



Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

DIVERSIDADE GENÉTICA DO CACHORRO-DO-MATO (*Cerdocyon thous*)
EM REGIÕES DA BAHIA

Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação

RÚBIA SANTANA ANDRADE



Programa de Pós-Graduação em
Genética, Biodiversidade e Conservação



RÚBIA SANTANA ANDRADE

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**DIVERSIDADE GENÉTICA DO CACHORRO-DO-MATO (*Cerdocyon thous*)
EM REGIÕES DA BAHIA**



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, para obtenção do Título de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cervini



Jequié-BA
2017

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

io

A553d Andrade, Rúbia Santana.

Diversidade genética do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) em regiões da Bahia / Rúbia Santana Andrade.- Jequié, 2017.

54f.

(Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB, sob orientação do Prof. Dr. Marcelo Cervini)

1. Canidae. 2. DNA mitocondrial. 3. Estruturação. 4. Haplótipos. 5. Simpatria. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II.Título

CDD – 575

Rafaella Cância Portela de Sousa - CRB 5/1710. Bibliotecária – UESB - Jequié



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA - UESB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E
CONSERVAÇÃO

Campus Jequié-BA

Gené

ão

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: "Diversidade genética do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) em regiões da Bahia"

Autor (a): Rúbia Santana Andrade

Orientador (a): Prof. Dr. Marcelo Cervini

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE EM GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: GENÉTICA, BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO, pela Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marcelo Cervini – UESB / Jequié

Gené

ão

Profª. Dra. Lídia Nogueira Silva - IFBA / Valença-BA

Profª. Dra. Caroline Garcia – UESB/Jequié-BA

Data de realização: 30 de agosto de 2017.

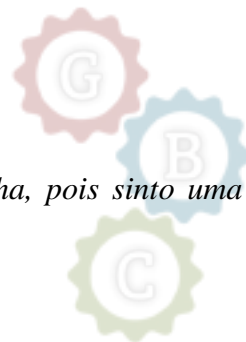
Avenida José Moreira Sobrinho, s/n – Jequiezinho – Jequié/BA – CEP 45.206-190.
Telefones: (0**73) 3528-9725 – E-mail: ppggbc@uesb.edu.br



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Para minha Pretinha, pois sinto uma saudade sem fim!

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação (PPGGBC), pela estrutura e apoio concedidos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FASPEB), pelo apoio financeiro (1114/2015), pela bolsa de mestrado.

Ao Dr. Marcelo Cervini, por ter aceitado me orientar, por acreditar no meu potencial e estar sempre disposto a me ajudar.

À Dra. Jamille Bitencourt, por me ajudar nas análises e pelas preciosas dicas.

À Dra. Caroline Garcia, por aceitar fazer parte da banca e contribuir de forma significativa para a melhoria desse trabalho.

À Dra. Lídia Nogueira, por aceitar fazer parte da banca e contribuir de forma significativa para a melhoria desse trabalho.

Aos amigos do laboratório de Genética Molecular (Nino, Renata, Samela, Alexandre, Ramon, Leidy) pela convivência agradável, ajuda, carinho, boas risadas e por todo o conhecimento compartilhado.

A Lisi, por todo o apoio, carinho e pelos muitos áudios compartilhados.

A Anselmo, por sua amizade, seu carinho, conselhos e por sua inestimável ajuda nas viagens de campo. Muito obrigada!

À Josiani Vieira e Camila Guimarães, secretárias do PPGGBC, por todos os auxílios prestados.

Aos motoristas da UESB, Tiago, Waldisnei, Silvano e Leo pela paciência e ajuda durante as coletas.

A Anderson, que me indicou novas áreas de coletas e foi comigo diversas vezes nessa jornada.

A Manu, funcionária do setor de transporte que com todo carinho e dedicação sempre achava uma brecha para as minhas coletas.

A Josué, que contribuiu de forma significativa para o desenvolvimento desse trabalho. A você, meu mais sincero obrigado!

À melhor mãe do mundo, não consigo imaginar toda essa jornada sem ter seu amor, seu carinho e toda sua dedicação e esforço para me colocar onde estou agora. Você é meu coração batendo fora do corpo!



As minhas irmãs, Marla e Flávia pelo maravilhoso fato de existir. Eu não consigo mensurar meu amor por vocês!

Ao amor de minha vida, minha Sophia (fubá, xubiruba, Sopia), a criança mais inteligente que conheci em toda minha vida (sei que não tem outra igual).

A Lai, a irmã que a UESB me deu. É impossível mensurar o quanto sua amizade é importante pra mim. Que essa amizade seja eterna!

A meus filhotes (Preta, Morgana, Lua e Ferdinando), que fizeram e fazem minha felicidade.

A todos vocês, meu mais sincero obrigada!





BIOGRAFIA

Rúbia Santana Andrade, filha de Marivalda Moreira Santana e Gildásio Pereira Andrade, nasceu em 27 de fevereiro de 1989, na cidade de Santo Antônio de Jesus, Bahia, Brasil. Em 2010, ingressou no curso de Bacharelado em Ciências Biológicas com ênfase em “Genética”, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié. Durante a graduação, foi bolsista de iniciação científica pela UESB (2011-2012) e desenvolveu o trabalho de genética, com populações naturais de umbuzeiros (*Spondias tuberosa*), sob a orientação do Prof. Dr. Derval Gomes (UESB). Em 2015, concluiu o curso de graduação, com o trabalho de monografia intitulado: “Levantamento de Carnívoros no Parque Nacional de Boa Nova – BA com abordagem ecológica e molecular”. Neste mesmo ano, ingressou no curso de mestrado pelo Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação, da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié, sob a orientação do Prof. Dr. Marcelo Cervini, sendo bolsista FAPESB e desenvolvendo trabalhos na área de Genética Molecular.



RESUMO

O conhecimento das características genéticas e ecológicas das espécies é necessário para a compreensão da ação dos processos evolutivos. Espécies como o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) são eficientes reguladores tróficos, sendo importante entender como esses processos podem afetar sua viabilidade. A distribuição atual do cachorro-do-mato abrange a maior parte do território da América do Sul, com ocorrência em quase todos os domínios morfoclimáticos brasileiros. São animais generalistas e com grande mobilidade, tanto em áreas de mata quanto em ambientes antropizados. Apesar dessa plasticidade adaptativa, essa espécie vem sofrendo com a fragmentação e destruição de seu hábitat, resultando em maior mortalidade devido a conflito com agricultores, contágio por doenças de animais domésticos, hibridação e atropelamentos. Estudos filogeográficos do gênero indicam a ocorrência de um padrão norte/sul de diferenciação genético definido para o bioma Mata Atlântica, mais precisamente no Estado da Bahia. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi avaliar a diversidade genética de *C. thous* em áreas do estado da Bahia, bem como, verificar se os espécimes que ocorrem nessa região apresentam o padrão de diferenciação genético norte/sul, visto que essas informações geradas podem validar as informações filogeográficas descritas para esse grupo, em especial a possível ocorrência desses grupos genéticos distintos nessa região. Para isso, foram realizadas análises com fragmentos dos genes mitocondriais HVS-I e COI para a identificação da espécie, análises de variabilidade genética e de estruturação populacional em amostras de cachorro-do-mato coletados em duas áreas. Foram observados altos valores de diversidade haplotípica (H_d : 0,508 e 0,983) e nucleotídica (π : 0,007 e 0,039) para os dois genes COI e HVS-I respectivamente. A rede de haplótipos e as árvores filogenéticas demonstraram que as amostras coletadas apresentam semelhança com os dois grupos filogenéticos descritos na literatura para a espécie. As análises de estruturação indicaram uma maior heterogeneidade entre as amostras com valores moderados de Φ_{st} (0,265 e 0,362) para os dois fragmentos utilizados, COI e HVS-I, respectivamente. Todas essas observações de diversidade não foram separadas pelas localidades. Esses dados podem sugerir que dois dos diferentes grupos genéticos descritos para essa espécie estão em simpatria nessas áreas, corroborando com a inferência de que a Bahia é uma região divisória para esse padrão da diferenciação genética. Entretanto, é necessário utilizar outros genes com respostas distintas e uma maior amostragem pelo Estado para que essas observações se confirmem. Dessa forma, políticas de conservação deverão considerar esses diferentes grupos como linhagens evolutivas distintas, resultando em ações de conservação dessas entidades com maior amplitude.

Palavras-chave: Canidae, DNA mitocondrial, estruturação, haplótipos, simpatria.



ABSTRACT

The knowledge of the genetic and ecological characteristics of the species is necessary for understanding the action of evolutionary processes. Species such as the crab-eating-fox (*Cerdocyon thous*) are efficient trophic regulators, and it is important to understand how these processes can affect their viability. The present distribution of the crab-eating fox covers most of the territory of South America, occurring in almost all Brazilian morphoclimatic domains. They are generalist animals with great mobility, both in forest areas and in anthropized environments. Although this adaptive plasticity, this species has been suffering from the fragmentation and destruction of its habitat, resulting in higher mortality due to conflict with farmers, contagion from diseases of domestic animals, hybridization and death by trampling. Phylogeographic studies of the genus indicate the occurrence of a north/south pattern of genetic differentiation defined for the Atlantic Forest biome in the state of Bahia. Thus, this present research it is necessary to evaluate the genetic diversity of these animals in the State of Bahia, because this generated information can validate the phylogeographic information described for this group, in particular, the possible occurrence of these distinct genetic groups in this region. For this, analyzes were performed with fragments of the mitochondrial genes HVS-I and COI for the identification of the species, analyzes of genetic variability and population structure in samples of crab-eating fox collected in two areas. It was observed high values of haplotype ($Hd:0,508$ and $0,983$) and nucleotide diversity ($\pi:0,007$ and $0,039$) in the two genes HVS-I and COI respectively. The network of haplotypes and phylogenetic trees demonstrated that the collected samples are similar to the two phylogenetic groups described for the species. Structural analyzes indicated greater heterogeneity between samples. Structural analyzes indicated greater heterogeneity between samples with moderate values ($0,265$ and $0,326$) in the two fragments, respectively. These data may suggest that two of the different genetic groups described for this species are in sympatry in these areas, corroborating with the inference that the state of Bahia is a dividing region for this pattern of genetic differentiation. However, it is necessary to use other genes with distinct responses and greater sampling by the State for these observations to be confirmed. Thus, conservation politics should consider these different groups as distinct evolutionary strains, resulting in conservation actions of these entities with greater amplitude.

Keywords: Canidae, DNA mitochondrial, structuring, haplotypes, sympatry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Árvore filogenética dos canídeos. Em verde o clado dos canídeos sul Americanos, evidenciando o monofilétismo do grupo. Onde, apenas duas linhagens ancestrais que colonizaram a América do Sul deram origem aos cinco gêneros atuais dos canídeos sul Americanos. Fonte: Lindblad-Toh et al. 2005. ----- 19

Figura 2 Cachorro-do-mato. Imagens do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) capturadas através de armadilhas fotográficas nos municípios de Cravolândia-BA a) e Jequié-BA. b). Fonte: Arquivo pessoal.----- 21

Figura 3 Mapa do estado da Bahia com as áreas amostradas. Os pontos verdes indicam as amostras coletadas na região da Chapada Diamantina (população CD), os pontos em vermelho indicam as amostras coletadas nas áreas próximas a Jequié (população MJ). As linhas em laranja representam as principais rodovias da área amostrada. Os pontos fora das principais rodovias são amostras coletadas em vias secundárias, que não são mostradas devido à escala do mapa. ----- 26

Figura 4 Prováveis rastros de cachorro-do-mato utilizados para determinar as áreas de coleta. a) Amostra de fezes encontrada no município de Cravolândia. b) Pegada de canídeo encontrado na área de coleta, no município de Santa Inês. Fonte: Arquivo pessoal.----- 27

Figura 5 Cachorro-do-mato. a) Animal atropelado na BA-488, no município de Itaberaba em Julho de 2016, a imagem corresponde a amostra 41. b) Cachorro-do-mato atropelado na BA-052, em Morro do Chapéu em Junho de 2016, imagem corresponde a amostra 31. Fonte: Arquivo pessoal. ----- 34

Figura 6 Rede de haplótipos construída com sequências do HVS-I; b) Rede de haplótipos construída com sequências do fragmento do gene Citocromo Oxidase C subunidade I (COI). Os círculos indicam os diferentes haplótipos, sendo o diâmetro de cada círculo proporcional à frequência do haplótipo na amostra; as cores indicam a frequência do haplótipo em cada localidade e as barras indicam o número de mutações entre os haplótipos.----- 39

Figura 7 Análise de estruturação populacional gerado com a probabilidade da formação de grupos biológicos com informações a posteriori. a) Gráfico gerado utilizando um fragmento de 250pb do segmento HVS-I. b) Gráfico gerado a partir da análise do segmento de 580pb do gene COI. As diferentes cores representam os diferentes grupos formados, os números correspondem à identificação das amostras biológicas e as siglas representam as duas populações com base na área de coleta: Microrregião de Jequié (MJ) e Chapada Diamantina (CD). ----- 40

Figura 8 Árvores filogenéticas das amostras de *Cerdocyon thous* construídas através dos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) (topologia mostrada). a) Árvore gerada a partir do segmento do HVS-I e b) Árvore gerada a partir do fragmento do gene COI. Os valores de suporte localizados nos ramos principais correspondem à frequência de *bootstrap*, referente às análises de ML e probabilidade a posteriori para BI, respectivamente. Os asteriscos indicam a ausência do ramo formado para aquela análise. ----- 42



LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Lista das amostras utilizadas nesse estudo, com respectivos pontos de coleta, data e população a qual pertence: MJ – Microrregião de Jequié, CD – Chapada diamantina.-----27

Tabela 2 Sequências referências utilizadas nas análises genéticas obtidas nas plataformas BOLD (COI) e Genbank (HVS-I).-----30

Tabela 3 Estimativas de diversidade genética para cada uma das populações amostradas de acordo com o conjunto de dados utilizado: N – Número de indivíduos, k – Número de haplótipos, Hd – Diversidade haplotípica, π – Diversidade nucleotídica, F_s – Teste de neutralidade de Fu, D – Teste de neutralidade de Tajima..-----36





SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| 1. INTRODUÇÃO | 14 |
| 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 15 |
| 2.1 Fragmentação, perda de habitat e suas consequências | 15 |
| 2.2 Distribuição dos canídeos na América do Sul..... | 17 |
| 2.3 Cachorro-do-mato (<i>Cerdocyon thous</i>) | 20 |
| 2.3 Marcadores mitocondriais e a identificação molecular de espécies | 23 |
| 3. OBJETIVOS | 24 |
| 3.1 Objetivo geral..... | 24 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 24 |
| 4. METODOLOGIA | 25 |
| 4.1 Delineamento amostral..... | 25 |
| 4.1.2 Coleta de amostras biológicas | 26 |
| 4.2 Extração de DNA | 29 |
| 4.3 Amplificação e sequenciamento..... | 29 |
| 4.4 Análises moleculares..... | 30 |
| 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 32 |
| 5.1 Amostras coletadas e identificação molecular | 32 |
| 5.1.1 Amostras de fezes..... | 32 |
| 5.1.2 Amostras de tecido | 33 |
| 5.2 Análises moleculares..... | 34 |
| 5.2.1 Estatística Sumária e Testes de Neutralidade..... | 34 |
| 5.2.2 Análises de Estruturação populacional..... | 37 |
| 6. CONCLUSÕES..... | 46 |
| 7. REFERÊNCIAS | 47 |

1. INTRODUÇÃO

A ocupação e a atividade humana afetam diretamente a sobrevivência de diversas espécies de animais e vegetais em todo o mundo. Como reflexo direto e indireto da fragmentação e da degradação do hábitat, algumas espécies de animais têm se aproximado das áreas de ocupação humana, geralmente em busca de recursos alimentares, gerando conflito com os agricultores e pecuaristas. Além disso, a expansão da malha viária resulta no aumento da mortalidade de inúmeras espécies de vertebrados, resultando na perda de milhões de animais atropelados no Brasil a cada ano.

Dentre as espécies que sofrem os impactos descritos acima, destaca-se o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), espécie de canídeo generalista e oportunista que ocorre em quase todo o território brasileiro. Apesar de apresentar evidente plasticidade adaptativa e não estarem em risco de extinção, esses animais sofrerem com a caça e doenças oriundas de animais domésticos, além de estarem entre os mamíferos mais atropelados no Brasil.

Devido a sua importância ecológica nos mais diversos biomas, se faz necessário obter informações sobre as características genéticas e populacionais de *C. thous*, visando um maior entendimento da história evolutiva, da diversidade genética e da viabilidade das populações existentes nessas áreas de distribuição.

Além disso, estudos filogeográficos dessa espécie indicam que no estado da Bahia há uma zona de contato entre dois grandes grupos genéticos distribuídos no sentido norte/sul do Brasil. Apesar dessa linha divisória sugerida englobar esse estado, poucas informações genéticas foram estimadas para o cachorro-do-mato, sendo importante validar essas inferências na região, além de resultar na identificação desses diferentes animais que podem estar coexistindo nessa região. A importância dessa área e suas barreiras geográficas existentes, que atuam como diferencial na diversidade genética foi relatada na literatura para outros grupos de organismos, sendo considerado um ponto chave na evolução de inúmeras espécies.

Nesse contexto, conhecer a diversidade genética do cachorro-do-mato no território baiano é de grande importância, haja visto que, poucas informações sobre *C. thous* é conhecida nessa região. Diante do cenário apresentado, aonde essa espécie vem sofrendo de diversas formas devido às ações antrópicas, faz-se necessário uma melhor compreensão da história genética das populações de cachorro-do-mato, visando gerar novas informações e contribuir com dados fitogeográficos já descritos na literatura, fornecendo assim um maior entendimento da história evolutiva desse canídeo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Fragmentação, perda de habitat e suas consequências

A história do desmatamento no Brasil se inicia com a chegada dos portugueses no século XVI, se estendendo até os dias atuais. Em pouco mais de 500 anos de exploração, o país hoje apresenta uma pequena fração da cobertura original dos principais domínios morfoclimáticos (Freitas, 2010). A exploração dos recursos naturais tem início com a extração de madeira, principalmente o pau-brasil (*Caesalpinia echinata*), pelos portugueses e, posteriormente, os processos se agravaram em decorrência das demandas dos ciclos econômicos, tais como a produção de cana-de-açúcar, o garimpo, a produção do café e implantação da pecuária extensiva (Fizon et al. 2003).

Outro fator que contribuiu para o agravamento na destruição das florestas, principalmente da Mata Atlântica, foi o aumento populacional. Estima-se que o tamanho populacional era de um milhão de pessoas nos estados da região Sudeste em 1808, subindo para 6,4 milhões em apenas oito anos. Esse crescimento aumentou a taxa de consumo e de ocupação de áreas de matas nativas (Fizon et al. 2003).

Alguns anos mais tarde, os incentivos governamentais para a ocupação de áreas no interior do Brasil, com programas desenvolvidos pelo Instituto Nacional de Colonização e Reforma Agrária – INCRA e pelo Instituto Brasileiro de Desenvolvimento Florestal – IBDF, geraram um novo aumento da degradação ambiental em grande parte do país (Fizon et al. 2003).

A Mata Atlântica, a Caatinga e o Cerrado são os biomas que apresentam os maiores índices de desmatamento no país (Tabarelli et al. 2005; Rocha et al. 2011; Ganem et al. 2013). Assim, esses domínios morfoclimáticos apresentam-se com elevados índices de fragmentação e degradação ambiental e, conseqüente perda de espécies originais em virtude das alterações realizadas pelo homem (Freitas, 2010; Rocha et al. 2011).

Além da degradação ambiental, diversos estudos realizados nesses três domínios morfoclimáticos retratam problemas decorrentes da interação entre o homem e as espécies nativas, tais como a caça furtiva em populações naturais de *Cerdocyon thous* (Lemos et al. 2011), (Beisiegel et al. 2013); *Cebus nigritus* (Araújo et al. 2008); *Lycalopex vetulus* (Garcez, 2015); *Panthera onca* (Conforti et al. 2003) e *Puma concolor* (Mazzoli, 1993), (Palmeira e Barrella, 2007), (Palmeira et al. 2008), (Castilho et al. 2012), ataques por cães domésticos, atropelamentos, envenenamentos e doenças em populações de *Cerdocyon thous* (Lemos et al. 2011), (Beisiegel et al. 2013) e *Lycalopex vetulus* (Garcez, 2015), (Lemos et al. 2013).

Assim, o que antes era um contínuo de mata virgem, posteriormente ao desmatamento se torna diversos fragmentos isolados nos quais, o tamanho do fragmento, a forma, o tipo de matriz circundante, o efeito de borda e a distância entre eles vão influenciar diretamente na persistência e na sobrevivência das espécies daquela área (Cerqueira et al. 2003; Rabello et al. 2010). O processo de degradação ambiental é progressivo mesmo após o desmatamento, já que diversos fatores influenciam na qualidade do ambiente e quando este é reduzido, esses efeitos tendem a se intensificar (Cerqueira et al. 2003; Alves et al. 2012; Ganem et al. 2013). O isolamento entre as populações da área reflete esse processo, onde, quanto maior a distância entre os remanescentes, mais isoladas serão as populações (Cerqueira et al. 2003; Alves et al. 2012).

A permeabilidade de uma espécie está relacionada com sua capacidade de migrar entre os fragmentos através da matriz circundante. A aptidão ao deslocamento varia entre as espécies, onde espécies mais generalistas tendem a ter uma facilidade maior de dispersão na matriz, já espécies mais especializadas tendem a ter uma maior dificuldade de migrar entre os fragmentos. Levando assim a uma menor taxa de migração e conseqüente redução do fluxo gênico entre as populações dos diferentes fragmentos (Kageyama e Gandara, 1998; Cerqueira et al. 2003; Landau, 2003; Tabarelli e Gascon, 2005; Alves et al. 2012).

O crescente avanço das fronteiras agrícolas e da pecuária gera problemas para a conservação e manutenção de diversas espécies, visto que, para o estabelecimento desses sistemas, é necessário desmatar grandes áreas de mata nativa, levando assim a redução da área de mata e conseqüente redução dos recursos para as espécies locais e maior possibilidade de áreas com altos índices de atropelamentos e conflitos (Landau, 2003; Tabarelli et al. 2005; Tabarelli e Gascon, 2005; Rocha et al. 2011).

O desenvolvimento das rodovias pode acarretar em diferentes problemas para a fauna local, gerando diferentes impactos para as espécies, como a alteração da área de vida. Em alguns casos, as estradas funcionam como uma barreira entre regiões, dificultando ou até impedindo o deslocamento de determinadas espécies. Já para outros grupos de animais, os quais conseguem transpor essas barreiras, é observado um elevado índice de atropelamento, impactando inúmeras espécies, variando desde pequenos invertebrados até vertebrados de grande porte (Trombulak e Frissell, 2000; Spellerberg, 1998; Forman et al. 2003; Freitas, 2012).

Os atropelamentos da fauna brasileira aumentam a cada ano. Segundo o Sistema Urubu grupo que reúne e disponibiliza informações sobre atropelamentos na malha viária brasileira, cerca de 475 milhões de animais são atropelados no Brasil a cada ano, com uma média de 15

atropelamentos por segundo. O aumento no número de atropelamentos está associado a inúmeros fatores: (1) como a fragmentação e degradação ambiental, (2) construção de estradas em regiões dentro ou próximas de reservas ambientais, (3) imprudência no trânsito, entre outras.

Os mamíferos de grande e médio porte em especial, tendem a sofrer grande impacto com atropelamentos, uma vez que, segundo Macnab (1963), a taxa de atropelamentos apresenta uma correlação entre tamanho corporal e área de vida das espécies. Sendo assim, os mamíferos de grande e médio porte, que são espécies com grandes áreas de vida com altos índices de deslocamento, são vítimas diárias desse tipo de ação (Almeida, 2007; Freitas, 2012). Segundo o Sistema Urubu, cerca de 45 milhões de mamíferos de médio (40 milhões) e grande (5 milhões) foram atropelados durante o ano de no Brasil.

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), espécie de canídeo que foi identificado em alguns estudos como a espécie de mamífero mais atropelada (Prada, 2004; Bueno et al. 2009; Souza e Miranda, 2010; Junior et al. 2011; Praxedes et al. 2011), esses animais utilizam as estradas como rotas de locomoção para acessar diferentes fragmentos em busca de novos territórios de caça, fuga de queimadas e para a obtenção de parceiros (Souza e Miranda, 2010; Junior et al. 2011; Praxedes et al. 2011).

Além das consequências citadas acima, as modificações no ambiente natural têm levado a alterações na área de ocorrência de diversas espécies, retraindo ou aumentando a distribuição de suas áreas de vida (Cerqueira et al. 2003; Landau, 2003). A destruição de barreiras naturais tem promovido o contato entre espécies mais relacionadas, gerando assim, casos de hibridação (Garcez, 2015), fato que pode levar a redução do potencial adaptativo das mesmas.

2.2 Distribuição dos canídeos na América do Sul

O habito cursorial e generalista da maioria das espécies dos canídeos pode explicar sua ampla distribuição, descrita para quase todos os continentes, exceto para a Antártica, Nova Guiné, Borneu, Filipinas, Ilhas do Caribe, Madagascar e Taiwan. Populações de cães selvagens foram descritas no continente Australiano e na Nova Zelândia, contudo essa ocorrência é resultado da introdução de cães domésticos (Sillero-Zubiri et al. 2004; Tchaicka, 2006).

As trinta e quatro espécies pertencentes à família Canidae estão distribuídas em 16 gêneros estreitamente relacionados, com início de diversificação datada há aproximadamente

10 milhões de anos (Lindblad-Toh et al. 2005). Em decorrência da recente história evolutiva dos canídeos, sua filogenia apresentava-se mal resolvida até pouco tempo, devido à baixa diferenciação genética dentro do táxon (Lindblad-Toh et al. 2005; Tchaicka, 2006; Favarini, 2011; Garcez, 2015).

O registro fóssil encontrado no sudoeste do Texas, datado do final do Eoceno (40 mya), indica o registro do primeiro canídeo verdadeiro, o *Prehesperocyon* (Silva, 2011). A partir do seu surgimento na América do Norte, os canídeos colonizaram a América do Sul através do Istmo do Panamá no final do Plioceno e início do Pleistoceno, ao longo dos eventos migratórios (Berta, 1987; Rocha, 2006; Tchaicka, 2006; Silva, 2011; Garcez, 2015).

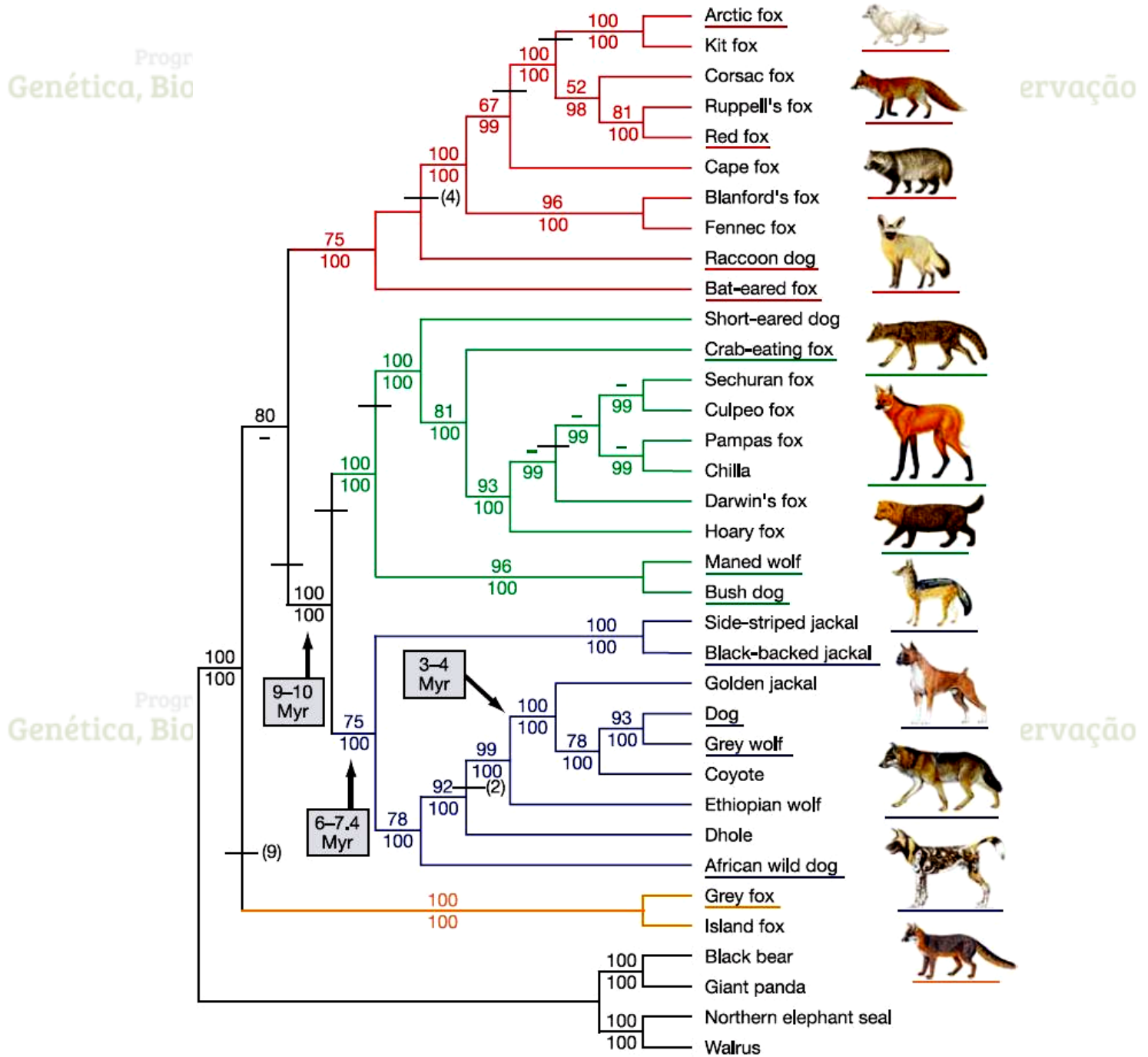
O grande intercâmbio americano que ocorreu a aproximadamente três milhões de anos, com a formação do Istmo do Panamá possibilitou a migração de diversas espécies de animais entre as Américas. Esse evento provavelmente foi influenciado por mudanças climáticas, onde a queda de temperatura no final do Eoceno e início do Oligoceno gerou uma mudança progressiva no clima, que levou a modificação nas características ambientais em todo continente americano, transformando matas úmidas em áreas com savana. Sendo esse um dos possíveis fatores que possibilitou a diversificação dos canídeos, além de seu hábito generalista (Berta, 1987; Wang e Tedford, 2008; Silva, 2011).

Possivelmente o canídeo ancestral que originou as atuais espécies dos canídeos sul americano, também migrou nesse período. Havendo uma diversificação na América do Norte ou Central, onde apenas duas linhagens ancestrais deram origem a todos os gêneros atuais (Wang e Tedford, 2008; Prevosti et al. 2010; Ramirez e Prevosti, 2014; Garcez, 2015).

As duas linhagens ancestrais (Figura 1) que colonizaram a América do Sul deram origem aos cinco gêneros atuais. A primeira linhagem originou os gêneros *Atelocynus*, *Cerdocyon* e *Lycalopex* e a segunda linhagem aos gêneros *Chrysocyon* e *Speothos* (Prevosti et al. 2010; Silva, 2011). Dessa forma, são descritos para a América do Sul um total de 10 espécies de canídeos, formando um grupo monofilético no qual o lobo guará (*Chrysocyon brachiurus*) e o cachorro-do-mato-vinagre (*Speothos venaticus*) são considerados os grupos mais basais (Lindblad-Toh et al. 2005; Tchaicka, 2006; Wang e Tedford, 2008; Prevosti et al. 2010; Favarini, 2011; Garcez, 2015).

O grupo das raposas sul Americanas (Figura 1), composta pelas espécies do gênero *Lycalopex*, formam o clado mais derivado dentre os canídeos da América do Sul. Esse grupo sofreu uma rápida diversificação, concomitantemente a uma elevada taxa de radiação adaptativa que culminou no desenvolvimento de seis espécies de raposas distintas (*Lycalopex gymnocercus*, *L. vetulus*, *L. griseus*, *L. sechurae*, *L. fulvipes* e *L. culpaeus*), as quais ocupam

diversos ambientes que variam de áreas desérticas a regiões de matas úmidas (Lindblad-Toh et al. 2005; Tchaicka, 2006; Favarini, 2011; Garcez, 2015).



Equação 1 Árvore filogenética dos canídeos. Em verde o clado dos canídeos sul Americanos, evidenciando o monofilétismo do grupo. Onde, apenas duas linhagens ancestrais que colonizaram a America do Sul deram origem aos cinco gêneros atuais dos canídeos sul Americanos. Fonte: Lindblad-Toh et al. 2005.

Para o Brasil são descritos a ocorrência de cinco gêneros de canídeos, constituídos de seis espécies distribuídas ao longo de todo território nacional e ocupando os mais diversos biomas. Apenas duas espécies do gênero *Lycalopex* possuem ocorrência descrita para o

Brasil, onde *L. gymnocercus* ocorre na região mais ao sul do país e países vizinhos como Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina, ocorrendo principalmente em áreas com vegetação aberta. Já *L. vetulus* possui ocorrência descrita apenas para o território brasileiro e sua distribuição está estritamente relacionada com o bioma Cerrado (Tchaicka, 2006; Favarini, 2011; Lemos et al. 2013; Queirolo et al. 2013; Garcez, 2015).

Além das duas espécies do gênero *Lycalopex*, ocorrem no Brasil quatro espécies de diferentes gêneros, *Atelocynus microtis* com distribuição restrita às regiões Amazônicas do Brasil, Colômbia e Bolívia; *Speothos venaticus* que possui ocorrência confirmada em quase todo território brasileiro e em partes da Colômbia, Venezuela, Peru, Bolívia, Costa Rica, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e Panamá; *Chrysocyon brachyurus* ocorre em quase toda região Centro Oeste e Sudeste do Brasil e em partes da Bolívia, Paraguai e Argentina, essa espécie habita principalmente áreas com vegetação aberta, tais como Cerrado, Chacos e Pampas (Rodden et al. 2004; Sillero-Zubiri et al. 2004; Tchaicka, 2006; Favarini, 2011; Queirolo et al. 2013; Garcez, 2015).

Cerdocyon thous é a espécie de canídeo com maior área de distribuição no Brasil, sua ocorrência é descrita para quase todos os biomas, habitando desde áreas com vegetação aberta até regiões de mata (Sillero-Zubiri et al. 2004; Tchaicka, 2006; Favarini, 2011). Das seis espécies com ocorrência descrita para o território brasileiro, apenas as espécies *Speothos venaticus* e *Lycalopex gymnocercus* não possuem dados na literatura que indiquem sua ocorrência no estado da Bahia.

2.3 Cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*)

O cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous* Linnaeus, 1766) (Figura 2) é um canídeo que pertence à ordem Carnívora, família Canidae, subfamília Canoidea e a única espécie atual do gênero *Cerdocyon* (Berta, 1987). Por sua ampla distribuição ao longo do continente sul americano, *C. thous* recebe diversas denominações populares tais como, lobinho, raposa, graxaim do mato, zorro, zorro de patas negras, zorro cangrejero e perro de monte (Berta, 1987; Courtenay e Maffei, 2004).

a

b



Figura 2 Cachorro-do-mato. Imagens do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) capturadas através de armadilhas fotográficas nos municípios de Cravolândia-BA **a)** e Jequié-BA. **b)** Fonte: Arquivo pessoal.

C. thous é caracterizado por apresentar porte médio (80 – 120 cm), variando entre cinco e sete quilos. Sua coloração varia ao longo de toda distribuição, desde o cinza escuro com preto na região da Venezuela, até o vermelho amarronzado na região nordeste do Brasil. Apresentam uma linha escura que inicia na parte superior da cabeça (relativamente curta e estreita), estendendo-se até a extremidade distal da cauda, sendo essa espessa e variando entre 220 a 410 mm. Assim como a cauda, a extremidade das patas são mais escuras que o corpo (Berta, 1982; Courtenay e Maffei, 2004).

A distribuição geográfica do cachorro-do-mato abrange quase todo o continente sul americano. Com ocorrência confirmada no Brasil, Venezuela, Uruguai, Bolívia, Paraguai, Argentina, região leste dos Andes e alguns registros no Suriname e na Guiana (Courtenay e Maffei, 2004). A ocorrência dessa espécie foi descrita recentemente na província de Darién, no Panamá (Tejera et al. 1999).

No Brasil, a distribuição atual do cachorro-do-mato abrange quase todos os domínios morfoclimáticos (Langguth, 1975; Berta, 1987; Courtenay e Maffei, 2004). Em 2008 foi descrita sua ocorrência em áreas de várzeas na região amazônica, provavelmente em decorrência do aumento das áreas desmatadas (CENAP, 2008; 2009), sendo um indício de expansão territorial da espécie (Beisiegel et al. 2013), como consequência das ações antrópicas.

A plasticidade adaptativa de *C. thous* pode ser explicada principalmente por se tratar de uma espécie com hábitos generalistas. A utilização do espaço varia de região para região, sendo preferencialmente encontrados em áreas com vegetação aberta, tais como no Cerrado, Caatinga e áreas de borda que apresenta uma vegetação mais espaça. Também são encontrados em áreas de floresta ombrófilas, decíduas e semidecíduas, florestas de altitude

(até 3.000 m), matas de galeria, mangues, restingas e áreas com diferentes níveis de interferência humana (Courtenay e Maffei, 2004; Gatti et al. 2006).

Essa variação de ocorrência em áreas de vegetação mais densa é característico em regiões que há sobreposição de habitats com outros canídeos, tal como ocorre no sul do país com o graxaim do campo (*Lycalopex gymnocercus*), sendo esse encontrado nas áreas de vegetação aberta (Vieira e Port, 2007; Di Bitetti et al. 2009).

O cachorro-do-mato é uma espécie onívora e oportunista, com hábito de forrageio noturno a crepuscular. Em sua dieta são encontrados pequenos mamíferos, crustáceos, restos de animais mortos, anfíbios, ovos, répteis, aves, bem como diversos tipos de insetos. Esses animais também se alimentam de frutos, tais como abacaxi e pimentão, sendo um importante dispersor de sementes (Cazetta e Galetti, 2009). A variação alimentar é sazonal e está diretamente relacionada com a disponibilidade de alimentos da área (Beisiegel, 1999; Juarez e Marinho Filho, 2002; Courtenay e Maffei 2004; Cazetta e Galetti, 2009).

São classificados como animais solitários na maior parte da vida, porém em alguns estudos relatam a formação de pequenos grupos familiares, como animais monogâmicos que vivem em pequenos grupos familiares que variam entre um a cinco indivíduos (Langguth, 1975; Berta, 1982; Courtenay e Maffei 2004). Após a formação do casal, os mesmos passam a ocupar territórios adjacentes, com sobreposição de área. Contudo, não há registros na literatura de ação de forrageio em cooperação entre o casal (Berta, 1982; Macdonald e Courtenay, 1996; Courtenay e Maffei 2004).

O período reprodutivo ocorre geralmente uma ou duas vezes por ano. O tempo de gestação é estimado em 56 dias, com nascimento (três a seis filhotes) ocorrendo geralmente entre Setembro e Outubro para a população da Ilha de Marajó (Macdonald e Courtenay, 1996) e entre Janeiro e Fevereiro para animais em cativeiros (Brady, 1978). O período de lactação é realizado por aproximadamente 90 dias e o cuidado parental é realizado pelo casal e dura em torno de nove meses, tempo necessário para atingir a maturidade sexual (Brady, 1978). Os juvenis tendem a dispersar entre 18 e 24 meses após o nascimento, estabelecendo territórios adjacentes aos dos progenitores (Macdonald e Courtenay, 1996).

Dados da literatura indicam a existência de cinco subespécies de *C. thous* ao longo do continente sul americano: *C. thous thous* (região sudeste da Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e região norte do Brasil); *C. thous azarae* (região nordeste e central do Brasil); *C. thous entrierianus* (região sudeste e sul do Brasil, Bolívia, Paraguai, Uruguai e Argentina); *C. thous aquilus* (norte da Venezuela e Colômbia) e *C. thous germanus* (Colômbia) (Berta, 1982).

Segundo informações da IUCN (*The International Union for Conservation of Nature*, 2015) o cachorro-do-mato apresenta o *status* de conservação de “menos preocupante”. Apesar disso, essa espécie sofre com ações diretas e indiretas da fragmentação do hábitat, como caça furtiva; ataques por cães domésticos; transmissão de patógenos em detrimento da proximidade com animais domésticos, além de mortes decorrentes de atropelamentos (Becker e Dalponte, 1999; Courtenay e Maffei 2004).

Segundo o Sistema Urubu, é a segunda espécie de mamífero com maior índice de atropelamentos registrados por ano (1000 animais), ficando atrás apenas da capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*), com 1235 registros. Esses valores são subestimados, visto que apenas os animais atropelados que forem informados ao sistema são computados. Apesar de o sistema ter um viés de registro para animais de médio e grande porte, o número de registro de atropelamento é alarmante.

Apesar de ser uma espécie de grande distribuição, poucas informações a respeito de sua história e composição genética, bem como informações ecológicas e evolutivas estão disponíveis. Essas informações são importantes, visto que podem auxiliar no entendimento da história evolutiva da espécie, além de gerar dados para o desenvolvimento de programas de conservação.

2.3 Marcadores mitocondriais e a identificação molecular de espécies

Genes mitocondriais e nucleares apresentam distintas características em relação a taxas de evolução, padrões de herança e valores de recombinação, podendo ser utilizados em diversos estudos.

A identificação molecular de espécies auxilia na diminuição de incertezas taxonômicas, podendo ser utilizada em conjunto com diversas áreas do conhecimento. Essas informações permitem a inferência de relações filogenéticas que visam compreender a história evolutiva dos organismos, sendo metodologias utilizadas em diversos estudos genéticos e ecológicos (Cristescu e Hebert, 2002; Bucklin et al. 2007; Wang et al. 2008; Figueiró, 2010).

A identificação molecular pode ser vantajosa sobre outras técnicas de identificação justificado pela utilização de pequena quantidade de material biológico (Dayrat, 2005; Pires e Marinoni, 2010) bem como pela possibilidade de identificar espécimes com alto grau de deterioração corporal, onde características fundamentais para a identificação morfológica podem estar inviáveis. Essa metodologia pode ser utilizada em estudos de dieta, ocorrência de

hibridação e de identificação de animais domésticos predados (Figueiró, 2010; Bhattarai e Fischer, 2014; Garcez, 2015).

Nesses estudos, diferentes genes podem ser utilizados. Determinadas regiões específicas do DNA possuem uma maior eficiência como marcadores moleculares, visto que, sua eficácia está relacionada às alterações que o DNA sofre ao longo do tempo, e assim, a identificação é realizada com base nas diferenças genéticas acumuladas ao longo dos anos entre as espécies (Snustad e Simmons, 2008; Pierce, 2011).

Várias regiões do DNA mitocondrial como o Citocromo b (Cytb), o Fragmento Hipervariável I (HVS-I) e o Citocromo Oxidase C subunidade I (COI), podem ser utilizadas na identificação de diversas espécies. Esses genes apresentam ausência ou baixas taxas de recombinação quando comparado com genes nucleares, bem como apresentam conteúdo gênico conservado, contudo quando comparado com os genes nucleares eles apresentam uma elevada taxa de mutação (Moritz et al., 1987).

Inúmeros estudos de diversidade genética, filogenia e filogeografia utilizaram as informações de diferentes genes (mitocondriais e nucleares) em variados tipos de amostras biológicas (Vilà et al. 1999; Lefébure et al. 2006; Tchaicka et al. 2007; Bucklin et al. 2007; Favarini, 2011). Essa plasticidade amostral potencializa estudos na área de genética da conservação de grandes mamíferos, visto as características ecológicas e comportamentais desses grupos, as quais dificultam trabalhos com captura direta de espécimes.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Esse trabalho tem como objetivo realizar identificação molecular de animais atropelados e analisar a diversidade genética populacional do cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*) por meio de genes mitocondriais em diferentes regiões do estado da Bahia.

3.2 Objetivos específicos

- 1- Realizar a identificação molecular do cachorro-do-mato;
- 2- Obter informações genéticas dos espécimes em diferentes regiões do estado da Bahia;
- 3- Identificar em quais dos padrões filogeográficos às amostras investigadas se aderem;

- 4- Avaliar se pode ser identificadas regiões com sobreposição desses diferentes grupos genéticos.

4. METODOLOGIA

4.1 Delineamento amostral

O Estado da Bahia está localizado entre os paralelos de 8° 32' S e 18° 21' S e os meridianos de 37° 20' O e 46° 37' O, possui uma área total de 564,7 mil km² e está subdividida em dez mesorregiões que abrigam um total de 417 municípios (IBGE, 2015).

As características climáticas descritas para o estado são caracterizadas como edafoclimáticas, onde é observada uma variação entre clima úmido e árido, com a presença de três domínios morfoclimáticos (matas úmidas, caatinga e cerrado), onde 67,4% das localidades apresentam excessos térmicos, baixos valores de umidade relativa do ar e baixa quantidade de água no solo (Menezes et al. 2009; Pais et al. 2012).

O estudo foi conduzido ao longo de duas regiões no estado da Bahia. As amostras coletadas ao longo das microrregiões de Irecê, Itaberaba e Seabra foram denominadas como população da Chapada Diamantina (CD), devido a proximidade ao parque Chapada Diamantina (Figura 3), (Tabela 1). A região da Chapada Diamantina apresenta uma variedade de formações, sendo caracterizada como um mosaico quanto a sua vegetação. O Complexo da Chapada Diamantina inclui formações xerofíticas encontradas geralmente entre 500m e 900m de altitude, essas formações são típicas do bioma Caatinga; áreas de formações de campos rupestres também podem ser observadas, bem como podem ser encontradas formações campestres de solos rasos ou solos profundos, nessas áreas é possível observar formações florestais, bem como áreas com ausência de árvores e com uma elevada cobertura de gramíneas, que pode ser associadas ao bioma Cerrado; é também possível observar áreas com vegetação que apresentam características decíduais, semidecíduais ou mesmo perenifoliadas, associadas ao bioma Mata Atlântica (MMA, 2007).

As amostras coletadas nas microrregiões de Vitória da Conquista e Jequié, foram alocadas na população Região de Jequié (RJ) (Figura 3), (Tabela 1). Essa região apresenta clima tropical semi-árido e a vegetação é de transição entre Caatinga e Mata Atlântica. São encontradas também nessa região as florestas de altitudes ou matas de Cipó que estão localizadas entre os dois principais biomas que ocorrem na área (Nascimento 2005; ICMBio, 2017).

A altitude das áreas variou de 935m (Morro do Chapéu, na Chapada Diamantina) a 238m (Jequié, Bahia).

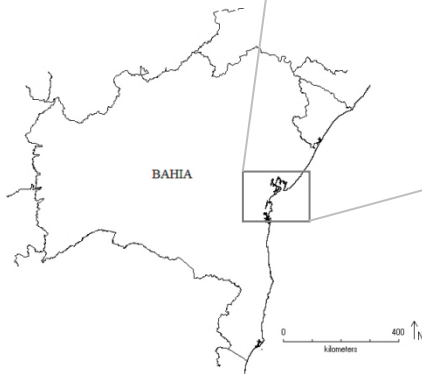
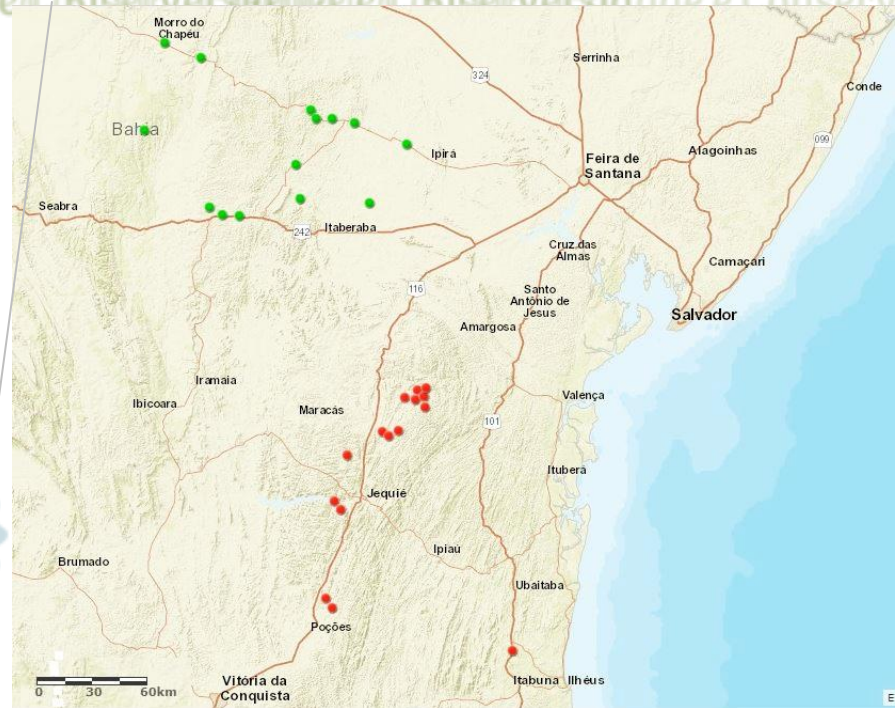


Figura 3 Mapa do estado da Bahia gerado no programa DivaGis, com as áreas amostradas. Os pontos verdes indicam as amostras coletadas na região da Chapada Diamantina (população CD), os pontos em vermelho indicam as amostras coletadas nas áreas próximas a Jequié (população MJ). As linhas em laranja representam as principais rodovias da área amostrada. Os pontos fora das principais rodovias são amostras coletadas em vias secundárias, que não são mostradas devido à escala do mapa.

4.1.2 Coleta de amostras biológicas

As amostras de fezes foram coletadas no período entre junho de 2015 a agosto de 2016. As coletas foram realizadas mensalmente por busca ativa, prioritariamente durante o período

da manhã, visto que nesse horário há uma maior probabilidade de encontrar amostras de fezes frescas. Para definir pontos de maior sucesso de coleta dessas amostras, foram localizados pegadas e outros rastros no solo (Figura 4), restos alimentares utilizados na dieta do cachorro-do-mato, assim como registros fotográficos obtidos através de armadilhas fotográficas em pontos de locomoção dessa espécie (Figura 2).

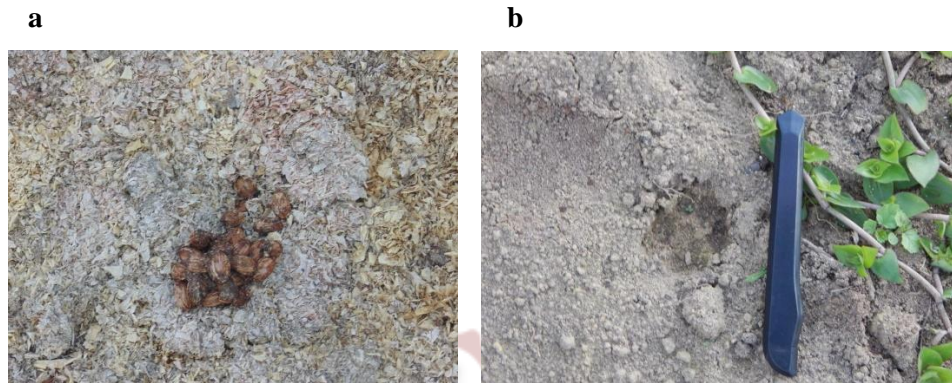


Figura 4 Prováveis rastros de cachorro-do-mato utilizados para determinar as áreas de coleta. a) Amostra de fezes encontrada no município de Cravolândia. b) Pegada de canídeo encontrado na área de coleta, no município de Santa Inês. Fonte: Arquivo pessoal.

As amostras de fezes foram armazenadas em tubos de polipropileno com álcool 99,5% para posterior processamento. O material coletado foi etiquetado com a referência geográfica da área amostrada e a data de coleta, sendo encaminhado para o laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié. O material foi armazenado a -20°C até o momento da extração de DNA.

As amostras de tecido foram coletadas entre junho de 2014 a julho de 2016 a partir de animais atropelados em rodovias (Tabela 1) sendo o local e data de obtenção das amostras registradas.

Tabela 1 Lista das amostras utilizadas no presente estudo.

| Locais | Origem geográfica | Coordenada geográfica (lat/log) | Rodovia | Número da amostra | Tipo de amostra | Data de Coleta |
|-----------------------|-------------------|---------------------------------|---------|-------------------|-----------------|----------------|
| Região de Jequié (MJ) | Cravolândia | -13,3566/-39,8300 | BA-120 | RJCRCT07 | Tecido | 06.2014 |
| | | -13,3566/-39,8300 | BA-120 | RJCRCT08 | Tecido | 06.2014 |
| | | -13,3573/-39,8805 | BA-120 | RJCRCT24 | Tecido | 03.2016 |
| | | -13,3513/-39,8145 | Imbé | RJCRCT90 | Fecal | 06.2015 |
| | | -13,3513/-39,8145 | Imbé | RJCRCT204 | Fecal | 03.2016 |

| | | | | | | |
|--------------------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-----------|--------|---------|
| | | -14,4070/-40,2567 | BA-030 | RJBNCT11 | Tecido | 08.2014 |
| | Boa nova | -14,3694/-40,2894 | BA-030 | RJBNCT15 | Tecido | 11.2014 |
| | | -13,5202/-39,9927 | BA-420 | RJJGCT19 | Tecido | 08.2015 |
| | Jaguaquara | -13,4272/-39,9230 | BA-420 | RJJGCT23 | Tecido | 03.2016 |
| | | -13,5202/-39,9927 | BA-420 | RJJGCT02 | Tecido | 06.2014 |
| | Santa Inês | -13,3133/-39,8174 | BA-120 | RJSICT25 | Tecido | 02.2016 |
| | Lafaiete Coutinho | -13,6494/-40,1700 | BA-555 | RJLCCT37 | Tecido | 05.2016 |
| | Uruçuca | -14,6111/-39,3305 | BR-101 | RJUCCT39 | Tecido | 07.2016 |
| | | -13,8826/-40,2300 | Barragem da pedra | RJJQCT188 | Fecal | 04.2016 |
| | Jequié | -13,8766/-40,2458 | Barragem da pedra | RJJQCT199 | Fecal | 04.2016 |
| | | -12,4017/-40,8882 | BA-407 | CDLJCT26 | Tecido | 06.2016 |
| | Lajedinho | -12,4455/-40,7273 | BR-242 | CDLJCT27 | Tecido | 06.2016 |
| | | -12,4393/-40,8152 | BR-242 | CDLJCT28 | Tecido | 06.2016 |
| | Mundo Novo | -11,9187/-40,3658 | BA-052 | CDMNCT30 | Tecido | 06.2016 |
| | | -11,9393/-40,3556 | BA-052 | CDMNCT44 | Tecido | 07.2016 |
| | Morro do Chapéu | -11,6485/-40,9204 | BA-052 | CDMCCT31 | Tecido | 06.2016 |
| | | -11,5758/-41,1134 | BA-052 | CDMCCT35 | Tecido | 06.2016 |
| Chapada Diamantina (CD) | Baixa Grande | -11,9593/-40,2523 | BA-052 | CDBGCT32 | Tecido | 06.2016 |
| | | -11,9771/-40,1420 | BA-052 | CDBGCT43 | Tecido | 07.2016 |
| | Macajuba | -12,1812/-40,4373 | BA-407 | CDMJCT33 | Tecido | 06.2016 |
| | Ruy Barbosa | -12,3648/-40,4104 | BA-046 | CDRBCT34 | Tecido | 06.2016 |
| | Itaberaba | -12,3846/-40,0640 | BA-488 | CDITCT41 | Tecido | 07.2016 |
| | Ipirá | -12,1278/-39,8814 | BA-052 | CDIPCT42 | Tecido | 07.2016 |
| | Bonito | -12,0028/-41,2232 | BA-426 | CDBTCT48 | Tecido | 07.2016 |

Para a obtenção das amostras de tecido, foi realizada uma busca nas rodovias (Tabela 1) próximas a região de Jequié e a Chapada Diamantina, visto os inúmeros relatos na frequência de ocorrência de atropelamentos desses animais nas rodovias e estradas dessas regiões. As buscas foram realizadas nos períodos entre junho e julho de 2016, percorrendo aproximadamente 2.500 Km entre diversas rodovias (Figura 3). Após o avistamento da carcaça de algum animal atropelado, o tecido (menos deteriorado) foi coletado em tubos esterilizados, preenchidos com etanol a 99,5% e etiquetadas com as coordenadas georeferenciadas do ponto de coleta (Tabela 1). As amostras foram encaminhadas ao laboratório de Genética Molecular da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, *campus* de Jequié, onde foram armazenados em freezers a - 22^o C, até o momento da extração de DNA.

4.2 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras fecais foram realizadas utilizando o *kit QIAamp DNA stool kit* (Qiagen™), de acordo com as normas do fabricante.

Para as amostras de tecido a extração de DNA foi realizada utilizando o kit de extração “Wizard® *Genomic DNA Purification Kit*” (Promega™), segundo as normas do fabricante. A quantidade e a integridade do DNA extraído foram verificadas por eletroforese horizontal em gel de agarose 0,8 % corado com Gelred (Invitrogen™).

4.3 Amplificação e sequenciamento

Foram amplificadas duas regiões do DNA mitocondrial (mtDNA) para as análises moleculares: um fragmento de 658 pares de base do gene Citocromo Oxidase c subunidade I (COI), utilizando os *primers* HCO2198 (5'-TAA ACT TCA GGG TGA CCA AAA AAT CA - 3') e LCO1490 (5'- GGT CAA CAA ATC ATA AAG ATA TTG G - 3'), descrito por Folmer et al. (1994) e um fragmento de 274 pb da região controle do DNA mitocondrial, contendo o segmento hipervariável I (HVS-I), utilizando os iniciadores MTL PRO2 (5'-CACTATCAGCACCCAAAGCTG-3') e H16498 (5'-CCTGAAGTAGGAACCAGATG-3') descrito por Ward et al. (1991).

Todas as reações de PCR foram realizadas num volume final de 20 µL, contendo 1U de *Taq Platinum* (Invitrogen), tampão 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl), 10µM de cada iniciador, 1,25µM de dNTP e 1,5µM de MgCl₂. As condições de amplificação do fragmento do COI foram: 94° C por 5 minutos, seguido por 35 ciclos (94° C por 1 minuto, 48° C por 1,15 segundos e 72° C por 1 minuto), seguido por 72° C por 10 minutos. Para o fragmento HVS-I as condições de amplificação foram: Dez ciclos iniciais, com 94° C por 45 segundos, (60°-51° - *touchdown*) por 45 segundos e 72°C por 90 segundos, seguido de 30 ciclos com 94° C por 45 segundos, 50° C por 90 segundos e 72° C por 90 segundos. Os amplificadores foram verificados por eletroforese em gel de agarose 0,8 % corado com Gelred (Invitrogen™).

A reação de purificação dos fragmentos amplificados foi realizada segundo o método de precipitação com polietilenoglicol (PEG 20%) proposto por Lis (1980). As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando o kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing*

(Applied Biosystems, USA). Os produtos amplificados foram enviados para sequenciamento na Fundação Osvaldo Cruz, (Salvador, Bahia).

As sequências foram editadas manualmente utilizando o programa *Bioedit Sequence Alignment Editor* versão 7.1.9 (Hall, 1999). Para confirmar o fragmento amplificado e para a identificação molecular da espécie das amostras utilizadas, os fragmentos foram comparados com sequências referências depositadas no NCBI (*National Center for Biotechnology Information*), através da ferramenta BLAST (*Basic Alignment Search Tool*).

4.4 Análises moleculares

Para realizar as análises comparativas e alinhamentos foram utilizadas sequências de *C. thous* disponíveis no NCBI (HVS-I) e na base de dados do BOLD (COI). Essas informações podem ser visualizadas na Tabela 2.

Tabela 2 Sequências referências utilizadas nas análises genéticas obtidas nas plataformas BOLD (COI) e Genbank (HVS-I).

| Gene | Espécie | Número de acesso | Origem geográfica |
|------------------------------|--------------------------|------------------------|-----------------------------|
| COI | <i>Cerdocyon thous</i> | ABSA003 | Venezuela (Cerro Carbatana) |
| | | CAR124 | Goiás (GO) |
| | | CAR125 | Rio Grande do Sul (RS) |
| | | CAR126 | Paraná (PR) |
| | | CAR127 | Mato Grosso do Sul (MS) |
| | | CAR128 | Pernambuco (PE) |
| | | CAR129 | Ceará (CE) |
| | | CAR130 | Maranhão (MA) |
| | | CAR131 | Maranhão (MA) |
| | <i>Lycalopex vetulus</i> | CAR141 | Distrito Federal () |
| | | CAR142 | Minas Gerais (MG) |
| | | CAR143 | Minas Gerais (MG) |
| | | CAR133 | Rio grande do Sul (RS) |
| <i>Lycalopes gymnocercus</i> | CAR136 | Rio grande do Sul (RS) | |
| | CAR138 | Rio grande do Sul (RS) | |
| | HVS-I | <i>Cerdocyon thous</i> | EF107014 (bCth187) |
| EF107015 (bCth309) | | | Paraíba (PB) |
| EF107017 (bCth194) | | | Ceará (CE) |
| EF107028 (bCth197) | | | Ceará (CE) |
| EF107001.1 (bCth226) | | | Maranhão (MA) |
| EF107003 (bCth227) | | | Maranhão (MA) |
| EF107016 (bCth118) | Rio Grande do Sul (RS) | | |

| | | |
|------------------------------|--------------------|-------------------------|
| | EF107023 (bCth05) | Goiás (GO) |
| | EF107008 (bCth305) | São Paulo (SP) |
| | EF107027 (bCth206) | Goiás (GO) |
| | EF107021 (bCth50) | Mato Grosso (MT) |
| | EF107031 (bCth174) | Mato Grosso do Sul (MS) |
| | EF107005 (bCth200) | Minas Gerais (MG) |
| | EF107022 (bCth205) | Goiás (GO) |
| | EF107007 (bCth49) | Mato Grosso (MT) |
| <i>Lycalopex vetulus</i> | EF107032 | Pernambuco (PE) |
| | EF107033 | Pernambuco (PE) |
| | EF107035 | Pernambuco (PE) |
| <i>Lycalopex gymnocercus</i> | EF107034 | Pernambuco (PE) |
| | EF107036 | Pernambuco (PE) |
| | EF107037 | Pernambuco (PE) |

Para o alinhamento final das sequências foi utilizado a ferramenta *Clustal W* Multiple Alignment (Thompson et al. 1994) do programa BioEdit 7.12.6 (Hall, 1999). O programa *DNA Sequence Polymorphism* 5.10 (Rozas et al. 2003) foi utilizado para realizar os cálculos da estatística sumária (diversidade haplotípica – Hd e diversidade nucleotídica – π) e os testes de neutralidade D de Tajima (Tajima, 1989) e Fs de Fu (Fu, 1997).

Para investigar uma possível estruturação genética entre os indivíduos, foi utilizado o programa Arlequin 3.1 (Excoffier et al. 2005) para calcular o Φ_{st} par-a-par. Essa medida é semelhante ao Fst. Contudo a análise de Φ_{st} se adéqua de forma mais sensível a conjuntos de dados em que os tamanhos populacionais são muito diferentes (Weir e Cockerham, 1984), e por esse motivo utilizado para essas análises.

Para verificar as frequências e as relações filogenéticas entre os haplótipos mitocondriais, foi construído uma rede de haplótipos com base nos vetores gráficos que visam conectá-los através das semelhanças, utilizando o parâmetro *Median Joining Network* (Bandelt et al. 1999) a partir do cálculo dos vetores medianos, implementado no programa PopArt (*Population Analysis with Reticulate Trees*).

Para verificar uma possível estruturação genética, foi utilizado o programa BAPS 5.3 (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) (Corander et al. 2003), que utiliza um algoritmo bayesiano com dados estimados a *posteriori* para calcular a probabilidade de formação de grupos biológicos, visando estimar a distribuição das frequências alélicas para toda a população.

As relações filogenéticas entre as sequências foram estimadas através dos algoritmos de máxima verossimilhança (*maximum likelihood* - ML) e inferência Bayesiana (*Bayesian Inference* – BI). A análise de ML foi realizada na plataforma *CIPRES Science Gateway* (Miller et al. 2010), utilizando o parâmetro *RaxML-HPC BlackBox*. Os valores de suporte dos ramos da topologia resultante foram estimados pelo teste da frequência de *bootstrap* após a geração de 1.000 réplicas.

As análises filogenéticas baseadas em BI foram conduzidas por meio da obtenção da distribuição posterior, via algoritmo Markov chain Monte Carlo (MCMC), através da plataforma *CIPRES Science Gateway* (Miller et al. 2010), através do parâmetro *MrBayes on XSEDE*, no qual foram realizadas duas corridas simultaneamente com duas cadeias cada, onde 25% das amostras iniciais foram excluídas (*burn-in*) gerando um total de 14.852 árvores. Os modelos evolutivos TPM2uf +I e TPM1uf+G foram estimados por meio do programa *jModelTest 3.7* (Posada, 2008), de acordo com critério de Akaike (AIC) (Akaike, 1973) para os dois fragmentos do DNA mitocondrial utilizados (COI e HVS-I), respectivamente.

O suporte estatístico dos clados foi inferido através do cálculo da sua probabilidade a *posteriori* após convergência. As árvores geradas com os métodos empregados foram visualizadas e editadas no programa *Figtree*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Amostras coletadas e identificação molecular

5.1.1 Amostras de fezes

Foram coletadas 93 amostras de fezes nas áreas de estudo, com diferentes graus de degradação. Desse total, foi possível extrair o DNA de 32 amostras (34,40%). Contudo, foi possível amplificar e gerar sequências de boa qualidade para serem analisadas (após a verificação manual dos resultados gerados) em apenas nove amostras utilizando o fragmento COI. Dessas, apenas quatro amostras foram identificadas como *C. thous*, sendo as mesmas utilizadas nas demais análises realizadas. As outras amostras foram identificadas como *Dermestes maculatus* (coleóptero), *Equus caballus* (cavalo), *Felis catus* (gato doméstico) e duas amostras foram identificadas como *Cryptococcus neoformans* (levedura).

As dificuldades na obtenção de DNA viável de amostras fecais são decorrentes de diversos fatores, como o método de preservação das amostras, o tempo de exposição aos fatores bióticos e abióticos, quantidade de inibidores, além do tamanho dos fragmentos a

serem amplificados (Taberlet et al. 1999; Kalinowski et al. 2006; Miotto et al. 2007). Essas são algumas das razões observadas que podem refletir na baixa taxa de sucesso de amplificação (4,30%) dentre as amostras de fezes extraídas.

Em estudos de filogeografia, estruturação genética e diversidade do cão-selvagem asiático (*Cuon alpinus*) utilizando amostras fecais, Iyengar, (2005) conseguiu utilizar cerca de 25% das amostras coletadas para as análises genéticas.

Apesar dessa baixa eficiência na obtenção de DNA viável para as análises genéticas, inúmeros estudos que utilizaram essa metodologia conseguiram empregar com eficiência a identificação molecular das espécies nesse tipo de amostra (Taberlet et al. 1997; Taberlet e Luikart, 1999; Kalinowski et al. 2006; Miotto et al. 2007; 2012).

5.1.2 Amostras de tecido

Foram obtidas 30 amostras provenientes de animais atropelados nas diferentes rodovias avaliadas (Tabela 1). As amostras estavam em diferentes graus de degradação, impedindo (na maioria das vezes) a determinação sexual e a qual espécie pertencia precisamente. Dessa forma, todas as amostras foram submetidas à identificação molecular e posteriormente comparadas com amostras de cachorro-do-mato depositadas em bancos de dados (Tabela 2). Nem todas as amostras foram amplificadas para os dois fragmentos de mtDNA utilizados, algumas amostras amplificaram apenas o HVS-I (RJJGCT02, RJCRCCT07, RJBNCCT11, CDMJCT33 e CDRBCT34), e outras apenas o gene COI (CDLJCT26, CDMCCT35, CDIPCT42 e CDBTCT48). Das amostras de tecidos, apenas uma foi identificada como outra espécie, *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato) e conseqüentemente removida de todas as análises.

A amplificação de um fragmento de 250pb do HVS-I foi obtida para 24 amostras de tecido, proveniente de animais atropelados em estradas baianas (Tabela 1). Dessas amostras, apenas 21 apresentaram boa qualidade e puderam ser analisadas, sendo todas identificadas como *C. thous*, com alto valor de identidade (97 a 100%).

Para o COI foi amplificado um fragmento de aproximadamente 658pb em 26 amostras de tecido. A partir da identificação molecular foi possível identificar, com valores de identidade que variaram entre 98 e 100%, 20 amostras de cachorro-do-mato (Tabela 1). Das 26 amostras, quatro não apresentaram boa qualidade e foram removidas das análises subsequentes.

Os relatos de atropelamento do cachorro-do-mato e o número de animais coletados nesse trabalho vítimas desse incidente indicam a necessidade de medidas que visem mitigar o número de animais mortos a cada ano. Carvalho et al. (2015) identificaram o cachorro-do-mato como mamíferos mais atropelados na rodovia MS-080. Resultados similares foram observados por Cunha et al. (2010) na rodovia GO-060.

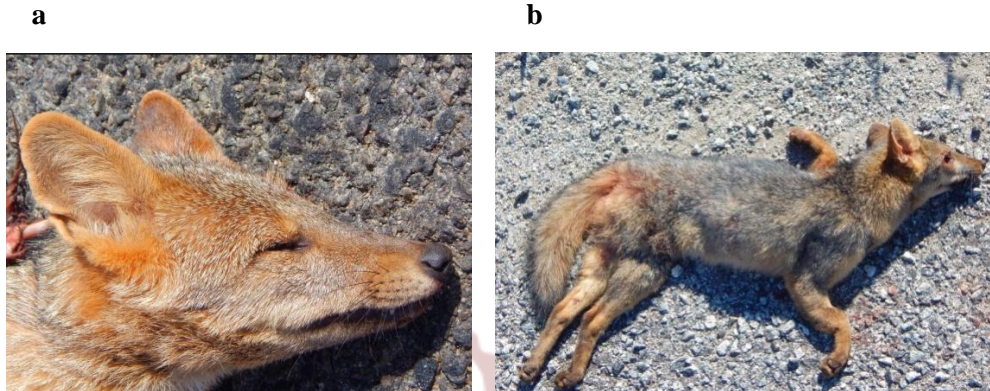


Figura 5 Cachorro-do-mato. **a)** Animal atropelado na BA-488, no município de Itaberaba em Julho de 2016, a imagem corresponde a amostra 41. **b)** Cachorro-do-mato atropelado na BA-052, em Morro do Chapéu em Junho de 2016, imagem corresponde a amostra 31. Fonte: Arquivo pessoal.

De acordo com Hasse-Ceia et al. (2017), aproximadamente um terço das espécies de carnívoros atropeladas em todo o mundo são de espécies que não se encontram com o *status* de ameaçada, segundo os critérios da IUCN. Além disso, os autores destacam que mesmo em rodovias com baixo fluxo de veículos é significativo o número de animais atropelados.

Segundo o Sistema Urubu foram registrados cerca de dois mil registros de atropelamento em unidades de conservação apenas para o ano de 2017. Isso indica que mesmo em áreas protegidas, os índices são preocupantes. Como estratégia de conservação para essa questão destaca-se a construção de lombadas, valetas e radares, além de programas de conscientização e sensibilização dos motoristas (Beiseigel et al. 2013).

5.2 Análises moleculares

5.2.1 Estatística Sumária e Testes de Neutralidade

As amostras de foram separadas em dois grupos, com base nas áreas amostradas: Região de Jequié (RJ) e Chapada Diamantina (CD). As cidades que fazem parte de cada uma dessas regiões podem ser visualizadas na Tabela 1.

A partir das análises de variabilidade genética, podem-se observar diferenças nos valores obtidos tanto entre os diferentes genes quanto entre as populações RJ e CD.

Para o HSV-I, foi possível observar 26 haplótipos, além de altos níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica: $H_d = 0,983$ ($SE = 0,010$); $\pi = 0,039$ ($SE = 0,002$) para *C. thous*, respectivamente (Tabela 3).

Quando comparamos a diversidade haplotípica e nucleotídica entre os grupos formados para esse gene, observamos que o grupo CD, apresentou diversidade haplotípica maior ($H_d = 1,000$; $SE = 0,045$), que os outros grupos. Contudo, a diversidade nucleotídica foi igual para RJ ($\pi = 0,032$; $SE = 0,007$) e para as Sequências referência (Tabela 2).

Para o COI, foram observados quatro haplótipos distintos, e baixos níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica $H_d = 0,508$ ($SE = 0,082$); $\pi = 0,007$ ($SE = 0,001$), respectivamente quando comparado com os valores observados para o HVS I. Quando essa análise foi realizada para os três grupos (população RJ, CD e Sequências referência) separadamente, as amostras de RJ apresentou a mesma quantidade de haplótipos que o grupo das sequências referência, além de valores de diversidade ($H_d = 0,818$; $\pi = 0,012$) superiores as amostras CD ($H_d = 0,618$; $\pi = 0,003$).

Os valores obtidos para o COI são inferiores ao calculado para o HSV-I. Essas diferenças estão relacionadas aos diferentes níveis de conservação dos genes estudados, sendo que o HSV-I apresenta taxas de mutação maiores que o COI. Essa diferença foi refletida em todas as análises realizadas.

O valor de diversidade haplotípica do HSV-I estimado ($H_d = 0,983$) foi superior ao relatado por Tchaicka et al. (2007), ($H_d = 0,83$) utilizando a região controle do mtDNA em 106 amostras coletadas ao longo das regiões de ocorrência (Cerrado, Caatinga, Mata Atlântica e Amazônia oriental) do cachorro-do-mato no Brasil, com exceção das amostras do Pantanal ($H_d = 1,0$). Mesmo quando essas amostras foram divididas em dois grupos (Mata Atlântica Sudeste e Mata Atlântica Nordeste), o valor estimado nesse trabalho foi superior.

Em estudo realizado por Garcez, (2015), com *Lycalopex vetulos* (raposinha-do-campo) ao longo de sua distribuição, utilizando a região controle do mtDNA, foi observado uma diversidade haplotípica menor ($H_d = 0,97$), que o valor encontrado para *C. thous* nessa pesquisa.

Tabela 3 Estimativas de diversidade genética para cada uma das populações amostradas de acordo com o conjunto de dados utilizado: N – Número de indivíduos, h – Número de haplótipos, Hd – Diversidade haplotípica, π – Diversidade nucleotídica, F_s – Teste de neutralidade de Fu, D – Teste de neutralidade de Tajima.

| Conjunto de dados (mtDNA) | População | N | h | Hd | π | F_s | D |
|---------------------------|------------------------|----|----|---------------|---------------|---------|---------|
| HVS I (284 pb) | RJ | 11 | 10 | 0,982 (0,046) | 0,032 (0,007) | -2,475* | 0,488* |
| | CD | 10 | 10 | 1,000 (0,045) | 0,018 (0,003) | -6,167 | -1,011* |
| | Sequências referências | 15 | 12 | 0,971 (0,033) | 0,032 (0,007) | -2,739* | -0,114* |
| | Total | 36 | 26 | 0,983 (0,010) | 0,039 (0,002) | -8,853 | 0,085* |
| COI (130 pb) | RJ | 12 | 3 | 0,439 (0,158) | 0,007 (0,002) | 0,654* | 0,028* |
| | CD | 12 | 2 | 0,167 (0,134) | 0,002 (0,001) | 0,421* | -1,451* |
| | Sequências referências | 9 | 3 | 0,667 (0,132) | 0,009 (0,001) | 0,909* | 0,794* |
| | Total | 33 | 4 | 0,508 (0,082) | 0,007 (0,001) | 0,609* | 0,152* |

Valor estatisticamente não significativo ($p > 0,05$)

Quando a diversidade nucleotídica foi comparada com os valores obtidos por Tchaicka et al. (2007), para o conjunto de dados da Amazônia oriental ($\pi = 0,038$) utilizando a região controle do mtDNA, foi observado valor muito próximo ao obtido no presente trabalho ($\pi = 0,039$). Esse dado é explicado pela particularidade da área amostrada, onde todos os haplótipos encontrados para essa região foram definidos como eco-região específico ou amostra específica.

Os testes de neutralidade foram realizados com o objetivo de detectar a ocorrência de seleção para o fragmento analisado, assumindo o modelo onde as mutações são neutras. Essas estimativas assumem a hipótese nula, sugerindo tamanho populacional constante e ausência de estruturação e da ação dos demais fatores evolutivos (Rozas et al. 2003).

Dentre os testes de neutralidades realizados, apenas o teste de F_s de Fu's apresentou valores estatisticamente significativo ($p < 0,05$) para o gene HSV-I, tanto para as amostras da Chapada Diamantina ($F_s = -6,167$) quanto para o conjunto total ($F_s = -8,853$). Esses valores negativos e estatisticamente significativos podem indicar alterações na estrutura das populações, como uma expansão populacional recente. Resultado similar ao encontrado para o HVS-I foi observado por Garcez, (2015), para *L. vetulus* utilizando dois fragmentos da região controle do mtDNA concatenados. Já nos testes de neutralidade do COI, nenhum dos valores obtidos foi estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

5.2.2 Análises de Estruturação populacional

A ação e a interação entre os diferentes fatores evolutivos e mecanismos ecológicos podem levar a estruturação genética das populações. Dessa forma, é necessário avaliar as estimativas genéticas e populacionais que permitam realizar inferências sobre a possível estruturação das populações e quantificar a repartição da diversidade entre elas (Garcez, 2015).

O teste de AMOVA evidenciou altos valores de Φ_{st} para os dois fragmentos analisados (HVS-I = 0,362) e (COI = 0,265). Esses valores foram apoiados pela inferência par-a-par, que mostrou altos valores de diversidade genética dentro das populações (63,72 e 73,47%) e valores moderados de diversidade genética (36,28 e 26,53%) entre as populações, para os dois fragmentos HVS-I e COI utilizados, respectivamente (Tabela 3).

Os valores encontrados pela AMOVA sugerem uma moderada estruturação entre os grupos formados, com valores que indicam a existência de uma diferenciação entre os grupos. Essa moderada estruturação encontrada, associada a altos valores de diversidade genética para *C. thous* pode ser decorrente da utilização de sequências proveniente de diversas áreas amostradas pelas sequências obtidas nos bancos de dados.

Essa diferença nos valores de Φ_{st} para a região controle do mtDNA quando comparada com outros estudos com espécies de canídeos, pode ser decorrente de uma maior distribuição na coleta das amostras avaliadas. Inúmeros exemplos podem ser relatados, como os descritos abaixo:

Altos valores de Φ_{st} (0,68) foram obtidos para a região controle do mtDNA em amostras coletadas em várias áreas de distribuição do cachorro-do-mato, por todo o Brasil. No qual foi possível observar um padrão de distribuição norte/sul na diferenciação genética desses animais, com subdivisão clara em dois grandes clados (Tchaicka et al. 2007). Além disso, o limite imaginado da divisão desse grupo com ampla distribuição na América do Sul encontra-se em regiões da Bahia.

Garcez (2015), após a análise genética de genes mitocondriais concatenados, identificou estruturação genética (Φ_{st} 0,29) em raposinha-do-campo (*Lycalopex vetulus*) ao longo da distribuição da espécie (centro-oeste brasileiro). Onde, o mesmo padrão de subdivisão norte-sul, já observado em diferentes espécies, foi confirmado para *L. vetulus*.

González et al. (2015), obtiveram alto nível de estruturação (Φ_{st} 0,30) em *Chrysocyon brachyurus* (lobo-guará), sendo as diferenças observadas no cerrado brasileiro e em regiões da Bolívia. Essa estruturação foi intensificada devido à fragmentação e outras alterações

ambientais, além das mudanças ambientais históricas descritas para os períodos glaciais e interglaciais.

Estudos com o cão-selvagem asiático (*Cuon alpinus*) apresentaram diferentes graus de diversidade genética, com diferenças significativas entre populações de Java, na Indonésia que apresentou baixa diversidade, quando comparado com populações da Índia (Iyengar et al. 2005). Essas diferenças foram justificadas pelo isolamento em uma ilha (população de Java), impedindo o fluxo gênico entre as diferentes populações.

Apesar dos canídeos em geral serem caracterizados pela grande mobilidade, estudos com diferentes espécies desse grupo a partir de marcadores mitocondriais, apresentaram valores de estruturação significativos, podendo ser um indicativo da influência de processos históricos (ciclos glaciais para os canídeos sul americanos), fragmentação de hábitat, caça furtiva, hibridização, entre outras características interferindo na dinâmica das populações dessas espécies (Tchaicka et al. 2007; Garcez, 2015).

Outra metodologia que permite visualizar graficamente a diversidade genética é a construção de uma rede de haplótipos, através das informações das sequências das amostras.

A partir da análise das sequências do fragmento HVS-I obtidos no presente estudo (Tabela 1) e sequências obtidas em bancos de dados (Tabela 2), foram identificados 26 diferentes haplótipos. A rede de haplótipos (Figura 6) sugeriu a formação de dois grupos distintos, separados por dez passos mutacionais, entre os espécimes de cachorro-do-mato. Já o gráfico gerado para o COI (Figura 5b), indicou a presença de três haplótipos distintos, compartilhado pela maioria dos indivíduos amostrados, e um haplótipo exclusivo, presente no indivíduo COI90, coletado no município de Cravolândia.

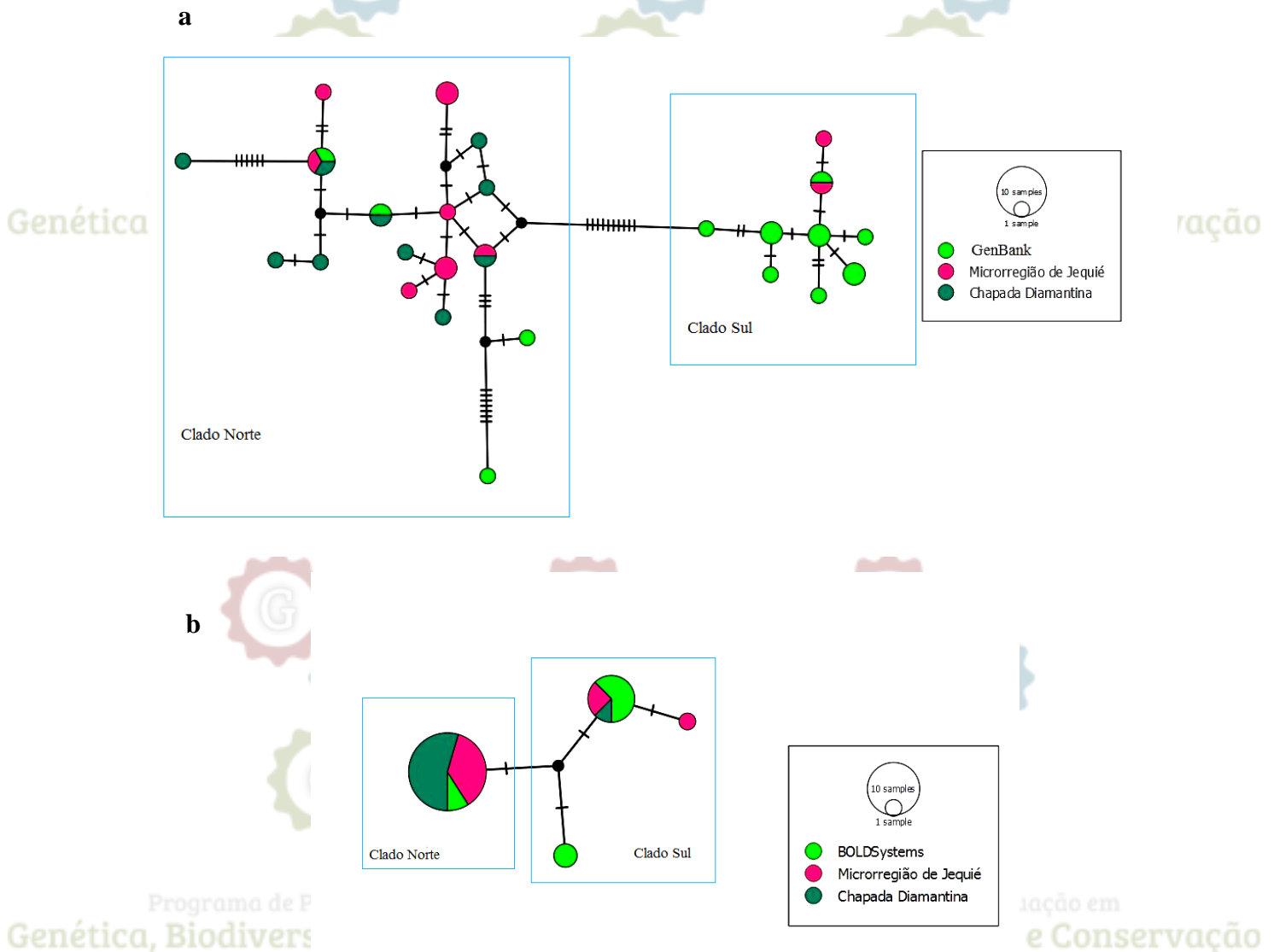


Figura 6 a) Rede de haplótipos construída com sequências do HVS-I; b) Rede de haplótipos construída com sequências do fragmento do gene Citocromo Oxidase C subunidade I (COI). Os círculos indicam os diferentes haplótipos, sendo o diâmetro de cada círculo proporcional à frequência do haplótipo na amostra; as cores indicam a frequência do haplótipo em cada localidade e as barras indicam o número de mutações entre os haplótipos.

As redes de haplótipos para os fragmentos analisados apresentaram resultados distintos. O HVS-I por ser um fragmento com alta taxa de polimorfismo (Lunt et al. 1998), apresentou uma quantidade de haplótipos e de passos mutacionais superior as variações haplotípicas mostradas para o COI.

Os possíveis agrupamentos formados entre os indivíduos das diferentes populações amostradas podem ser visualizados graficamente, permitindo avaliar as semelhanças e diferenças entre os grupos genéticos.

A análise de agrupamento de populações realizado no BAPS 5.3 (Corander et al. 2003), para os dois fragmentos (HVS-I e COI), indicaram a formação de três grupos distintos (Figura 6a e b), com o melhor valor de probabilidade ($p < 0,05$) baseado em 500 simulações de frequência alélica a *posteriori*. O gráfico de estruturação baseado na análise Bayesiana, para o fragmento COI mostrou a separação da amostra RJCRCCTI90, a mesma que apresentou o haplótipo exclusivo descrito acima (Figura 6b). Essa análise corrobora com a informação gerada na rede de haplótipos, evidenciando a diferenciação apresentada por essa amostra.

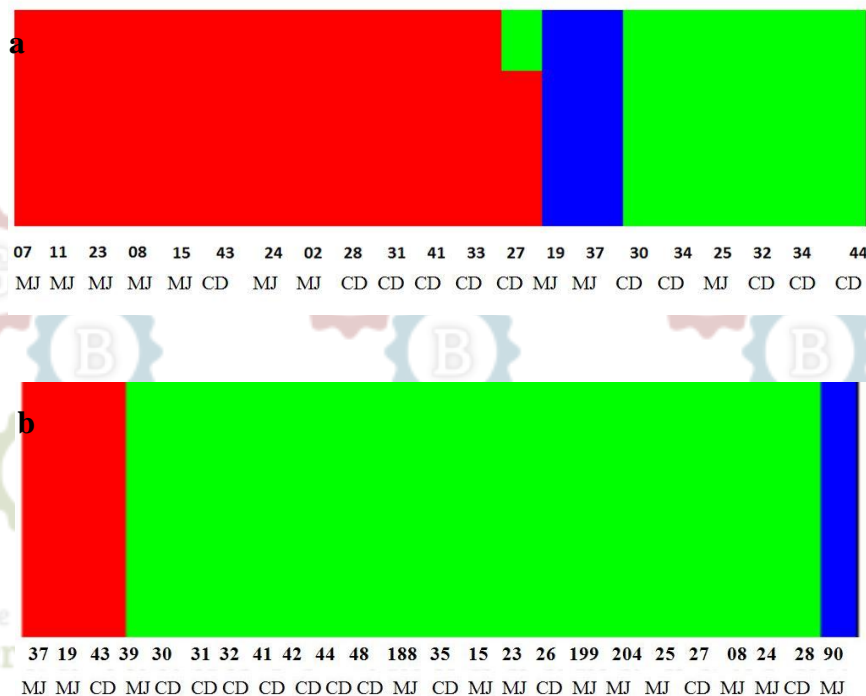


Figura 7 Análise de estruturação populacional gerado com a probabilidade da formação de grupos biológicos com informações a posteriori. a) Gráfico gerado utilizando um fragmento de 250pb do segmento HVS-I. b) Gráfico gerado a partir da análise do segmento de 580pb do gene COI. As diferentes cores representam os diferentes grupos formados, os números correspondem à identificação das amostras biológicas e as siglas representam as duas populações com base na área de coleta: Microrregião de Jequié (RJ) e Chapada Diamantina (CD).

As árvores filogenéticas foram estimadas a partir dos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e por Inferência Bayesiana (BI) (Figura 8). As duas árvores geradas apresentaram topologias similares, com valores altos para os ramos principais, os quais foram apoiados tanto por valores de *bootstrap* como por probabilidade a *posteriori*.

A árvore do COI (Figura 8b) apresentou uma topologia semelhante à árvore gerada nas análises para o HVS-I (Figura 8a), com a formação de dois grupos distintos para o *C.thous* do-mato. O ramo (azul) com as amostras provenientes dos municípios de Jaguaquara e Lafaiete Coutinho (amostras RJJGCT19 e RJLCCT37 – RJ, amostrada em ambas as árvores),

além da amostra RJCRCCT90 (RJ) e CDBJCT43 (CD) agruparam com os indivíduos coletados nas regiões do Mato Grosso do Sul, Paraná e Venezuela (Tabela 2), com valores suporte de 79 e 50 (ML e BI respectivamente), emergindo do ramo que reuniu as demais amostras.

As sequências referência oriundas da região nordeste formaram o grupo (vermelho), com a maioria das amostras coletadas nessa pesquisa (83,33%), com valores de suporte 100 e 90 (ML e BI respectivamente).

As sequências de *Lycalopex vetulus* e *Lycalopex gymnocercus* (Figura 8 - verde) utilizadas como grupos externos, formaram dois grupos distintos com valores bem apoiados em todas as análises.

As análises de máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana (Figura 8) confirmaram a formação de dois grupos distintos nas árvores, para os dois fragmentos mitocondriais utilizados (ramos vermelhos e azuis). A maioria das amostras obtidas nessa pesquisa agrupou com espécimes oriundos da região nordeste, sugerindo uma composição genética diferente das demais áreas de distribuição. A topologia das árvores foram semelhante à de Tchaicka et al. (2007), onde houve a formação de dois clados distintos, com padrão norte-sul de distribuição. Machado e Hingst-Zaher, (2009), realizando um estudo filogeográfico com *C. thous* também encontrou esse padrão de subdivisão norte-sul para as áreas amostradas.

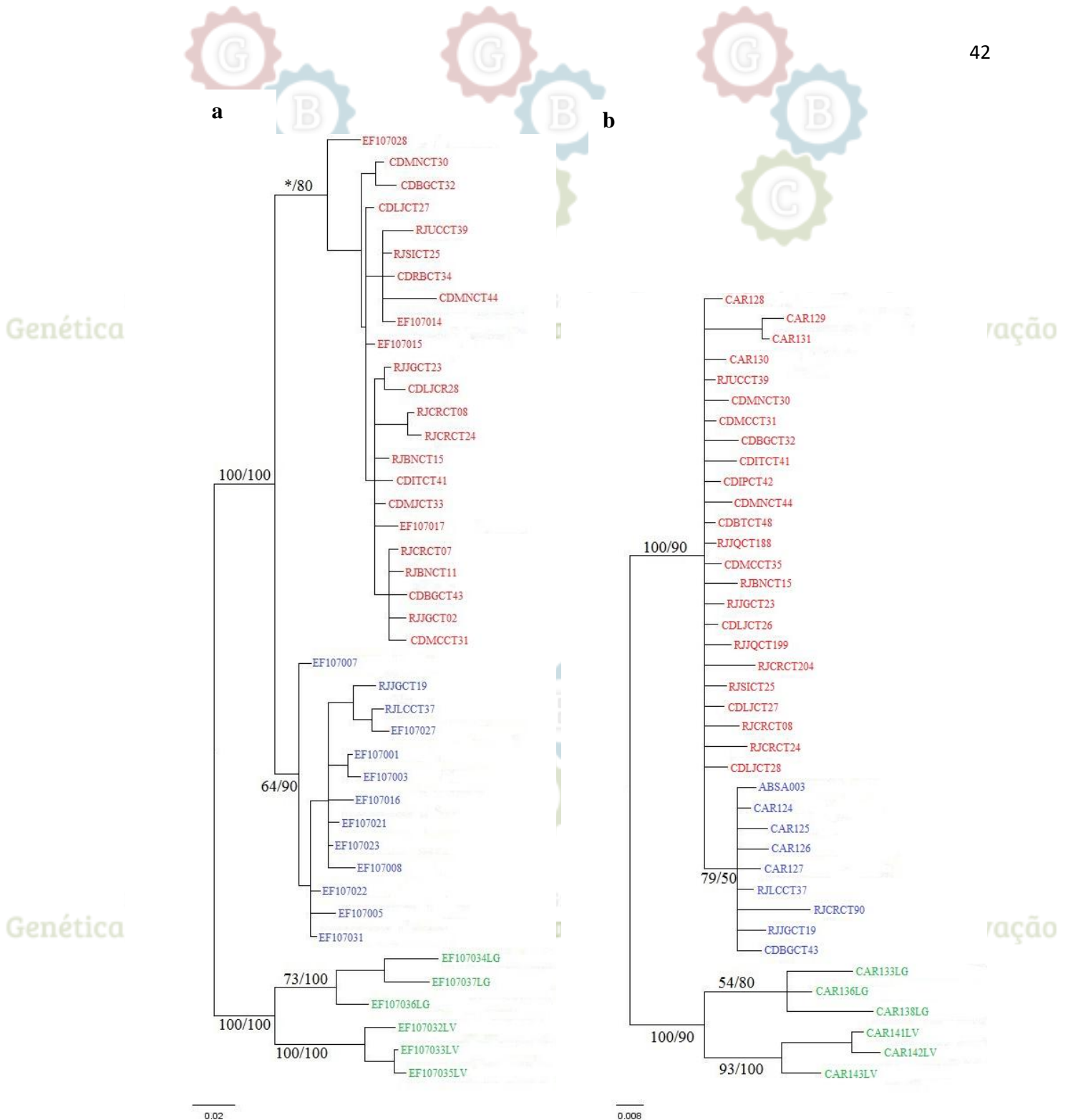


Figura 8 Árvores filogenéticas das amostras de *Cerdocyon thous* construídas através dos métodos de Máxima Verossimilhança (ML) e Inferência Bayesiana (BI) (topologia mostrada). a) Árvore gerada a partir do segmento do HVS-I e b) Árvore gerada a partir do fragmento do gene COI. Os valores de suporte localizados nos ramos principais correspondem à frequência de *bootstrap*, referente às análises de ML e probabilidade a *posteriori* para BI, respectivamente. Os asteriscos indicam a ausência do ramo formado para aquela análise.

Segundo o estudo conduzido por Tchaicka et al. (2007), as regiões norte e nordeste apresentam alto valor de diversidade genética para o cachorro-do-mato, e quando comparado com amostras de outras regiões, observa-se uma separação dos espécimes dessa área (padrão

norte/sul). Esse resultado pode ser explicado pela teoria de refúgio Pleistocênico da mata Atlântica, proposto por Carnaval e Moritz, (2008), sendo o mesmo modelo utilizado para interpretar essa descontinuidade na diversidade genética em diferentes grupos (Costa et al. 2000; Haffer e Prance, 2001; Carnaval e Moritz, 2008; Martins, 2011; Porto, 2011).

De acordo com esses autores, o surgimento de áreas com vegetação aberta possibilitou a dispersão e colonização de novos ambientes para essas espécies. Contudo, ao longo dos ciclos glaciais e interglaciais ocasionando a retração e expansão das florestas, levou ao isolamento e subsequente diferenciação genética entre os grupos, formando esse padrão (norte/sul) de subdivisão (Carnaval e Moritz, 2008).

Segundo Berta, (1982) a espécie *C. thous* apresenta cinco subespécies distribuídas ao longo de sua ocorrência, sendo três subespécies descritas ao longo do território brasileiro. *C. thous thous* com ocorrência no sudeste da Venezuela, Guiana, Guiana Francesa, Suriname e região norte do Brasil, *C. thous entrerianus* com ocorrência na Bolívia, Paraguai, Uruguai e nas regiões sul e sudeste do Brasil, *C. thous azarae*, com distribuição nas áreas nordeste e central do Brasil. Até o momento, não existem trabalhos que identificaram a sobreposição dessas três subespécies nas prováveis fronteiras de diferenciação genética nas regiões sudeste e nordeste da Mata Atlântica.

A distribuição de *C. t. azarae* coincide com a área de amostragem desse trabalho. Parte da diferenciação genética encontrada em algumas amostras pode ser relacionada com o grupo genético dos espécimes oriundos do Nordeste (Figura 8). As demais amostras agruparam com indivíduos de diversas localidades (Tabela 2), descrita como ocorrência de *C. t. entrerianus*.

Essas informações podem indicar que as regiões amostradas podem ser uma importante área de sobreposição entre os dois grandes grupos genéticos descritos por Tchaicka et al. (2007), sendo essa área a linha divisória sugerida na descontinuidade genética dessa espécie. As análises de estruturação populacional baseadas na rede de haplótipos e no gráfico de estruturação revelaram a formação de três possíveis grupos para ambos os fragmentos e dois grupos baseado na rede de haplótipos para o fragmento HVS-I. Esses resultados poderiam também indicar essa distribuição simpátrica entre esses diferentes grupos.

As amostras que apresentaram um padrão genético diferente das demais amostras coletadas, foram obtida nas diferentes áreas de coletas. As amostras RJLFCT37, RJJGCT19 e RJCRCCT90 foram coletadas na área denominada RJ, já a amostra CDBGCT43 foi coletada na área CD. Essas amostras obtidas nas duas diferentes áreas pode ter influenciado na não estruturação indicada pelos valores de Φ_{st} (HVS-I = 0,014) e (COI = 0,037).

Estudos realizados com outras espécies de carnívoros também indicaram essa diferenciação genética ao longo da distribuição nessa área de ocorrência. Estudos de diversidade genética realizados com o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) observaram a estruturação genética em quatro diferentes grupos, após as análises com marcadores mitocondriais. Esses resultados podem ser explicados pelas modificações das áreas de Cerrado devido as inúmeras modificações climáticas que ocorreram no Pleistoceno, interferindo nos padrões de distribuição da diversidade genética desses animais ao longo da distribuição atual (González et al, 2015).

Segundo estudos realizados por Garcez (2015), a espécie *L. vetulus* não apresentou formação de *clusters* populacionais bem definidos, contudo foi observado em alto valor de Φ_{st} , nas amostras provenientes da região norte, além de uma diferenciação genética mais acentuada quando comparada com as demais áreas amostradas.

Outras espécies de mamíferos que ocorrem na Mata Atlântica e Amazônia (Costa, 2003), mamíferos neotropicais da Mata Atlântica, (Costa et al. 2000), e análises comparativas entre espécies de mamíferos voadores e não-voadores (Ditchfield, 2000), são alguns dos exemplos de estudos que comprovaram o compartilhamento dessas diferenças genéticas ao longo da distribuição, devido a fatores históricos oriundos dos ciclos glaciais.

Resultados semelhantes foram obtidos em estudos de relações filogenéticas em espécies de veado cinza (Figueiredo, 2014). A espécie *M. gouazoubira* foi subdividida em cinco clados de distribuição simpátrica em grande parte da sua ocorrência. Já a espécie *M. nemorivaga* foi separada em três clados, com distribuições biogeográficas distintas. Casos como esses devem ser cuidadosamente avaliados, pois determinados grupos geneticamente distintos que vivem em simpatia podem não ser conservados da forma correta.

Dentro desse contexto, definições conceituais sobre a determinação desses diferentes grupos devem ser repensadas. Conceitos como “Unidades Evolutivamente Significativas – ESU” (Ryder, 1986) e “Unidades de Manejamento – EU” (Moritz, 1994) devem ser utilizados, resultando em estratégias de conservação mais complexas, minimizando as perdas na variabilidade dessas entidades distintas.

Para confirmar se essas linhagens podem ser consideradas diferentes “ESUs”, “UMs” ou diferentes espécies, faz-se necessário a realização de análises complementares, em todos os campos de estudo (genético, ecológico, comportamental, entre outros). Crandall et al (2000) sugere uma extensão desse conceito, sendo necessário avaliar, além dos diferentes níveis de estruturação, características funcionais e adaptações locais, para gerar políticas de conservação mais complexas.

Dessa forma, os estudos de diversidade do cachorro-do-mato em diferentes regiões da Bahia devem ser ampliados, tanto na maior distribuição da coleta de amostras, quanto na utilização de outros genes informativos. Estudos com genes mitocondriais são informativos apenas para uma porção da história evolutiva, sendo necessário investigar se os resultados a partir de análises do DNA nuclear convergem ou sinalizam para os mesmos resultados observados.

Essas novas informações podem ter um grande efeito na determinação dos pontos de sobreposição e isolamento desses dois grandes grupos genéticos, potencializando as ações de conservação dessas diferentes unidades evolutivas.



6. CONCLUSÕES

- As análises dos marcadores mitocondriais permitiram a identificação molecular do cachorro-do-mato;
- Dentre as estimativas da diversidade genética calculada nos espécimes estudados na Bahia, podem-se observar altos valores de diversidade haplotípica, sendo igual ou superior a outras espécies de canídeos;
- A maioria dos animais avaliados (86,20%) apresentou padrões de diversidade genética semelhantes aos estimados para o grupo norte (Mata Atlântica);
- Algumas amostras apresentaram o padrão genético observado nos animais da região sul (Mata Atlântica);
- As estimativas de estruturação genética indicam a distribuição simpátrica desses dois grupos genéticos nas áreas amostradas.

7. REFERÊNCIAS

AKAIKE, H. 1973. Maximum likelihood identification of Gaussian autoregressive moving average models. *Biometrika*, v. 60, n. 2, p. 255-265.

ALMEIDA, Fernando. 2007. Os desafios da sustentabilidade: uma ruptura urgente. Elsevier Brasil.

ALVES, T. R.; FONSECA, R. C.; ENGEL, V. L. 2012. Mamíferos de médio e grande porte e sua relação com o mosaico de habitats na cuesta de Botucatu, Estado de São Paulo, Brasil. *Iheringia: Série Zoológica*, p. 150-158.

ARAÚJO, Roberta M. de; SOUZA, Maíra B. de; RUIZ-MIRANDA, Carlos R. 2008. Densidade e tamanho populacional de mamíferos cinegéticos em duas Unidades de Conservação do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Iheringia, Série Zoológica*, v. 98, n. 3, p. 391-396.

BANDELT, H.; FORSTER, P. e RÖHL, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 16, no. 1, p. 37-48.

BECKER, M.; DALPONTE, J. C. 1999. Rastros de mamíferos brasileiros. Editora Universidade de Brasília. Brasília.

BEISIEGEL, B. M.; LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; QUEIROLO, D.; JORGE, R. S. P. 2013. Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cercopithecus thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, v. 3, n. 1, p. 138-145

BEISIEGEL, B. M.; LEMOS, F. G.; AZEVEDO, F. C.; QUEIROLO, D.; JORGE, R. S. P., 2013. Avaliação do risco de extinção do Cachorro-do-mato *Cercopithecus thous* (Linnaeus, 1766) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, v. 3, n. 1, p. 138-145

BEISIEGEL, D. M. 1999. Contribuição ao estudo da história natural do cachorro do mato, *Cercopithecus thous*, e do cachorro vinagre, *Speothos venaticus*. São Paulo: Universidade de São Paulo. Tese de Doutorado. 118p.

BHATTARAI, Babu R.; FISCHER, Klaus. 2014. Human-tiger *Panthera tigris* conflict and its perception in Bardia National Park, Nepal. *Oryx*, v. 48, n. 4, p. 522-528.

BROQUET, T.; PETIT, E. 2004. Quantifying genotyping errors in noninvasive population genetics. *Mol Ecol*, vol. 13, p. 3601-3608.

BUCKLIN, A.; WIEBE, P. H.; SMOLENACK, S. B.; COPLEY, N. J.; BEAUDET, J. G.; BONNER, K. G.; RBER-LORDA, J. F. e PIERSON, J. J, 2007. DNA barcodes for species identification of euphausiids (Euphausiacea, Crustacea). *Journal of Plankton Research*. USA, vol. 29, no.6, p. 483-493.

CARNAVAL, Ana Carolina; MORITZ, Craig. 2008. Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. *Journal of Biogeography*, v. 35, n. 7, p. 1187-1201.

CARVALHO, Carine Firmino; CUSTÓDIO, Ana Elizabeth Iannini; JUNIOR, Oswaldo Marçal. 2015. Wild vertebrates roadkill aggregations on the br-050 highway, state of Minas Gerais, Brazil. *Bioscience Journal*, v. 31, n. 3.

CASTILHO, C. S.; MARINS-SÁ, L. G.; BENEDET, R. C.; FREITAS, T. R. 2012. Genetic structure and conservation of Mountain Lions in the south-Brazilian atlantic rain forest. *Genetics and molecular biology*, v. 35, n. 1, p. 65-73.

- CAZETTA, Eliana; GALETTI, Mauro. 2009. The Crab-eating Fox (*Cerdocyon thous*) as a secondary seed disperser of *Eugenia umbelliflora* (Myrtaceae) in a Restinga forest of southeastern Brazil. *Biota Neotropica*, v. 9, n. 2, p. 271-274.
- CEIA-HASSE, Ana et al. 2017. Global exposure of carnivores to roads. *Global Ecology and Biogeography*, v. 26, n. 5, p. 592-600.
- CERQUEIRA, R.; BRANT, Arthur; NASCIMENTO, Marcelo T.; PARDINI, R., 2003. Fragmentação: Alguns Conceitos. *In*:. Fragmentação de Ecossistemas: Causas efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. Denise Marçal Rambaldi & Daniela América Suárez de Oliveira (Orgs.) .Brasília: MMA, 2003. 510p.
- CONFORTI, V. A.; DE AZEVEDO, F. C. C. 2003. Local perceptions of jaguars (*Panthera onca*) and pumas (*Puma concolor*) in the Iguaçu National Park area, south Brazil. *Biological Conservation*, v. 111, n. 2, p. 215-221.
- CORANDER, Jukka; WALDMANN, Patrik; SILLANPÄÄ, Mikko J. 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, v. 163, n. 1, p. 367-374.
- COSTA, L.P.; LEITE, Y.L.R.; FONSECA, G.A.B. & FONSECA, M.T. 2000. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic forest. *Biotropica*, Lawrence, v. 32, p. 872-881.
- COURTENAY, O.; MAFFEI, L. 2004. Crab-eating fox *Cerdocyon thous* (Linnaeus, 1766). Canids: foxes, wolves, jackals and dogs. Status survey and conservation action plan, p. 32-38.
- CRANDALL, K. A.; BININDA-EMONDS, O. R.; MACE, G. M.; WAYNE, R. K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in ecology & evolution*, v. 15, n. 7, p. 290-295.
- CRISTESCU, M. E. A.; HEBERT, P. D. N. 2002. Phylogeny and adaptive radiation in the Onychopoda (Crustacea, Cladocera): evidence from multiple gene sequences. *J. Evol. Biol. Canada*, vol.15, p. 838-849.
- DAYRAT, Benoit. 2005. Towards integrative taxonomy. *Biological journal of the Linnean society*, v. 85, n. 3, p. 407-415.
- DI BITETTI, M. S.; DI BLANCO, Y. E.; PEREIRA, J. A.; PAVIOLO, A.; PÉREZ, I. J. 2009. Time partitioning favors the coexistence of sympatric crab-eating foxes (*Cerdocyon thous*) and pampas foxes (*Lycalopex gymnocercus*). *Journal of Mammalogy*, v. 90, n. 2, p. 479-490.
- DITCHFIELD, A. D. 2000. The comparative phylogeography of Neotropical mammals: patterns of intraspecific mitochondrial DNA variation among bats contrasted to nonvolant small mammals. *Molecular Ecology*, v. 9, n. 9, p. 1307-1318.
- FALEIRO, F. G.; ANDRADE, S. R. M.; REIS Jr., F. B. 2011. Biotecnologia: estado da arte e aplicações na agropecuária. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados.
- FALEIRO, F. G.; RAGAGNIN, V. A.; SHUSTER, I.; CORRÊA, R. X.; GOOD-GUD, P. I.; BROMMONSHENKEL, S. H.; MOREIRA, E. G. e BARROS, E. G. 2003. Mapeamento de Genes de Resistência do Feijoeiro à Ferrugem, Antracnose e Mancha-Angular Usando Marcadores RAPD. *Fitopatologia Brasileira*, Brasil, vol. 28, p.59-66.
- FAVARINI, M. O. 2011. Relações filogenéticas entre espécies do gênero *Lycalopex* (Mammalia, Canidae) inferidas com o uso de marcadores do DNA mitocondrial. Porto Alegre: Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Dissertação de mestrado em Zoologia. 40p.

FERREIRA DA CUNHA, Héliida; ALVES MOREIRA, Fabiane Geralda; SOUSA SILVA, Sylvania de. 2010. Roadkill of wild vertebrates along the GO-060 road between Goiânia and Iporá, Goiás State, Brazil. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 32, n. 3.

FIGUEIRÊDO, Marina Gomes de. 2014. Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*).

FIGUEIRÓ, H. V. 2010. Código de barra de DNA de mamíferos neotropicais, e sua aplicação em estudos ecológicos de carnívoros. *Dissertação de Mestrado em Zoologia*. 35 p.

FISZON, J. T., MARCHIORO, N. P. X., BRITTEZ, R. M., CABRAL, D. C., CAMELY, N. C., CANAVESI, V.; FIGUEIREDO, E. O. 2003. Causas antrópicas. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. 2ed. Brasília: MMA/SBF, p. 65-99.

FISZON, J. T.; MARCHIORO, N. P. X.; BRITTEZ, R. M.; CABRAL, D. C.; CAMELY, N. C.; CANAVESI, V.; FIGUEIREDO, E. O. 2003. Causas antrópicas. Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. 2ed. Brasília: MMA/SBF, p. 65-99.

FORMAN, Richard et al. 2003. *Road ecology: science and solutions*. Island Press.

FREITAS, ANDRÉ VICTOR L. 2010. Impactos potenciais das mudanças propostas no Código Florestal Brasileiro sobre as borboletas. *Biota Neotrop. Brasil*, vol. 10, no. 4, p. 53-57.

FREITAS, B. L. M. 2012. Inventário de mamíferos e o efeito do tamanho e formas dos fragmentos sobre a mastofauna de médio e grande em fragmentos florestais isolados dos centros de endemismo pernambucano. *Monografia de Graduação*. Universidade Federal de Pernambuco.

GANEM, R. S.; DRUMMOND, J. A.; FRANCO, J. L. de A. 2013. Conservation polices and control of habitat fragmentation in the Brazilian Cerrado biome. *Ambiente & Sociedade*, v. 16, n. 3, p. 99-118.

GANEM, R. S.; DRUMMOND, J. A.; FRANCO, J. L. de A. 2013. Conservation polices and control of habitat fragmentation in the Brazilian Cerrado biome. *Ambiente & Sociedade*, v. 16, n. 3, p. 99-118.

GARCEZ, F. S. 2015. Filogeografia e história populacional de *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae), incluindo sua hibridação com *L. gymnocercus* (Master's thesis. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul *Dissertação de Mestrado*).

GARCEZ, Fabricio Silva. 2015. Filogeografia e história populacional de *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae), incluindo sua hibridação com *L. gymnocercus*. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. *Dissertação de Mestrado em Zoologia*. 70p.

GARCEZ, Fabricio Silva. 2015. Filogeografia e história populacional de *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae), incluindo sua hibridação com *L. gymnocercus*. Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. *Dissertação de Mestrado em Zoologia*. 70p.

GATTI, A.; BIANCHI, R.; ROSA, C. R. X.; MENDES, S.L. 2006. Diet of two sympatric carnivores, *Cerdocyon thous* and *Procyon cancrivorus*, in a restinga area of Espírito Santo State, Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, v.22, p. 227–230.

HAFER, J.; PRANCE, G. T. 2001. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. *Amazoniana*, v. 16, n. 3, p. 579-607.

HALL, Tom A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: Nucleic acids symposium series. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000, p. 95-98.

HEDRICK, W. P. 2001. Conservation genetics: where are we now? Trends in Ecology & Evolution, Arizona, vol.16, no. 11.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE), 2013.
<<http://www.cidades.ibge.gov.br/painel/historico.php?lang=&codmun=290950&search=|cravolandia>>
Acesse em: 06. 03. 2015.

INSTITUTO CHICO MENDES DE CONSERVAÇÃO DA BIODIVERSIDADE (ICMBio), 2013.
<<http://www.icmbio.gov.br>> Acesso em: 17. 02. 2014.

IYENGAR, Garud N. 2005. Robust dynamic programming. Mathematics of Operations Research, v. 30, n. 2, p. 257-280.

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

KAGEYAMA, P. K.; GANDARA, F. B.; SOUZA, L. M. I. 1998. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Instituto de Pesquisa e Estudos Florestais. v. 12, n. 32, p. 65-70.

KAGEYAMA, Paulo Y.; GANDARA, Flávio B. 1998. Consequências genéticas da fragmentação sobre populações de espécies arbóreas. Série Técnica IPEF, Brasil, vol. 12, no. 32, p. 65-70.

KALINOWSKI, S.T.; WAGNER, A.P.; TAPER, M.L. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. Mol Ecol Notes. vol. 6, p. 576-579.

LANDAU, Elena C. 2003. Padrões de ocupação espacial da paisagem na Mata Atlântica do Sudeste da Bahia, Brasil. Instituto de Estudos Sócio-Ambientais do Sul da Bahia e Conservation International do Brasil. Brasil, p. 1-15.

LANGGUTH, Alfredo. 1975. Ecology and evolution in the South American canids. The wild canids (MW Fox, ed.). Van Nostrand Reinhold Co., New York, p. 192-206.

LEFÉBURE, T.; DOUADY, C. J.; GOUY, M. e GIBERT, J. 2006. Relationship between morphological taxonomy and molecular divergence within Crustacea: Proposal of a molecular threshold to help species delimitation. Molecular Phylogenetics Evolution, vol. 40, p. 435-447.

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

LEMOS, F.G.; FACURE, K.G. 2011. Seasonal variation in foraging group size of crab-eating foxes and hoary foxes in the Cerrado biome, Central Brazil. Mastozoología Neotropical. v. 18, p. 239-245.

LINDBLAD-TOH, K.; WADE, C. M.; MIKKELSEN, T. S.; KARLSSON, E. K. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature, v. 438, n. 7069, p. 803, 2005.

LIS, J. T., 1980. Fractionation of DNA fragments by polyethyleneglycol induced precipitation. Methods Enzymol, v. 65, p. 347-353.

LIST, IUCN Red. 2004. The IUCN red list of threatened species. Disponível em:<<http://www.iucnredlist.org/details/4248/0>>. Acesso em 03 de agosto de 2017 v. 12.

LUNT, James. 1998. Large-scale production, properties and commercial applications of polylactic acid polymers. *Polymer degradation and stability*, v. 59, n. 1-3, p. 145-152.

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

MACHADO, F. A.; HINGST-ZAHER, E. 2009. Investigating South American biogeographic history using patterns of skull shape variation on *Cercyon thous* (Mammalia: Canidae). *Biological Journal of the Linnean Society, London*, v. 98, p. 77-84.

MANTELLATTO, A. M. B.; CARNELOSSI, E. A. G.; DUARTE, J. M. B. 2010. Transferability of microsatellite loci from exotic Cervidae to Brazilian brocket deer (*Mazama spp*, Mammalia: Cervidae). *Genetics and Molecular Research*, vol. 9, no. 1, p. 277-282.

MAZZOLLI, Marcelo. 1993. Ocorrência de *Puma concolor* (Linnaeus)(Felidae, Carnivora) em áreas de vegetação remanescente de Santa Catarina, Brasil. *Revista brasileira de Zoologia*, v. 10, n. 4, p. 581-587.

MAZZOLLI, Marcelo. 1993. Ocorrência de *Puma concolor* (Linnaeus)(Felidae, Carnivora) em áreas de vegetação remanescente de Santa Catarina, Brasil. *Revista brasileira de Zoologia*, v. 10, n. 4, p. 581-587.

MCNAB, Brian K. 1963. Bioenergetics and the determination of home range size. *The American Naturalist*, v. 97, n. 894, p. 133-140.

MENEZES, Christiano Marcelino et al. 2009. Florística e fitossociologia do componente arbóreo do município de Conde, Bahia, Brasil. *Revista Biociências*, v. 15, n. 1.

MILLER, Mark A.; PFEIFFER, Wayne; SCHWARTZ, Terri. 2010. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: *Gateway Computing Environments Workshop (GCE)*, Ieee, 2010. p. 1-8.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE (MMA), 2014. <<http://www.mma.gov.br>> Acesso em: 17. 02. 2014.

MIOTTO, R. A. 2006. Análise do DNA fecal para a determinação da presença e do número populacional mínimo de onças-pardas (*Puma concolor*, Felidae) em duas Unidades de Conservação do estado de São Paulo, o Parque Estadual do Vassununga e a Estação Ecológica do Jataí. *Dissertação de Mestrado em Ecologia e Recursos Naturais*. 69 p.

MIOTTO, R. A.; CERVINI, M.; BEGOTTI, R. A.; GALETTI JR, P. M. 2012. Monitoring a puma (*Puma concolor*) population in a fragmented landscape in southeast Brazil. *Biotropica*, v. 44, n. 1, p. 98-104.

MIOTTO, R. A.; CIOCHETI, G.B.; RODRIGUES, F. P. A.; e GALETTI JR., P. M. 2007. Identification of pumas (*Puma concolor* (Linnaeus, 1771) through faeces: a comparison between morphological and molecular methods. *Braz. J. Biol, São Carlos*, vol.67, no. 4, p. 963-965.

MORITZ, C. T. E. D.; DOWLING, T. E.; BROWN, W. M. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, v. 18, n. 1, p. 269-292.

NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION (NCBI), 2014 <<http://www.ncbi.nih.gov/genbank/>> Acesso: 28.11.2014.

OLIVEIRA, Pedro C. P. de; GLOAGUEN, Thomas V.; GONÇALVES, Roberta A. B.; SANTOS, Dionei L. 2013. Produção de moranga irrigada com esgoto doméstico tratado Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental. Campina Grande, vol.17, no.8, p.861–867.

PAIS, José Machado. 2012. Sexualidades e afectos juvenis.

PALMEIRA, F. B. L.; BARRELLA, W. 2007. Conflitos causados pela predação de rebanhos domésticos por grandes felinos em comunidades quilombolas na Mata Atlântica. Biota Neotropica. Brasil, vol. 7, p. 21–30.

PALMEIRA, Francesca B.L.; CRAWSHAW, Jr. Peter G.; HADDAD, Claudio M.; FERRAZ, Katia Maria P.M.B. e VERDADE, Luciano M. 2008. Cattle depredation by puma (*Puma concolor*) and jaguar (*Panthera onca*) in central-western Brazil Biological Conservation. Brasil, vol. 141, p. 118-125.

PIERCE, Benjamin A. 2011. Genética: um enfoque conceitual. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan.

PIRES, Amanda Ciprandi; MARINONI, Luciane. 2010. DNA barcoding and traditional taxonomy unified through Integrative Taxonomy: a view that challenges the debate questioning both methodologies. Biota Neotropica, v. 10, n. 2, p. 339-346.

PORTELLA, T. P. 2011. Armadilhas de pêlos como método de amostragem não-invasiva para felídeos neotropicais. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. Dissertação de mestrado em Ecologia e Conservação. 55p.

POSADA, David. 2008. jModelTest: phylogenetic model averaging. Molecular biology and evolution, v. 25, n. 7, p. 1253-1256.

PRADO-MARTINEZ, Javier et al. 2013. Great ape genetic diversity and population history. Nature, v. 499, n. 7459, p. 471-475.

PREVOSTI, Francisco J. 2010. Phylogeny of the large extinct South American canids (Mammalia, Carnivora, Canidae) using a “total evidence” approach. Cladistics, v. 26, n. 5, p. 456-481.

RABELLO, A.; NUNES RAMOS, F.; HASUI, É. 2010. Efeito do tamanho do fragmento na dispersão de sementes de *Copaiba* (*Copaifera langsdorffii* Delf.). Biota Neotropica, v. 10, n. 1.

RAMIREZ, Mariano A.; PREVOSTI, Francisco J. 2014. Systematic revision of “*Canis*” *ensenadensis* Ameghino, 1888 (Carnivora, Canidae) and the description of a new specimen from the pleistocene of Argentina. Ameghiniana, v. 51, n. 1, p. 37-51.

ROCHA, E. C.; SILVA, E.; FEIO, R. N.; MARTINS, S. V. e LESSA, G. 2006. Aspectos da história natural e conservação de *Pseudalopex vetulus* (LUND, 1842) (Carnivora: Canidae) em áreas de pastagem e campo sujo, Campinópolis, Mato Grosso, Brasil. vol. 30, no. 4, p. 669-678.

ROCHA, G. F.; FERREIRA, L. G.; FERREIRA, N. C. e FERREIRA, M. E. 2011. Detecção de desmatamentos no bioma Cerrado entre 2002 E 2009: Padrões, Tendências e Impactos. Revista Brasileira de Cartografia. Brasil, vol. 63, no. 03, p. 341-349.

ROZAS, Julio et al. 2003. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. Bioinformatics, v. 19, n. 18, p. 2496-2497.

SANTOS, J. T. dos; MARAFON, A. T. 2013. Composição e caracterização da fauna de mamíferos de médio e grande porte na fazenda goiabeira, caçador, SC, Brasil - dados preliminares. Revista Extensão em Foco. Brasil, vol.1, no.1, p. 25-30.

SILVA, E. M. D. 2011. Evolução da força de mordida, encefalização e socialidade em canídeos (Carnívora: Mammalia). Pernambuco: Universidade Federal de Pernambuco. Dissertação de mestrado em Biologia Animal. 97p.

SILVEIRA, L. F.; BEISIEGEL, B. de M.; CURCIO, F. F.; VALDUJO, P. H.; DIXO, M.; VERDADE, V. K.; MATTOX, G. M. T. e CUNNINGHAM, P. T. M. 2010. What Use Do Fauna Inventories Serve? *Estudos Avançados*. vol. 24, no. 68, p. 173-207.

SMYTHE, L. 2008. Recent Records of Pumas (*Puma Concolor*) on the Kofa National Wildlife Refuge, Arizona. *Journal of the Arizona-Nevada Academy of Science*. Arizona, vol. 40, no. 2, p. 155-156.

SNUSTAD, D. P.; SIMMONS, M. J. 2008. *Fundamentos de genética*. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Kooggan.

SPELLERBERG, I. A. N. 1998. Ecological effects of roads and traffic: a literature review. *Global Ecology and Biogeography*, v. 7, n. 5, p. 317-333.

SRBEK-ARAUJO, A. C.; CHIARELLO, A. G. 2008. Domestic dogs in Atlantic forest preserves of south-eastern Brazil: a camera-trapping study on patterns of entrance and site occupancy rates. *Brazilian Journal of Biology*, v. 68, n. 4, p. 771-779.

TABARELLI, M.; GASCON, C. 2005. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. *Megadiversidade*. Brasil. vol. 1, no. 1, p. 181-188.

TABARELLI, M.; PINTO, L. P.; SILVA, José M. C.; HIROTA, Márcia M.; BEDÊ, Lúcio C., 2005. Desafios e oportunidades para a conservação da biodiversidade na Mata Atlântica brasileira. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 132-138.

TABARELLI, MARCELO; GASCON, C. 2005. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 181-188.

TABARELLI, MARCELO; GASCON, C. 2005. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 181-188.

TABARELLI, MARCELO; GASCON, Claude. 2005. Lições da pesquisa sobre fragmentação: aperfeiçoando políticas e diretrizes de manejo para a conservação da biodiversidade. *Megadiversidade*, v. 1, n. 1, p. 181-188.

TABERLET, Pierre; WAITS, Lisette P.; LUIKART, Gordon. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in ecology & evolution*, v. 14, n. 8, p. 323-327.

TAJIMA, Fumio. 1989. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, v. 123, n. 3, p. 585-595.

TCHAICKA, L. 2006. Abordagens filogenéticas, filogeográficas e populacionais em canídeos sul-americanos. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Tese de doutorado em Ciências. 193p.

TCHAICKA, L.; EIZIRIK, E.; DE OLIVEIRA, T. G.; CÂNDIDO, J. F.; FREITAS, T. R. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*. v. 16, n. 4, p. 819-838.

TEJERA, N.; ARAÚZ, G.; LEÓN, V.; RODRÍGUEZ, A. R.; GONZÁLEZ, P.; BERMÚDEZ, S.; MORENO, R. 1999. Primer registro del zorro cangrejero *Cercocyon thous* (Carnivora: Canidae) para Panamá. *Scientia* (Panamá), vol.14, n.2, p. 103-107.

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W.1999. Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, v. 22, n. 22, p. 4673-4680,

TOMAS, W. M.; RODRIGUES, F. H. G e FUSCO, R. 2004. Técnicas de Levantamento e Monitoração de populações de Carnívoros. *Embrapa Pantanal*. Corumbá, vol. 21, no. 7, p. 03-35.

TROMBULAK, Stephen C.; FRISSELL, Christopher A. 2000. Review of ecological effects of roads on terrestrial and aquatic communities. *Conservation biology*, v. 14, n. 1, p. 18-30.

VALIERE N. 2002. Gimlet: a computer program for analyzing genetic individual identification data. *Mol Ecol Notes*. vol. 2, p. 377–379.

VAN OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol Ecol Notes*. vol. 4, p. 535–538.

VARSHNEY, K. R.; GRANER, A.; SORRELLS, E. 2005. Genic microsatellite markers in plants: features and applications. *Elsevier*. vol. 23, no.1, p.48.

VIEIRA, E. M.; PORT, D. 2007. Niche overlap and resource partitioning between two sympatric fox species in southern Brazil. *Journal of Zoology*, v. 272, n. 1, p. 57-63.

VILÀ, C.; AMORIM, I. R.; LEONARD, J. A.; POSADA, D.; CASTROVIEJO, J.; PETRUCCI-FONSECA, F.; WAYNE, R. K. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, v. 8, n. 12, p. 2089-2103.
WANG, W.; LUO, Q.; GUO, H.; BOSSIER, P.; STAPPEN, G. V.; SORGELOOS, P.; XIN, N.; SUN, Q.; HU, S.; YU, J. 2008. Phylogenetic Analysis of Brine Shrimp (*Artemia*) in China Using DNA Barcoding. *Geno. Prot. Bioinfo. China*, vol. 6, no. 3–4, p. 155-162.

WEIR B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. vol. 38, p. 1358–1370.