

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Programa de Pós Graduação em Ciências Ambientais e Conservação

Diversidade genética e estrutura geográfica de lobos-guarás  
(*Chrysocyon brachyurus*) no Estado do Rio de Janeiro.

Vitor Oliveira da Costa

2020

Diversidade genética e estrutura geográfica de lobos-guarás  
(*Chrysocyon brachyurus*) no Estado do Rio de Janeiro.

Vitor Oliveira da Costa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, NUPEM, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Orientador: Pablo Rodrigues Gonçalves

Coorientador: Wiliam Corrêa Tavares

Macaé

Agosto de 2020.

Diversidade genética e estrutura geográfica de lobos-guarás (*Chrysocyon  
brachyurus*) no Estado do Rio de Janeiro.

Vitor Oliveira da Costa

Orientador: Pablo Rodrigues Gonçalves

Coorientador: Wiliam Corrêa Tavares

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-graduação em Ciências Ambientais e Conservação, NUPEM, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais e Conservação.

Banca examinadora:

---

Presidente, Prof. Dr. Pablo Rodrigues Gonçalves

---

Dra. Cibele Rodrigues Bonvicino

---

Dr. Fabiano Rodrigues de Melo

Macaé

Agosto de 2020.

## Ficha catalográfica

|             |  |
|-------------|--|
| X19m        | Costa, Vitor Oliveira<br>Diversidade genética e estrutura geográfica de lobos-guarás<br>( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) no Estado do Rio de Janeiro.<br>Vitor Oliveira da Costa. -- Rio de Janeiro, 2020.<br>101 f.<br>Orientador: Pablo Gonçalves.<br>...Coorientador: Wiliam Corrêa Tavares<br>Dissertação (mestrado) - Universidade Federal<br>do Rio de Janeiro, Campus Macaé, Programa de Pós<br>Graduação em Ciências Ambientais e Conservação,<br>2016.<br>1. Norte Fluminense . 2. genética . 3. conservação . 4.<br>fluxo gênico . 5. Mata Atlântica . I. Gonçalves, Pablo, orientador |
| II. Título. |  |

## Agradecimentos

Esta jornada de desenvolvimento pessoal não teria sido possível se não fosse pela presença de algumas pessoas que me acompanharam durante os anos de aplicação a esta Dissertação. Minha família foi extremamente importante em diversos momentos, principalmente minha mãe Suze Maria que me amparou e apoiou do início da graduação até o presente momento. Minha namorada e companheira Mariana Sampaio foi sem dúvida a que esteve mais perto de mim durante todo este processo e superou junto comigo todos os tipos de desafios que alguém que está dedicado a um trabalho acadêmico sério pode passar durante sua jornada acadêmica. Esta oportunidade também não seria possível sem a validação e apoio ao projeto por parte do programa de pós-graduação PPG-CiAC e pelo fomento financeiro em forma de bolsa oferecido pela CAPES

Também merecem um lugar especial neste texto um enorme pedido de agradecimento ao meu orientador Pablo Rodrigues Gonçalves, que não só confiou a mim este projeto de grande importância como esteve ao meu lado sempre que precisei. Mesmo sendo muito atarefado em suas responsabilidades como docente e orientador de outros alunos. A capacidade empática do professor Pablo em entender seus alunos emocionalmente tornam suas conversas a respeito de metas de forma objetiva e conciliatória, deixando o clima entre os alunos sempre agradável e gratificante em estar presente. Foi um enorme prazer conviver com o professor Pablo em todos os momentos que estivemos na companhia um do outro.

O professor William Tavares, apesar da distância e contato mais reduzidos, sempre esteve presente quando fui procurá-lo, sendo recebido por ele de forma muito atenciosa e simpática. A satisfação do professor em William em ensinar e ajudar, sem dúvidas me inspiraram a reconhecer de forma mais profunda o papel da orientação e docência. Foi também de grande importância para idealização e produção deste projeto a colaboração com as amostras de lobo-guará cedidas pela professora Cecilia Bueno e pelo professor Michel Faria. Portanto, gostaria de agradecê-los enormemente pelas amostras fornecidas e pela confiança de execução do projeto.

Agradeço à Profa. Dr. Carla Zilberberg pelas valiosas críticas e sugestões na revisão pré-banca, e aos Drs. Fabiano Rodrigues de Melo e Cibele Rodrigues Bonvicino por aceitarem compor minha banca de defesa, dando suas valiosas críticas e contribuições.

Às amizades que foram construídas ao longo deste trajeto eu só tenho a agradecer pelos momentos que passamos juntos. Ao grande amigo Hélio Secco, que tive mais contato dentro e fora do mestrado, eu só tenho a agradecer por todo apoio e conversas que tivemos a respeito de perspectivas futuras e sobre nossos respectivos trabalhos. Estes momentos são na minha opinião uns dos mais empolgantes e motivacionais para fazer o melhor trabalho possível e foram fundamentais para decisão de adentrar ao mestrado. Ao grande companheiro de laboratório Hudson Lemos, que me ensinou praticamente tudo que sei da bancada molecular, deixo aqui meu muito obrigado pelos ensinamentos e grande amizade que com certeza foram importantes para grande parte da produção técnica desenvolvida na construção desta dissertação.

À Caryne Braga e sua afiada perspectiva crítica ao avaliar trabalhos e apresentações, muito obrigado pelas colaborações e críticas feitas durante minhas apresentações para o grupo do laboratório. Sua visão sempre foi de grande ajuda para que este trabalho ficasse cada vez melhor. Não há como encerrar este agradecimento sem também dizer obrigado a todos os integrantes do laboratório de Mastozoologia do NUPEM/UFRJ, cujo convívio seja em campo, congresso ou na sala do orientador a companhia sempre me foi agradável tornando os momentos em que estivemos juntos essenciais para melhorar meu dia e esquecer pelo menos por alguns momentos muitos problemas que vinham acontecendo em minha vida pessoal familiar, portanto, meu muito obrigado a todos vocês.

## Sumário

|   |      |
|---|------|
| Agradecimentos .....  | v    |
| Lista de Figuras.....   | viii |
| Lista de Tabelas .....  | ix   |
| Resumo.....   | x    |
| Abstract .....  | xi   |
| 1. Introdução.....  | 12   |
| 1.1 Estruturação genética de populações naturais.....   | 12   |
| 1.2 O lobo-guará.....   | 13   |
| 1.3 Distribuição geográfica: mudanças recentes ou antigas?.....   | 15   |
| 2. Objetivos.....   | 19   |
| 2.1 Objetivo Geral .....  | 19   |
| 2.2 Objetivos específicos .....   | 19   |
| 3. Materiais e Métodos .....  | 19   |
| 3.1 Amostras populacionais .....  | 19   |
| 3.2 Extração de DNA.....  | 20   |
| 3.3 Sequenciamento e alinhamento .....  | 23   |
| 3.4 Inferência de redes haplotípicas .....  | 24   |
| 3.5 Índices de diversidade genética e Análise Molecular de Variância .....                                | 24   |
| 3.6 Análises de “Mismatch distribution” .....   | 25   |
| 4. Resultados.....  | 26   |
| 4.1 Redes haplotípicas .....  | 26   |
| 4.2 Diversidade genética e divergência interpopulacional .....  | 29   |
| 4.3 Análise Molecular de Variância (AMOVA) .....  | 33   |
| 4.4 Mismatch distribution .....   | 33   |
| 5. Discussão .....  | 35   |
| 5.1 Lobo-guará no litoral Norte do Rio de Janeiro: dispersão recente ou presença antiga? .....            | 35   |
| 5.2 Fatores históricos que teriam impedido o estabelecimento de lobos-guarás na costa há mais tempo ..... | 38   |
| 5.3 Conservação do lobo-guará na Mata Atlântica costeira.....   | 40   |
| 6. Referências Bibliográficas.....  | 42   |
| Apêndices .....   | 50   |

## Lista de Figuras

|  |    |
|--|----|
| Figura 1: Indivíduo de lobo-guará em cativeiro no zoológico Beardsley nos Estados Unidos. Autor: Sage Ross. ....   | 14 |
| Figura 2: Mapa da área de potencial distribuição estável para lobo-guará ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> , Illiger, 1815). (a) Áreas estáveis do LGM (Último Glacial Máximo a 21000 anos atrás até o presente; (b) Estabilidade, retração e expansão de áreas em relação a distribuição presente na América do Sul) (Modificado de: TORRES et al. 2013).....  | 18 |
| Figura 3: Localidades e grupos amostrais (populações) de onde foram coletadas as amostras de lobo-guará. A distribuição das fisionomias reconhecidas como Mata Atlântica e Savana Tropical seguem a definição de OLSON et al. (2001). Cada círculo representa a coordenada de uma ou mais amostras cuja localidade encontra-se numerada no mapa. Círculos da mesma cor indicam localidades pertencentes à mesma população. ....    | 20 |
| Figura 4: Rede haplotípica do lobo-guará baseada em sequências de D-loop e frequência dos haplótipos nas amostras populacionais. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é equivalente à sua frequência na espécie. Cada cor representa uma amostra populacional (mapa na Figura 3), as linhas representam o parentesco entre haplótipos, e os traços o número de mutações que diferenciam haplótipos próximos.....     | 27 |
| Figura 5: Rede de haplótipos de indivíduos de lobo-guará oriundos da Mata Atlântica. Os gráficos de pizza representam a frequência da diversidade dos haplótipos em cada localidade. Aqui as cores das localidades da Zona da Mata representam subpopulações menores (Centro Fluminense – RJ e Zona da Mata mineira) para fornecer uma maior resolução da variação espacial na frequência e composição haplotípica das amostras. . | 29 |
| Figura 6: Boxplot das relações entre $F_{st}$ e distância geográfica das populações de lobo-guará apresentadas na Figura 3.....  | 32 |
| Figura 7: Correlação entre o $F_{st}$ e a distância geográfica entre populações: a) em vermelho estão destacadas as comparações envolvendo a população do Norte Fluminense com as demais. b) em verde estão destacadas as comparações entre a população da Zona da Mata e as demais.....   | 33 |
| Figura 8: Distribuições das diferenças par-a-par entre haplótipos de lobo-guará ( <i>Chrysocyon brachyurus</i> ) dos grupos populacionais Cerrado_Bolívia e Cerrado_Mata_Atlântica. Linhas tracejadas representam as distribuições observadas e as linhas contínuas representam as distribuições esperadas a partir do modelo de expansão demográfica.....   | 34 |



## Lista de Tabelas

|   |    |
|---|----|
| Tabela 1: Espécimes de <i>Chrysocyon brachyurus</i> cujos dados genéticos foram produzidos no presente estudo. A coluna ID refere-se à numeração correspondente às localidades mapeadas na Figura 3.....  | 22 |
| Tabela 2: Localidades amostrais e populações de <i>Chrysocyon brachyurus</i> cujos dados genéticos foram obtidos por GONZÁLEZ et al. (2015) e que foram analisadas no presente estudo. A coluna ID é referente à numeração correspondente às localidades mapeadas na Figura 3. .... | 23 |
| Tabela 3: Amostras populacionais de lobo-guará analisadas e respectivos haplótipos compartilhados e exclusivos. Número de indivíduos portadores de cada haplótipo está entre parênteses.....  | 28 |
| Tabela 4: Parâmetros de diversidade genética das populações de lobo-guará baseados em sequências do D-Loop. SD: desvio-padrão. ....   | 30 |
| Tabela 5: Valores de $F_{st}$ entre as populações representadas na Figura 2 e com amostragem superior a cinco indivíduos. Valores em negrito possuem $P < 0.005$ . ....   | 31 |
| Tabela 6: Níveis hierárquicos de variação genética obtidos na AMOVA entre populações agrupadas em Mata Atlântica e Savana Tropical. ....  | 33 |
| Tabela 7: Parâmetros do modelo de expansão demográfica estimados para diferentes grupos populacionais de lobo-guará analisados por <i>mismatch distribution</i> .....   | 35 |

## Resumo

Diversidade genética e estrutura geográfica de lobos-guarás (*Chrysocyon brachyurus*) no Estado do Rio de Janeiro. Vitor Oliveira da Costa

Orientador: Pablo Rodrigues Gonçalves

Coorientador: Wiliam Corrêa Tavares

O lobo-guará, *Chrysocyon brachyurus*, é uma espécie ameaçada de extinção no Brasil e o representante de maior porte corporal da Família Canidae na América do Sul. Sua presença em regiões litorâneas do Estado do Rio de Janeiro tem sido recentemente documentada, levantando questões sobre sua distribuição e sua caracterização como uma espécie exótica na Mata Atlântica. O presente estudo avaliou duas hipóteses que buscam explicar a ocorrência do lobo-guará no litoral norte do Estado do Rio de Janeiro, com base em dados genéticos: (Hipótese 1) os lobos-guará ocorrentes no litoral do Norte Fluminense são oriundos de uma dispersão ou expansão demográfica recente advinda do interior, ou (Hipótese 2) os lobos-guarás no Norte Fluminense representam uma população antiga e geneticamente diferenciada. Para elucidar estas questões foram analisadas sequências da região hiper variável de controle (D-loop) do DNA mitocondrial de 112 espécimes provenientes de 24 localidades representando 10 populações de diferentes regiões do Brasil, Argentina, Uruguai e Bolívia. Foram estimados parâmetros de diversidade e divergência molecular, redes haplotípicas, analisadas diferenças populacionais por AMOVA, e avaliados sinais de expansão demográfica por “mismatch distribution”. 15 haplótipos foram encontrados, sendo um deles inédito. Os níveis de diversidade nucleotídica nas populações da Mata Atlântica foram mais baixos do que nas populações do interior. Os resultados não indicam estruturação geográfica ou divergência genética suficiente para que a população litorânea possa ser considerada isolada ou antiga. Também não há indícios de estruturação genética entre populações da costa e do interior. Há correlação positiva entre divergência genética e a distância geográfica entre populações, corroborando um modelo de isolamento pela distância e os sinais de expansão demográfica mais recente são mais evidentes em comparações envolvendo populações da Mata Atlântica e do Cerrado. Sendo assim, os lobos-guarás no litoral Norte Fluminense são oriundos de uma dispersão recente, contrariando as predições de modelos de paleodistribuição da espécie e da Hipótese 2.

Palavras-chaves: Norte Fluminense; genética; conservação; fluxo gênico; Mata Atlântica.

## Abstract

The maned wolf, *Chrysocyon brachyurus*, is an endangered species in Brazil and the largest body representative of the Canidae Family in South America. Its presence in coastal regions of the state of Rio de Janeiro has recently been documented, raising questions about its distribution and its characterization as an exotic species in the Atlantic Forest. The present study evaluated two hypotheses that seek to explain the occurrence of the maned wolf on the northern coast of the state of Rio de Janeiro, based on genetic data: (Hypothesis 1) the maned wolves that occur on the northern coast of Rio de Janeiro are from a dispersion or recent demographic expansion from the interior, or (Hypothesis 2) the maned wolves in Northern Fluminense represent an old and genetically differentiated population. To elucidate these questions, we analyzed sequences of the mitochondrial DNA control variable (D-loop) of 112 specimens from 14 sampling localities, and 10 populations from different regions of Brazil, Argentina, Uruguay and Bolivia were analyzed. We estimated molecular diversity and divergence parameters haplotype networks, assessed population structure by AMOVA and tested for signs of demographic expansion using mismatch distribution analysis. 15 haplotypes were recovered, one of them novel. The levels of nucleotide diversity in populations of Atlantic Forest were lower than in the populations of the interior. The results do not indicate enough geographic structure or genetic divergence for the coastal population be considered isolated or old. There is also no evidence of genetic structure between coastal and inland populations. There is a positive correlation between genetic divergence and the geographical distance between populations, corroborating a model of isolation by distance and the more recent signs of demographic expansion are more evident in comparisons involving populations from the Atlantic Forest and the Cerrado. Thus, the presence of maned wolves on the Northern littoral of Rio de Janeiro is due to a recent dispersion, contrary to the predictions of paleodistribution models and of Hypothesis 2.

Keywords: Norte Fluminense; genetics; conservation; gene flow; Atlantic forest.

# 1. Introdução

## 1.1 Estruturação genética de populações naturais

Na década de 1930, Sewall Wright e Ronald A. Fisher foram os pioneiros no estudo de evolução em populações modeladas a partir de informações genéticas (WRIGHT, 1931; FISHER, 1930). Desde então, o ramo da genética de populações vem se popularizando e aprimorando suas capacidades técnicas e teóricas para interpretar, à luz da evolução molecular, quais são os fatores responsáveis pela estruturação de populações na natureza (SAETRE & RAVINET, 2019; HEY & MACHADO, 2003). Compreender de forma clara como as populações naturais estão estruturadas é um grande desafio, dada a complexidade dos processos associados a estas populações. Dentre estes, temos 1) a variação de tamanho populacional ao longo do tempo; 2) variação da densidade; 3) mudanças na localização espacial, e 4) fragmentação ou união de populações devido ao surgimento e ao desaparecimento de barreiras geográficas (HEY & MACHADO, 2003). Entretanto, existem algumas abordagens metodológicas que podem nos ajudar a mensurar as diferenças genéticas entre as populações modeladas. Sendo assim, podemos inferir como as populações estão estruturadas espacialmente e inferir sua histórica demográfica. (SLATKIN, 1987; HEY & MACHADO, 2003).

As ações antropogênicas, como potencial modificadoras do meio ambiente, através de atividades industriais e agropecuárias, podem ser responsáveis pela movimentação das espécies para além de suas áreas nativas e podem causar distúrbios ecológicos, afetando negativamente a diversidade biológica (VITOUSEK et al. 1997). Dentre os possíveis impactos causados pela ação humana, a perda e fragmentação de habitat são sérias ameaças à biodiversidade, sendo também responsáveis por modificar a distribuição das espécies espacialmente (VÁZQUEZ, 2002; FAHRIG, 1997). Ambos impactos podem ocorrer de forma natural, mas, quando motivados por intervenção humana, estes efeitos geralmente têm proporções maiores (VITOUSEK et al. 1997), levando a uma gradativa queda populacional até uma eventual extinção (FAHRIG, 1997). Portanto, estudos que buscam elucidar as implicações destes impactos possuem grande importância para preservação da biodiversidade.

As restrições às espécies proporcionadas por estes impactos podem causar a perda de variabilidade genética devido ao isolamento populacional (JOHANSSON, 2007), que tende a acelerar o efeito de deriva genética dentro de uma população (SLATKIN, 1987). Por outro lado,

é plausível que espécies que possuam elevada capacidade de dispersão tenham a chance de colonizar novas áreas, desde que sua plasticidade adaptativa permita esta exploração. Como um potencial exemplo deste caso temos o lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815). Este canídeo de grande porte tem sido frequentemente encontrado em habitats da América do Sul onde ele aparentemente não ocorria antes, levando alguns autores a sugerir uma possível expansão demográfica recente para áreas costeiras (TROLLE et al. 2007; QUEIROLO et al. 2011). Contudo, apenas recentemente a história demográfica do lobo-guará tem sido explorada por estudos genéticos (ex. GONZÁLEZ et al., 2015). Portanto, outras hipóteses poderiam explicar a ocorrência da espécie em áreas costeiras (XAVIER et al. 2017). Este estudo se propõe a avaliar estas hipóteses utilizando dados genéticos moleculares. Mas antes de apresentá-las, alguns aspectos importantes sobre a biologia, conservação e distribuição geográfica do lobo-guará precisam ser considerados.

## 1.2 O lobo-guará

*Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) é popularmente conhecido no Brasil como lobo-guará, ou guará, e representa o maior canídeo vivo na América do Sul (DIETZ, 1984; RODDEN, 2004). Os canídeos da América do Sul constituem um grupo monofilético, a subtribo Cerdocyonina (BARDELEBEN et al. 2005; LINDBLAD-TOH et al. 2005; PERINI et al. 2010). O registro fóssil associado ao grupo sugere uma diversificação inicial na América do Norte e a posterior dispersão de pelo menos duas principais linhagens descendentes para a América do Sul após o estabelecimento do Istmo do Panamá, por volta de 3,5 milhões de anos atrás. Reconstruções filogenéticas com base em dados moleculares e morfológicos sugerem que uma destas linhagens deu origem aos gêneros vivos de raposas sulamericanas e cachorros-do-mato *Lycalopex*, *Atelocynus* e *Cerdocyon*, enquanto a outra se diferenciou nos gêneros do cachorro-vinagre *Speothos* e do lobo-guará *Chrysocyon*, há aproximadamente 3 milhões de anos (BARDELEBEN et al. 2005; PERINI et al. 2010; ZRZAVÝ et al. 2018). O gênero *Chrysocyon* é monotípico e sua elevada divergência evolutiva dentre os demais canídeos sulamericanos, conforme apontada pelos estudos filogenéticos, faz de *C. brachyurus* um elemento importante para a conservação da diversidade filogenética de carnívoros da América do Sul.

O lobo-guará chama a atenção devido às suas características peculiares, sendo facilmente distinguível dos demais canídeos. Seus membros são longos, orelhas bem amplas, e possui uma pequena juba negra que se estende da nuca à região escapular, (DIETZ, 1984, 1985; RODDEN, 2004) (Figura 1). Tais características, são importantes para a sobrevivência da espécie em habitats da Savana Tropical, no interior da América do Sul, que inclui o Cerrado brasileiro (DIETZ, 1984; RODDEN, 2004). A espécie é conhecida por ter um hábito crepuscular-noturno, solitário ou monogâmico facultativo, com área de vida de 6,0 a 115,0 km<sup>2</sup> (DIETZ, 1984; CHEBEZ, 1994; MANTOVANI, 2007; AZEVEDO, 2008, RODDEN, 2014). Sua dieta no Cerrado se constitui de frutos, em sua maioria o fruto da lobeira (*Solanum lycocarpum*), e de pequenos vertebrados. Diante desta alimentação, é relevante ressaltar a lobeira como uma das principais fontes de alimento do lobo-guará, podendo ser utilizada como bioindicadora de habitats favoráveis à presença da espécie (MOTTA-JUNIOR et al. 2002). O consumo frequente de recursos vegetais e sua ampla capacidade de dispersão em áreas abertas (COELHO et al. 2008) conferem ao lobo-guará um importante papel na manutenção da paisagem devido ao seu potencial dispersor de sementes (MOTTA-JUNIOR et al. 2002).



Figura 1: Indivíduo de lobo-guará em cativeiro no zoológico Beardsley nos Estados Unidos. Autor: Sage Ross.

Atualmente, o lobo-guará encontra-se sob ameaça de extinção, na categoria Vulnerável (VU) para o território brasileiro (BRASIL, 2018), e na categoria de Quase Ameaçado (NT) para o mundo (IUCN, 2015). De acordo com a IUCN, atualmente as principais ameaças ao *C. brachyuyus* são relacionadas a impactos gerados por ações antropogênicas que causam perda de habitat, especialmente pela atividade extensiva agropecuária no Cerrado, serviços de transporte como rodovias e ferrovias, que impactam as populações por meio de atropelamento; uso de recursos naturais, proveniente da caça ilegal; e doenças causadas por espécies invasoras e vírus. De forma mais detalhada, o plano de conservação do lobo-guará (PAULA et al. 2008) aponta como algumas ameaças à espécie: a falta de políticas públicas direcionadas à conservação do Cerrado, um dos biomas mais ameaçados do Brasil, e alteração do habitat a partir de frequentes fragmentações decorrentes da expansão agrícola e urbana. Mais recentemente, PAULA et al. (2013) também reforçam, além da perda de habitat, a perda de indivíduos devido a conflitos com humanos (caça), e os atropelamentos como fatores importantes para o declínio populacional da espécie.

### **1.3 Distribuição geográfica: mudanças recentes ou antigas?**

Apesar das maiores populações do lobo-guará estarem no território brasileiro, a espécie também se distribui na Argentina, Paraguai, Bolívia, Peru e Uruguai (DIETZ, 1984; MOTTA-JUNIOR et al. 2002). Historicamente, o lobo-guará tem sido associado às fisionomias savânicas do interior da América do Sul, coletivamente chamadas de Savanas Tropicais (OLSON et al. 2001), e que incluem o Cerrado no Brasil. Os ambientes de Savana Tropical possuem como características paisagísticas formações arbustivas e campestres, com planícies úmidas, campos rupestres, e relictos de florestas decíduais e semidecíduais (COELHO, et al. 2008; RODDEN, 2004, 2014; EMMONS, 2012; DIETZ, 1985). Contudo, os registros cada vez mais numerosos nos últimos 10 anos da presença do lobo-guará fora da Savana Tropical, mais especificamente na Mata Atlântica da região sudeste, têm provocado revisões sobre sua distribuição moderna e suscitado questões sobre a influência humana na extensão de ocorrência da espécie (QUEIROLO et al. 2011; PINTO et al. 2013).

Na última década, lobos-guarás têm sido frequentemente documentados em áreas degradadas de Mata Atlântica (BERETA et al. 2017; XAVIER et al. 2017; FARIA et al. 2020). Estas áreas modificadas assemelham-se paisagisticamente com habitats de Cerrado encontrados no interior do Brasil. Considerando a alta capacidade de dispersão da espécie, atrelada à

degradação da Mata Atlântica e criação de habitats não-florestais na costa, a ocorrência costeira de lobos-guarás sido interpretada por diversos autores como resultado de sua dispersão recente para a costa atlântica em busca de recursos (COELHO et al. 2008; MOTTA-JUNIOR et al. 2002; SANTOS et al. 2003). Os registros inusitados da espécie próximos ao litoral chamaram atenção até mesmo da comunidade não-acadêmica, como a revista “Terra da Gente” com um texto publicado por Dimas Marques em 2012, intitulado “Os lobos invadem a praia” que relata um atropelamento de lobo-guará em Ubatuba, litoral norte de São Paulo, que preserva uma vegetação florestal típica de Mata Atlântica. A ocorrência cada vez mais litorânea do lobo-guará tem sido documentada com uma frequência crescente por diversos estudos (QUEIROLO et al. 2011; BERETA et al. 2017; XAVIER et al. 2017; ECKHARDT, 2016). Dentre estes registros, destacam-se aqueles documentados por XAVIER et al. (2017) revelando a presença de sete indivíduos no litoral Norte Fluminense de 2013 a 2015. Estes podem ser considerados os registros mais litorâneos da espécie (a menos de 11km do mar) comprovados por espécimes-testemunho.

A maioria dos registros costeiros da espécie tem sido explicada por meio de uma hipótese de dispersão recente dos lobos-guarás do Cerrado para a Mata Atlântica costeira (BERETA et al. 2017; PINTO et al. 2013; XAVIER et al. 2017; FARIA et al. 2020). Segundo QUEIROLO et al. (2011), este processo de dispersão seria facilitado pela criação de matrizes campestres em áreas originalmente cobertas por florestas costeiras. De fato, a Mata Atlântica no litoral Fluminense é atualmente constituída por fragmentos florestais, que foram e continuam sendo fragmentados ou reduzidos pela ação humana, imersos em uma matriz de ambientes abertos antropogênicos destinados à agropecuária, pasto e rodovias (RIBEIRO et al. 2009). Contudo, a literatura carece de avaliações genéticas que corroborem essa afirmação, levando ao questionamento a respeito da antiguidade e origem geográfica das populações de lobos-guarás presentes em regiões litorâneas.

Uma hipótese alternativa à hipótese de dispersão recente é a de que os lobos-guarás ocorrentes no litoral seriam parte de uma população nativa bem estabelecida em enclaves de formações abertas na Mata Atlântica costeira, especialmente na região Norte Fluminense. Essa hipótese alternativa foi levantada por XAVIER et al. (2017), e parte do pressuposto de que formações abertas têm ocorrido naturalmente no Norte Fluminense há pelo menos 7.000 anos, de acordo com reconstruções paleoambientais e modelagens de paleodistribuição (LUZ et al. 2011; TORRES et al. 2013). LUZ et al. (2011), a partir de análises palinológicas, sugerem que



drásticas mudanças na distribuição das florestas úmidas do Norte Fluminense ocorreram ao longo do Holoceno. Estas alterações foram causadas naturalmente por regressão do nível do mar, provocando expansão da costa brasileira. Tais mudanças teriam proporcionado substituições das formações florestais presentes na Mata Atlântica por áreas de formações abertas. Essas variações ambientais relacionadas ao nível do mar dificultaram o estabelecimento de vegetações florestais, causando a redução de áreas florestais e a sua substituição por vastas áreas campestres. Além disso, estudos de modelagem de nicho espacial e climático sugerem que o Norte Fluminense abrigaria condições propícias para a ocorrência de lobos-guarás durante os últimos 21.000 anos (TORRES et al. 2013) (Figura 2). Portanto, como alternativa à hipótese de dispersão ou expansão demográfica recente, surge a hipótese de que a população litorânea de *C. brachyurus* no Norte Fluminense seja mais antiga do que a influência antropogênica recente, e de que a criação de formações abertas por meio do desmatamento da Mata Atlântica nos últimos 100 anos tenha reconectado as populações costeiras e interioranas da espécie.

GONZÁLEZ et al. (2015) e MANNISE et al. (2017) forneceram as únicas análises genéticas evolutivas abrangentes de lobos-guarás na América do Sul, até o momento. Estes autores sugerem que as populações de lobo-guará na Savana Tropical possuem níveis moderados de variabilidade genética se comparados com outros canídeos ameaçados. Suas estimativas genéticas indicam diferenças mais acentuadas quando avaliadas a partir de marcadores mitocondriais apontando quatro grupos populacionais (Brasil, Uruguai, Bolívia e Argentina) ou apenas dois grupos (Bolívia – Brasil, Argentina, Uruguai), dependendo do marcador molecular utilizado. As análises destes autores indicam que as populações modernas de lobos-guarás no Brasil são oriundas de uma expansão demográfica durante o último Glacial Máximo (GONZÁLEZ et al 2015). Contudo, ambos trabalhos não abordaram o problema da ocorrência da espécie na Mata Atlântica e ressaltaram a necessidade de ampliação da base amostral para reconhecer de forma mais precisa a estruturação demográfica da espécie. Neste sentido, o presente estudo fornece informações importantes a partir de amostras de localidades da Mata Atlântica que ainda não haviam sido avaliadas na literatura até o presente momento.

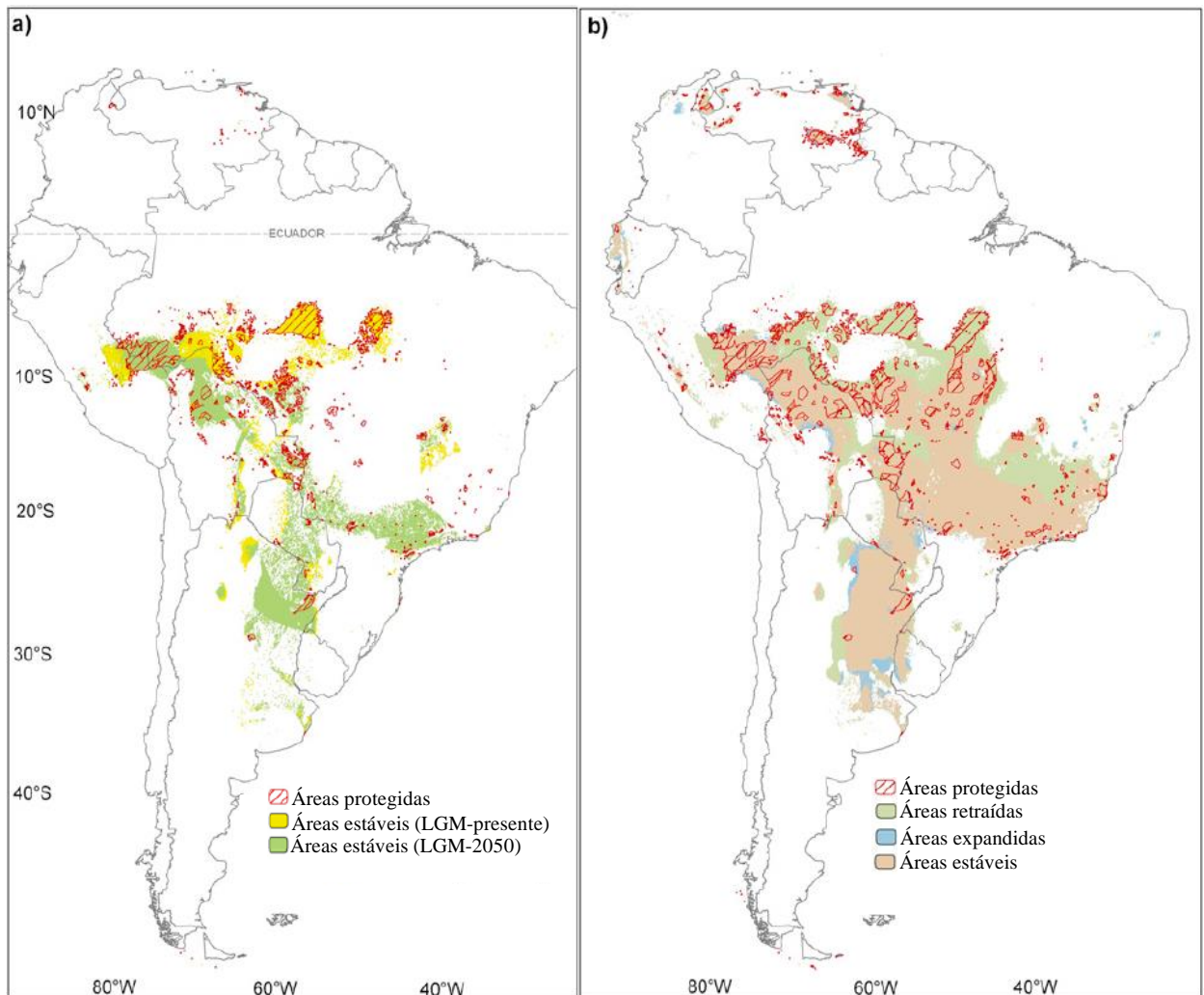


Figura 2: Mapa da área de potencial distribuição estável para lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815). (a) Áreas estáveis do LGM (Último Glacial Máximo a 21000 anos atrás até o presente; (b) Estabilidade, retração e expansão de áreas em relação a distribuição presente na América do Sul) (Modificado de: TORRES et al. 2013).

Para avaliar a variabilidade genética representada pelos espécimes analisados no presente estudo foi utilizado uma abordagem metodológica baseada na teoria da coalescência que avalia através de modelos estatísticos matemáticos os padrões de variações nas sequências de DNA, permitindo-nos inferir os níveis de variabilidade genética dentro e entre as populações (HEY & MACHADO, 2003). Este tipo de diagnóstico feito por diversos marcadores moleculares tem a capacidade de identificar estruturas populacionais ao longo do tempo, acompanhando sua distribuição e colaborando para o manejo e conservação das espécies (SCHWARTZ et al. 2006). A escolha de um marcador molecular é fundamental para poder interpretar corretamente os resultados a serem produzidos e varia de acordo com as hipóteses que são testadas. As análises de marcadores moleculares nucleares e mitocondriais

têm a capacidade de reconstruir a história das populações ao longo do tempo (SCHWARTZ et al. 2006). No presente estudo foi escolhido o uso do marcador D-loop, uma região de controle do DNA mitocondrial, com taxa de substituição estimada em cinco vezes mais rápida do que o restante do DNA mitocondrial, principalmente no caso de mamíferos (AVISE, 2000; AQUADRO & GREENBERG, 1983). Portanto, o uso deste marcador tem potencial suficiente para testar as hipóteses de que (i) os lobos-guará ocorrentes no litoral do Norte Fluminense são oriundos de uma dispersão recente advinda do interior, ou que (ii) a os lobos-guarás no Norte Fluminense representam uma população antiga e geneticamente diferenciada.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar se os lobos-guará ocorrentes na costa fluminense se dispersaram recentemente do interior, ou se representam uma população costeira mais antiga.

### 2.2 Objetivos específicos

- Estimar a magnitude e a distribuição da variabilidade genética das populações.
- Avaliar se a estruturação geográfica da espécie coincide com os biomas de Mata Atlântica e de Savana Tropical, incluindo novos dados sobre as populações mais costeiras.
- Estimar a divergência e conectividade genética entre as populações costeiras da Mata Atlântica e interioranas do Cerrado, com foco nas populações fluminenses.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1 Amostras populacionais

Os dados utilizados nas análises foram obtidos a partir de amostras da Bolívia, Uruguai, Argentina e Brasil (Figura 3). As análises foram baseadas em 29 amostras individuais inéditas de espécimes de lobo-guará obtidas no presente estudo (Tabela 1), e em 85 sequências previamente publicadas por GONZÁLEZ et al. (2015), disponíveis no GenBank (Tabela 2). 19 amostras individuais foram cedidas pela Dra. Cecília Bueno (Universidade Veiga de Almeida), uma foi cedida pelo Dr. Hélio Secco (NUPEM/UFRJ), e duas foram cedidas pelo Dr. Michel Barros Faria (UEMG-Carangola). Os espécimes associados a estas amostras de tecido encontram-se depositados no Instituto Nacional da Mata Atlântica, Museu Nacional e Coleção Zoológica da

UEMG. As demais amostras foram obtidas da coleção de tecidos do NUPEM, a partir de amostras de fígado ou músculo de espécimes atropelados recebidos entre 2013 e 2019, resultando em um acervo final total de 114 amostras analisadas no presente estudo (Apêndice 1).

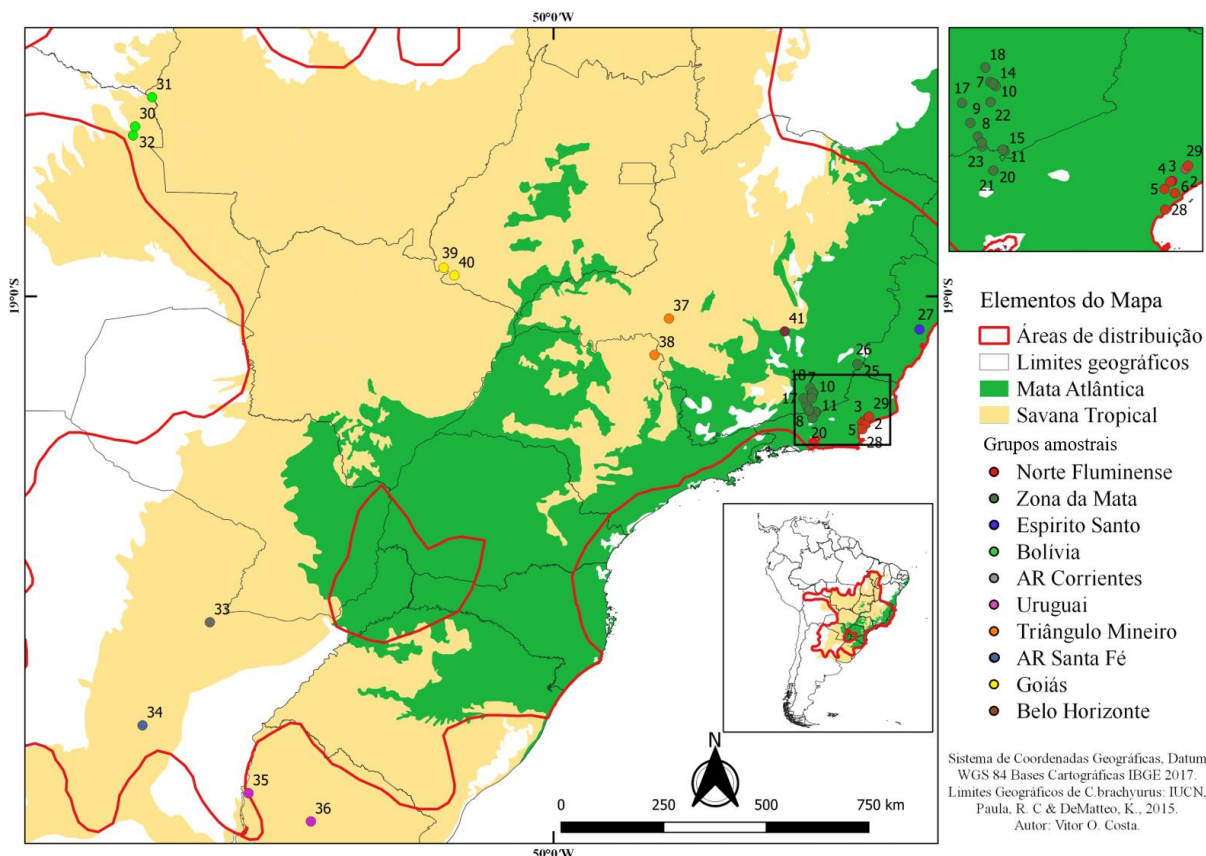


Figura 3: Localidades e grupos amostrais (populações) de onde foram coletadas as amostras de lobo-guará. A distribuição das fisionomias reconhecidas como Mata Atlântica e Savana Tropical seguem a definição de OLSON et al. (2001). Cada círculo representa a coordenada de uma ou mais amostras cuja localidade encontra-se numerada no mapa. Círculos da mesma cor indicam localidades pertencentes à mesma população.

As localidades contendo menos de cinco espécimes foram agrupadas com outras localidades geograficamente próximas para compor grupos amostrais maiores ou “populações”, favorecendo a estimativa mais apropriada de parâmetros de diversidade intrapopulacional. As populações formadas pelos agrupamentos das localidades com base em suas distâncias geográficas encontram-se representadas no mapa da Figura 3 por pontos da mesma cor. As localidades de amostragem encontram-se relacionadas nas Tabelas 1 e 2.

### 3.2 Extração de DNA

As 29 amostras individuais processadas neste estudo tiveram seu DNA total extraído

com uso adaptado do protocolo de fenol-clorofórmio descrito por KÖCHL et al. (2005) e em seguida foram amplificadas e sequenciadas para a região de controle do mtDNA (*D-loop*). Alíquotas dos tecidos foram separadas da amostra original, secas em uma estufa à 37°C, em seguida imersas em 450µl de tampão lise, 50µl de dodecilsulfato de sódio (SDS) a 10% e 10µl de proteinase-k 20 mg/ml, sendo submetidas à agitação em um termobloco durante aproximadamente 12 horas a 56°C. Após a digestão dos tecidos, foi adicionado 500µl de fenol pH 8.0, realizada a homogeneização das amostras e as mesmas foram centrifugadas por 15 minutos em uma rotação de 16.000g. Após centrifugação, foi retirado todo fenol presente nas amostras e inseridos 500µl de clorofórmio, em seguida foi feita a homogeneização e centrifugação por 15 minutos a 16.000g novamente. A partir da retirada do clorofórmio as amostras foram centrifugadas por mais 15 minutos a 16.000g e trocadas de tubo, transferindo somente o sobrenadante e descartando o fundo. Após a troca de tubos foi adicionado às amostras 1ml de etanol gelado, agitando levemente e em seguida centrifugando a 16.000g por mais 15 minutos. Ao retirar as amostras da centrifuga o etanol foi descartado por inversão, preservando-se o pellet até que estivesse seco para diluição do DNA extraído em 50-100 µl de água ultra-pura (milliQ®). Foram feitos géis de agarose a 1,5% no intuito de identificar se a extração foi bem-sucedida.

Tabela 1: Espécimes de *Chrysocyon brachyurus* cujos dados genéticos foram produzidos no presente estudo. A coluna ID refere-se à numeração correspondente às localidades mapeadas na Figura 3.

| ID | Espécime | Grupos amostrais | Localidade                     | Bioma          | Origem          | Longitude | Latitude |
|----|----------|------------------|--------------------------------|----------------|-----------------|-----------|----------|
| 1  | TXD072   | Norte Fluminense | Macaé – RJ                     | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,788   | -22,231  |
| 2  | TXD085   | Norte Fluminense | Conceição de Macabu -RJ        | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,742   | -22,167  |
| 3  | TXD112   | Norte Fluminense | Macaé – RJ                     | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,843   | -22,26   |
| 4  | TXD124   | Norte Fluminense | Carapebus - RJ                 | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,859   | -22,266  |
| 5  | TXD291   | Norte Fluminense | Macaé – RJ                     | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,903   | -22,321  |
| 6  | CBCRAS   | Norte Fluminense | Macaé – RJ                     | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,824   | -22,353  |
| 7  | CB47     | Zona da Mata     | Matias Barbosa - MG            | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,225   | -21,511  |
| 8  | CB20     | Zona da Mata     | Simão Pereira MG               | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,319   | -21,924  |
| 9  | CB229    | Zona da Mata     | Matias Barbosa - MG            | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,376   | -21,821  |
| 10 | CB289    | Zona da Mata     | Simão Pereira- MG              | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,19    | -21,531  |
| 11 | CB300    | Zona da Mata     | Três Rios - RJ                 | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,12    | -22,025  |
| 12 | CB310    | Zona da Mata     | Comendador Levy Gasparian - RJ | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,124   | -22,024  |
| 13 | CB319    | Zona da Mata     | Matias Barbosa - MG            | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,193   | -21,526  |
| 14 | CB396    | Zona da Mata     | Simão Pereira – MG             | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,184   | -21,541  |
| 15 | CB498    | Zona da Mata     | Três Rios – RJ                 | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,116   | -22,034  |
| 16 | CB582    | Zona da Mata     | Comendador Levy Gasparian – RJ | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,131   | -22,024  |
| 17 | CB705    | Zona da Mata     | Juiz de Fora – MG              | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,439   | -21,67   |
| 18 | CB822    | Zona da Mata     | Matias Barbosa - MG            | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,262   | -21,401  |
| 19 | CB823    | Zona da Mata     | Matias Barbosa - MG            | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,203   | -21,523  |
| 20 | CB866    | Zona da Mata     | Paraíba do Sul – RJ            | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,222   | -21,495  |
| 21 | CB1115   | Zona da Mata     | Comendador Levy Gasparian – RJ | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,201   | -22,181  |
| 22 | CB1286   | Zona da Mata     | Juiz de Fora – MG              | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,222   | -21,663  |
| 23 | CB1297   | Zona da Mata     | Simão Pereira – MG             | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,286   | -21,999  |
| 24 | CB1318   | Zona da Mata     | Simão Pereira – MG             | Mata Atlântica | Presente estudo | -43,29    | -21,967  |
| 25 | MBF346   | Zona da Mata     | Carangola – MG                 | Mata Atlântica | Presente estudo | -42,025   | -20,776  |
| 26 | MBF604   | Zona da Mata     | Carangola – MG                 | Mata Atlântica | Presente estudo | -42,024   | -20,776  |
| 27 | MAM18ES  | Espirito Santo   | Viana – ES                     | Mata Atlântica | Presente estudo | -40,397   | -19,866  |
| 28 | TXD373   | Norte Fluminense | Rio das Ostra - RJs            | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,897   | -22,478  |
| 29 | TXD398   | Norte Fluminense | Carapebus – RJ                 | Mata Atlântica | Presente estudo | -41,723   | -22,145  |

Tabela 2: Localidades amostrais e populações de *Chrysocyon brachyurus* cujos dados genéticos foram obtidos por GONZÁLEZ et al. (2015) e que foram analisadas no presente estudo. A coluna ID é referente à numeração correspondente às localidades mapeadas na Figura 3.

| ID | Localidade                 | Grupos amostrais     | Localidade                     | Bioma           | Número de exemplares | Longitude | Latitude |
|----|----------------------------|----------------------|--------------------------------|-----------------|----------------------|-----------|----------|
| 30 | BO-Park Los Fierros        | Bolívia              | Park Los Fierros               | Savana Tropical | 16                   | -60,927   | -14,55   |
| 31 | BO-Mangabalito             | Bolívia              | Mangabalito                    | Savana Tropical | 1                    | -60,533   | -13,783  |
| 32 | BO-El Refugio              | Bolívia              | El Refugio                     | Savana Tropical | 5                    | -61,033   | -14,783  |
| 33 | AR-Corrientes              | Argentina Corrientes | Corrientes                     | Savana Tropical | 20                   | -59,017   | -27,533  |
| 34 | AR-Santa Fé                | Argentina Santa Fé   | Santa Fé                       | Savana Tropical | 5                    | -60,783   | -30,233  |
| 35 | UR-Rio Negro               | Uruguai              | Rio Negro                      | Savana Tropical | 1                    | 58,002    | -32,01   |
| 36 | UR-Cerro Largo             | Uruguai              | Cerro Largo                    | Savana Tropical | 2                    | -56,367   | -32,75   |
| 37 | MG-Triângulo Mineiro       | Triângulo Mineiro    | Araxá – MG                     | Savana Tropical | 7                    | -46,97    | -19,58   |
| 38 | SP-Ribeirão Preto          | Triângulo Mineiro    | Franca – SP                    | Savana Tropical | 5                    | -47,35    | -20,533  |
| 39 | GO-Sul Goiano              | Goiás                | Parque Nacional da Emas - GO - | Savana Tropical | 13                   | -52,883   | -18,25   |
| 40 | MS-Leste da Chapada do Sul | Goiás                | Chapada do Sul - MS            | Savana Tropical | 2                    | -52,6     | -18,45   |
| 41 | MG-Belo Horizonte          | Belo Horizonte       | Belo Horizonte                 | Savana Tropical | 8                    | -43,933   | -19,917  |

### 3.3 Sequenciamento e alinhamento

Após a extração de DNA, as amostras individuais foram submetidas a reações em cadeia da polimerase (PCR, *Polymerase chain reaction*) com volume final de 25µl por amostra para a amplificação da região de controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) (Thr-L15910: 5'-GAATCCCCGGTCTTGTAACCC-3' e DL-H16498: 5'CCTGAACTAGGAACCAGATG-3'; VILÀ et al. 1999) seguindo os protocolos e *primers* descritos por GONZÁLEZ et al. (2015). Foi utilizado por amostra 19,6µl de água ultra pura (milliQ®), 2,5µl de tampão 5x GoTaq Flexi, 0,5µl de DNTP 0.2 mM, 0,2µl de Taq polimerase 5µ/µl, 1µl de MgCl<sub>2</sub> 1.5mM, 1 pmol/µl para cada primer usando 0.2 µl e 1µl de DNA com aproximadamente 100 ng, sendo todos reagentes produzidos pela Promega®. As amostras foram submetidas ao ciclo de temperatura: 1. 94.0°C - 03:00 min; 2. 94.0°C - 01:00 min; 3. 48.0°C - 01:30 min; 4. 72.0°C - 01:00 min; 5, retornando ao passo 2 por 35 vezes. Após as amplificações, as amostras foram submetidas à purificação com uso do *Wizard Genomic DNA Purification kit*®, e em seguida enviadas para a sede da MacroGen®, uma empresa biotecnológica na Coreia do Sul para a realização do sequenciamento. Após receber os resultados, as sequências foram verificadas quanto à qualidade de seus cromatogramas, editadas e montadas com o software ChromasPro 2.0 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). Após as edições, as sequências foram alinhadas com o algoritmo ClustalX (THOMPSON et al. 1997) e comparadas com haplótipos

previamente publicados por GONZÁLEZ et al. (2015) por meio do programa MEGA 7.0 (TAMURA et al. 2011).

### **3.4 Inferência de redes haplotípicas**

As sequências da região de controle do DNA mitocondrial (*D-loop*) de todos os 112 indivíduos sequenciados foram analisadas por Median-Joining (BANDELTA et al. 1999) para produção de uma rede haplotípica no software Network 5.0 (BANDELTA et al. 1999). A rede haplotípica trata-se de um diagrama onde os haplótipos (sequências únicas de *D-loop*) são conectados entre si com base em sua similaridade, de forma que alguns haplótipos ocupem posições mais centrais na rede e outros posições mais periféricas. Os haplótipos centrais são geralmente considerados mais antigos e os periféricos mais recentes. Esta análise tem capacidade de lidar com grande quantidade de dados e múltiplos caracteres, sendo um método rápido de analisar grande quantidade de haplótipos em um curto período de tempo (POSADA & CRANDALL, 2001).

No intuito de avaliar como a variabilidade haplotípica está estruturada espacialmente, foram geradas duas redes de haplótipos, uma com as amostras de todas as regiões e outra somente com as amostras processadas no presente estudo. A quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos, a estruturação espacial da rede e proporções de espécimes de cada haplótipo foram as referências utilizadas para identificar a existência de alguma estruturação haplotípica que possa elucidar a existência ou ausência de estruturações populacionais regionais (BANDELTA et al. 1999). No caso de ausência de estruturação geográfica da variação haplotípica, é esperado que poucos passos mutacionais sejam encontrados entre haplótipos geograficamente distantes, ou até mesmo que populações geograficamente distantes compartilhem um mesmo haplótipo. Por outro lado, no caso de estruturação geográfica mais pronunciada da variação haplotípica, é esperado que um número maior de passos mutacionais seja observado entre haplótipos geograficamente distantes, e que haplótipos mais similares sejam também geograficamente mais próximos (BANDELTA et al. 1999).

### **3.5 Índices de diversidade genética e Análise Molecular de Variância**

Após o alinhamento das sequências foram calculadas para as populações com uso do software Arlequin 3.5 (EXCOFFIER et al. 2010) a diversidade nucleotídica, a diversidade haplotípica, e produzidos os parâmetros populacionais  $\theta$   $\pi$  e a distribuição do número de diferenças de pares de base entre haplótipos de diferentes grupamentos regionais. As amostras foram agrupadas usando critério de distância geográfica para determinar os grupos



populacionais, sendo inseridas nestas análises apenas populações que possuem tamanho amostral maior ou igual a 5. Foi utilizado o mesmo programa para a análise de variância molecular (AMOVA) no intuito de avaliar a diversidade genética intrapopulacional para todos os grupos, bem como diferentes índices de dissimilaridades (distâncias genéticas) entre pares de populações 1)  $\Phi_{CT}$  (entre grupos); 2)  $\Phi_{SC}$  (entre populações dentro dos grupos) e 3)  $\Phi_{ST}$  (dentro das populações). Os grupos foram denominados como Mata Atlântica e Savana Tropical representando as populações dos biomas. As populações nos grupos foram segregadas a partir da distância geográfica entre as amostras. O conjunto da Mata Atlântica foi composto pelas amostras da Zona da Mata e Norte Fluminense enquanto a Savana Tropical foi composta pelas amostras de Goiás, Triângulo Mineiro, Belo Horizonte, Bolívia, Argentina Santa Fé e Argentina Corrientes. Os valores de  $\Phi_{ST}$  (daqui em diante “Fst”) foram usados como medidas comparativas das proporções de diferenças genéticas entre os grupos formados, permitindo-nos inferir a respeito de possíveis isolamentos e fluxo gênico entre os grupos (HEDRICK, 2005; REYNOLDS et al. 1983; SLATKIN, 1995). Foi utilizado o software PASSaGE 2 (ROSENBERG & ANDERSON, 2011) para verificar existência de uma correlação positiva entre a distância geográfica e diferença genética dos grupos, que seria esperada a partir de um modelo de isolamento pela distância (WRIGHT, 1978) No intuito de identificar a correlação entre as matrizes foi feito o teste de Mantel (MANTEL & VALAND, 1970) no mesmo programa.

### 3.6 Análises de “Mismatch distribution”

No intuito de verificar a capacidade do mtDNA (*D-loop*) em detectar sinais de expansão demográfica recente das populações de lobo-guará de diferentes regiões, foi realizada uma análise de *Mismatch distribution* a partir do número de diferenças par-a-par entre sequências. Esta análise foi realizada no programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER et al. 2010), implementando 1000 interações de bootstrap. A cada iteração, a frequência do número de diferenças entre haplótipos era simulada assumindo um modelo de expansão demográfica, compondo uma distribuição nula à qual as frequências observadas do número de diferenças entre haplótipos foram comparadas. Nesta comparação são calculadas duas métricas de ajuste entre as distribuições esperada e observada: o P(Rag) e o P(Ssd). Quanto mais próximos de 1 forem os valores destes dois parâmetros, melhor é o ajuste do modelo de expansão demográfica aos dados. A partir da distribuição das frequências observadas de números de diferenças entre haplótipos foi calculado também o valor de Tau ( $\tau$ ), que reflete o tempo desde o início da expansão demográfica:  $\tau = 2\mu t$ ; onde t é o tempo de gerações e  $\mu$  é a taxa de mutação por

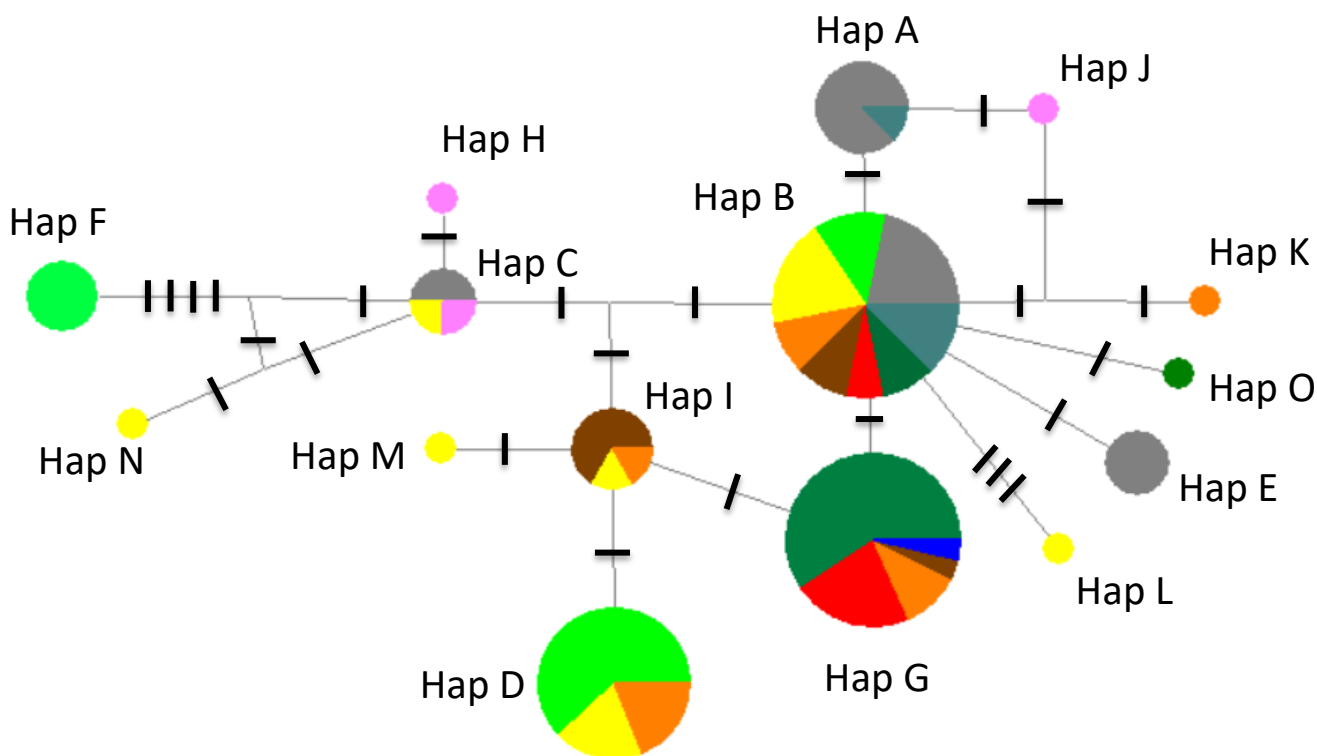
geração. Populações apresentando expansão demográfica recente tendem a apresentar uma distribuição unimodal das frequências de diferenças entre haplótipos e valores relativamente menores de  $\tau$  do que populações em equilíbrio ou com expansão antiga (ROGERS & HARPENDING 1992).

## 4. Resultados

### 4.1 Redes haplotípicas

O alinhamento de sequências de *D-loop* obtidas para os lobos-guarás resultou em uma matriz com 223 pares de base e 30 sítios variáveis. Um total de 15 haplótipos foram encontrados dentre os 112 indivíduos amostrados, dentre eles um novo haplótipo “O” foi identificado para uma das amostras da Zona da Mata Mineira (Tabela 3; Figura 4). Os demais 14 já haviam sido descritos por GONZALEZ et al. (2015).

A topologia da rede haplotípica reconstruída por Median-Joining se mostrou bem similar à obtida por GONZÁLEZ et al. (2015) (Figura 4). Os haplótipos com maior frequência e mais amplamente disseminados pelas populações ocupam posição mais central na rede enquanto os haplótipos com menor frequência e distribuição geográfica mais restrita ocupam posição mais periférica. Os três haplótipos mais frequentes (B, D e G) estão distribuídos por populações argentinas, uruguaias e brasileiras e diferenciam-se entre si por uma a três mutações. Os haplótipos menos frequentes e geograficamente mais restritos estão conectados a estes haplótipos mais comuns, divergindo destes por uma a quatro mutações, com exceção do Haplótipo F, exclusivo da Bolívia, que apresentou a maior divergência dentro da rede (Figura 4).



|                   | A | B | C | D  | E | F | G  | H | I | J | K | L | M | N | O |
|-------------------|---|---|---|----|---|---|----|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Norte Fluminense  |   | 2 |   |    |   |   | 6  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Zona da Mata      |   | 3 |   |    |   |   | 16 |   |   |   |   |   |   |   | 1 |
| Triângulo Mineiro |   | 3 |   | 4  |   |   | 3  |   | 1 |   | 1 |   |   |   |   |
| Belo Horizonte    |   | 3 |   |    |   |   | 1  |   | 4 |   |   |   |   |   |   |
| Goiás             |   | 6 | 1 | 4  |   |   |    |   | 1 |   |   | 1 | 1 | 1 |   |
| Espírito Santo    |   |   |   |    |   |   | 1  |   |   |   |   |   |   |   |   |
| AR Corrientes     | 7 | 7 | 2 |    | 4 |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |
| AR Santa Fé       | 1 | 4 |   |    |   |   |    |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Bolívia           |   | 4 |   | 13 |   | 5 |    |   |   |   |   |   |   |   |   |
| Uruguai           |   |   | 1 |    |   |   |    | 1 |   | 1 |   |   |   |   |   |

Figura 4: Rede haplotípica do lobo-guará baseada em seqüências de D-loop e frequência dos haplótipos nas amostras populacionais. Cada círculo representa um haplótipo e seu tamanho é equivalente à sua frequência na espécie. Cada cor representa uma amostra populacional (mapa na Figura 3), as linhas representam o parentesco entre haplótipos, e os traços o número de mutações que diferenciam haplótipos próximos.

Tabela 3: Amostras populacionais de lobo-guará analisadas e respectivos haplótipos compartilhados e exclusivos. Número de indivíduos portadores de cada haplótipo está entre parênteses.

| Grupos amostrais         | Haplótipos compartilhados                     | Haplótipos únicos                  |
|--------------------------|---|------------------------------------|
| Norte_Fluminense         | Hap B (2); Hap G (6)                          | -                                  |
| Zona_da_Mata             | Hap B (3); Hap G (16)                         | Hap O (1)                          |
| Triangulo_Mineiro        | Hap B (3); Hap D (4); Hap G (3);<br>Hap I (1) | Hap K (1)                          |
| Belo_Horizonte           | Hap B (3); Hap G (1); Hap I (4)               | -                                  |
| Parque_Nacional_das_Emas | Hap C (1); Hap D (6); Hap B (4);<br>Hap I (1) | Hap N (1); Hap M (1);<br>Hap L (1) |
| Argentina - Santa_Fé     | Hap B (4); Hap A (1)                          | -                                  |
| Argentina - Corrientes   | Hap C (2); Hap B (7); Hap A (7)               | Hap E (4)                          |
| Bolívia                  | Hap B (4); Hap D (13)                         | Hap F (5)                          |
| Viana                    | Hap G (1)                                     | -                                  |
| Uruguai                  | Hap C (1)                                     | Hap J (1); Hap H (1)               |

A rede haplotípica obtida sugere alguma tendência de diferenciação geográfica das populações de lobo-guará da Bolívia em relação às demais, embora haja extenso compartilhamento de haplótipos entre populações distantes. O Haplótipo F, um dos haplótipos mais divergentes da espécie, encontra-se restrito à Bolívia e em elevada frequência. Já os haplótipos B e D, também presentes na população boliviana, estão mais disseminados em outras populações.

As populações de lobo-guará do Estado do Rio de Janeiro apresentaram três haplótipos de *D-loop*, sendo eles B e G, e do haplótipo inédito O. O haplótipo B é amplamente disseminado na maioria das populações da Argentina, Bolívia e Brasil, enquanto o haplótipo G, que apresentou maior frequência nas populações fluminenses, encontra-se restrito ao sudeste do Brasil (Tabela 3). Já o haplótipo inédito O foi exclusivamente representado por um indivíduo da população Zona da Mata. Apenas uma mutação o diferencia do Haplótipo B, ao qual está mais proximamente conectado (Figura 4). A rede haplotípica de escala regional, contemplando apenas as populações da Mata Atlântica apresentou todos os três haplótipos presentes na Mata Atlântica apenas na região Centro Fluminense, sendo a região da Mata Atlântica com maior diversidade haplotípica. Além de estar presente em todas as regiões o haplótipo G é o mais frequente (Figura 5).

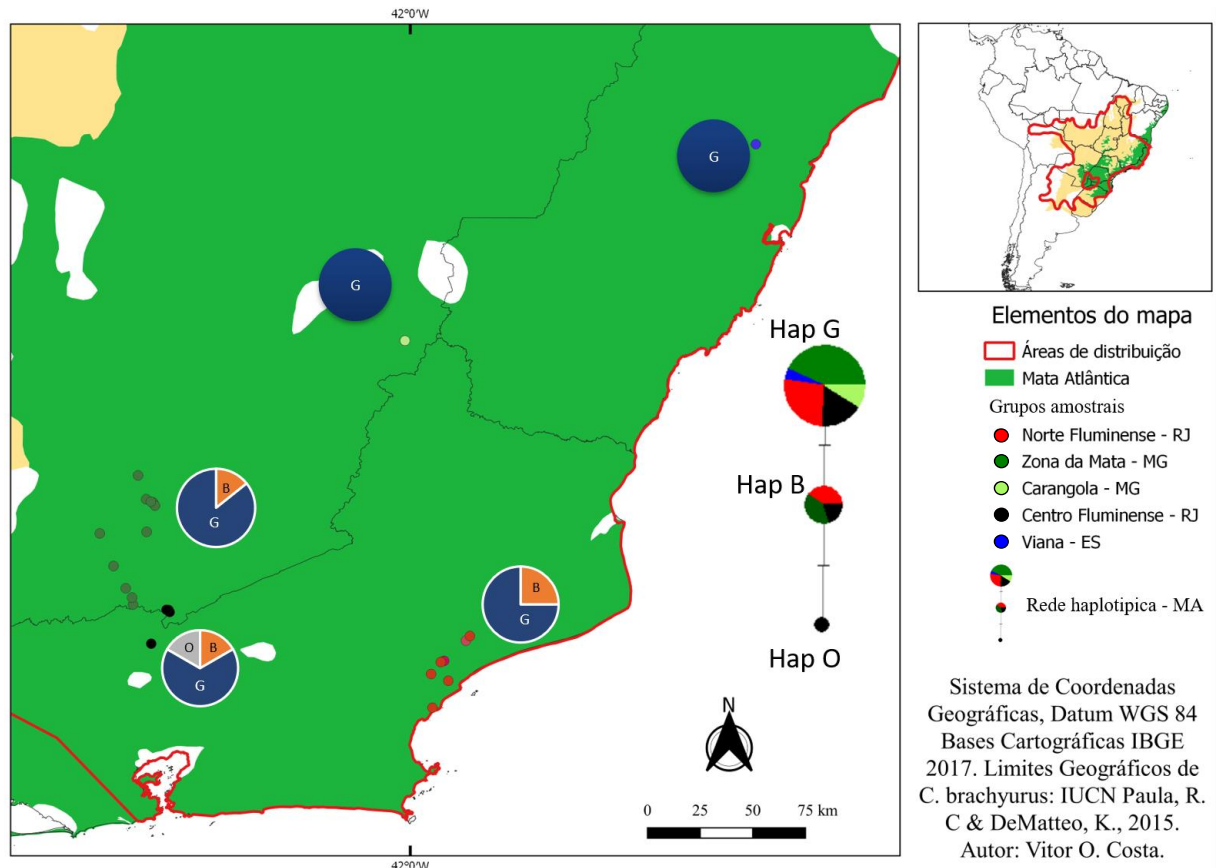


Figura 5: Rede de haplótipos de indivíduos de lobo-guará oriundos da Mata Atlântica. Os gráficos de pizza representam a frequência da diversidade dos haplótipos em cada localidade. Aqui as cores das localidades da Zona da Mata representam subpopulações menores (Centro Fluminense – RJ e Zona da Mata mineira) para fornecer uma maior resolução da variação espacial na frequência e composição haplotípica das amostras.

#### 4.2 Diversidade genética e divergência interpopulacional

De modo geral, como observado na Tabela 4, os níveis de diversidade nucleotídica e haplotípica presentes nas populações da Mata Atlântica são baixos. O padrão fica mais evidente se compararmos os extremos geográficos das populações litorâneas com o interior da Bolívia, onde a vegetação nativa da Savana Tropical ainda é predominante, mostrando uma diferença ainda maior quando avaliamos os valores de  $\theta_\pi$  destas populações geograficamente afastadas umas das outras. A população da Bolívia se destaca com a maior diversidade genética, com  $\theta_\pi = 3.25108$ , enquanto a população Norte Fluminense apresenta a menor diversidade, com  $\theta_\pi = 0.42857$ .

Tabela 4: Parâmetros de diversidade genética das populações de lobo-guará baseados em sequências do D-Loop. SD: desvio-padrão.

| Parâmetros              | Norte Fluminense | Zona da Mata | Goiás    | Triângulo Mineiro | Belo Horizonte | Bolívia  | AR Corrientes | AR Santa Fé | Média   | SD      |
|-------------------------|------------------|--------------|----------|-------------------|----------------|----------|---------------|-------------|---------|---------|
| Nº de indivíduos        | 8                | 20           | 15       | 12                | 8              | 22       | 5             | 20          | 13,75   | 6,0570  |
| Nº de haplótipos        | 2                | 3            | 7        | 5                 | 3              | 3        | 4             | 2           | 3,6250  | 1,5762  |
| Diversidade haplotípica | 0.1250           | 0.0500       | 0.0667   | 0.0833            | 0.1250         | 0.0455   | 0.2000        | 0.0500      | 0,0932  | 0,0503  |
| $\pi$                   | 0.001931         | 0.001968     | 0.010933 | 0.008221          | 0.004987       | 0.014645 | 0.001802      | 0.007658    | 0,0065  | 0,0047  |
| $\theta_\pi$            | 0.42857          | 0.43684      | 2.43810  | 1.83333           | 1.10714        | 3.25108  | 0.40000       | 1.70000     | 1.44938 | 1.05014 |

Os valores de  $F_{st}$  sugerem que as populações da Zona da Mata e Norte fluminense são muito semelhantes geneticamente ( $F_{st} = 0$ ). Foram identificados níveis intermediários de conectividade entre as populações da Mata Atlântica e do Cerrado brasileiro, com  $F_{st} = 0.18095$ , como é o caso da divergência entre Norte Fluminense e Belo Horizonte, e entre a Zona da Mata e Goiás, cuja divergência é de  $F_{st} = 0.28915$  (Tabela 5). As diferenças entre as populações do Cerrado foram baixas, indicando maior conectividade, como é o caso da divergência entre Triângulo Mineiro, Belo Horizonte e Goiás, cujos valores de  $F_{st}$  variaram entre 0 e 0.00585. Dentro do Cerrado, a similaridade mais elevada é da população do Triângulo Mineiro com Goiás e com Belo Horizonte ( $F_{st} = 0$ ). Em relação às amostras fora do Brasil, a população de AR Santa Fé apresentou níveis baixos a intermediários de divergência com as populações do Cerrado, variando entre 0.09336 (Goiás) e 0.17095 (Triângulo Mineiro). AR Corrientes apresentaram os valores de  $F_{st}$  mais elevados dentre todas as populações, com um valor de 0.59360 e 0.56107 em relação às populações da Zona da Mata e Norte Fluminense, respectivamente. A população da Bolívia também apresentou elevada divergência em relação às populações da Zona da Mata e Argentina Corrientes, com valores de 0.42153 e 0.33659, sendo considerada a população com maior tamanho amostral e geneticamente diferente das demais populações.

Tabela 5: Valores de  $F_{st}$  entre as populações representadas na Figura 3 e com amostragem superior a cinco indivíduos. Valores em negrito representam valores de  $F_{st}$  estatisticamente maiores do que 0 ( $P < 0.005$ ).

|                   | Norte Fluminense | Zona da Mata   | Goiás          | Triângulo Mineiro | Belo Horizonte | Bolívia        | AR Corrientes | AR Santa Fé |
|-------------------|------------------|----------------|----------------|-------------------|----------------|----------------|---------------|-------------|
| Norte Fluminense  | 0                |                |                |                   |                |                |               |             |
| Zona da Mata      | 0                | 0              |                |                   |                |                |               |             |
| Goiás             | <b>0.18017</b>   | <b>0.28915</b> | 0              |                   |                |                |               |             |
| Triângulo Mineiro | 0.11758          | <b>0.21223</b> | 0              | 0                 |                |                |               |             |
| Belo Horizonte    | 0.18095          | <b>0.27068</b> | 0.00584        | 0                 | 0              |                |               |             |
| Bolívia           | <b>0.33306</b>   | <b>0.42153</b> | <b>0.11166</b> | <b>0.13671</b>    | <b>0.19659</b> | 0              |               |             |
| AR Corrientes     | <b>0.56107</b>   | <b>0.59360</b> | 0.15741        | 0.28467           | 0.38959        | 0.33659        | 0             |             |
| AR Santa Fé       | <b>0.25356</b>   | <b>0.35637</b> | 0.09336        | 0.17095           | <b>0.16791</b> | <b>0.27048</b> | 0             | 0           |

Na figura 6 é possível observar mais claramente quais populações são mais ou menos divergentes. As populações da Bolívia, Zona da Mata e Argentina Corrientes apresentam valores de  $F_{st}$  em média maiores do que as populações de Goiás e Triângulo Mineiro. A divergência mais acentuada nestas populações está possivelmente associada à presença de haplótipos exclusivos.

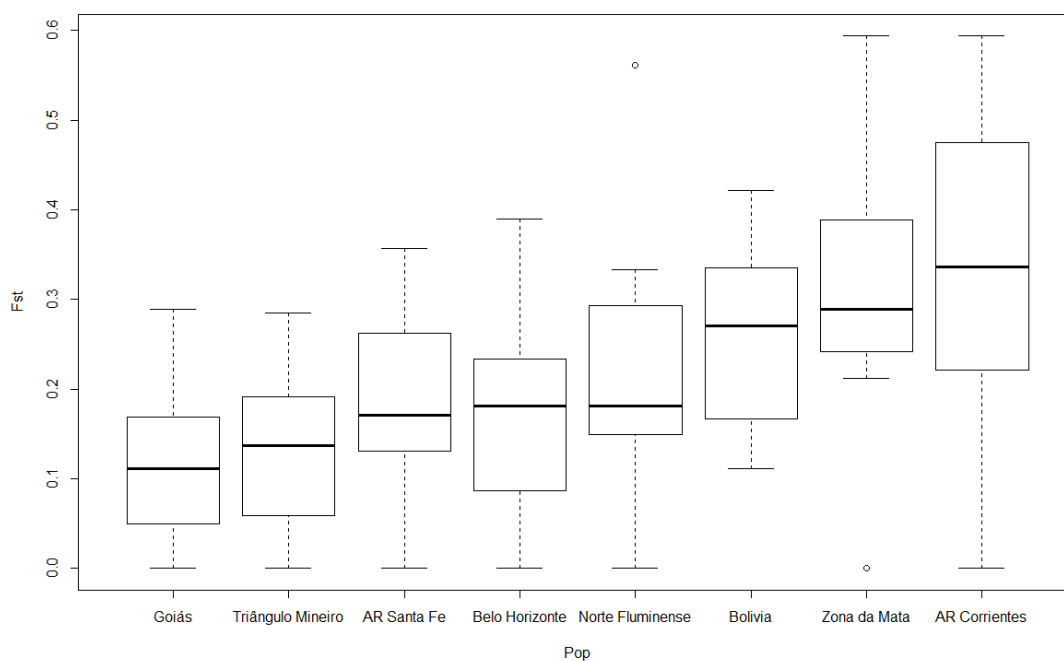


Figura 6: Boxplot das relações entre  $F_{st}$  e distância geográfica das populações de lobo-guará apresentadas na Figura 3.

A relação entre divergências genéticas e distribuição geográfica das populações foi avaliada por um teste de Mantel, que identificou uma correlação significativa de 0,74044 ( $t = 4,60319$  e  $P = 0,00100$ ) entre distâncias genéticas e espaciais. Este resultado indica que os valores de  $F_{st}$  entre populações aumentam conforme a distância geográfica entre elas. A Figura 7 ilustra a relação entre o  $F_{st}$  e a distância geográfica entre amostras, onde a linha de tendência representa o aumento linear da divergência genética ( $F_{st}$ ) com o aumento da distância espacial (km). As observações que se afastam da linha de tendência indicam valores de  $F_{st}$  maiores ou menores do que o esperado a partir da distância geográfica entre populações. Como pode ser observado na Figura 7a, os valores de  $F_{st}$  entre as populações do Norte Fluminense e as populações da Zona da Mata, Triângulo Mineiro, Goiás e Bolívia encontraram-se bem próximos do que seria esperado a partir de suas distâncias geográficas. Já o valor de  $F_{st}$  entre Norte Fluminense e AR Corrientes está acima do esperado. Em contraste, os valores de  $F_{st}$  entre as populações da Zona da Mata e todas as demais encontram-se quase todos acima do esperado (Figura 7b), com exceção da população do Norte Fluminense. De modo geral, este



resultado mostra que a Zona da Mata é ligeiramente mais divergente do que a população Norte Fluminense em relação às demais.

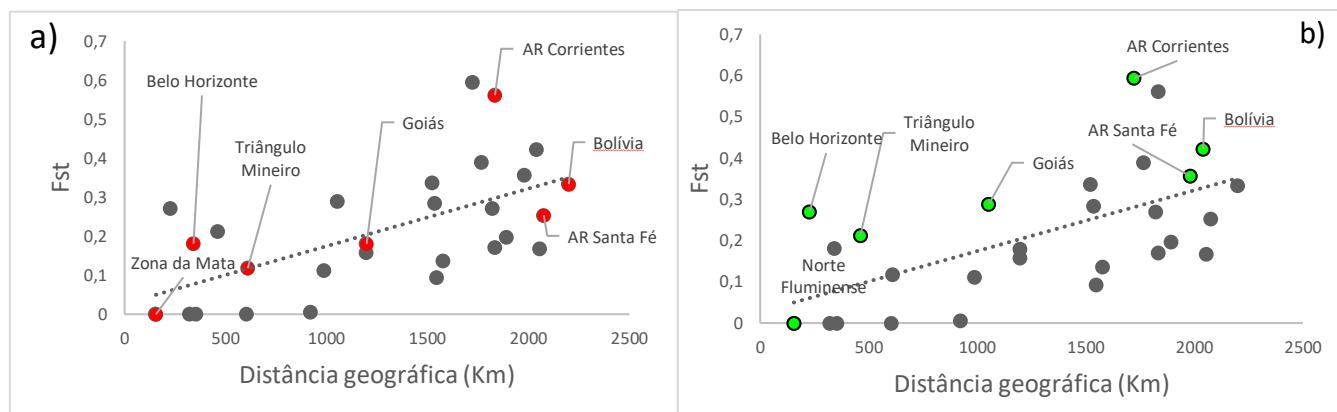


Figura 7: Correlação entre o  $F_{st}$  e a distância geográfica entre populações: a) em vermelho estão destacadas as comparações envolvendo a população do Norte Fluminense com as demais. b) em verde estão destacadas as comparações entre a população da Zona da Mata e as demais.

### 4.3 Análise Molecular de Variância (AMOVA)

A AMOVA indicou um percentual da variação genética total  $\Phi_{ST}$  0,29473 associado às diferenças entre os grupos de populações da Savana Tropical e da Mata Atlântica (Tabela 6), sendo considerado um nível elevado de diferenciação sendo este significativo ( $P < 0,001$ ) (WRIGHT, 1978). Além disso, a porcentagem de variação dentro das populações é mais elevada do que a porcentagem de variação entre os grupos, sugerindo que os níveis de diferenciação interpopulacional e inter-regional no lobo-guará são baixos. Este resultado sugere que as populações não estão estruturadas a partir das diferenças entre esses biomas.

Tabela 6: Níveis hierárquicos de variação genética obtidos na AMOVA entre populações agrupadas em Mata Atlântica e Savana Tropical.

| Fonte de variação                                  | Porcentagem de variação | Índices de fixação |
|--|-------------------------|--------------------|
| Entre grupos ( $\Phi_{CT}$ )                       | 13.77                   | 0.13766            |
| Entre populações dentro dos grupos ( $\Phi_{SC}$ ) | 15.71                   | 0.18215            |
| Dentro das populações ( $\Phi_{ST}$ )              | 70.53                   | 0.29473            |

### 4.4 Mismatch distribution

As análises de *mismatch distribution* foram realizadas considerando dois conjuntos populacionais, que representam graus distintos de diferenciação geográfica entre populações,

conforme evidenciado pelos valores de  $F_{st}$  da seção anterior. O primeiro conjunto, classificado como Grupo 1, corresponde às populações do Cerrado brasileiro (Goiás; Belo Horizonte e Triângulo Mineiro) e da Bolívia (Park Los Fierros; El Refugio), que em média apresenta maior diferenciação genética dentre as demais populações com tamanhos amostrais adequados (Figura 6) (GONZÁLEZ et al. 2015; MANNISE et al. 2017). Deste modo, o Grupo 1 representa uma situação de maior divergência entre populações. O segundo conjunto, classificado como Grupo 2, corresponde às populações da Mata Atlântica (Norte Fluminense e Zona da Mata e do Cerrado brasileiro (Goiás; Belo Horizonte e Triângulo Mineiro), que aparentemente apresentam uma distribuição geográfica mais contínua, menor divergência genética e são o foco do presente trabalho.

O modelo de expansão demográfica se adequou tanto ao Grupo 1 como ao Grupo 2 ( $P_{ssd/rag} > 0,05$ ) (Tabela 7). Contudo, a adequação ao modelo de expansão populacional foi melhor no conjunto de populações Mata Atlântica x Cerrado ( $P_{rag} = 0,45 / P_{ssd} = 0,59$ ) do que no conjunto Bolívia x Cerrado ( $P_{rag} = 0,16 / P_{ssd} = 0,22$ ) (Tabela 7). Deste modo, embora ambos conjuntos de populações apresentem traços de expansão populacional, as populações do Cerrado e da Mata Atlântica apresentam sinais mais fortes e se adequam melhor a este evento. Esta constatação também é sugerida pela tendência multimodal da distribuição dos “picos” de diferenças genéticas apresentada pelas populações da Bolívia e Cerrado (Figura 8).

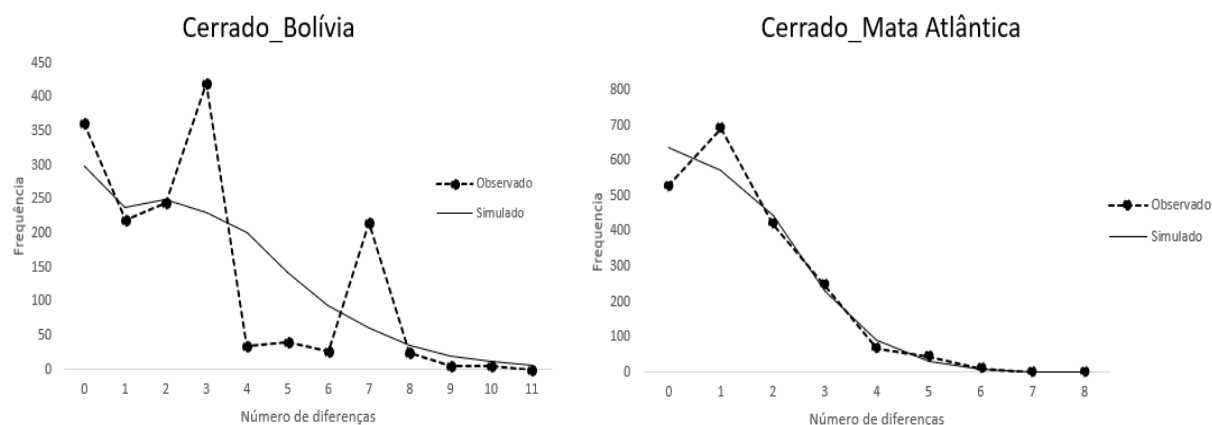


Figura 8: Distribuições das diferenças par-a-par entre haplótipos de lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) dos grupos populacionais Cerrado\_Bolívia e Cerrado\_Mata\_Atlântica. Linhas tracejadas representam as distribuições observadas e as linhas contínuas representam as distribuições esperadas a partir do modelo de expansão demográfica.

Os valores de Tau foram mais elevados para o conjunto de populações da Bolívia x Cerrado ( $\tau = 2,172$ ), do que para o conjunto Cerrado x Mata Atlântica ( $\tau = 1,437$ ). Estes resultados sugerem que a expansão demográfica envolvendo populações do Cerrado e da Mata

Atlântica seria mais recente do que a expansão envolvendo as populações do Cerrado e da Bolívia.

Tabela 7: Parâmetros do modelo de expansão demográfica estimados para diferentes grupos populacionais de lobo-guará analisados por *mismatch distribution*.

| Populações       | Grupo 1: Cerrado_Bolívia<br>(Goiás; Belo Horizonte;<br>Triângulo Mineiro; Park Los<br>Fierros; El Refugio) | Grupo 2: Cerrado_Mata Atlântica<br>(Goiás; Belo Horizonte; Triângulo<br>Mineiro; Zona da Mata; Norte<br>Fluminense) |
|------------------|--|---|
| Nº de indivíduos | 57   | 64  |
| Tau              | 2,172  | 1,437   |
| P (Sim. Rag)     | 0,156  | 0,450   |
| P (Sim. Ssd)     | 0,217  | 0,589   |

## 5. Discussão

### 5.1 Lobo-guará no litoral Norte do Rio de Janeiro: dispersão recente ou presença antiga?

Os resultados produzidos no presente estudo sugerem que os lobos-guarás no litoral Norte Fluminense são oriundos de uma dispersão recente. Avaliando a topologia das redes haplotípicas apresentadas neste estudo não é possível identificar qualquer tipo de estruturação filogeográfica que permita inferir isolamento populacional do lobo-guará na região costeira do Estado do Rio de Janeiro. A avaliação de estruturação geográfica para o Brasil proposta por GONZÁLEZ et al. (2015) não a permitia identificar o mesmo padrão devido a ausência de amostras litorâneas em suas análises, reforçando a importância do presente estudo ao ampliar esta base amostral para inferir a respeito da estruturação de populações numa escala geográfica diferente. A topologia apresentada pela rede contendo as sequências de todas as regiões mostra que os espécimes do Norte Fluminense compartilham os mesmos haplótipos com populações de outras regiões geograficamente distantes. O compartilhamento de haplótipos é bastante heterogêneo geograficamente, como observado no Hap B e Hap G, sugerindo que estes haplótipos estejam presentes na maioria das populações de lobo-guará. Ao avaliar a rede produzida somente para Mata Atlântica, podemos observar que as amostras pertencentes ao Rio de Janeiro compartilham os mesmos haplótipos de populações adjacentes, como Zona da Mata mineira e Viana no Espírito Santo. O compartilhamento destes haplótipos e a baixa frequência de haplótipos exclusivos nas populações do Estado do Rio de Janeiro, sugerem níveis relativamente elevados de conectividade entre estas populações costeiras da espécie. Portanto, a população do Norte Fluminense é possivelmente um subconjunto geneticamente empobrecido da população Zona da Mata.

Ao comparar a estruturação haplotípica do lobo-guará com o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*), apresentada por TCHAICKA et al. (2006) utilizando o mesmo marcador mitocondrial, pode-se observar uma topologia da rede haplotípica onde as similaridades genéticas entre amostras refletem suas proximidades geográficas, sendo possível identificar um grupo “Mata Atlântica Norte” e outro “Mata Atlântica Sul”. Esta regionalização mais clara nos cachorros-do-mato é sustentada por sucessivos passos mutacionais entre os dois grupos geográficos, indicando que a taxa de mutação tem sido mais elevada que o fluxo gênico entre os grupos, impactando de forma significativa a diferenciação genética entre eles (HEDRICK, 2005). TCHAICKA et al. (2006) explica que esta estruturação supostamente é resultado de um histórico demográfico complexo e de isolamento por distância limitando o fluxo gênico entre as populações, principalmente na região da Mata Atlântica Norte. Apesar da distância geográfica também afetar o quão semelhantes geneticamente as populações de lobo-guará são entre si, este fator limitante não é tão intenso a ponto de um isolamento definitivo. Esta diferença entre cachorro-do-mato e o lobo-guará pode ser explicada devido ao cachorro do mato possuir um porte médio com área de vida de até 11,11 km<sup>2</sup> (BERTA, 1982; MICHALSKI et al. 2006), enquanto o lobo-guará é de grande porte e possui uma área de vida de 6,0 a 115,0 km<sup>2</sup> (DIETZ, 1984; CHEBEZ, 1994; MANTOVANI, 2007; AZEVEDO, 2008, RODDEN, 2014). Este fator pode limitar mais o deslocamento do cachorro-do-mato para longas distâncias facilitando o processo de isolamento.

Quando avaliamos a divergência e conectividade genética entre as populações costeiras da Mata Atlântica e interioranas do Cerrado através dos valores de  $F_{st}$ , não há indicação de que o fluxo gênico seja mais intenso dentro dos biomas do que entre os biomas. Um valor de  $F_{st} = 0$  foi encontrado entre as amostras do Norte Fluminense e Zona da Mata evidenciando um fluxo gênico constante entre as populações da Mata Atlântica. Aprofundando-se nestas relações de similaridade genética entre as populações, a Figura 7 mostra que a população do Norte Fluminense possui uma relação de distância geográfica e diferenças genéticas próximo do esperado a partir do modelo de isolamento por distância. A adequação deste modelo aos dados sugere que apesar da elevada capacidade de dispersão do lobo-guará, o fluxo gênico entre as populações diminui conforme a distância entre as populações aumenta. Aparentemente, as limitações do lobo-guará relacionadas à sua capacidade de dispersão começam a ficar mais evidentes quando comparamos a população da Mata Atlântica com a Bolívia e Argentina, onde os valores de  $F_{st}$  são mais elevados do que o esperado. GONZÁLEZ et al. (2015) não encontrou uma correlação estatisticamente significava entre distância geográfica e genética de suas

amostras, ressaltando as diferenças observadas que encontramos através da ampliação amostral proporcionada pelo presente estudo. Contudo, a avaliação da interação entre estas informações são compatíveis com os resultados das redes haplotípicas, mostrando uma maior similaridade genética entre os haplótipos das amostras que estão mais próximas geograficamente.

Os parâmetros de diversidade genética encontrados no presente estudo sugerem que as populações de lobo-guará do Cerrado possuem uma variabilidade genética pelo menos cinco vezes maior que a variabilidade encontrada nas populações da Mata Atlântica. A diversidade nucleotídica e a diversidade de haplótipos seguem sendo mais elevados para as populações do Cerrado, que se localizam no centro da área nativa da espécie. Deste modo, é esperado que os tamanhos efetivos destas populações sejam maiores e que o efeito de deriva genética sob a população seja mais ameno do que em populações pequenas (SAETRE & RAVINET, 2019).

Os valores encontrados nas análises de variância molecular não indicaram estruturação geográfica das populações de lobo-guará conforme as regiões de Savana Tropical e do bioma da Mata Atlântica. Com um índice de fixação geral do  $F_{st} = 0.29473$  nos resultados apresentados pelo presente estudo, a inclusão das amostras da Mata Atlântica parece não divergir muito do índice de  $F_{st} = 0.29852$  apresentado por GONZÁLEZ et al. (2015). Portanto, com base nestas informações, atreladas aos outros resultados já discutidos, podemos inferir que não houve no passado uma barreira de formação florestal que isolasse a população do litoral das demais populações de lobo-guará do Brasil. Uma população que estivesse isolada e bem estruturada com elevado tamanho populacional durante milhares de anos apresentaria valores de  $F_{st}$  possivelmente maiores do que os observados no presente estudo.

Os modelos de expansão demográfica produzidos pelas análises de *Mismatch distribution* neste estudo são indicativos de uma expansão recente pelo conjunto Mata Atlântica e Cerrado, reforçando a hipótese de expansão recente. A adição de novas amostras em nossos modelos proporcionou a verificação desta expansão demográfica em uma escala mais regional dentro do Brasil, reforçando os sinais consistentes encontrados por GONZÁLEZ et al. (2015) de uma expansão demográfica na população brasileira de lobo-guará há pelo menos 24.000 anos atrás. Nossos resultados também sugerem que a expansão demográfica envolvendo as populações costeiras teria sido ainda mais recente do que o último Glacial Máximo, devido à elevada adequabilidade do modelo de expansão recente e do valor mais reduzido de  $\tau$  destas populações em relação a outros conjuntos populacionais da espécie.

## 5.2 Fatores históricos que teriam impedido o estabelecimento de lobos-guarás na costa há mais tempo

A corroboração da hipótese de dispersão e expansão recente dos lobos-guará para a região Norte Fluminense contraria algumas inferências sobre a distribuição pretérita da espécie feitas por estudos de paleodistribuição (TORRES et al. 2013). Embora imerso na Mata Atlântica, o Norte Fluminense tem sido considerado através de modelagens climáticas como uma área de possível expansão de biotas não-florestais durante o período do último glacial máximo, há aproximadamente 21 mil anos atrás (CARNAVAL et al. 2008; WERNECK et al. 2012; TORRES et al. 2013). Além disso, LUZ et al. (2011) sugerem que há 7.000 anos o litoral Norte Fluminense ainda possuía predominância de formações não-florestais. Esta caracterização pode ter favorecido a presença do lobo-guará nesta região durante um período mais antigo do que os séculos XX e XXI, possibilitando o isolamento de populações litorâneas há pelo menos 7.000 anos. A formação de um corredor conectando o Cerrado ao litoral Norte Fluminense neste período, por exemplo, é um pressuposto utilizado por TAVARES et al. (2015) para explicar a história biogeográfica de *Cerradomys goytaca*, uma espécie de roedor atualmente endêmica de restingas litorâneas, mas com parentesco mais próximo às espécies do Cerrado brasileiro.

Entretanto, apesar da região Norte Fluminense ter apresentado características de habitat adequadas para a ocupação por lobos-guarás durante o último glacial máximo (TORRES et al. 2013), alguns fatores podem ter sido limitantes para a ocorrência ou persistência do lobo-guará nesta região ao longo dos últimos 20 mil anos. A provável predominância de formações florestais de Mata Atlântica há cerca de 6.000 anos (CARNAVAL et al. 2008) pode ter isolado, por efeito barreira, as populações litorâneas de lobo-guará das demais populações interioranas. É possível que o longo tempo de isolamento (pelo menos 6 milhares de anos), atrelado ao baixo tamanho populacional, tenha intensificado os efeitos de deriva genética tornando a população litorânea inviável a longo prazo. Segundo PAULA & DESBIEZ, (2014), o tamanho reduzido de habitat para uma ocupação estável pode em 21 anos reduzir o tamanho populacional do lobo-guará em 29%. Portanto, 6.000 anos poderiam ser mais do que suficientes para resultar numa extinção local da espécie na ausência de intercâmbio genético com as populações interioranas. Deste modo, se os lobos-guarás ocorreram no Norte Fluminense há mais de 6.000 anos atrás, eles possivelmente teriam sido extintos antes de que cientistas contemporâneos pudessem registrá-los.

O naturalista alemão Príncipe Maximilian zu Wied-Neuwied percorreu o litoral e o interior do leste brasileiro, incluindo o Norte Fluminense, durante o século XIX. Wied fez diversos registros detalhados da biodiversidade local em seu livro “Viagem ao Brasil” (WIED-NEUWIED, 2001) e descreveu numerosas espécies. Durante os dias em que passou no litoral Norte Fluminense, Wied relata o encontro com diversos animais da nossa fauna, principalmente de aves e mamíferos, a maioria trazida a conhecimento dele por caçadores e coletores locais. Contudo, não há nenhuma menção ao lobo-guará em seus registros de passagem pelo Norte Fluminense. O lobo-guará foi mencionado por Wied apenas quando ele posteriormente adentrou formações abertas do interior da Bahia (região atual de Vitória da Conquista) e descreveu *Canis campestris* Wied, 1821, sinônimo de *Canis brachyurus* Illiger, 1815. Este fato sugere que uma espécie do porte do lobo-guará dificilmente passaria despercebida por Wied, caso estivesse realmente presente na fauna local. Portanto, os relatos históricos não confirmam a presença do lobo-guará no Norte Fluminense mais antiga do que o final do século XX.

A ocupação de uma área por uma espécie é determinada por características ecológicas e por eventos históricos. A formação de barreiras que surgem e desaparecem ao longo do tempo, a capacidade de dispersão e adaptativa de uma espécie são importantes preditores de como ela varia historicamente em sua extensão geográfica tornando o histórico demográfico de algumas populações bastante complexo (SLATKIN, 1987). A área ocupada por uma população numa região depende de quando e onde a espécie se originou, e quais barreiras impedem que ela ocupe novas áreas. As vezes essas barreiras são facilmente identificáveis como fator limitante para dispersão da espécie, mas outras vezes essas barreiras são pequenas, não ficando tão claro o que está limitando a espécie de expandir-se geograficamente (SLATKIN, 1987). Todos estes fatores dificultam a previsibilidade e interpretação de como as populações naturais estão estruturadas e para o lobo-guará não é diferente.

As modelagens de distribuição potencial e histórica usam de informações bioclimáticas e pontos de ocorrência para predizerem a estabilidade das regiões para as espécies modeladas (ELITH et al. 2010), mas deixa de avaliar diversos outros fatores que são importantes para que uma espécie ocupe determinada área como alimentação, abrigo e história biogeográfica. Em suma, estes modelos avaliam a adequabilidade ambiental a partir das propriedades do ambiente e não de seu ocupante. Portanto, são úteis para sugerir se uma determinada área teria condições bioclimáticas estáveis para a ocupação da espécie ou não (DE MARCO & SIQUEIRA, 2009). Além disso, são importantes para sugerir locais de manejo de espécies ameaçadas em necessidade de translocação, transportando-as para locais onde os modelos encontraram alta

estabilidade de ocupação (DE MARCO & SIQUEIRA, 2009). Contudo, como a ocorrência da espécie depende também de outros fatores além dos bioclimáticos, nem sempre estes modelos farão previsões acuradas sobre as distribuições pretérita ou presente da espécie.

### **5.3 Conservação do lobo-guará na Mata Atlântica costeira**

O teste das hipóteses realizados neste estudo tem importantes implicações conservacionistas. Como as análises sugerem que a espécie se dispersou recentemente para o litoral Norte Fluminense, ela pode ser potencialmente invasora caso impacte negativamente a biodiversidade nativa da Mata Atlântica. Invasões biológicas são conhecidas como uma das principais causas de perda de biodiversidade, sendo responsáveis por possíveis alterações nos processos ecossistêmicos dos locais ocupados pelas espécies invasoras (VITOUSEK et al. 1997). Portanto, há uma necessidade imediata de investigar quais as implicações dessa invasão no bioma Mata Atlântica e a necessidade de considerar que esta dispersão seja melhor avaliada para identificar seus impactos na própria espécie e nas espécies nativas que tiverem contato com ela, com finalidade de saber como lidar com essa ampliação da distribuição da espécie.

Sabemos que o lobo-guará é uma espécie ameaçada de extinção no Brasil, e que o principal impacto direto na viabilidade das populações é a perda de habitat (PAULA & DESBIEZ, 2014), que se mostra como a mais crítica no que tange às dificuldades para a conservação da espécie. MACHADO et al. (2004) estima a partir de estudos realizados com dados desde 2002 que o Cerrado já teve 55% de seu território original desmatado ou transformado pela ação humana. Com a atual situação do Cerrado e uma estimativa de desmatamento de aproximadamente 1% ou mais ao ano (2,2 milhões de hectares para o Cerrado), caso não se amplie a proteção deste bioma, ele deixará de existir em 2030, restando somente 4,5% que estão sob a proteção de unidades de conservação e terras indígenas (MACHADO et al. 2004). Como consequência destes impactos sobre as populações de lobo-guará ao longo dos anos, PAULA & DESBIEZ (2014) submeteram os dados conhecidos do lobo a um modelo de viabilidade populacional e inferiram que, a partir de parâmetros biológicos e demográficos, a espécie sofrerá uma redução de aproximadamente 29% do tamanho populacional atual nos próximos 21 anos, tendo como base apenas as estimativas de perda de habitat do Cerrado mesmo não levando em consideração outros fatores de mortalidade para espécie como atropelamentos. Atualmente o número estimado de lobo-guará em estágio reprodutivo é de 17.000 indivíduos, sendo 90% deste total presente no território brasileiro (PAULA & DEMATTEO, 2015). Sendo assim, o cenário populacional atual é de 15.849



indivíduos maduros no Brasil; 613 no Paraguai; 487 na Argentina e um pouco mais de 1.000 na Bolívia (PAULA & DEMATTEO, 2015).

Apesar destas avaliações, mais esforços são necessários para entender a dinâmica populacional da espécie, além de acompanhar a escala e possíveis consequências desta expansão demográfica que pode ser resultado dos impactos antrópicos em seu habitat nativo. O lobo-guará é uma espécie atualmente ameaçada de extinção e a redução cada vez mais presente de seu habitat nativo fazem os estudos de viabilidade populacional apontarem para um grande declínio de indivíduos para os próximos anos. Os registros de atropelamento são conhecidos como de grande ameaça para a espécie (RODRIGUES, 2002) e tem se mantido frequentes na região Norte Fluminense, talvez este seja um indício de novos cuidados que devam ser implementados pelas unidades de conservação local para que suas medidas contemplem esta espécie que possui grande importância ecológica e atualmente não está sendo considerada como presente em nenhuma UC do sudeste do Estado do Rio de Janeiro. Além disso, novos estudos são necessários para identificar a viabilidade das populações para a região da Mata Atlântica. PAULA (2016), aponta a região sudeste do Estado do Rio de Janeiro como adequada para ocupação da espécie a partir de modelagens feitas com variáveis climáticas, mas a literatura ainda carece de estudos que apontem esta viabilidade a nível de capacidade de suporte destas áreas fragmentadas da Mata Atlântica que a espécie está acessando ao expandir-se para região sudeste. Apesar das áreas fragmentadas da Mata Atlântica serem caracterizadas como matrizes não-florestais que poderiam se assemelhar com a paisagem do Cerrado, o Cerrado não se trata de uma floresta que foi desmatada, milhares de anos de evolução foram necessários para este bioma possuir suas características atuais, compara-lo às matrizes antropizadas da Mata Atlântica em termos de riqueza de espécies e condições ambientais para sustentar a longo prazo populações de lobo-guará pode ser um equívoco.

## 6. Referências Bibliográficas

AQUADRO C. F., GREENBERG B. D. Human mitochondrial DNA variation and evolution: analysis of nucleotide sequences from seven individuals. *Genetics*. N.103, p. 287–312. 1983.

AVISE, J. C. *Phylogeography the history and formation of species*. Harvard University. London, England. 2000.

AZEVEDO, F. C. Área de vida e organização espacial de lobos-guará (*Chrysocyon brachyurus*) na região do Parque Nacional da Serra da Canastra, Minas Gerais. Federal University of Minas Gerais. Dissertação de mestrado. Brasil. 2008.

BANDELT. H. J., FORSTER, P., RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol Biol E*. v. 16, p.37-48. 1999.

BARDELEBEN C, MOORE R. L., WAYNE, R. K A molecular phylogeny of the Canidae based on six nuclear loci. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. v. 37, p. 815–831. 2005.

BERETA, A., FREITAS, S. R., & BUENO, C. Novas ocorrências de *Chrysocyon brachyurus* (Carnivora) no Estado do Rio de Janeiro indicando a expansão de sua distribuição geográfica. *Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia*. v. 78, p.5-8. 2017.

BERTA, A. *Cerdocyon thous*. Mammalian species, n. 186, p. 1-4. 1982.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I. 1. ed. – Brasília, DF: ICMBio/MMA. p 492. 2018.

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

COELHO, C. M., DE MELO, L. F. B., SÁBATO, M. A. L., VAZ MAGNI, E. M., HIRSCH, A., YOUNG, R. J. Habitat use by wild maned wolves (*Chrysocyon brachyurus*) in a transition zone environment. *Journal of Mammalogy*, v. 89, n. 1, p. 97-104. 2008.

CHEBEZ, J. C., BERTONATTI, C. L. que se van: especies argentinas en peligro. Editorial Albatros, 1994.

DIETZ, J. M. Ecology and social organization of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). 1984.

DIETZ, J. M. *Chrysocyon brachyurus*. Mammalian Species. New York. v. 234, p.1-4. 1985.

Disponível em: INEA - Instituto Estadual do Ambiente do Estado do Rio de Janeiro. <http://www.terrabrasil.org.br/ecotecadigital/index.php/estantes/mapas/2620-unidades-de-conservacao-da-natureza-no-Estado-do-rio-de-janeiro>. 2014. Pesquisado em 2020.

DE MARCO JÚNIOR, P.; SIQUEIRA, M. F. Como determinar a distribuição potencial de espécies sob uma abordagem conservacionista. Megadiversidade, v. 5, n. 1-2, p. 65-76. 2009.

ECKHARDT, B. Análise da presença do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* no Estado do Rio de Janeiro presença e estratégias de conservação (Illiger, 1815). Dissertação de Mestrado. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro Escola Nacional de Botânica Tropical. 2016.

ELITH, J., PHILLIPS, S. J., HASTIE, T., DUDÍK, M., CHEE, Y. E., YATES, C. J. A statistical explanation of MaxEnt for ecologists. Diversity and distributions, v. 17, n. 1, p. 43-57. 2011.

EMMONS, L. H. The maned wolves of Noel Kempff Mercado National Park. Smithsonian Contributions to Zoology, 2012.

EXCOFFIER, L., LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. Molecular Ecology Resources. v. 10, p. 564-567. 2010.

FAHRIG, L. Relative Effects of Habitat Loss and Fragmentation on Population Extinction. The Journal of Wildlife Management, Ottawa-Carleton Institute of Biology, Carleton University. v. 61, n. 3, p. 603-610. Canada. 1997.

FARIA, M. B., RIBEIRO, M. C. S., SILVA FERRAZ, D. Effects of habitat fragmentation on the geographic distribution of *Chrysocyon brachyurus* Illiger, 1815 (Carnivora, Canidae) in the State of Minas Gerais. v. 3, n. 1. 2020.

FISHER, R. The Genetical Theory of Natural Selection. Clarendon, Oxford. 1930.

FONTOURA-RODRIGUES, M. L., EIZIRIK, E. Evolutionary and Conservation Genetics of the Maned Wolf. Ecology and Conservation of the Maned Wolf. p. 77-86. 2014.

GONZÁLEZ, S., COSSE, M., FRANCO M. D. R., EMMONS L., VYNNE C., DUARTE J. M. B., BECCACESI M. D., MALDONADO J. E. Population structure of mtDNA variation due to Pleistocene fluctuations in the south american maned wolf (*Chrysocyon brachyurus* , Illiger ,1815): management units for conservation. Journal of Heredity v.106, n. 1, p. 459–468. 2015.

HEDRICK, P. W. A standardized genetic differentiation measure. Evolution, v. 59, n. 8, p. 1633-1638. 2005.

HEY, J., MACHADO, C. A. The study of structured populations—new hope for a difficult and divided science. Nature Reviews Genetics, v. 4, n. 7, p. 535-543. 2003.

IUCN (International Union for Conservation of Nature). Maned Wolf. 2015. <https://www.iucnredlist.org/species/4819/88135664> Acessado em 30 de maio de. 2019.

KÖCHL, S., NIEDERSTÄTTER, H., PARSON, W. DNA extraction and quantitation of forensic samples using the phenol-chloroform method and real-time PCR. In: Forensic DNA typing protocols. Humana Press. p. 13-29. 2005.

LINDBLAD-TOH K., WADE C. M., MIKKELSEN T. S., KARLSSON E. K., JAFFE D. B., KAMAL M., CLAMP M. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. Nature. v. 438, p.803–819. 2005.

LION, M. B., EIZIRIK, E., GARDA, A. A., DA FONTOURA-RODRIGUES, M. L., RODRIGUES, F. H. G., & MARINHO-FILHO, J. S. Conservation genetics of maned wolves in a highly impacted area of the Brazilian Cerrado biome. Genetica, v. 139, n. 3, p. 369-381. 2011.

LUZ C. F. P., BARTH O. M., MARTIN L., SILVA. C. G., TURCQ B. J. Palynological evidence of the replacement of the hygrophilous forest by field vegetation during the last 7,000 years B.P. in the northern coast of Rio de Janeiro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. v. 83, n.3, p. 39-52. Brazil. 2011.

MACHADO, R. B., R., NETO, M. B., PEREIRA, P., CALDAS, E., GONÇALVES, D., SANTOS, N., TABOR, K. & STEININGER, M. Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro. *Conservation International do Brasil*, Brasília. MANTOVANI, J. E., MATTOS, P. R., SANTOS, J. E., & PIRES, J. R. 2004.

MANNISE, N., COSSE, M., GONZÁLEZ, S., EMMONS, L. H., DUARTE, J. M. B., BECCACECI, M. D., MALDONADO, J. E. Maned wolves retain moderate levels of genetic diversity and gene flow despite drastic habitat fragmentation. *Endangered Species Research*, v. 34, p. 449-462. 2017.

MANTEL, N., VALAND. R.S. A technique of nonparametric multivariate analysis. *Biometrics* v. 26, p. 547-558. 1970.

MARQUES, D. Terra da gente. Lobos invadem a praia. p. 14-21. 2012.

MICHALSKI, F., CRAWSHAW, P. G., DE OLIVEIRA, T. G., FABIÁN, M. E. Notes on home range and habitat use of three small carnivore species in a disturbed vegetation mosaic of southeastern Brazil. v. 70, n. 1-2, p. 52-57. 2006.

MOTTA-JUNIOR, J. C., MARTINS, K. The frugivorous diet of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* in Brazil: ecology and conservation. Seed dispersal and frugivory: ecology, evolution and conservation, p. 291-303. 2002.

OLSON, D. M., DINERSTEIN, E., WIKRAMANAYAKE, E. D., BURGESS, N. D., POWELL, G. V., UNDERWOOD, E. C., LOUCKS, C. J. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth A new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. *BioScience*, v. 51, n. 11, p. 933-938, 2001.

PAULA, R. C., RODRIGUES, F. H. G., QUEIROLO, D., JORGE, R. P. S. Avaliação do estado de conservação do lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. 2008.

PAULA, R. C. Adequabilidade ambiental dos biomas brasileiros à ocorrência do lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*) e efeitos da composição da paisagem em sua ecologia espacial, atividade e movimentação. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. São Paulo. 2016.

PAULA, R. C. & DEMATTEO, K. *Chrysocyon brachyurus* (errata version published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 2015:(See <https://www.iucnredlist.org/species/4819/88135664>). Downloaded on 30 May 2019. 2015.

PAULA, R. C., RODRIGUES, F. H. G., QUEIROLO, D., JORGE, R. P. S., LEMOS, F. G., RODRIGUES, L. A. Avaliação do estado de conservação do Lobo-guará *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) no Brasil. Biodiversidade Brasileira, v. 3, n. 1, p. 146-159. 2013.

PAULA, R. C., DESBIEZ, A. L. J. Maned Wolf Population Viability. Ecology and Conservation of the Maned Wolf. p.15-33. 2014.

PERINI, F. A., RUSSO, C. A. M., SCHRAGO, C. G. The evolution of South American endemic canids: A history of rapid diversification and morphological parallelism. Journal of Evolutionary Biology v.23, p.311-322. 2010.

PINTO L., DUARTE M. Occurrence (new record) of maned wolf *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815) (Carnivora, Canidae) in Southern Brazil. Ciência Florestal. v. 23, n.1, p.253-259. 2013.

POSADA, D., CRANDALL, K. A. Intraspecific gene genealogies: trees grafting into networks. Trends in Ecology & Evolution, v. 16, n. 1, p. 37–45. 2001.

QUEIROLO D., MOREIRA J.R., SOLER L., EMMONS L., RODRIGUES, F. H. G., PAUTASSO A., CARTES J. L. & SALVATORI V. Historical and current range of the Near Threatened maned wolf *Chrysocyon brachyurus* in South America. Oryx, v. 45, n. 2, p. 296-303. 2011.

RIBEIRO, M. C., METZGER, J. P., MARTENSEN, A. C., PONZONI, F. J., HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. Biological Conservation. v.142, n.6, p. 1141–1153. 2009.

RODDEN, M.; RODRIGUES, F.; BESTELMEYER, S. Maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). Canids: Foxes, Wolves, Jackals and Dogs, Status Survey and Conservation Action Plan. Gland and Cambridge: IUCN/SSC Canid Specialist Group, p. 38-43, 2004.

RODRIGUES, F. H. G. Biologia e conservação do lobo-guará na Estação Ecológica de Águas Emendadas. Tese de doutorado. Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas. DF. Campinas. 2002.

ROGERS, A. R., HARPENDING, H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, v. 9, n. 3, p. 552-569. 1992.

ROSENBERG, M.S., ANDERSON, C. D. PASSaGE: pattern analysis, spatial statistics and geographic exegesis. Version 2. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 2, n. 3, p. 229-232. 2011.

SAETRE, G. P., RAVINET, M. *Evolutionary genetics: Concepts, analysis, and practice*. Oxford University Press, USA, 2019.

SANTOS, E. F., SETZ, E. Z. F., GOBBI, N. Diet of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and its role in seed dispersal on a cattle ranch in Brazil. *Journal of Zoology*, v. 260, n. 2, p. 203-208, 2003.

SCHWARTZ, M., LUIKART, G., & WAPLES, R. Genetic monitoring as a promising tool for conservation and management. *Trends in Ecology & Evolution*, v.22(1), p. 25–33. 2007.

TAMURA, K., PETERSON, D., PETERSON, N., STECHER, G., NEI, M., KUMAR, S. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*. v. 28, p. 2731–2739. 2011.

TAVARES, W. C., PESSÔA, L. M., SEUÁNEZ, H. N. Systematics and acceleration of cranial evolution in *Cerradomys* (Rodentia, Cricetidae, Sigmodontinae) of Quaternary sandy plains in Southeastern Brazil. *Journal of Mammalian Evolution*, v. 23, n. 3, p. 281-296. 2016.

TCHAICKA, L., EIZIRIK, E., DE OLIVEIRA, T. G., CANDIDO JR, J. F., FREITAS,

T. R. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*, v. 16, n. 4, p. 819-838. 2007.

THOMPSON, J. D., GIBSON T. J., PLEWNIAK F., JEANMOUGIN, F., HIGGINS, D. G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*. v. 24, p. 4876–4882. 1997.

TORRES, R., JAYAT J. P., PACHECO S. Modelling potential impacts of climate change on the bioclimatic envelope and conservation of the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*). *Mammalian Biology*. v.1 p. 41-49. 2013.

VÁZQUEZ, D. P. Multiple effects of introduced mammalian herbivores in a temperate forest. *Biological invasions*, v. 4, n. 1-2, p. 175-191. 2002.

VILÀ, C., AMORIM I. R., LEONARD J. A., POSADA D., CASTROVIEJO J., PETRUCCI-FONSECA F., CRANDALL K. A., ELLEGREN H., WAYNE R. K. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*. v. 8, p. 2089–2103. 1999.

VITOUSEK, P. M., D'ANTONIO, C. M., LOOPE, L. L., REJMANEK, M., WESTBROOKS, R. Introduced species: a significant component of human-caused global change. *New Zealand Journal of Ecology*, p. 1-16. 1997.

WERNECK, F. P., NOGUEIRA, C., COLLI, G. R., SITES JR, J. W., COSTA, G. C. Climatic stability in the Brazilian Cerrado: implications for biogeographical connections of South American savannas, species richness and conservation in a biodiversity hotspot. *Journal of Biogeography*, v. 39, n. 9, p. 1695-1706. 2012.

WIED-NEUWIED, M. A. P.. Viagem ao Brasil do Príncipe Maximiliano de Wied-Neuwied: Legado do Príncipe Maximiliano de Wied-Neuwied. ilustrações da viagem ao Brasil de 1815 a 1817. Kapa Ed. 2001.

WRIGHT, S. Evolution in Mendelian populations. *Genetics*. v.16, p. 97–159. 1931.

WRIGHT, S. Evolution and the genetics of populations: a treatise in four volumes: Vol. 4: variability within and among natural populations. University of Chicago Press. 1978.



XAVIER, M. S., LEMOS H. M., CACCAVO A., BEZERRA A., SECCO H., GONÇALVES P. R. Noteworthy coastal records of the maned wolf, *Chrysocyon brachyurus* (Illiger, 1815), in Southeastern Brazil. Boletim da Sociedade Brasileira de Mastozoologia. v. 78, p. 9-13. Brasil. 2017.

ZRZAVÝ, J., DUDA, P., ROBOVSKÝ, J., OKŘINOVÁ, I., & PAVELKOVÁ ŘIČÁNKOVÁ, V. Phylogeny of the Caninae (Carnivora): combining morphology, behaviour, genes and fossils. Zoologica Scripta. v. 47, n. 4, p. 373-389. 2018.

## Apêndices

Apêndice 1: Tabela com todos os espécimes e suas respectivas coordenadas geográficas analisadas no presente estudo. NF = Norte Fluminense; CF = Centro Fluminense; ZdM = Zona da Mata; MA = Mata Atlântica.

| Espécime | População | Origem Geográfica | Latitude | Longitude |
|----------|-----------|-------------------|----------|-----------|
| TXD373   | NF/MA     | Rio das Ostras    | -22,478  | -41,897   |
| TXD398   | NF/MA     | Carapebus         | -22,145  | -41,723   |
| TXD291   | NF/MA     | Macaé             | -22,321  | -41,903   |
| CBCRAS   | NF/MA     | Macaé             | -22,353  | -41,824   |
| TXD072   | NF/MA     | Macaé             | -22,231  | -41,788   |
| TXD085   | NF/MA     | Conceição Macabu  | -22,167  | -41,742   |
| TXD112   | NF/MA     | Macaé             | -22,26   | -41,843   |
| TXD124   | NF/MA     | Carapebus         | -22,266  | -41,859   |
| CB20     | ZdM/MA    | SimãoPereira      | -21,924  | -43,319   |
| CB1286   | ZdM/MA    | JuizdeFora        | -21,663  | -43,222   |
| CB1297   | ZdM/MA    | SimãoPereira      | -21,999  | -43,286   |
| CB1318   | ZdM/MA    | SimãoPereira      | -21,967  | -43,29    |
| CB229    | ZdM/MA    | MatiasBarbosa     | -21,821  | -43,376   |
| CB47     | ZdM/MA    | MatiasBarbosa     | -21,511  | -43,225   |
| CB289    | ZdM/MA    | SimãoPereira      | -21,531  | -43,19    |
| CB300    | CF/MA     | TresRios          | -22,025  | -43,12    |
| CB310    | CF/MA     | LevyGasparian     | -22,024  | -43,124   |
| CB1115   | CF/MA     | LevyGasparian     | -22,181  | -43,201   |
| CB319    | ZdM/MA    | MatiasBarbosa     | -21,526  | -43,193   |
| CB822    | ZdM/MA    | MatiasBarbosa     | -21,401  | -43,262   |
| CB866    | CF/MA     | ParaibadoSul      | -21,495  | -43,222   |
| CB823    | ZdM/MA    | JuizdeFora        | -21,523  | -43,203   |
| CB396    | ZdM/MA    | SimãoPereira      | -21,541  | -43,184   |

|        |           |               |         |         |
|--------|-----------|---------------|---------|---------|
| CB498  | CF/MA     | TresRios      | -22,034 | -43,116 |
| CB582  | CF/MA     | LevyGasparian | -22,024 | -43,131 |
| CB705  | ZdM/MA    | JuizdeFora    | -21,67  | -43,439 |
| MBF346 | ZdM/MA    | Carangola     | -20,776 | -42,025 |
| MBF604 | ZdM/MA    | Carangola     | -20,776 | -42,024 |
| AAR1   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| AAR2   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| AAR3   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| AAR4   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| AAR5   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| AAR6   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| AAR7   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| AAR8   | Argentina | SantaFe       | -30,233 | -60,783 |
| BAR1   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| BAR2   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| BAR3   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| BAR4   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| BAR5   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| BAR6   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| BAR7   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| BAR8   | Argentina | SantaFe       | -30,233 | -60,783 |
| BAR9   | Argentina | SantaFe       | -30,233 | -60,783 |
| BAR10  | Argentina | SantaFe       | -30,233 | -60,783 |
| BAR11  | Argentina | SantaFe       | -30,233 | -60,783 |
| CAR1   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| CAR2   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| EAR1   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |
| EAR2   | Argentina | Corrientes    | -27,533 | -59,017 |

|        |               |             |         |         |
|--------|---------------|-------------|---------|---------|
| EAR3   | Argentina     | Corrientes  | -27,533 | -59,017 |
| EAR4   | Argentina     | Corrientes  | -27,533 | -59,017 |
| BBO1   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| BBO2   | Bolivia       | Mangabalito | -13,783 | -60,533 |
| BBO3   | Bolivia       | ElRefugio   | -14,783 | -61,033 |
| BBO4   | Bolivia       | ElRefugio   | -14,783 | -61,033 |
| DBO1   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO2   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO3   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO4   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO5   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO6   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO7   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO8   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO9   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO10  | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO11  | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO12  | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| DBO13  | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| FBO1   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| FBO2   | Bolivia       | LosFierros  | -14,55  | -60,927 |
| FBO3   | Bolivia       | ElRefugio   | -14,783 | -61,033 |
| FBO4   | Bolivia       | ElRefugio   | -14,783 | -61,033 |
| FBO5   | Bolivia       | ElRefugio   | -14,783 | -61,033 |
| BBRGO1 | Goiás/Cerrado | Emas        | -18,25  | -52,883 |
| BBRGO2 | Goiás/Cerrado | Emas        | -18,25  | -52,883 |
| BBRGO3 | Goiás/Cerrado | Emas        | -18,25  | -52,883 |
| BBRGO4 | Goiás/Cerrado | Emas        | -18,25  | -52,883 |

|        |               |               |         |         |
|--------|---------------|---------------|---------|---------|
| CBR1   | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| DBR1   | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| DBR2   | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| DBR3   | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| DBR4   | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| DBR5   | Goiás/Cerrado | Franca        | -20,533 | -47,35  |
| IBRGO1 | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| IBRGO2 | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| MBRGO1 | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| NBRGO1 | Goiás/Cerrado | Emas          | -18,25  | -52,883 |
| BBRMG1 | MG/Cerrado    | Araxa         | -19,58  | -46,97  |
| BBRMG2 | MG/Cerrado    | Araxa         | -19,58  | -46,97  |
| BBRMG3 | MG/Cerrado    | Araxa         | -19,58  | -46,97  |
| BBRMG4 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| BBRMG5 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| BBRMG6 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| DBR6   | MG/Cerrado    | Araxa         | -19,58  | -46,97  |
| DBR7   | MG/Cerrado    | Araxa         | -19,58  | -46,97  |
| DBR8   | MG/Cerrado    | Araxa         | -19,58  | -46,97  |
| GBRMG1 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| IBRMG1 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| IBRMG2 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| IBRMG3 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| IBRMG4 | MG/Cerrado    | BeloHorizonte | -19,917 | -43,933 |
| KBRMG1 | MG/Cerrado    | Araxa         | -19,58  | -46,97  |
| BBRMS1 | MS/Cerrado    | Chapada       | -18,45  | -52,6   |
| BBRMS2 | MS/Cerrado    | Chapada       | -18,45  | -52,6   |
| CUR1   | Uruguai       | CerroLargo    | -32,75  | -56,367 |

|           |            |            |         |         |
|-----------|------------|------------|---------|---------|
| HUR1      | Uruguai    | RioNegro   | -32,01  | -58,002 |
| JUR1      | Uruguai    | CerroLargo | -32,75  | -56,367 |
| GBRSP1    | SP/Cerrado | Franca     | -20,533 | -47,35  |
| GBRSP2    | SP/Cerrado | Franca     | -20,533 | -47,35  |
| GBRSP3    | SP/Cerrado | Franca     | -20,533 | -47,35  |
| IBRSP1    | SP/Cerrado | Franca     | -20,533 | -47,35  |
| MBMLGUARA | ES/MA      | Viana      | -19,866 | -40,397 |

---