apesar disso, carnívoros desempenham um importante papel na manutenção da estabilidade de ecossistemas naturais. Eliminá-los pode

trazer consequências desastrosas para a comunidade local. Eles são considerados “espécies-chave” por efetuarem o controle populacional de diversas outras espécies, das quais se alimentam (Begon et al. 2005; Ricklefs 2001). Além disso, estas espécies fascinam as pessoas. Para muitos, a observação destes animais aguça a curiosidade e desperta emoções estimulantes (Carvell et al. 1998). Talvez por isso o lobo-guará seja considerado um animal símbolo do Cerrado.

O Cerrado é um bioma ameaçado. As taxas atuais de desmatamento do Cerrado são mais altas que as descritas para a Amazônia (Klink & Machado 2005). Estudos revelam que se medidas voltadas para a conservação do Cerrado não tomarem lugar nas políticas públicas regionais, estima-se que em 30 anos a vegetação original do bioma poderá desaparecer (Machado et al. 2004). Este quadro ameaça severamente as espécies da fauna associadas ao bioma, inclusive o lobo-guará. A proteção desta espécie implica na preservação de áreas relativamente extensas. Portanto, a criação de uma estratégia de conservação efetiva, focada nestas populações ameaçadas, abarcaria uma ampla gama de espécies. Estas estariam contempladas em unidades delineadas de acordo com requerimentos desta espécie-bandeira e topo de cadeia trófica, o lobo-guará. Assim, proteger o lobo evitaria que o Cerrado perdesse o símbolo de sua natureza e também levaria à proteção da saúde de todo ecossistema. Para as pessoas isso significa proteger a qualidade de vida atual e futura, que será deixada para as gerações vindouras.

6. CONCLUSÕES

1. O método não-invasivo de genotipagem de microsatélites foi aplicado com sucesso para o lobo-guará;
2. No Cerrado, as coletas de fezes com fins de amplificação de DNA devem ser efetuadas preferencialmente nos meses secos (entre abril e setembro);
3. Apesar da eficiência de genotipagem do material não-invasivo (15,7%) ser menor que do material invasivo (100%), foi possível a identificação de cerca de três vezes mais animais pelas fezes do que por capturas;
4. A comparação temporal da diversidade genética na ESECAE sugere que a variabilidade tenha permanecido igual ou aumentado;
5. Não existiu uma estruturação genética significativa entre as três Unidades de Conservação, se tratando, portanto, de apenas uma população, com indivíduos distribuídos nas três áreas;
6. A diversidade genética da população de lobos guará ainda não demonstra os efeitos da endogamia;
7. O fato da riqueza de alelos ser maior no DF do que na população da Serra da Canastra acentua sua importância biogeográfica para futuras estratégias de manejo e conservação biológica.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, J. R., B. T. Kelly, and L. P. Waits. 2003. Using Faecal DNA sampling and GIS to monitor hybridization between red wolves (*Canis rufus*) and coyotes (*Canis latrans*) Molecular Ecology **12**:2175-2186.
- Awise, J. C. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Balloux, F., and N. Lugon-Moulin. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. Molecular Ecology **11**:155-165.
- Banks, S. C., A. Horsup, A. N. Wilton, and A. C. Taylor. 2003. Genetic marker investigation of the source and impact of predation on a highly endangered species. Molecular Ecology **12**:1663-1667.
- Begon, M., C. R. Townsend, and J. L. Harper 2005. Ecology: from individuals to ecosystems. Blackwell, Malden.
- Bestelmeyer, S. V. 2000. Solitary, reproductive and parental behavior of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*). Page 192. Department of Biology. Colorado State University, Fort Collins
- Bigarella, J. J., and A. M. M. Ferreira. 1985. Amazonian geology and the pleistocene and the cenozoic environments and paleoclimates. Pages 49-71 in G. T. Prance, and T. E. Lovejoy, editors. Key Environments: Amazonia. Pergamon Press, Oxford.
- Bonin, A., E. Bellemain, P. B. Eidesen, F. Pompanon, C. Brochmann, and P. Taberlet. 2004. How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. Molecular Ecology **13**:3261-3273.
- Carvell, C., N. F. J. Inglis, G. M. Mace, and A. Purvis. 1998. How Diana climbed the rattins at the zoo. Nature **395**:213.
- Charlesworth, D., and B. Charlesworth. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. Annual Review of Ecological Systematics **18**:237-268.
- Conner, J. K., and D. L. Hartl 2004. A Primer of Ecological Genetics. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Costa, L. P., Y. L. R. Leite, S. L. Mendes, and A. D. Ditchfield. 2005. Mammal Conservation in Brazil. Conservation Biology **19**:672-679.

- Cullen Jr., L., R. Rudran, and C. Valladares-Padua, editors. 2003. Métodos de estudo em biologia da conservação & manejo da vida silvestre. Ed. da UFPR; Fundação o Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba.
- Dietz, J. 1984. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Smithsonian Contributions to Zoology* **392**:1-51.
- Eizirik, E., J. H. Kim, M. Menotti-Raymond, P. G. Crawshaw Jr, S. J. O'Brien, and W. E. Johnson. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology* **10**:65-79.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* **1**:47-50.
- Falush, D., M. Stephens, and J. K. Pritchard. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics* **164**:1567-1587.
- Francisco, L. V., A. A. Langston, C. S. Mellersh, and C. L. Neal. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome* **7**:359 - 362.
- Frankel, O. H., and M. E. Soulé 1981. *Conservation and Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frankham, R. 1995. Conservation genetics. *Annual Review of Genetics* **29**:305-327.
- Frankham, R., J. D. Ballou, and D. A. Briscoe 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Frantz, A. C., L. C. Pope, P. J. Carpenter, T. J. Roper, G. J. Wilson, R. J. Delahay, and T. Burke. 2003. Reliable microsatellite genotyping of the Eurasian Badger (*Meles meles*) using faecal DNA. *Molecular Ecology* **12**:1649-1661.
- Frantzen, M. A. J., J. B. Silk, J. W. H. Ferguson, R. K. Wayne, and M. H. Kohn. 1998. Empirical evaluation of preservation methods for faecal DNA. *Molecular Ecology* **7**:1423-1428.
- Gilpin, M. E., and M. E. Soulé. 1986. Minimum viable populations: processes of species extinctions. Pages 19-34 in M. E. Soulé, editor.

- Conservation Biology: the science of scarcity and diversity. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Girman, D. J., C. Vila, E. Geffen, S. Creel, M. G. L. Mills, J. W. McNutt, J. Ginsberg, P. W. Kat, K. H. Mamiya, and R. K. Wayne. 2001. Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Molecular Ecology* **10**:1703-1723.
- Gittleman, J. L., S. M. Funk, D. Macdonald, and R. K. Wayne, editors. 2001. *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Goldstein, D. B., and C. Schlötterer, editors. 1999. *Microsatellites Evolution and Applications*. Oxford University Press, Oxford.
- Goossens, B., L. Chikhi, S. S. Utami, J. Ruiter, and M. W. Bruford. 2000. A multi-samples, multi-extracts approach for microsatellite analysis of faecal samples in an arboreal ape. *Conservation Genetics* **1**:157-162.
- Goudet, J. 1995. FSTAT (1.2 version): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity* **86**:485-486.
- Goudet, J., M. Raymond, T. Demeeus, and F. Rousset. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics* **144**:1933-1940.
- Goulart, F. G. T. 2006. A conservação do ambiente urbano na área tomabada de Brasília. Page 95. Departamento de Geografia. Universidade de Brasília, Brasília.
- Griffin, A. S., B. Nurnberger, and J. M. Pemberton. 2001. A panel of microsatellites developed for meerkats (*Suricata suricatta*) by cross-species amplification and species-specific cloning. *Molecular Ecology Notes* **1**:83-85.
- Guo, S. W., and E. A. Thompson. 1992. Performing the Exact Test of Hardy-Weinberg Proportion for Multiple Alleles. *Biometrics* **48**:361-372.
- Halliburton, R. 2004. *Introduction to Population Genetics*. Pearson Prentice Hall, Upper Saddle River.
- Hanski, I. 1994. Patch-occupancy dynamics in fragmented landscapes *Trends in Ecology & Evolution* **9**:131-135.
- Hartl, D. L., and A. G. Clark 1997. *Principles of Population Genetics*. Sinauer Associates, Inc., Sunderland.

- IBAMA. 2003. Lista de espécies da fauna brasileira ameaçadas de extinção. Ministério do Meio Ambiente, IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis, Brasília.
- IBGE. 2007a. <http://www.ibge.gov.br>. Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão.
- IBGE. 2007b. Produção Agrícola 2005 Ministério do Planejamento, Orçamento e Gestão, <http://www.ibge.gov.br/estadosat/>.
- Ichikawa, Y., Y. Takahashi, S. Tsumagari, M. Takeishi, K. Ishihama, M. Morita, M. Kanemaki, M. Minezawa, and H. Takahashi. 2002. Identification and characterization of 40 dinucleotide microsatellites in the dog genome. *Animal Genetics* **33**:400-401.
- IUCN. 2006. 2006 IUCN red list of threatened species. Page www.iucnredlist.org. IUCN Species Survival Commission Gland, Suíça e Cambridge, Reino Unido.
- Iyengar, A., V. N. Babu, S. Hedges, A. B. Venkataraman, N. Maclean, and P. A. Morin. 2005. Phylogeography, genetic structure, and diversity in the dhole (*Cuon alpinus*). *Molecular Ecology* **14**:2281-2297.
- Juarez, K. M., and J. Marinho-Filho. 2002. Diet, habitat use, and home ranges of sympatric canids in central Brazil *Jornal of Mammalogy* **83**:925-933.
- Klink, C. A., and R. B. Machado. 2005. Conservation of the brazilian cerrado. *Conservation Biology* **19**:707-713.
- Klink, C. A., and A. G. Moreira. 2002. Past and current human occupation, and land use in P. S. Oliveira, and R. J. Marquis, editors. *The Cerrados of Brazil*. Columbia University Press, New York.
- Klukowska, J., T. Strabel, M. Mackowski, and M. Switonski. 2003. Microsatellite polymorphism and genetic distances between the dog, red fox and arctic fox. *Journal of Breeding Genetics* **120**:88-94.
- Kohn, M. H., and R. K. Wayne. 1997. Facts from feces revisited. *Tree* **12**:223-227.
- Koskinen, M. T., and P. Bredbacka. 2000. Assessment of the population structure of five Finnish dog breeds with microsatellites. *Animal Genetics* **31**:310-317.

- Lacerda, A. C. R. 2002. Análise de ocorrência de *Canis familiaris* no Parque Nacional de Brasília: influência da matriz, monitoramento e controle. Departamento de Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília.
- Langguth, A. 1975. Ecology and evolution in the south american canids. Pages 192-206 in M. W. Fox, editor. The Wild Canids. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Leonard, J. A., C. Vila, and R. K. Wayne. 2005. Legacy lost: genetic variability and population size of extirpated US grey wolves (*Canis lupus*). Molecular Ecology **14**:9-17.
- Litt, M., and J. A. Luty. 1989. A hipervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. American Journal of Human Genetics **44**:397-401.
- Lovejoy, T. E. 2005. Spotlight on Brazil. Conservation Biology **19**:587-588.
- Luikart, G., and J. M. Cornuet. 1998. Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. Conservation Biology **12**:228-237.
- Luikart, G., and P. England. 1999. Statistical analysis of microsatellite DNA data. Trends in Ecology and Evolution **14**:253-256.
- Machado, R. B., M. B. Ramos Neto, P. G. P. Pereira, E. F. Caldas, D. A. Gonçalves, N. S. Santos, K. Tabor, and M. Steininger. 2004. Estimativas de perda de área do Cerrado brasileiro. Conservação Internacional, Brasília, DF.
- Maia, O. B., and A. M. G. Gouveia. 2002. Birth and mortality of maned wolves *chrysocyon brachyurus* (Illiger 1811) in captivity. Revista Brasileira de Biologia **62**:25-32.
- Mantovani, J. E. 2001. Telemetria convencional e via satélite na determinação da área de vida de três espécies de carnívoros da região nordeste do estado de São Paulo. Page 118. Centro de Ciências Biológicas e da Saúde. Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP.
- McKelvey, K. S., and M. K. Schwartz. 2004. Genetic errors associated with population estimation using non-invasive molecular tagging: problems and new solutions. Journal of Wildlife Management **68**:439-448.

- Melo, L. F. B., M. A. L. Sábato, E. M. V. Magni, R. J. Young, and C. M. Coelho. 2007. Secret lives of maned wolves (*Chrysocyon brachyurus* Illiger 1815): as revealed by GPS tracking collars. *Journal of Zoology* **271**:27-36.
- MMA. 2002. Biodiversidade brasileira: avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição de benefícios da biodiversidade brasileira. Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF), Ministério do Meio Ambiente (MMA), Brasília.
- Moreira, J. R., N. Klautau-Guimarães, E. P. B. Contel, and A. R. Bem. 1998. Estudo preliminar da variabilidade genética do lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*). Pages 1-10. EMBRAPA/CENARGEN, Brasília.
- Myers, N., R. A. Mittermeier, C. G. Mittermeier, G. A. B. da Fonseca, and J. Kent. 2000. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* **403**:853-858.
- Noss, R. F., H. B. Quigley, M. G. Hornocker, T. Merrill, and P. C. Paquet. 1996. Conservation Biology and Carnivore Conservation in the Rocky Mountains. *Conservation Biology* **10**:949-963.
- Oliveira, P. S., and R. J. Marquis, editors. 2002. The Cerrados of Brazil. Columbia University Press, New York.
- Paetkau, D., L. P. Waits, P. L. Clarkson, E. Vyse, R. Ward, and C. Strobeck. 1998. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology* **12**:418-429.
- Palomares, F., J. A. Godoy, A. Piriz, S. J. O'Brien, and W. E. Johnson. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology* **11**:2171-2182.
- Parra, D., G. Dolf, and S. Dunner. 2003. Contribution of a new set of canine microsatellites to the knowledge of the canine genetic map. *Animal Genetics* **34**:69-70.
- Paxinos, E., C. McIntosh, K. Ralls, and R. Fleischer. 1997. A noninvasive method for distinguishing among canid species: amplification and enzyme restriction of DNA from dung. *Molecular Ecology* **6**:483-486.

- Perez-Sweeney, B. M., F. P. Rodrigues, and D. J. Melnick. 2003. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. Pages 343-380 in L. Cullen Jr., C. Valladares-Padua, and R. Rudran, editors. Métodos de Estudos em Biologia da Conservação e Manejo da Vida Silvestre Ed. da UFPR e Fundação o Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba.
- Piggott, M. P., S. C. Banks, N. Stone, C. Banffy, and A. C. Taylor. 2006. Estimating population size of endangered brush-tailed rock-wallaby (*Petrogale penicillata*) colonies using faecal DNA. *Molecular Ecology* **15**:81-91.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* **155**:945-959.
- Prugh, L. R., C. E. Ritland, S. M. Arthur, and C. J. Krebs. 2005. Monitoring coyote population dynamics by genotyping faeces. *Molecular Ecology* **14**:1585-1596.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. GENEPOP (Vesion 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity* **86**:248-249.
- Reed, D. H., and R. Frankham. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology* **17**:230-237.
- Reed, J. E., R. J. Baker, W. B. Ballard, and B. T. Kelly. 2004. Differentiating mexican gray wolf and coyote scats using DNA analysis. *Wildlife Society Bulletin* **32**:685-692.
- Reed, J. Z., D. J. Tollit, P. M. Thompson, and W. Amos. 1997. Molecular scatology: the use of molecular genetic analysis to assign species, sex and individual identity to seal faeces. *Molecular Ecology* **6**:225-234.
- Ricklefs, R. E. 2001. *The Economy of Nature*. Freeman, New York.
- Rodden, M., F. Rodrigues, and S. V. Bestelmeyer. 2004. *Chrysocyon Brachyurus* (Illiger, 1815) in M. Hoffmann, and C. Sillero-Zubiri, editors. Neotropical Canids Action Plan IUCN/SSC - Canid Specialist Group, Oxford.
- Rodrigues, F. H. G. 2002. Biologia e conservação do lobo guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas, DF. Page 96. *Ecologia*. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

- Rousset, F. 1996. Equilibrium values of measures of population subdivision for stepwise mutation processes. *Genetics* **142**:1357-1362.
- Sá, R. M. L., and L. V. Ferreira. 2000. Áreas protegidas ou espaços ameaçados: o grau de implementação e vulnerabilidade das unidades de conservação federal brasileiras de uso indireto. Série Técnica Vol. III. WWF, Brasil, Brasília.
- Salim, D. C. 2005. Estudo da variabilidade genética do lobo guará, *Chrysocyon brachyurus*, no Brasil. Page 71. *Biologia Animal*. Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis 1989. *Molecular Cloning - A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, New York.
- Santos, E. F., E. Z. F. Setz, and N. Gobbi. 2003. Diet of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and its role in seed dispersal on a cattle ranch in Brazil. *Journal Of Zoology* **260**:203-208.
- Seuánez, H. N., A. DiFiore, M. A. M. Moreira, C. A. S. Almeida, and F. C. Canavez. 2002. Genetics and evolution of lion tamarins. Pages 117-132 in D. G. Kleiman, and A. B. Rylands, editors. *Lions tamarins: biology and conservation*. Smithsonian Institution Press, Washington, DC.
- Silveira, L. 1999. Ecologia e conservação dos mamíferos carnívoros do Parque Nacional das Emas, Goiás. Page 117. Departamento de Ecologia. Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequency. *Genetics* **139**:457-462.
- Smith, D. A., K. Ralls, A. Hurt, B. Adams, M. Parker, and J. E. Maldonado. 2006. Assessing reliability of microsatellite genotypes from kit fox faecal samples using genetic and GIS analyses. *Molecular Ecology* **15**:387-406.
- Soulé, M. E., editor. 1984. *Conservation biology: the science of scarcity and diversity*. Sinauer Associates, Massachussets.
- Soulé, M. E. 1985. What is conservation Biology? . *BioScience* **35**:727-734.
- Soulé, M. E., editor. 1987. *Viable Populations for Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge and New York.

- Soulé, M. E., M. Gilpin, W. Conway, and T. Foose. 1986. The millenium ark: How long a voyage, how many staterooms, how many passengers? *Zoo Biology* **5**:101-113.
- Soulé, M. E., and G. Lease, editors. 1989. *Research Priorities in Conservation Biology*. Island Press, Washington, DC.
- Soulé, M. E., and D. Simberloff. 1986. What do genetics and ecology tell us about the design of nature reserves? *Biological Conservation* **35**:19-40.
- Soulé, M. E., and B. M. Wilcox, editors. 1980. *Conservation Biology: An Ecological-Evolutionary Perspective*. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Steinke, E. T. 2004. Considerações sobre variabilidade e mudança climática no Distrito Federal, suas repercussões nos recursos hídricos e informações ao grande público. Page 197. Departamento de Ecologia. Universidade de Brasília, Brasília, DF.
- Taberlet, P., S. Griffin, B. Goossens, S. Questiau, V. Manceau, N. Escaravage, L. P. Waits, and J. Bouvet. 1996. Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. *Nucleic Acids Research* **24**:3189-3194.
- Taberlet, P., G. Luikart, and E. Geffen. 2001. New methods for obtaining and analyzing genetic data from free-ranging carnivores in J. L. Gittleman, S. M. Funk, D. Macdonald, and R. K. Wayne, editors. *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Tautz, D. 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA. *Nucleic Acids Research* **17**:6462-6471.
- Valdes, A. M., M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. *Genetics* **133**:737-749.
- Wasser, S. K., C. S. Houston, G. M. Koehler, G. G. Cadd, and S. R. Fain. 1997. Techniques for application of faecal DNA methods to field studies of Ursids. *Molecular Ecology* **6**:1091-1097.
- Wayne, R. K., E. Geffen, D. J. Girman, K. P. Koepfli, L. M. Lau, and C. R. Marshall. 1997. Molecular Systematics of the Canidae. *Systematic Biology* **46**:622-653.

- Wikramanayake, E., M. McKnight, E. Dinerstein, A. Joshi, B. Gurung, and D. Smith. 2004. Designing a Conservation Landscape for Tigers in Human-Dominated Environments. *Conservation Biology* **18**:839-844.
- Woodroffe, R. 2001. Strategies for carnivore conservation: lessons from contemporary extinctions in J. L. Gittleman, S. M. Funk, D. Macdonald, and R. K. Wayne, editors. *Carnivore Conservation*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Young, A. G., and G. M. Clarke, editors. 2000. *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Zar, J. H. 1999. *Biostatistical Analysis*. Prentice Hall, New Jersey.
- Zrzavý, J., and V. Ricánková. 2004. Phylogeny of recent canidae (Mammalia, Carnivora): relative reliability and utility of morfological and molecular datasets. *Zoologica Scripta* **33**:311-333.