

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**FILOGEOGRAFIA E HISTÓRIA POPULACIONAL DE *Lycalopex vetulus*
(CARNIVORA, CANIDAE), INCLUINDO SUA HIBRIDAÇÃO COM *L. gymnocercus***

Fabricio Silva Garcez

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

Av. Ipiranga, 6681 - Partenon

Fone: (51) 3320-3500 – CEP: 90619-900

Porto Alegre/RS – Brasil

2015

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**FILOGEOGRAFIA E HISTÓRIA POPULACIONAL DE *Lycalopex vetulus*
(CARNIVORA, CANIDAE), INCLUINDO SUA HIBRIDAÇÃO COM *L. gymnocercus***

Fabricio Silva Garcez

Orientador: Dr. Eduardo Eizirik

Co-orientadora: Dra. Ligia Tchaicka

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2015

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
APRESENTAÇÃO.....	VII
INTRODUÇÃO GERAL.....	VIII
ARTIGO CIENTÍFICO.....	XIV
Abstract.....	2
Introdução.....	3
Métodos.....	6
Resultados.....	10
Discussão.....	14
Agradecimentos.....	21
Literatura Citada.....	22
Tabelas.....	29
Legendas das figuras.....	33
Figuras.....	35
Material suplementar.....	42
REFERÊNCIAS.....	XV

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente ao meu orientador, prof^o Dr. Eduardo Eizirik pela confiança e pelos valiosos ensinamentos realizados durante toda essa jornada, certamente servindo de inspiração ao meu crescimento científico.

À minha co-orientadora prof^a Dr^a Ligia Tchaicka por ter me ensinado a fazer ciência, me acompanhando desde os primeiros passos, sempre com muita dedicação e paciência.

Aos meus pais, Hermínio e Albertina por formarem a minha base moral e ética, além de fornecer forças essenciais a essa caminhada através de palavras de incentivo e apoio.

Agradecer, em especial à minha namorada, companheira, amiga e grande amor Fabianna por toda a paciência e palavras de conforto durante esses dois anos, se fazendo presente todos os dias, mesmo na distância.

Aos meus amigos e companheiros de morada: Isadora e Fernando. Por compartilharem e dividirem desde as contas até os momentos de angústia e de felicidade.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS, mesmo àqueles que hoje não se encontram presentes, por todos os momentos agradáveis propiciados e também pela ajuda fornecida em diferentes etapas da pesquisa.

Gostaria de agradecer a todas as instituições e pesquisadores que forneceram amostras biológicas utilizadas neste estudo: Rose Gasparini (CENAP/ICMBio), Rodrigo Jorge (ICMBio), Arnaud Desbiez (IPÊ-SP), Frederico Lemos (PCMC). Márcio Repenning (PUCRS), Tadeu Oliveira (UEMA).

À Lucas Gonçalves (PUCRS) por todo o suporte dado na elaboração e construção dos mapas.

Agradecer à instituição, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, pela excelente infraestrutura fornecida durante a pesquisa, em especial aos professores por terem contribuído de forma grandiosa com meu crescimento e formação.

Por fim, agradeço ao CNPq pelo apoio financeiro, essencial à realização da pesquisa.

RESUMO

A raposinha-do-campo (*Lycalopex vetulus*) é o menor dos canídeos brasileiros sendo endêmica do bioma Cerrado, porém podendo ser encontrada também em áreas de transição adjacentes. Estudos recentes investigaram as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Lycalopex* e indicaram que *L. vetulus* é a espécie mais basal deste grupo, cuja diversificação ocorreu há apenas 1 milhão de anos. Além disso, obtiveram evidências que sugerem a ocorrência de um potencial processo de hibridação entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus* em uma zona de contato recém-formada. Usando dados de microssatélites e DNA mitocondrial, investigamos a influência dos processos históricos nos padrões de estrutura populacional de *L. vetulus*, bem como a ocorrência de hibridação entre esta espécie e *L. gymnocercus*. Com este objetivo, foram obtidas amostras de tecido e sangue provenientes de animais que representam a maior parte da distribuição de *L. vetulus* ($n = 61$), bem como amostras de *L. gymnocercus* ($n = 30$) oriundas da zona de contato entre ambas as espécies e áreas adjacentes. Nossos resultados mostraram altos níveis de diversidade genética para *L. vetulus* (diversidade haplotípica: $Hd = 0,98$ e heterozigosidade esperada: $He = 0,81$) e diferentes cenários populacionais de acordo com o marcador molecular utilizado, o que sugere um fluxo gênico influenciado pelos machos e filopatria das fêmeas. Observou-se também uma partição norte-sul entre dois grupos filogeográficos, não existindo o compartilhamento de haplótipos entre essas regiões. Este padrão é semelhante ao observado em outra espécie simpátrica de canídeo (*Cerdocyon thous*) e em vários outros vertebrados da Floresta Atlântica, levantando a hipótese de que também espécies que ocorrem em habitats abertos possam ser afetadas por processos vicariantes equivalentes. Seis indivíduos capturados na zona de contato mostraram sinais de mistura com *L. gymnocercus* na composição de seu genótipo, com cinco destes apresentando haplótipos de mtDNA compartilhados. Estes resultados suportam a existência de hibridação entre estas espécies, provavelmente induzida por efeitos antropogênicos (desmatamento na Mata Atlântica). Nosso estudo ilustra como a fragmentação e a alteração de habitats naturais pode afetar a constituição genética de populações nativas, fornecendo dados úteis para o delineamento de estratégias de conservação para as duas espécies.

ABSTRACT

Phylogeography and population history of *Lycalopex vetulus* (CARNIVORA, CANIDAE), including hybridization with *L. gymnocercus*

The hoary fox (*Lycalopex vetulus*) is the smallest Brazilian canid and an endemic species of the Cerrado biome, including adjacent transitional areas harboring open habitats. Recent studies reported some evidence suggesting a potential hybridization process between *L. vetulus* and *L. gymnocercus* in a contact zone that has likely been formed recently. Using microsatellite and mtDNA markers, we investigated the influence of historical processes on the population structure of *L. vetulus*, as well as the occurrence of hybridization between this species and *L. gymnocercus*. For these purposes, tissue and blood samples from animals representing most of the hoary fox distribution were obtained (n = 61), as well as from *L. gymnocercus* (n = 30) sampled in their contact zone and adjacent areas. Our results showed high levels of genetic diversity for *L. vetulus* (haplotype diversity: Hd = 0.98 and expected heterozygosity: He = 0.81) and different population scenarios with each of the molecular marker types, suggesting male-mediated gene flow. We also observed a south-north partition, with no haplotype sharing between these regions. This pattern is similar to the one observed in a sympatric canid (*Cerdocyon thous*) and in various other Atlantic Forest vertebrates, raising the hypothesis that species occurring in open habitats may undergo equivalent vicariant processes. Six individuals caught in the contact zone showed signs of mixing with *L. gymnocercus* in the composition of their microsatellite genotypes, five of which presenting introgressed mtDNA haplotypes from the same species. These results support the inference of hybridization between these canids, likely induced by anthropogenic effects (*i.e.* deforestation in the Atlantic Forest). Our study illustrates how the fragmentation and alteration of natural habitats can play an important role in the genetic composition of wild populations, and should provide useful data for the design of conservation strategies on behalf of both species.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação, que tem como título: “Filogeografia e história populacional de *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae), incluindo sua hibridação com *L. gymnocercus*”, é um dos requisitos indispensáveis à obtenção do grau de Mestre, exigido pelo Programa de Pós-Graduação em Zoologia, da Faculdade de Biociências, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

Este estudo teve como objetivos principais (i) investigar a influência de processos históricos nos padrões de estruturação populacional da raposa-do-campo (*L. vetulus*), em toda a sua distribuição; e (ii) testar a ocorrência de hibridação entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus* em uma zona recente de contato entre as espécies.

Todos os dados utilizados no presente trabalho foram gerados no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS através de suporte financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) concedido na forma de bolsa de mestrado.

Esta dissertação será apresentada no formato de artigo científico, sendo precedida de uma introdução geral ao tema abordado, com suas respectivas referências ao final do documento. O artigo encontra-se formatado de acordo com as normas de submissão do periódico *Conservation Biology*, disponíveis para acesso no endereço eletrônico: [http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1523-1739/homepage/ForAuthors.html](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1523-1739/homepage/ForAuthors.html).

INTRODUÇÃO GERAL

Pertencentes à ordem Carnivora (subordem Caniformia e superfamília Canoidea) (Flynn & Nedbal 1998), os canídeos são animais com uma alta taxa de dispersão. Encontram-se presentes ao longo do globo em quase todos os continentes, com exceção da Antártica (Redford & Eisenberg 1992). Atualmente estão classificados em 16 gêneros e 36 espécies (Nowak 1999; Perini et al. 2010), sendo que a América do Sul abriga a maior diversidade de canídeos dentre os continentes, com 6 gêneros e 11 espécies atuais (Wozencraft 2005).

Os primeiros representantes da família Canidae entraram no continente sul-americano ao fim do Plioceno e começo do Pleistoceno. Esta invasão a partir da América do Norte foi possibilitada pela formação do Istmo do Panamá, há aproximadamente três milhões de anos (Ma), no evento conhecido como Grande Intercâmbio Americano (Langguth 1975; Berta 1987). Na América do Sul, encontraram novas oportunidades ecológicas: o surgimento de áreas abertas causado por mudanças ambientais nas áreas adjacentes ao Istmo do Panamá, aliado aos hábitos generalistas e oportunistas desses animais, possibilitou aos mesmos uma grande expansão geográfica e subsequente radiação adaptativa (Langguth 1975; Berta 1987; Van Valkenburg 1999; Wozencraft 2005).

Acredita-se que a diversificação inicial dos canídeos sul-americanos possa ter ocorrido na América do Norte ou Central, antes da invasão, há cerca de 4 Ma, havendo a entrada de pelo menos duas linhagens ancestrais no continente: a primeira dando origem aos gêneros *Atelocynus*, *Cerdocyon* e *Lycalopex*; e uma segunda linhagem aos gêneros *Speothos* e *Chrysocyon* (Prevosti 2010).

O gênero *Lycalopex* deriva de uma rápida e recente radiação, muito provavelmente ocorrida já na América do Sul, tendo sua origem datada em cerca de 1.3 Ma e atualmente compreendendo seis espécies: *L. gymnocercus*, *L. vetulus*, *L. griseus*, *L. sechurae*, *L. fulvipes* e *L. culpaeus* (Wozencraft 2005; Tchaicka 2006; Perini et al. 2010; Favarini 2011).

A especiação do gênero pode estar associada principalmente a complexos e dinâmicos eventos de retração e expansão glacial, com consequentes mudanças

climáticas ocorridas nos Andes e no sul da América do Sul durante o Pleistoceno e o início do Holoceno, alternando entre períodos de formação de grandes áreas abertas e a expansão de florestas (Markgraf 1993; Avise et al. 1998; De Vivo & Camignotto 2004).

A espécie *Lycalopex vetulus* costuma ser encontrada principalmente em áreas de formações vegetais abertas do Planalto Central e áreas periféricas de transição, atuando como onívoro do estrato subarbustivo no Cerrado. O tamanho do seu corpo varia de 58,5 a 64,0 cm e a cauda de 28,0 a 32,0 cm, pesando até 4,0 kg. Seus membros são esbranquiçados, a cauda é espessa, com uma pelagem densa, geralmente apresentando uma mancha em sua base. Possui uma pelagem vermelho-amarronzada na cabeça, e dorsalmente, cinza-amarronzada com uma faixa escura que se estende da nuca até a extremidade da cauda, característica mais evidente nos machos adultos (Nowak 1999; Ramos Jr. 2003; Dalponte & Courtenay 2004, 2008).

A base da sua dieta é constituída principalmente por insetos (térmitas), podendo se alimentar também de pequenos vertebrados e frutos, sendo considerado um ótimo dispersor de sementes (Dalponte 1997, 1999; Nowak 1999). Tem hábito noturno e crepuscular, vivendo de forma solitária, em pares ou em pequenas unidades familiares com fêmeas e filhotes (Nowak 1999).

As principais ameaças à espécie parecem ser a destruição de seu hábitat e outros efeitos negativos diretos e indiretos causados pelo homem (Lemos et al. 2011). Devido ao fato de a espécie ter sua distribuição associada ao Cerrado, bioma que sofre uma alta pressão antrópica, com menos de 20% de sua área original ainda em estado primitivo e classificado como um dos 34 ecossistemas mais ameaçados do planeta (Mittermeier et al. 2005), estima-se que a espécie terá uma perda de hábitat equivalente a pelo menos 10% nos próximos 15 anos (Lemos et al. 2013). Além disso, outras ameaças consistem de eventuais ataques por cães domésticos nas proximidades de fazendas e áreas urbanas, atropelamentos, doenças, alta mortalidade de filhotes/juvenis e o eventual abate por caçadores com o intuito de proteger suas criações domésticas, já que os indivíduos são comumente confundidos com outra espécie simpátrica de canídeo, o cachorro-do-mato (*Cerdocyon thous*), à qual são supostamente atribuídas perdas de animais domésticos por predação (MacDonald &

Sillero-Zubiri 2004; Bernardi et al. 2005; Dalponte & Courtenay 2008; Spíndola et al. 2008; Lemos et al. 2013).

Tendo em vista tais fatores, a espécie foi recentemente categorizada na Lista Vermelha Brasileira como vulnerável (VU) (Lemos et al. 2013), apresentando ainda o status de espécie em perigo (EN) para o estado de Minas Gerais (Chiarello et al. 2008) e deficiente de dados (DD) no Paraná (Mikich & Bérnils 2004). Apesar disso, a raposa-do-campo está atualmente classificada como pouco preocupante (LC) na lista elaborada pela IUCN (*The World Conservation Union*) (Dalponte & Courtenay 2008), onde até o ano de 2004 constava como deficiente em dados (DD). Esta avaliação tem como base o fato de a espécie aparentar ser relativamente comum e localmente abundante na área central de sua distribuição, além de, segundo alguns autores, exibir certa adaptabilidade a distúrbios antropogênicos (Juarez & Marinho-Filho 2002; Jácomo et al. 2004; Courtenay et al. 2005; Dalponte & Courtenay 2004, 2008; Bocchiglieri et al. 2010).

Outra espécie do gênero *Lycalopex* com ocorrência no Brasil é *L. gymnocercus*, comumente conhecida como graxaim-do-campo ou raposa-do-campo. Sua distribuição em território brasileiro abrange os estados do Rio Grande do Sul (Lucherini & Vidal 2008), Santa Catarina (Cherem et al. 2004) e Paraná (Mikich & Bérnils 2004), havendo registros recentes de sua ocorrência no sudeste do estado de São Paulo, evidenciando uma expansão de seu território e uma possível simpatria com *L. vetulus* na região (Queirolo, Kasper & Lemos, com. pess.).

Lycalopex gymnocercus parece adaptar-se bem a alterações induzidas pelo homem, porém a transformação do habitat em áreas agrícolas é a principal ameaça à sua conservação (Jímenez et al. 2008; Lucherini & Vidal, 2008). Apesar disso, a espécie não consta na lista nacional de espécies ameaçadas e atualmente tem seu status classificado pela IUCN como pouco preocupante (LC) (Jímenez et al. 2008).

A expansão do conhecimento e o aprimoramento das tecnologias e aplicações das técnicas genéticas representam uma poderosa ferramenta para a conservação dos canídeos (Martinez et al. 2013). Dentre os seus diversos usos, a genética da conservação pode determinar as relações entre táxons (Geffen et al. 1992, Geffen & Mc Donald 1992; Mercure et al. 1993; Slater et al. 2009), distinguir limites de distribuição (Yahnke et al. 1996; Goldstein et al. 2000; Gaubert et al. 2012; Martinez et

al. 2013), contribuir para a diferenciação taxonômica (Maldonado et al. 1997; Lindblad-Toh et al. 2005), realizar estudos em nível populacional, abordando aspectos como fluxo gênico, dispersão e relações de parentesco entre indivíduos (Mills et al. 2000; Taylor et al. 2000; vonHoldt et al. 2011; Fontoura-Rodrigues & Eizirik 2014), identificar porções significativas da diversidade genética contida em cada espécie, as chamadas Unidades Evolutivamente Significativas (UES) (Dalén et al. 2005; Tchaicka et al. 2007; Carmichael et al. 2008; Pilot et al. 2010), além de investigar a ocorrência de hibridação (Lehman et al. 1991; Wayne et al. 1992; Vilà & Wayne 1999; Moura et al. 2014; Randi et al. 2014).

Para auxiliar no embasamento de estratégias de conservação e ações de manejo apropriadas, faz-se necessário o uso de métodos filogeográficos de pesquisa. A filogeografia é um campo de estudo que investiga os processos que afetam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente no âmbito intra-específico (Avice 2000). Devido à sua capacidade de servir como elo entre várias outras áreas de conhecimento, tais como a sistemática filogenética, a genética populacional e a ecologia, esta abordagem se tornou uma importante ferramenta na busca por hipóteses para explicar a complexa relação entre a história da Terra e os padrões contemporâneos de biodiversidade (Schneider et al. 1998; Arbogast & Kenagy 2001). De uma forma mais específica, a filogeografia facilita a investigação do impacto causado por eventos históricos na composição genética e na estruturação de populações atuais (Avice et al. 1987), permitindo, dentre outras análises, uma reconstrução da trajetória evolutiva de uma determinada espécie através do tempo e do espaço (Nelson & Ladiges 1996; Bermingham & Moritz 1998; Avice 2000).

Muitos estudos filogeográficos vêm tendo como foco principal a análise de processos demográficos históricos, incluído estimativas de fluxo gênico e variação no tamanho populacional efetivo (Avice et al. 1984, 1988; Wilson et al. 1985; Vilà et al. 1999), porém grande parte dos estudos ainda se concentra na caracterização da estrutura populacional, incluindo a identificação de populações geográficas evolutivamente distintas (Taberlet & Bouvet 1994; Bernatches & Wilson 1998; Riddle et al. 2000; Rodrigues 2009; Perini et al. 2010; Machado 2011; Magnus 2011; Hahn 2011; Pires 2012).

Para que sejam realizadas análises desta natureza, é necessária a utilização de um ou mais marcadores moleculares. Por terem características complementares, até o momento os mais utilizados têm sido as sequências de segmentos do DNA mitocondrial (mtDNA) em conjunto com locos de microssatélites (*short tandem repeats* - STR) nucleares.

O genoma mitocondrial é herdado de forma uniparental (linhagem materna), apresentando um tamanho efetivo populacional quatro vezes menor do que segmentos nucleares autossômicos e uma taxa de evolução molecular relativamente mais rápida, evidenciando processos de diferenciação populacional de maneira mais eficiente (Brown et al. 1982; Avise et al. 1987; Eizirik et al. 2006). Essas características são observadas em especial na região controladora do mtDNA (D-loop), que dentre todas as outras regiões, apresenta a maior taxa de polimorfismo intraespecífico, mostrando-se usualmente adequada para análises filogeográficas microevolutivas (Avise et al. 1987; McMillan & Palumbi 1997; Lunt et al. 1998).

Por outro lado, a herança exclusivamente uniparental do mtDNA faz com que apenas uma parte da história seja revelada por este marcador, fazendo com que, em alguns casos, a estrutura genética real do organismo não seja representada de maneira adequada (MacHugh et al. 1997; Avise 2000; Eizirik et al. 2006). De forma a suprir tais limitações, se faz necessário o uso em combinação de marcadores nucleares; destes, de acordo com suas características complementares, os mais utilizados têm sido os microssatélites. Estes marcadores vêm sendo amplamente utilizados para abordar questões referentes à diversidade genética e à história evolutiva de vários organismos. Além de apresentarem uma alta taxa mutacional, e, por conseguinte, níveis acentuados de variabilidade, estes apresentam herança biparental, portanto permitindo a análise também da linhagem paterna, o que complementa os estudos do mtDNA (Jorde et al. 2000).

Estudos recentes investigaram as relações filogenéticas entre as espécies do gênero *Lycalopex* em conjunto a alguns aspectos da filogeografia deste grupo (Tchaicka 2006; Favarini 2011). Estes estudos iniciais confirmaram a monofilia deste gênero, apoiaram a posição basal de *Lycalopex vetulus* neste clado, e revelaram alguns casos interessantes de estruturação filogeográfica intraespecífica para algumas espécies deste grupo.

Em um destes estudos, Favarini (2011) relatou a presença de dois indivíduos amostrados no Estado de São Paulo que haviam sido fenotipicamente identificados como *Lycalopex vetulus*, porém apresentavam haplótipos de mtDNA provenientes de *L. gymnocercus*. Tal descoberta levanta duas hipóteses distintas: (i) tais indivíduos eram de fato exemplares de *L. gymnocercus* identificados erroneamente como *L. vetulus*, algo inesperado tendo em vista que não havia ocorrência prevista de *L. gymnocercus* em São Paulo; e (ii) a observação se deve à introgressão de haplótipos de *L. gymnocercus* em *L. vetulus*, sugerindo que esteja ocorrendo hibridação entre as duas espécies nesta região. Em ambos os casos, pode-se hipotetizar que a expansão geográfica de *L. gymnocercus* e/ou sua hibridação com *L. vetulus* sejam induzidas por efeitos antropogênicos, especificamente o desflorestamento da Mata Atlântica que outrora atuava como barreira geográfica entre estas espécies (ambas ocorrendo em ambientes abertos). Neste sentido, o teste destas hipóteses se apresenta como uma necessidade urgente de pesquisa no contexto da biologia evolutiva e biologia da conservação destas duas espécies, ressaltando ainda mais a necessidade da realização de maiores estudos com foco neste tema.

ARTIGO CIENTÍFICO

“Análises filogeográficas de *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) revelam um processo recente de hibridação com um canídeo relacionado, *L. gymnocercus*”

Fabricio Silva Garcez; Ligia Tchaicka e Eduardo Eizirik

A ser submetido ao periódico Conservation Biology

Análises filogeográficas de *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) revelam um processo recente de hibridação com um canídeo relacionado, *L. gymnocercus*

Filogeografia de *Lycalopex vetulus* e hibridação

Palavras-chave: Efeitos antropogênicos, fragmentação, história demográfica, raposinha, graxaim-do-campo, zona híbrida.

Fabricio Silva Garcez^a; Ligia Tchaicka^b; Eduardo Eizirik^{ac}

^a Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, CEP 90619-900, Porto Alegre, RS, Brasil.

^b Departamento de Química e Biologia; Universidade Estadual do Maranhão, Cidade Universitária Paulo VI, S/N, Tirirical, CEP 65055-970, São Luis, MA, Brasil.

^c Instituto Pró-Carnívoros, Parque Edmundo Zanoni, Av. Horácio Neto, 1030, CEP 12945-010, Atibaia, SP, Brasil

* Autor correspondente:

Dr. Eduardo Eizirik. Faculdade de Biociências, PUCRS.

Análises filogeográficas de *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) revelam um processo recente de hibridação com um canídeo relacionado, *L. gymnocercus*

Abstract

The hoary fox (*Lycalopex vetulus*) is the smallest Brazilian canid and an endemic species of the Cerrado biome, including adjacent transitional areas harboring open habitats. Recent studies reported some evidence suggesting a potential hybridization process between *L. vetulus* and *L. gymnocercus* in a contact zone that has likely been formed recently. Using microsatellite and mtDNA markers, we investigated the influence of historical processes on the population structure of *L. vetulus*, as well as the occurrence of hybridization between this species and *L. gymnocercus*. For these purposes, tissue and blood samples from animals representing most of the hoary fox distribution were obtained ($n = 61$), as well as from *L. gymnocercus* ($n = 30$) sampled in their contact zone and adjacent areas. Our results showed high levels of genetic diversity for *L. vetulus* (haplotype diversity: $Hd = 0.98$ and expected heterozygosity: $He = 0.81$) and different population scenarios with each of the molecular marker types, suggesting male-mediated gene flow. We also observed a south-north partition, with no haplotype sharing between these regions. This pattern is similar to the one observed in a sympatric canid (*Cerdocyon thous*) and in various other Atlantic Forest vertebrates, raising the hypothesis that species occurring in open habitats may undergo equivalent vicariant processes. Six individuals caught in the contact zone showed signs of mixing with *L. gymnocercus* in the composition of their microsatellite genotypes, five of which presenting introgressed mtDNA haplotypes from the same species. These results support the inference of hybridization between these canids, likely induced by anthropogenic effects (*i.e.* deforestation in the Atlantic Forest). Our study illustrates how the fragmentation and alteration of natural habitats can play an important role in the genetic composition of wild populations, and should provide useful data for the design of conservation strategies on behalf of both species.

Introdução

Os canídeos estão presentes em todos os continentes da Terra (à exceção da Antártica), dentre os quais a América do Sul é detentora da maior diversidade para o grupo, abrigando 6 gêneros e 11 espécies (Redford & Eisenberg 1992). Seis dessas pertencem ao gênero endêmico *Lycalopex*, (*L. gymnocercus*, *L. vetulus*, *L. griseus*, *L. sechurae*, *L. fulvipes* e *L. culpaeus*) (Wozencraft 2005) que deriva de uma rápida e recente radiação, tendo sua origem datada em cerca de 1.3 milhões de anos atrás (Ma) (Perini et al. 2010). Essa radiação rápida é um dos motivos pelos quais a taxonomia do gênero se mostrou um desafio durante muito tempo (Langguth 1975; Medel et al. 1990; Zunino et al. 1995; Yahnke et al. 1996; Tchaicka 2006; Perini et al. 2010) e não foi ainda completamente elucidada.

Lycalopex vetulus (Lund 1842), também conhecida como raposinha-do-campo, é o menor dos canídeos brasileiros e a única espécie do gênero endêmica do Brasil, onde habita áreas de formações vegetais abertas do Planalto Central. Sua distribuição está intimamente associada ao bioma Cerrado, porém pode ser também encontrada em áreas de transição e áreas abertas formadas por outros habitats, como por exemplo, o Pantanal e a Caatinga (Costa & Courteney 2003; Dalponte 2009; Bocchiglieri 2010; Olifiers 2013) (Fig. 1a).

A espécie vem sofrendo uma importante modificação e redução de seu habitat (estima-se uma perda de 10% nos próximos 15 anos) causada principalmente por uma alta pressão antrópica exercida no bioma Cerrado, o qual possui apenas 20% de sua área original ainda em estado primitivo (Lemos et al. 2013), sendo portanto considerado um dos 34 ecossistemas mais ameaçados do planeta (Mittermeier et al. 2005). Outras ameaças à conservação da espécie consistem em mortes por

atropelamentos, doenças, ataques de cães domésticos, alta mortalidade de filhotes/juvenis e o eventual abate por caçadores (Dalponte & Courtenay 2008; Spíndola et al. 2008; Lemos et al. 2013). Tais fatores levaram a uma recente classificação como espécie vulnerável segundo a Lista Vermelha Brasileira de Fauna Ameaçada (ICMBio 2014), sendo sua situação considerada mais preocupante em algumas regiões de ocorrência (Chiarello et al. 2008).

Apesar do recente aumento de estudos englobando aspectos ecológicos e biológicos de *L. vetulus* (Jácomo et al. 2004; Courtenay et al. 2005; Rocha et al. 2008; Lemos & Facure 2011; Lemos et al. 2013), a espécie ainda é considerada um dos canídeos brasileiros menos estudados, necessitando de mais investigações que abordem questões relacionadas à sua distribuição geográfica, variabilidade genética, requisitos de ambiente e mesmo aspectos básicos de sua história natural (Dalponte 1997; Oliveira 2006; Tchaicka 2006; Favarini 2011; Olifiers 2013).

No Brasil, ainda há a ocorrência de outra espécie do gênero *Lycalopex*, *L. gymnocercus*, também conhecido como graxaim-do-campo ou raposa-do-campo. A espécie parece adaptar-se bem a alterações induzidas pelo homem (Lucherini & Vidal 2008) e sua distribuição em território brasileiro abrange as áreas de campos abertos do sul, ocupando todo o bioma dos Pampas até o sul do cerrado (Fig. 1b) (Mikich & Bérnils 2004; Lucherini & Vidal 2008). Os limites de sua distribuição ao sul do país ainda são incertos, devido principalmente a constantes modificações no ambiente com consequente surgimento de áreas abertas, havendo indícios de uma recente expansão de seu território e uma possível simpatria com *L. vetulus* na região (F. Lemos & P. Vilella, com. pessoal).

Devido à história evolutiva relativamente recente dos canídeos, aliado a hábitos generalistas e alta capacidade de dispersão, o que permite que ocorram em uma grande variedade de habitats, inclusive em ambientes antropizados (Sillero-Zubiri 2014), vários casos de hibridação já foram reportados para o grupo: *Canis lupus* e *C. latrans* (Lehman et al. 1991; Kays et al. 2010); *C. simensis* e *C. familiaris* (Sillero-Zubiri et al. 1996); *C. latrans* e *C. familiaris* (Adams 2003); *C. lupus baileyi*, *C. latrans* e *C. rufus* (Hailer & Leonard 2008), levando algumas espécies até mesmo ao risco de extinção (Gottelli et al. 1994; Roy et al. 1994).

Embora não exista uma evidência concreta da ocorrência de hibridação entre espécies do gênero *Lycalopex*, alguns estudos levantaram hipóteses de um possível cruzamento entre *L. gymnocercus* e *L. griseus* (Tchaicka 2006) e mais recentemente entre *L. gymnocercus* e *L. vetulus* (Favarini 2011).

Este último estudo relatou como possíveis híbridos dois dos indivíduos amostrados na região de possível contato recente entre a distribuição das duas espécies, em São Paulo. Os animais foram fenotipicamente identificados como *L. vetulus*, porém apresentando haplótipos de mtDNA provenientes de *L. gymnocercus*. Neste sentido, nós objetivamos, com base na análise de locos de microssatélites (STR) e segmentos de DNA mitocondrial (mtDNA), (i) investigar a influência de processos históricos nos padrões de estruturação populacional da raposa-do-campo (*L. vetulus*), em toda a sua distribuição, e (ii) testar a ocorrência de hibridação entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus* na possível zona de contato entre estas espécies.

Métodos

Amostragem e procedimentos laboratoriais

Para o estudo nós utilizamos amostras biológicas de sangue, obtidas de animais capturados por pesquisadores colaboradores, preservadas em solução tampão (100mM Tris, 100mM EDTA, 2% SDS) e de tecido a partir de animais atropelados provenientes de indivíduos distribuídos ao longo de todas as regiões descritas para a ocorrência da espécie (n = 61) (Fig. 1a). Adicionalmente, 28 amostras de *L. gymnocercus*, oriundas da possível zona de contato entre as espécies e regiões adjacentes (Fig. 1b), foram inclusas no estudo com o objetivo de avaliar a existência de híbridos (Tabela 1).

Procedimentos laboratoriais

A extração de DNA foi realizada através do protocolo de fenol/clorofórmio seguido da precipitação por acetato de sódio/isopropanol, modificado a partir de Sambrook et al. (1989), sendo posteriormente verificado o grau de integridade e a concentração por eletroforese horizontal em gel de agarose 1%, corado com GelRed (Biotium).

Foram amplificadas duas regiões do mtDNA: um segmento de 1165 pb do gene *ND5*, e um fragmento de 609 pb da região controladora. Devido a diferenças amostrais nos dados gerados para cada região do mtDNA para *L. vetulus*, as análises foram realizadas utilizando os dados de forma concatenada (n = 47) e posteriormente tiveram seus resultados comparados com a análise apenas da região controladora (n = 55)

(Tabela 1). Para a amplificação dos fragmentos e o sequenciamento foram utilizados os *primers* e protocolos descritos por Favarini (2011).

Adicionalmente a este conjunto de dados, nós analisamos 11 locos de microssatélites: 2001, 2004, 2010, 2054, 2088, 2132, 2137, 2140, 2018, 2096 e 2159, todos tetranucleotídicos, inicialmente desenvolvidos para cães domésticos (Francisco et al. 1996) e que tiveram sua eficiência posteriormente testada para espécies do gênero *Lycalopex* (Fontoura-Rodrigues et al. 2008). Os locos de microssatélites foram amplificados em condições de PCR estabelecidas por Fontoura-Rodrigues et al. (2008) e genotipados em reações multiplex por sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare), utilizando como padrão de tamanho Genetab 500 (GeneID). O comprimento final do fragmento foi determinado através do programa Genetic Profiler 2.2 (GE Healthcare). Para fins de confirmação e de uma melhor confiabilidade dos dados obtidos, indivíduos homozigotos e/ou com incertezas em seus genótipos, bem como os que não funcionaram em uma primeira tentativa, tiveram suas genotipagens repetidas (aproximadamente 30% do total). Após estes passos de validação, amostras que tiveram ≥ 3 locos com dados faltantes foram excluídas das análises (Tabela 1). A presença de alelos nulos foi investigada através do programa Micro Checker (VanOosterhout et al. 2004), tanto considerando o conjunto total de dados como uma única população, quanto alocando os indivíduos a três populações geográficas distintas: norte, centro e sul, para comparação (Fig. 1a).

Análises estatísticas

Os eletroferogramas das sequências mitocondriais foram analisados visualmente e editados utilizando o programa Geneious (Kearse et al. 2012). As sequências finais

foram alinhadas com o algoritmo ClustalW implementado no pacote MEGA 6 (Tamura et al. 2013). O modelo mais adequado de evolução da sequência de nucleotídeos para o conjunto de dados foi determinado com o programa JModeltest (Darriba et al. 2012), e incorporado nas análises posteriores.

A partir dos dados de mtDNA, nós calculamos a diversidade haplotípica (H_d), diversidade nucleotídica (π), D de Tajima (Tajima 1989) e F_s de Fu e Li (Fu 1997). Para investigar uma possível estruturação geográfica a partir de uma diferenciação genética entre os indivíduos localizados no norte, centro e sul da distribuição da espécie, nós calculamos o índice Φ_{st} par-a-par, medida análoga ao F_{st} , mas que lida melhor com análises de conjuntos de dados em que os tamanhos populacionais são muito diferentes (Weir & Cockerham 1984), sendo mais adequada ao presente estudo. Todas as análises acima foram realizadas com o programa Arlequin (Excoffier & Lischer 2010).

Para verificar as frequências e as relações filogenéticas entre os haplótipos mitocondriais, bem como avaliar a existência de introgressão entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus*, foi construída uma rede de haplótipos baseada no cálculo dos vetores medianos implementado no programa Network (Bandelt et al. 1999).

De forma complementar, as relações filogenéticas entre as sequências foram estimadas com base em dois algoritmos, máxima verossimilhança (*maximum likelihood* - ML) e por inferência Bayesiana (*Bayesian Inference* - BI). Para a análise por ML nós utilizamos o programa PhyML (Guindon et al. 2010). Os valores de suporte dos ramos da topologia resultante foram estimados pelo teste da frequência de *bootstrap* após a geração de 1.000 réplicas. A análise filogenética baseada em BI foi conduzida por meio da obtenção da distribuição posterior, via algoritmo MCMC, através do programa

MrBayes (Ronquist & Huelsenbeck 2003), sendo quatro corridas realizadas simultaneamente com quatro cadeias cada, onde 25% das amostras iniciais foram excluídas (*burn-in*) gerando um total de 30.000 árvores. O programa Tracer (Rambaut et al. 2014) possibilitou o acompanhamento e a análise da convergência das cadeias, estas sendo amostradas a cada 100 ciclos. O suporte estatístico dos clados foi inferido através do cálculo da sua probabilidade posterior após convergência. As árvores geradas com ambos os métodos empregados foram visualizadas e editadas no programa Figtree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para os dados de microssatélite, nós estimamos o coeficiente de endocruzamento (Fis), as heterozigosidades observada e esperada e o índice de Shannon (I) empregando o programa GenAlEx (Peakall & Smouse 2006), o cálculo da riqueza alélica foi realizado com o programa Fstat (Goudet 2001). Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) foram realizados por meio do programa GenePop (Rousset 2008), utilizando o método de MCMC. Para as análises de diferenciação e estruturação populacional, seguindo os mesmos grupos determinados anteriormente, foi realizado o cálculo do índice Fst por meio do programa GenAlEx e comparativamente do índice Rst através do programa Arlequin.

Além destas abordagens, investigamos a estrutura populacional e a possibilidade de hibridação utilizando a análise Bayesiana implementada no programa Structure (Pritchard et al. 2000). Inicialmente, utilizamos os dados de microssatélite somente dos indivíduos considerados puros de *L. vetulus* (n = 29) e *L. gymnocercus* (n = 14), ou seja, aqueles que obtiveram valores de q > 0,9. Esta análise tinha o objetivo de avaliar se os marcadores utilizados no estudo eram capazes de diferenciar os indivíduos de ambas as espécies, portanto não foi incorporada à análise qualquer informação fenotípica. Através de um modelo que permite a mistura genética entre

indivíduos e assumindo frequências alélicas correlacionadas entre os grupos, foram geradas 1.000.000 de repetições MCMC após um burn-in de 500.000 gerações. Dez corridas independentes foram realizadas, com o número de grupos (k) variando de 1 a 4. O programa StructureHarvester (Earl & vonHoldt 2012) foi utilizado para ter acesso aos resultados e o número ideal de agrupamentos foi baseado no cálculo de ΔK (Evanno et al. 2005). Após a definição dos indivíduos puros de cada uma das duas espécies, foi realizada uma nova corrida, utilizando os mesmos parâmetros anteriores, porém, com a adição dos indivíduos originários da zona de contato (n = 11) objetivando determinar a ancestralidade dos mesmos e avaliar a existência de possíveis híbridos. Novamente, nenhuma informação fenotípica foi adicionada a análise. A ancestralidade foi então estimada para cada grupo de acordo com o valor de q. Para cada uma das análises, as diferentes corridas foram sumarizadas utilizando o programa Clumpp (Jakobsson & Rosenberg 2007), sendo o gráfico gerado através do programa Distruct (Rosenberg 2004).

Resultados

Com relação à variabilidade genética encontrada em *L. vetulus*, os níveis de diversidade haplotípica e nucleotídica foram altos: $H_d = 0,9803$ (SE = 0,0121); $\pi = 0,0135$ (SE = 0,0068). Dentre os testes de neutralidade realizados, ambos resultaram em valores negativos, o que pode indicar uma história de expansão populacional, porém apenas o teste F_s de F_u e L_i apresentou um resultado estatisticamente significativo (-10,74; $p < 0,01$). Apesar de apresentarem valores de diversidade bem próximos, os indivíduos originários da área central da distribuição da espécie foram os que apresentaram a maior diversidade nucleotídica ($\pi = 0,0133$; SE = 0,0069), e em

contrapartida a menor diversidade haplotípica dentre as regiões ($H_d = 0,9508$; $SE = 0,028$). As análises realizadas com base apenas nas sequências obtidas para a região controladora, porém utilizando um número maior de indivíduos, apresentaram valores próximos aos valores do conjunto de dados concatenados (Tabela 2).

A diversidade genética encontrada nos locos de microssatélites também apresentou valores relativamente altos: $I = 1,90$; Riqueza Alélica = 6,80. A heterozigosidade observada (0,767; $SE = 0,023$) foi menor do que a heterozigosidade esperada (0,806; $SE = 0,015$), porém com valores bem próximos, resultando em um baixo coeficiente de endocruzamento F_{is} (0,047; $SE = 0,023$). Apesar desses resultados, alguns locos apresentaram desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (Tabela 3).

Quando analisado todo o conjunto de dados como uma única população, através do programa MicroChecker, foram identificados alelos nulos presentes em 4 locos: 2004, 2010, 2054 e 2159. Porém, o número de locos que apresentaram alelos nulos foi reduzido quando os indivíduos foram separados em grupos de acordo com a sua origem, sendo identificado apenas 1 loco tanto para os indivíduos do Centro (loco 2054) quanto para os do Sul da distribuição (loco 2010) e nenhum para os indivíduos do Norte. Além disso, os locos identificados nessa segunda análise não foram semelhantes entre os grupos, nos levando a acreditar em falsos positivos induzidos por desvios no equilíbrio de HWE (possivelmente derivados de estrutura populacional não identificada) em tais regiões.

As investigações acerca da composição genética das populações e da diferenciação entre as mesmas resultaram em diferentes padrões de acordo com o marcador utilizado. Com base nos marcadores mitocondriais, a análise do Φ_{st} par-a-

par revelou uma alta diferenciação genética entre os grupos, indicando um baixo nível de fluxo gênico entre os mesmos (Tabela 4). Os indivíduos amostrados no norte foram os que apresentaram a maior diferenciação em relação aos demais, resultando em valores de $\Phi_{st} = 0,2971$ e $0,3152$, quando comparados com os indivíduos do centro e do sul, respectivamente (Tabela 4).

Em contrapartida, quando analisados os dados de microssatélites, de forma geral os valores revelam uma baixa diferenciação genética entre os grupos, indicando a existência de fluxo gênico entre as populações (Tabela 4). Assim como nos marcadores mitocondriais, a maior diferença observada entre as populações foram entre os indivíduos do norte e os do sul ($F_{st} = 0,041$; $R_{st} = 0,102$).

A partir da rede de haplótipos, observou-se uma separação clara entre os dois táxons (*L. vetulus* e *L. gymnocercus*) com a formação de dois grupos bem definidos (Fig. 2). Entre os indivíduos de *L. vetulus* analisados ($n = 42$), foram obtidos 33 diferentes haplótipos. Foi observado um compartilhamento de haplótipos entre as regiões centro e sul, porém não houve indícios de compartilhamento entre as populações da região norte e as demais regiões. Apesar disso, a estruturação geográfica sugerida, com base nos valores do índice Φ_{st} (Tabela 4), não ficou muito clara na rede de haplótipos obtida, inexistindo a formação de clados intraespecíficos bem definidos em *L. vetulus* (Fig. 2).

As árvores filogenéticas geradas no estudo utilizando os métodos de ML e BI se mostraram bastante congruentes, gerando topologias similares com ramos principais bem apoiados tanto por probabilidade posterior quanto pela frequência de *bootstrap*, estimando com uma boa resolução as relações filogenéticas existentes entre os táxons analisados (Fig. 3). Os indivíduos de *L. vetulus* e *L. gymnocercus* formaram dois clados

bem separados e apoiados, tendo *L. vetulus* assumindo uma posição mais basal em relação às outras espécies incluídas.

Foram detectados haplótipos do mtDNA provenientes de *L. gymnocercus* em cinco indivíduos de *L. vetulus* capturados em São Paulo. Todos haviam sido identificados fenotipicamente como *L. vetulus*; porém, as análises filogenéticas revelaram um forte agrupamento de suas sequências com aquelas de *L. gymnocercus*, formando um clado bem apoiado (Fig. 3). A rede de haplótipos veio a complementar tal resultado, uma vez que nos permitiu detectar a presença de haplótipos compartilhados entre tais indivíduos de *L. vetulus* e *L. gymnocercus* amostrados na possível zona de contato formada entre as duas espécies (fig. 2), o que confere ainda mais suporte ao fato de realmente se tratarem de indivíduos contendo haplótipos introgridos recentemente. Adicionalmente, para comprovar que tais indivíduos não foram simplesmente identificados erroneamente, a classificação taxonômica dos mesmos foi novamente avaliada com base nos dados de microssatélites.

Utilizando os dados de microssatélites gerados para as duas espécies, identificamos inicialmente os representantes considerados “puros” de cada espécie com o programa Structure, sendo este conjunto classificado como grupo controle parental nas análises subsequentes (Fig. 4A). Os dados obtidos revelaram uma diferenciação genética significativa entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus*, formando duas populações bem definidas de acordo com o valor de ΔK (Fig. 5A). No total, o grupo controle parental foi composto por 14 *L. gymnocercus* e 29 *L. vetulus*, todos com um percentual mínimo de 90% da composição de seu genótipo associada à respectiva espécie de origem.

Após adicionar os animais originários da zona de contato juntamente ao grupo controle parental às análises, foi confirmado que os cinco *L. vetulus* que anteriormente haviam apresentado haplótipos mitocondriais introgrididos, realmente se tratam de indivíduos híbridos entre as duas espécies. Sendo que, três destes demonstraram sinais de mistura entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus* na composição de seu genótipo (bPve323, bPve324, bPve325), e outros dois (bPve328 e bPve353) provenientes de um provável retrocruzamento ($q > 0,94$) (Fig. 4b). Além destes, outro indivíduo amostrado na zona de contato demonstrou a presença de miscigenação em seu genótipo (bPve351) (Fig. 4b), porém neste caso não se observou introgressão de mtDNA proveniente de *L. gymnocercus*.

Com isso, foram obtidas evidências concretas da ocorrência de hibridação entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus* no sudeste do Brasil, mais especificamente no estado de São Paulo.

Discussão

Diversidade genética

A variabilidade genética existente em *L. vetulus* para a região controladora (*D-loop*) do mtDNA não diferiu muito entre as populações, sendo bastante alta quando a espécie foi avaliada como um todo ($Hd = 0,97$; $\pi = 0,021$). A diversidade observada foi superior à encontrada para o mesmo segmento mitocondrial em outras espécies de canídeos, como a raposa-do-ártico (*Alopex lagopus*, $\pi = 0,009$; Dálen et al. 2005) e o lobo-etíope (*C. simensis*, $\pi = 0,009$; Gottelli et al. 2004), porém com valores próximos ao do cão-selvagem-africano (*Lycaon pictus*, $\pi = 0,014$; Girman et al. 2001) e aos encontrados para uma espécie simpátrica de canídeo, o graxaim-do-mato (*Cerdocyon*

thous, $Hd = 0,83 / \pi = 0,019$; Tchaicka et al. 2007). Mesmo assim, a variabilidade genética da espécie ainda é menor do que a encontrada em canídeos que apresentam grandes áreas de distribuição, como o lobo-cinzento (*C. lupus*, $\pi = 0,026$; Vilà et al. 1999) e o coiote (*C. latrans*, $\pi = 0,046$; Vilà et al. 1999).

Para os microssatélites, a heterozigosidade esperada encontrada em *L. vetulus* ($He = 0,81$) foi maior do que a obtida para os mesmos locos em *C. thous* ($He = 0,74$; Fontoura-Rodrigues et al. 2008), porém com um valor próximo ao encontrado em outra espécie simpátrica de canídeo, o lobo-guará (*Chrysocyon brachyurus*, $He = 0,79$; Fontoura-Rodrigues et al. 2008) e também em *L. gymnocercus* ($He = 0,80$; Fontoura-Rodrigues et al. 2008).

História e estrutura populacional

O valor negativo e estatisticamente significativo do índice F_s de F_u ($F_s = -10,7404$; $p < 0,01$), aliado à alta diversidade genética encontrada na espécie para ambos os marcadores, sugere que a mesma possa ter sofrido uma expansão populacional natural relativamente recente em sua história evolutiva, episódio que pode estar relacionado a períodos de expansão das áreas abertas, ocorridas durante o Pleistoceno na região habitada pela espécie (Markgraf 1993; Avise et al. 1998; De Vivo & Camignotto 2004).

Tanto a rede de haplótipos quanto a filogenia construídas com base no mtDNA indicaram a ausência de “clusters” populacionais bem definidos (Figs. 2 e 3), não evidenciando, desse modo, uma estruturação populacional significativa em *L. vetulus*. Em contrapartida, os valores de Φ_{st} obtidos foram altos (Tabela 4), sendo os indivíduos da população norte os que apresentaram uma maior diferenciação genética em relação

às demais populações (Centro, $\Phi_{st} = 0,297$; Sul, $\Phi_{st} = 0,315$). Este padrão pode ser observado também na rede de haplótipos, onde não há a existência de haplótipos compartilhados entre a população norte e as demais populações.

Podemos observar na rede de haplótipos uma distribuição usualmente basal dos haplótipos amostrados na área central de ocorrência da espécie, sendo os haplótipos das demais regiões originados a partir destes (Fig. 2). Isso nos possibilita inferir que essa região possa ter funcionado como a mais antiga área de distribuição para a espécie e, juntamente com a posição basal de *L. vetulus* no gênero (Fig. 3), confirmada também através de outros estudos (Tchaicka 2006; Favarini 2011) nos traz indícios de que o primeiro ponto de radiação do gênero *Lycalopex* possa ter ocorrido na região central da América do Sul (Langguth, 1975), uma vez que a espécie é endêmica do Brasil e tem sua distribuição intimamente associada a áreas abertas formadas pelo cerrado (Dalponte & Courtenay 2008).

Diferente do padrão populacional encontrado nos marcadores mitocondriais, as análises com base nos dados de microssatélites não evidenciaram uma estruturação populacional em *L. vetulus*, com baixos valores tanto de F_{ST} quanto de R_{ST} (Tabela 4), o que sugere a existência de fluxo gênico entre as populações. A heterozigosidade esperada obtida para *L. vetulus* ($H_e = 0.81$) foi a mesma encontrada em um estudo anterior envolvendo a espécie (Fontoura-Rodrigues et al. 2008). O fato de este último estudo, realizado com base em uma quantidade menor de locos e uma pequena parcela de indivíduos (nove locos e vinte indivíduos contra onze locos e quarenta e três indivíduos do estudo atual), ter alcançado o mesmo valor de diversidade genética obtido quando analisado a espécie em toda a sua distribuição apóia a inferência de que não haja uma estruturação populacional significativa nesta espécie.

De uma forma geral, os resultados obtidos acerca da estrutura populacional levaram a dois diferentes cenários de acordo com o marcador molecular utilizado. Enquanto as análises baseadas no mtDNA apontaram para um padrão de estruturação norte-sul, os dados de microssatélites sugeriram se tratar de uma população panmítica, sem a existência de estrutura populacional evidente.

Este cenário de estruturação populacional norte-sul encontrado em *L. vetulus* coincide com o padrão encontrado em uma espécie simpátrica de canídeo, *Cerdocyon thous* (Tchaicka et al. 2007; Machado & Hingst-Zaher 2009), bem como em outras espécies de vertebrados típicas de áreas florestais da região (Bates et al. 1998; Costa et al. 2000; Costa 2003), o que dá indícios de que essa descontinuidade genética possa estar relacionada com processos vicariantes impulsionados por mudanças ocorridas durante o Pleistoceno, onde ocorreram vários eventos de retração e expansão glacial nos Andes e ao sul da América do Sul, alternando entre períodos de formação de grandes áreas abertas e a expansão de florestas devido a mudanças climáticas (Markgraf 1993; Avise et al. 1998; De Vivo & Camignotto 2004). O surgimento de novas áreas abertas possibilitou uma maior dispersão, resultando na colonização das áreas mais ao norte (mais recente), com subsequente limitação no fluxo gênico das fêmeas (filopatria). Tal limitação pode ter sido exacerbada, ao longo dos ciclos glaciais, por momentos de expansão das florestas, isolando temporariamente áreas abertas e suas populações, e induzindo a diferenciação genética entre grupos regionais.

A existência de diferentes estratégias de dispersão entre os sexos, com os machos dispersando mais frequentemente e/ou por maiores distâncias, sendo portanto, predominantemente responsáveis pelo fluxo gênico entre as populações, e as fêmeas adotando um comportamento mais filopátrico, se reflete na divergência obtida entre os

marcadores no padrão de estruturação da espécie (Tabela 4). Convém ressaltar que este cenário de fluxo gênico mediado pelos machos e filopatria das fêmeas não é novidade dentre os canídeos, sendo relatado anteriormente em outras espécies, como *Lycaon pictus* (Girman et al. 2001), *Vulpes velox* (Kamier et al. 2004) e *C. thous* (Tchaicka et al. 2007). Apesar destas evidências moleculares, sabe-se ainda pouco sobre os padrões de dispersão na maioria dos canídeos, mesmo se tratando de um aspecto crucial para o entendimento dos processos populacionais atuais e históricos, os quais são necessários para que se planeje estratégias adequadas para a conservação destas espécies (MacDonald & Sillero-Zubiri 2004).

Hibridação *Lycalopex vetulus* x *L. gymnocercus*

A presença de haplótipos mitocondriais de *L. gymnocercus* em cinco indivíduos de *L. vetulus* (Fig. 3), os quais, a partir da análise de microssatélites, apresentaram evidências de mistura de material genético (Fig. 4b), sugere que fêmeas da primeira espécie cruzaram com machos da segunda. Por outro lado, a existência de um indivíduo de *L. vetulus* (bPve351) com evidência de miscigenação nos marcadores nucleares (Fig. 4b), porém sem um haplótipo mitocondrial proveniente de *L. gymnocercus*, indica a participação de fêmeas de *L. vetulus* no processo, podendo ter ocorrido a hibridação na direção oposta ou o cruzamento destas com machos híbridos F1 ou F2. O fato de haver um compartilhamento de haplótipo entre as duas espécies (Fig. 2), sugere que se trata de um processo muito recente, uma vez que não houve tempo suficiente para o acúmulo de novas mutações e o surgimento de novos haplótipos exclusivos dos indivíduos híbridos (p. ex. Trigo et al. 2013).

Aparentemente, nenhum dos indivíduos híbridos encontrados no estudo pertence à geração F1 (Fig. 4b), o que permite afirmar que os híbridos inicialmente gerados são ao menos parcialmente férteis. A origem de indivíduos híbridos estéreis poderia resultar em uma perda do potencial reprodutivo na região com consequente redução do crescimento populacional, podendo levar até mesmo a uma extinção local. Por outro lado, a presença de híbridos férteis abre a possibilidade de que o processo se expanda, gerando uma zona híbrida de grandes proporções ou mesmo a miscigenação completa entre as duas espécies, levando a uma descaracterização da constituição genética original destes organismos.

Tendo em vista a inferência de que se trata de um processo muito recente (talvez incipiente ainda), pode-se hipotetizar que a hibridação entre as duas espécies tenha sido induzida por efeitos antropogênicos, especificamente o desmatamento da Mata Atlântica que outrora atuava como barreira geográfica entre ambas (Fig. 6). O surgimento de áreas abertas devido a tais alterações ambientais permitiu a expansão dos limites de distribuição geográfica das duas espécies, levando à formação de uma zona de contato entre elas. Tal processo pode ter sido facilitado pelo fato de que ambas são típicas de áreas abertas e possuem hábitos generalistas e oportunistas, com uma alta taxa de dispersão (Jiménez et al. 2008; Lucherini & Vidal 2008; Dalponte 2009). A mobilidade pode influenciar a intensidade com que a hibridação afeta a composição genética das espécies hibridizantes, pois influencia a difusão de alelos em uma ou ambas as direções. Se a seleção natural contra os híbridos é fraca, as zonas híbridas podem se estender até consideráveis distâncias, afetando fortemente a constiuição genética das duas espécies envolvidas (Wilson et al. 2000).

Apesar de a hibridação poder ocorrer como um processo natural e exercer em alguns casos um importante papel no processo evolutivo, atuando como fonte de variabilidade genética tanto em animais quanto em plantas (Downling & Secor 1997; Seehausen 2004), este fenômeno pode vir a se tornar um problema grave quando induzido por mudanças no ambiente natural ou na composição das espécies causadas por atividades antropogênicas (Lehman et al. 1991; Allendorf et al. 2001; Wood 2003).

A modificação antrópica do ambiente tem alterado amplamente a distribuição de várias espécies de canídeos, com pelo menos sete delas aumentando e nove diminuindo sua distribuição no último século (MacDonald & Sillero-Zubiri 2004; Queirolo et al. 2011). Com o desflorestamento da Mata Atlântica, *L. vetulus* e o *L. gymnocercus*, outrora espécies tidas como alopátricas, expandiram sua área de distribuição, tornando-se simpátricas, o que possibilitou a ocorrência de hibridação. Tal fato pôde ser agravado pelo fato de *L. vetulus* possuir certa “adaptabilidade” a ambientes antropizados (Dalponte & Courtenay 2004; Rocha et al. 2008) e que a conversão de áreas naturais florestadas em pastos ou em áreas abertas resultaria em um aumento na disponibilidade do recurso alimentar, visto que esses animais tem sua dieta baseada em térmitas (Juarez & Marinho-Filho 2002) e na redução de potenciais predadores (Jácomo et al. 2004) criando um ambiente favorável ao aumento da densidade populacional da espécie (porém ver Lemos et al. 2013). Uma provável razão para o cruzamento interespecífico é a diferença na densidade de indivíduos existentes entre as duas espécies na recém-formada zona de contato, algo semelhante ao processo de hibridação ocorrido entre lobos-cinza (*Canis lupus*) e coiotes (*C. latrans*) (Lehman et al. 1991; Hailer & Leonard 2008).

A partir destes resultados, recomendamos que novos estudos envolvendo tais espécies e que dependam de sua correta identificação taxonômica, utilizem ferramentas moleculares para avaliar a presença de híbridos, especialmente no caso de indivíduos amostrados na zona de contato aqui identificada.

De uma forma geral, este estudo registrou, pela primeira vez, a ocorrência de hibridação entre *L. vetulus* e *L. gymnocercus*, provavelmente causada por efeitos antropogênicos na estrutura do ambiente natural, evidenciando como a fragmentação e a alteração de habitats naturais, algo cada vez mais comum nos tempos modernos, podem exercer um papel fundamental na conservação de espécies. Estudos detalhados devem ser realizados nesta região, integrando abordagens moleculares e ecológicas, com a finalidade de se investigar de forma mais aprofundada as características desta zona de contato e a significância evolutiva da hibridação para as duas espécies, avaliando se este contato irá resultar na origem: i) de populações de indivíduos híbridos férteis, levando a uma completa fusão das duas espécies (*hybrid swarm*); ou ii) levar a formação de uma zona híbrida estável constituída por indivíduos híbridos parcialmente férteis. Tais investigações serão de suma importância no embasamento de estratégias que visem à conservação de ambas as espécies nesta região, bem como à manutenção de sua integridade genética em longo prazo.

Agradecimentos

Gostaríamos de agradecer a todas as instituições e pesquisadores listados no Apêndice S1 (material suplementar), por fornecerem amostras biológicas utilizadas neste estudo, em especial a: Rose Gasparini (CENAP/ICMBio), Rodrigo Jorge

(ICMBio), Arnaud Desbiez (IPÊ-SP), Frederico Lemos (PCMC), Márcio Repenning (PUCRS), Tadeu Oliveira (UEMA).

Material Suplementar

Uma lista caracterizando todas as amostras utilizadas no estudo (Apêndice S1) bem como a identificação de cada amostra de acordo com os diferentes marcadores utilizados (Apêndice S2) estarão disponíveis online. Os autores são inteiramente responsáveis pelo conteúdo e funcionalidade destes materiais. Consultas devem ser direcionadas ao autor correspondente.

Literatura Citada

- Adams, J.R., J.A. Leonard, e L.P. Waits. 2003. Widespread occurrence of a domestic dog mitochondrial DNA haplotype in southeastern US coyotes. *Molecular Ecology*. **12**:541-546.
- Allendorf, F.W., R.F. Leary, P. Spruell, e J.K. Wenburg. 2001. The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*. **16**:613-622.
- Avise, J.C., D. Walker, e G.C. Johns. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **265**:1707-1712.
- Bandelt, H.J., P. Forster, e A. Röhl. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. **16**:37-48.
- Bates, J.M., S.J. Hackett, e J. Cracraft. 1998. Area-relationships in the neotropical lowlands: an hypothesis based on raw distributions of passerine birds. *Journal of Biogeography*. **25**:783-793.
- Bocchiglieri, A., A.F. Mendonça, e R.P.B. Henriques. 2010. Composition and diversity of medium and large size mammals in the Cerrado of central Brazil. *Biota Neotropica*. **10**:169-176.

- Chiarello, A.G., et al. 2008. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. Páginas 681-885 in A.B.M. Machado, G.M. Drummond e P. Paglia, editores. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. MMA, Fundação Biodiversitas. Brasil.
- Costa, C.H.N., e O. Courtenay. 2003. A new record of the hoary fox *Pseudalopex vetulus* in north Brazil. *Mammalia*. **67**:593-594.
- Costa, L.P. 2003. The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of Biogeography*. **30**:71-86.
- Costa, L.P., Y.L.R. Leite, G.A.B. Fonseca, e M.T. Fonseca. 2000. Biogeography of South American forest mammals: endemism and diversity in the Atlantic Forest. *Biotropica*. **32**:872-881.
- Courtenay, O., D.W. MacDonald, S. Gillingham, G. Almeida, e R. Dias. 2005. First observation on South America's large insectivorous canid: the hoary fox (*Pseudalopex vetulus*). *Journal of Zoology*. **268**:45-54.
- Dalén, L., E. Fuglei, P. Hersteinsson, C.M.O. Kapel, J.D. Roth, G. Samelius, M. Tannerfeldt, e A. Angerbjörn. 2005. Population history and genetic structure of a circumpolar species: the arctic fox. *Biological Journal of the Linnean Society*. **84**:79-89.
- Dalponete, J., e O. Courtenay. 2008. *Pseudalopex vetulus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível de www.iucnredlist.org (Acessado em Outubro 2014).
- Dalponete, J.C. 1997. Diet of hoary fox, *Lycalopex vetulus*, in Mato Grosso, Brazil. *Mammalia*. **61**:537-546.
- Dalponete, J.C. 2009. *Lycalopex vetulus* (Carnivora: Canidae). *Mammalian Species*. **847**:1-7.
- Darriba, D., G.L. Taboada, R. Doallo, e D. Posada. 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*. **9**:772.
- De Vivo, M., e A.P. Carmignotto. 2004. Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. *Journal of Biogeography*. **31**:943-957.
- Dowling, T.E., e C.L. Secor. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annual Review of Ecology and Systematics*. **28**:593-619.
- Earl, D.A., e B.M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*. **4**:359-361.
- Evanno, G., S. Regnaut, e J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*. **14**:2611-2620.
- Excoffier, L., e H.E.L. Lischer. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*. **10**:564-567.

- Favarini, M.O. 2011. Relações filogenéticas entre espécies do gênero *Lycalopex* (Mammalia, Canidae) inferidas com o uso de marcadores do DNA mitocondrial. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Fontoura-Rodrigues, M.L., C.A.V. Lima-Rosa, L. Tchaicka, F.P. Valdez, F.H.G. Rodrigues, R.C. Paula, M.P. Gough, W.E. Johnson, S.L. Bonatto, e E. Eizirik. 2008. Cross-amplification and characterization of 13 tetranucleotide microsatellites in multiple species of Neotropical canids. *Molecular Ecology Resources*. **8**:898-900.
- Francisco, L.V., A.A. Langston, C.S. Melersh, C.L. Neal, e C.A. Ostrander. 1996. A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*. **7**:359-362.
- Fu, Y.X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. **147**:915-925.
- Girman, D.J., et al. 2001. Patterns of population subdivision, gene flow and genetic variability in the African wild dog (*Lycaon pictus*). *Molecular Ecology*. **10**:1703-1723.
- Gottelli, D., C. Sillero-Zubiri, G.D. Applebaum, M.S. Roy, D.J. Girman, J. Garcia-Moreno, E.A. Ostrander, e R.K. Wayne. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid, the Ethiopian wolf, *Canis simensis*. *Molecular Ecology*. **3**:301-312.
- Gottelli, D., J. Marino, C. Sillero-Zubiri, e S.M. Funk. 2004. The effect of the last glacial age on speciation and population genetic structure of the endangered Ethiopian wolf (*Canis simensis*). *Molecular Ecology*. **13**:2275-2286.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Disponível de <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html> (Acessado em Março 2014).
- Guindon, S., J.F. Dufayard, V. Lefort, M. Anisimova, W. Hordijk, e O. Gascuel. 2010. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. *Systematic Biology*. **59**:307-21.
- Hailer, F., e J.A. Leonard. 2008. Hybridization among three native North American *Canis* species in a region of natural sympatry. *PLoS ONE*. **3**:1-9.
- ICMBIO. 2014. *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842). Disponível de www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/lista-de-especies/6121-especie-6121.html (Acessado em Dezembro 2014).
- Jácomo, A.T.A., L. Silveira, e J.A.F. Diniz-Filho. 2004. Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in the Cerrado of Central Brazil. *Journal of Zoology*. **262**:99-106.
- Jakobsson, M., e N.A. Rosenberg. 2007. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*. **23**:1801-1803.

- Jiménez, J.E., M. Lucherini, e A.J. Novaro. 2008. *Pseudalopex gymnocercus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível de www.iucnredlist.org (Acessado em Outubro 2014).
- Juarez, K.M., e J. Marinho-Filho. 2002. Diet, habitat use and home range of sympatric canids in central Brazil. *Journal of Mammalogy*. **83**:925-933.
- Kamier, J.F., W.B. Ballard, E.M. Gese, R.L. Harrison, S. Karkis, e K. Mote. 2004. Adult male emigration and a female-based organization in swift foxes, *Vulpes velox*. *Animal Behavior*. **67**:699-702.
- Kays, R.K., A. Curtis, e J.J. Kirchman. 2010. Rapid adaptive evolution of northeastern coyotes via hybridization with wolves. *Biology Letters*. **6**:89-93.
- Kearse, M., et al. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*. **28**:1647-1649.
- Langguth, A. 1975. Ecology and evolution in the South American canids. Litton Educational Publishing. New York, USA.
- Lehman, N., A. Eisenhaver, K. Hansen, D.L. Mech, R.O. Peterson, P.J.P. Gogan, e R.K. Wayne. 1991. Introgression of coyote mitochondrial dna into sympatric north american gray wolf populations. *Evolution*. **45**:104-119.
- Lemos, F.G. 2007. Ecologia e comportamento da raposa-do-campo *Pseudalopex vetulus* e do cachorro-do-mato *Cerdocyon thous* em áreas de fazendas no bioma Cerrado. Uberlândia. Dissertação (Mestrado em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais). Instituto de Biologia, Universidade Federal de Uberlândia.
- Lemos, F.G., e K.G. Facure. 2011. Seasonal variation in foraging group size of crab-eating foxes and hoary foxes in the Cerrado biome, Central Brazil. *Mastozoología Neotropical*. **18**:239-245.
- Lemos, F.G., F.C. de Azevedo, D. de M. Beisiegel, R.P.S. Jorge, R.C. Paula, F.H.G. Rodrigues, e L. de A. Rodrigues. 2013. Avaliação do risco de extinção da Raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842) no Brasil. *Revista Científica Biodiversidade Brasileira*. **3**:160-171.
- Lucherini, M., e E.L. Vidal. 2008. *Lycalopex gymnocercus*. *Mammalian Species*. **820**:1-9.
- MacDonald, D.W., e C. Sillero-Zubiri. 2004. Biology and conservation of wild canids. Oxford University Press. New York, USA.
- Machado, F., e E. Hingst-Zaher. 2009. Investigating South American biogeographic history using patterns of skull shape variation on *Cerdocyon thous* (Mammalia: Canidae). *Biological Journal of the Linnean Society*. **98**:77-84.
- Markgraf, V. 1993. Peloenvironments and paleoclimates in Tierra del Fuego and southernmost Patagonia, South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*. **102**:53-68.

- Medel, R.G., J.E Jiménez, e F.M. Jaksic. 1990. Discovery of a continental population of the rare Darwin's fox, *Dusicyon fulvipes* (Martin,1837) in Chile. *Biological Conservation*. **51**:71–77.
- Mikich, S.B., e R.S. Bérnils. 2004. Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Disponível de <http://www.iap.pr.gov.br/> (Acessado em Outubro 2014).
- Mittermeier, R.A., et al. 2005. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most threatened terrestrial ecoregions. Conservation International. Cemex, México.
- Olifiers, O., e A.C. Delciellos. 2013. New record of *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) in Northeastern Brazil. *Oecologia Australis*. **17**:533-537.
- Oliveira, T.G. 2006. Research in terrestrial carnívora from Brazil: current knowledge and priorities for the millennium. Páginas 38-45 in R.G. Morato, et al. Manejo e conservação de carnívoros neotropicais. Ibama. São Paulo, Brasil.
- Olson, D.M., et al. 2001. Terrestrial ecoregions of the world: A new map of life on Earth. *BioScience*. **51**:933-938.
- Peakall, R.O.D., e P.E. Smouse. 2006. Genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*. **6**:288–295.
- Perini, F.A., C.A.M. Russo, e C.G. Schrago. 2010. The evolution of South American endemic canids: a history of rapid diversification and morphological parallelism. *Journal of Evolutionary Biology*. **23**:311-322.
- Pritchard, J.K., M. Stephens, e P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. **155**:945-959.
- Queirolo, D., J.R. Moreira, L. Soler, L.H. Emmons, F.H.G. Rodrigues, A.A. Pautasso, J.L. Cartes, e V. Salvatori. 2011. Historical and current range of the Near Threatened maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*) in South America. *Fauna & Flora International*. **45**:296-303.
- Queirolo, D., C.B. Kasper, e B. de M. Beisiegel. 2013. Avaliação do risco de extinção do graxaim-do-campo *Lycalopex gymnocercus* (G. Fischer, 1814) no Brasil. *Revista Científica Biodiversidade Brasileira*. **3**:172-178.
- Rambaut, A., M.A. Suchard, D. Xie, e A.J. Drummond. 2014. Tracer v1.6. Disponível de <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer> (Acessado em Março 2014).
- Redford, K.H., e J.F. Eisenberg. 1992. Mammals of the Neotropics. The Southern Cone. Volume 2. University of Chicago. Chicago, USA.
- Rocha, E.C., E. Silva, R.N. Feio, S.V. Martins, e G. Lessa. 2008. Densidade populacional de raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) em áreas de pastagem e campo sujo, Campinópolis, Mato Grosso, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*. **98**:78-83.
- Ronquist, F., e J.P. Huelsenbeck . 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. **19**:1572-1574.

- Rosenberg, N.A. 2004. Distruct: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*. **4**:137-138.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete re-implementation of the genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. **8**:103-106.
- Roy, M.S., E. Geffen, D. Smith, E.A. Ostrander, e R.K. Wayne. 1994. Patterns of differentiation and hybridization in North American wolf-like canids revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*. **11**:553-570.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch, e T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning*. 2ª edição. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends in Ecology and Evolution*. **19**:198-207.
- Sillero-Zubiri, C. 2014. The Canidae Family: settings the scene for maned wolf conservation. Páginas 3-14 in A.G. Consorte-McCrea e E.F.Santos, editores. *Ecology and conservation of the maned Wolf: multidisciplinary perspectives*. CRC Press.
- Sillero-Zubiri, C., A.A. King, e E.D.W. MacDonald. 1996. Rabies and mortality in Ethiopian wolves (*Canis simensis*). *Journal of Wildlife Diseases*. **32**:80-86.
- Spíndola, R.O., L.M. Machado, M.L. Carrieri, e I. Kotait. 2008. Characterization of rabies vírus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Reserach*. **131**:33-46.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. **123**:585-595.
- Tamura, K., G. Stecher, D. Peterson, A. Filipski, e S. Kumar. 2013. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*. **30**:2725-2729.
- Tchaicka, L. 2006. *Abordagens filogenéticas, filogeográficas e populacionais em canídeos Sul-americanos*. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Tchaicka, L., E. Eizirik, T.G. Oliveira, J.F. Cândido Jr, e T.R.O. Freitas. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*. **16**:819-838.
- Trigo, T.C., A. Schneider, T.G. Oliveira, L.M. Lehugeur, L. Silveira, T.R.O. Freitas, e E. Eizirik. 2013. Molecular data reveal complex hybridization and a cryptic species of neotropical wild cat. *Current Biology*. **23**:1-6.
- VanOosterhout, C., W.F. Hutchinson, D.P.M. Wills, e P. Shipley. 2004. MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*. **4**:535-538.
- Vilà, C., I.R. Amorim, J.A. Leonard, D. Posada, J. Castroviejo, F. Petrucci-Fonseca, K.A. Crandall, H. Ellegrem, e R.K. Wayne. 1999. Mitochondrial DNA

- phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*. **8**:2089-2103.
- Weir, B.S., e G.C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*. **38**:1.358-1.370.
- Wilson, P.J., et al. 2000. DNA profiles of the eastern Canadian wolf and the red wolf provide evidence for a common evolutionary history independent of the gray wolf. *Canadian Journal of Zoology*. **78**:2156-2166.
- Wood, P.M. 2003. Will Canadian policies protect British Columbia's endangered pairs of sympatric sticklebacks? *Fisheries*. **28**:19-26.
- Wozencraft, W.C. 2005. *Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference*. 3ª edição. Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA.
- Yahnke, C.J., et al. 1996. Darwin's Fox: A distinct endangered species in a vanishing habitat. *Conservation Biology*. **10**:366-375.
- Zunino, G.E., O.B. Vaccaro, M. Canevari, e A. Gardner. 1995. Taxonomy of the genus *Lycalopex* (Carnivora, Canidae) in Argentina. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. **108**:729-747.

Tabelas

Tabela 1. Lista do número de amostras utilizadas no estudo, bem como o número de indivíduos dos quais foram obtidos dados para os diferentes marcadores moleculares analisados.

Conjunto de dados	Total	mtDNA		Microssatélites
		<i>D-loop</i>	<i>ND5</i>	
<i>Lycalopex vetulus</i>	61	55	47	54
<i>Lycalopex gymnocercus</i>	28	18	18	14

Tabela 2. Estimativas de diversidade genética para cada uma das populações amostradas de acordo com o conjunto de dados utilizado: N – Número de indivíduos, k – Número de haplótipos, Hd – Diversidade haplotípica, π – Diversidade nucleotídica, F_s – Teste de neutralidade de Fu, D – Teste de neutralidade de Tajima, todos calculados com o programa Arlequin (Excoffier & Lischer 2010). Os números entre parênteses correspondem aos desvios-padrão (SE) referentes a cada resultado. Todos os valores do teste de neutralidade (F_s) mostrados foram estatisticamente significativos ($p < 0,01$).

Conjunto de dados (mtDNA)	População	N	k	Hd	π	F_s	D
D-loop (609 pb)	Norte	9	8	0,9722 (0,064)	0,0126 (0,007)	-	-
	Centro	28	16	0,9180 (0,036)	0,0183 (0,009)	-	-
	Sul	13	11	0,9615 (0,049)	0,0171 (0,009)	-	-
	Total	50	34	0,9706 (0,013)	0,0205 (0,010)	-11,7119	-0,9417*
ND5 e D-loop concatenados (1774 pb)	Norte	8	8	1,0000 (0,062)	0,0089 (0,005)	-	-
	Centro	26	18	0,9508 (0,028)	0,0133 (0,006)	-	-
	Sul	8	8	1,0000 (0,062)	0,0074 (0,004)	-	-
	Total	42	33	0,9803 (0,012)	0,0135 (0,007)	-10,7404	-0,7908*

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

Tabela 3. Valores de p correspondentes ao teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE), com seus respectivos desvios padrão (SE) realizado no programa GenePop (Rousset 2008). Índices de diversidade calculados para cada um dos locos: H_o – Heterozigosidade observada, H_e – Heterozigosidade esperada, F_{is} – Coeficiente de endocruzamento, I – Índice de Shannon, todos calculados no GenAlEx (Peakall & Smouse 2006). Riq. Alélica - Riqueza Alélica calculada no programa Fstat (Goudet 2001).

Loco	p	S.E.	H_o	H_e	F_{is}	I	Riq. Alélica
2001	0.175	0.006	0,625	0,770	0,188	1,532	4.828
2004	0.018	0.005	0,738	0,756	0,023	1,702	6.035
2010	0.345	0.012	0,661	0,777	0,150	1,693	5.618
2054	0.004	0.003	0,854	0,842	-0,014	2,127	8.437
2088	0.648	0.008	0,774	0,757	-0,022	1,568	5.350
2132	0	0.000	0,682	0,685	0,004	1,308	4.292
2137	0.057	0.035	0,837	0,907	0,076	2,569	9.833
2140	0.055	0.012	0,893	0,856	-0,043	2,194	7.824
2018	0	0	0,836	0,859	0,026	2,162	8.042
2096	0.012	0.002	0,738	0,745	0,009	1,482	4.566
2159	0	0	0,796	0,910	0,126	2,569	10.002
Total	-	-	0,767	0,806	0,047	1,900	6,802

Tabela 4. Testes de diferenciação populacional. Os resultados acima da diagonal correspondem aos valores de Φ_{st} calculados no programa Arlequin (Excoffier & Lischer 2010) para cada par de populações com base nos marcadores mitocondriais (*ND5* e *RC*). Abaixo da diagonal, encontram-se os valores de F_{st} / R_{st} , calculados através dos programas GenAlEx (Peakall & Smouse 2006) e Arlequin, respectivamente, utilizando os dados de microssatélites (STR).

	Norte	Centro	Sul
Norte	-	0,297	0,315
Centro	0,037 / -0,006*	-	0,148
Sul	0,041 / 0,102	0,025 / 0,052*	-

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

Legendas das figuras:

Figura 1. Mapa de distribuição espacial dos pontos de amostragem utilizados no projeto. Em (a), os locais de origem dos 61 indivíduos de *Lycalopex vetulus* divididos em populações norte (vermelho), centro (verde) e sul (azul), de acordo com a sua distribuição. A área em cinza corresponde à extensão do bioma cerrado, enquanto que em azul (hachurado) está a área descrita para a ocorrência da espécie (Lemos et al. 2013). (b) Locais de amostragem dos 61 indivíduos de *L. vetulus* (círculos) e 28 *L. gymnocercus* (quadrados) utilizados no estudo, plotados sobre as suas respectivas áreas de distribuição (Lemos et al. 2013; Queirolo et al. 2013). Os mapas foram gerados com o programa ESRI ArcGis 10.1.

Figura 2. Rede de haplótipos baseada em dados obtidos da região controladora (RC) e um segmento do gene *ND5* do DNA mitocondrial (mtDNA) concatenados de 64 indivíduos, e gerada a partir do cálculo dos vetores medianos realizado no programa Network (Bandelt et al. 1999). Cada círculo representa um haplótipo diferente, sendo o seu diâmetro proporcional à sua frequência na amostra. As cores indicam a frequência do haplótipo em cada grupo ou população de *Lycalopex vetulus* (vermelho para as populações do norte, verde para as populações do centro e azul para as do sul) e *L. gymnocercus* (amarelo). Os números indicam as diferenças ou passos mutacionais existentes entre os haplótipos; nas linhas onde este não é identificado existe apenas uma mutação.

Figura 3. Árvore filogenética construída através do método de máxima verossimilhança (ML) e por Inferência Bayesiana (BI) (topologia mostrada) a partir de dados da região controladora (RC) e do gene *ND5* do DNA mitocondrial (mtDNA) concatenados. Os valores de suporte localizados acima dos ramos correspondem à frequência de *bootstrap* (dividido por 10) referente à análise de ML, e aqueles abaixo dos ramos indicam a probabilidade posterior do clado, proveniente da análise Bayesiana. Ambos os métodos resultaram em topologias idênticas para os ramos principais, aos quais os valores de suporte são mostrados, com pequenas variações nos ramos terminais. O local de origem de cada indivíduo está indicado no material suplementar. Os asteriscos indicam os indivíduos de *Lycalopex vetulus* que apresentam introgressão de haplótipos mitocondriais oriundos de *L. gymnocercus*.

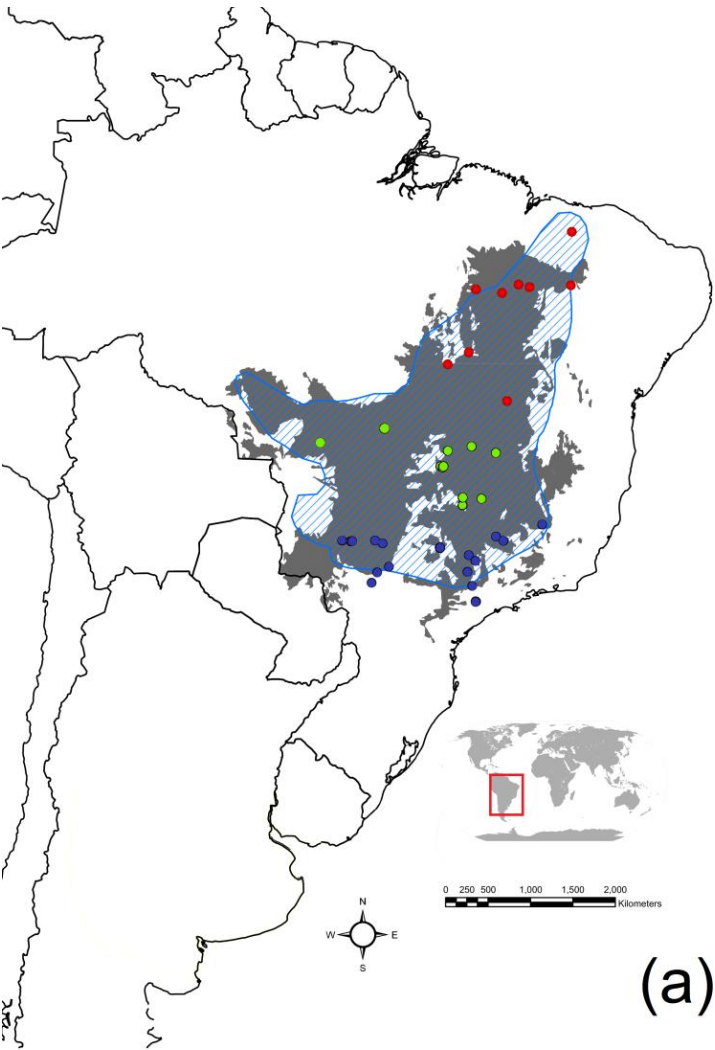
Figura 4. Gráficos de barras gerados com o programa Structure (Pritchard et al. 2000) onde cada uma das barras representa um indivíduo amostrado. A atribuição de cada indivíduo a cada um dos grupos geneticamente distintos ($K=2$) está representada pelo preenchimento da respectiva barra com as seguintes cores: *Lycalopex gymnocercus* (amarelo) e *L. vetulus* (azul). (a) Contém somente os indivíduos considerados “puros” de cada uma das duas espécies; (b) foram adicionadas as amostras originárias da zona de contato entre as duas espécies. Os asteriscos indicam os indivíduos de *L. vetulus*, identificados na Fig. 3 como possuindo haplótipos mitocondriais provenientes de *L. gymnocercus*.

Figura 5. Valores referentes ao ΔK testado em cada uma das análises realizadas com o programa Structure (Pritchard et al. 2000): (a) indivíduos considerados “puros” de cada uma das duas espécies (*Lycalopex vetulus* e *L. gymnocercus*) e em (b) estão presentes os indivíduos originários da zona de contato entre as duas espécies. Os gráficos foram

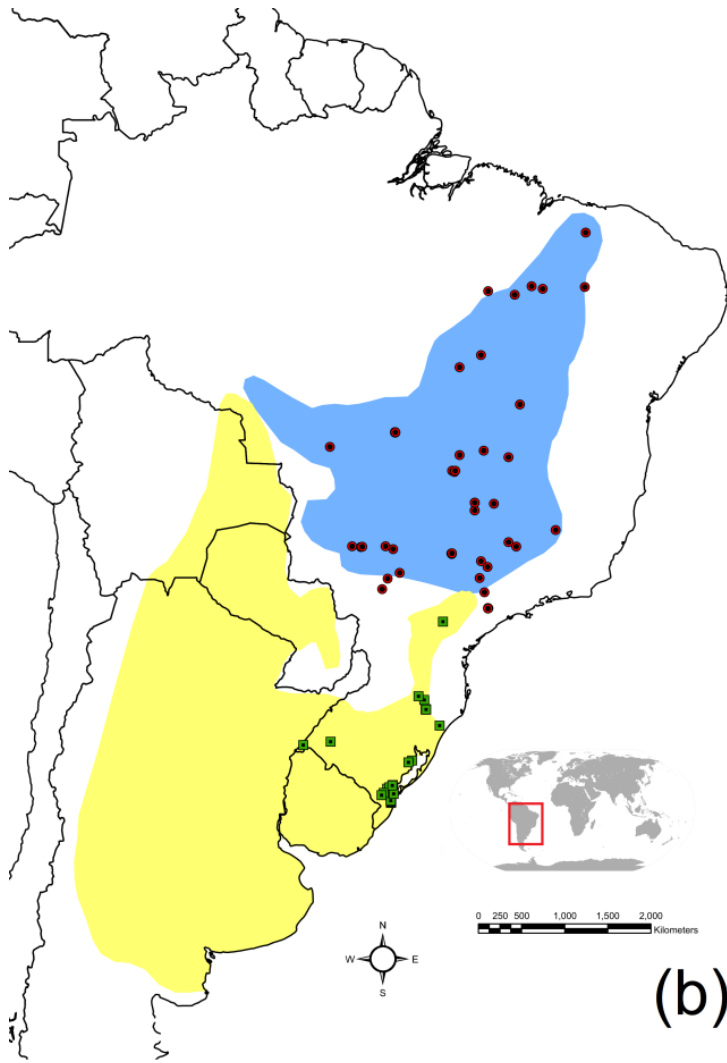
gerados através do programa StructureHarvester (Earl & vanHoldt 2012) utilizando o método descrito por (Evanno et al. 2005).

Figura 6. Mapa de fragmentação da Mata Atlântica na zona de contato entre *Lycalopex vetulus* e *L. gymnocercus*: (a) Extensão original do bioma (Olsen et al. 2001); (b) Fragmentos florestais remanescentes na região (Globcover 2009).

Figura 1.



(a)



(b)

Figura 2.

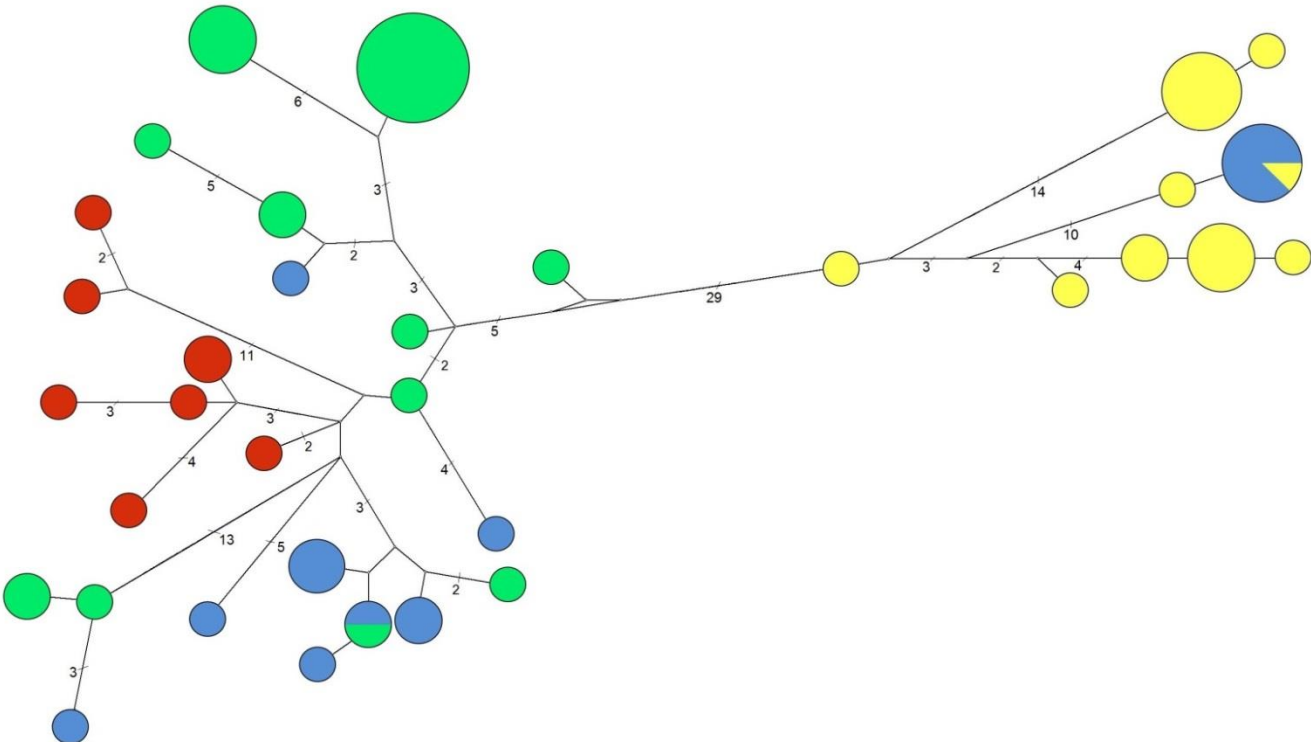


Figura 3.

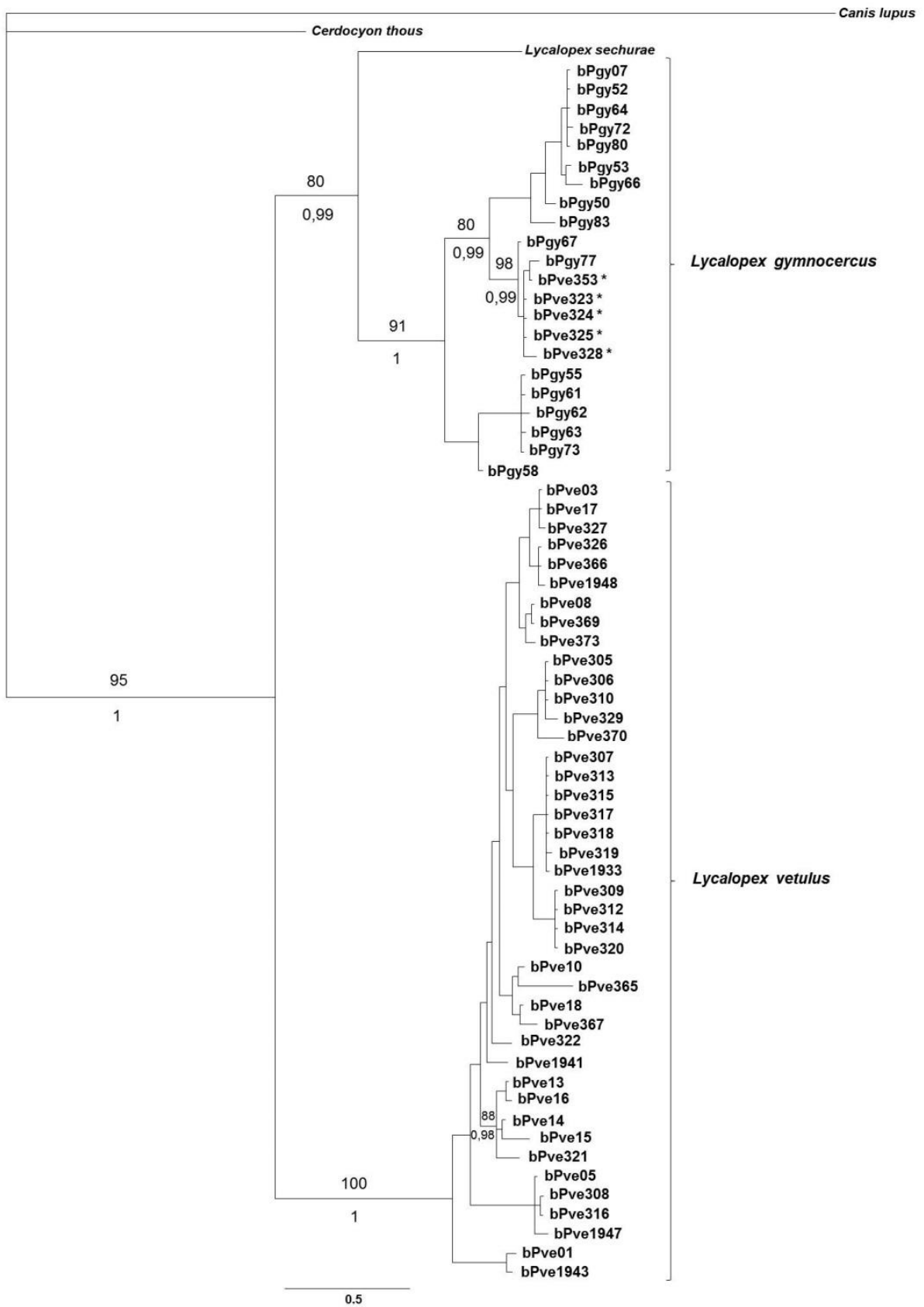


Figura 4.

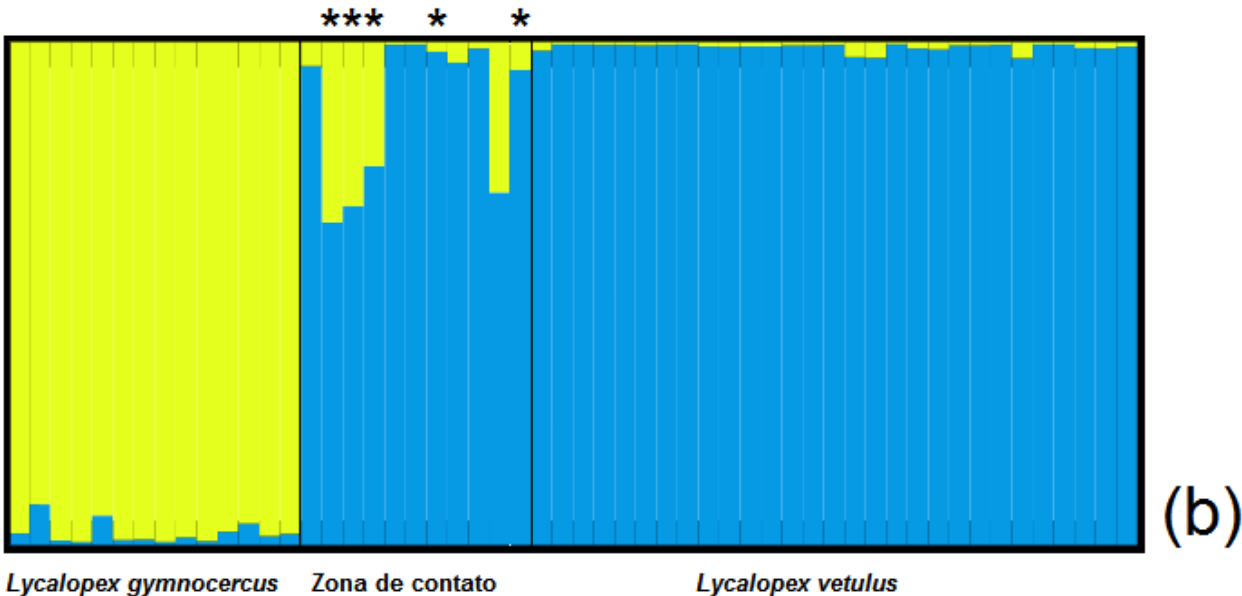
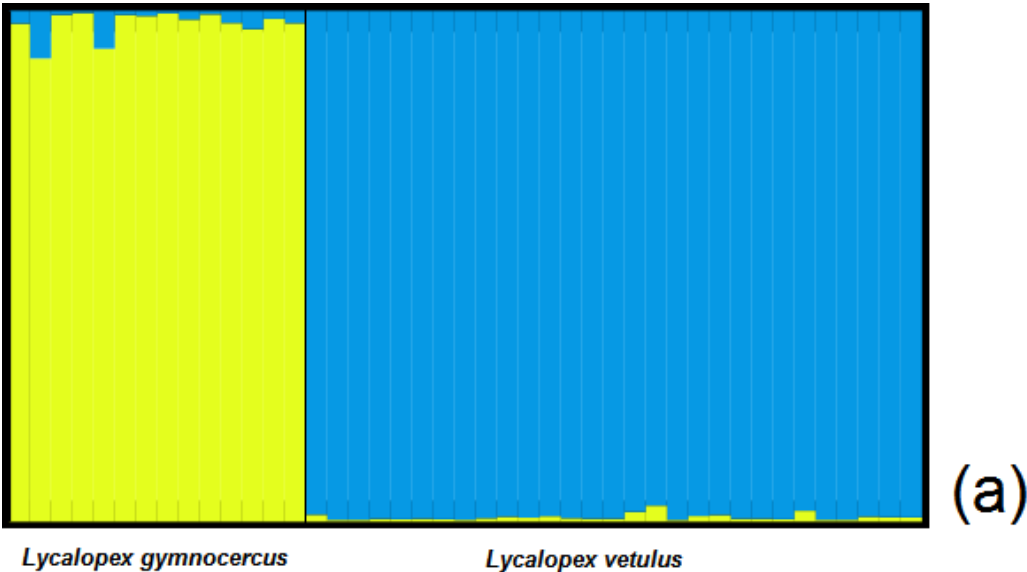


Figura 5.

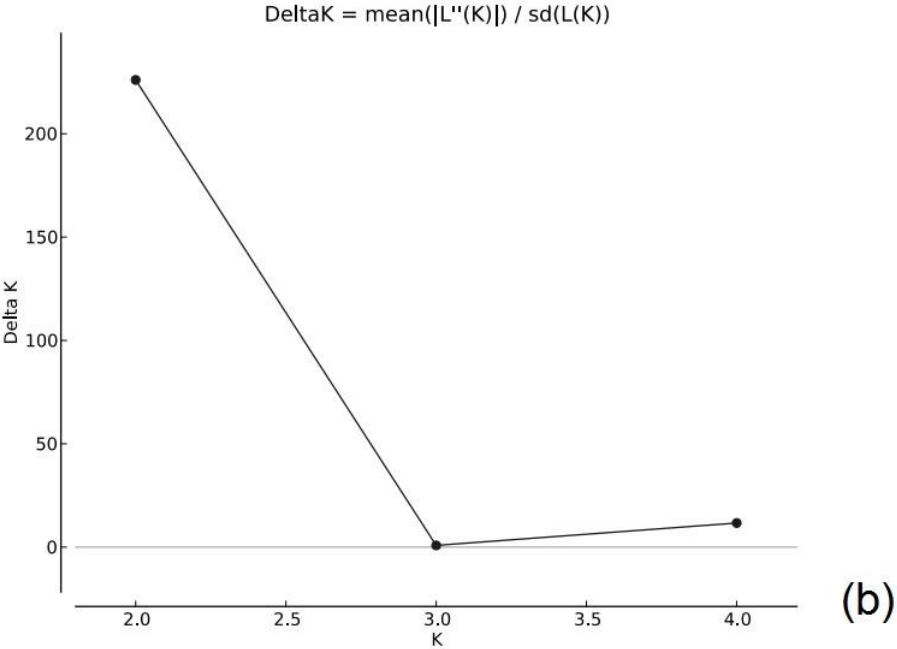
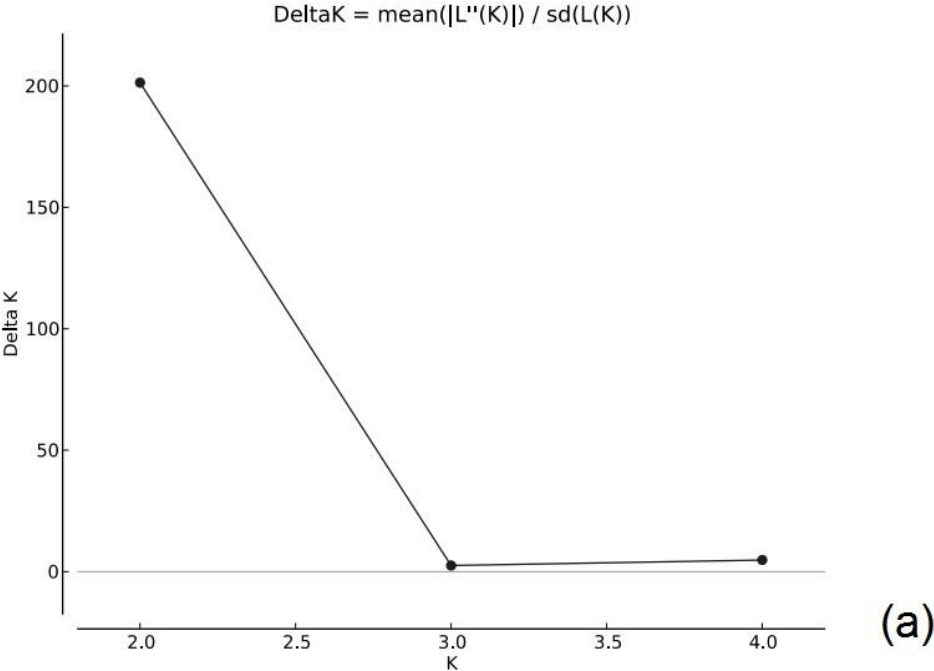
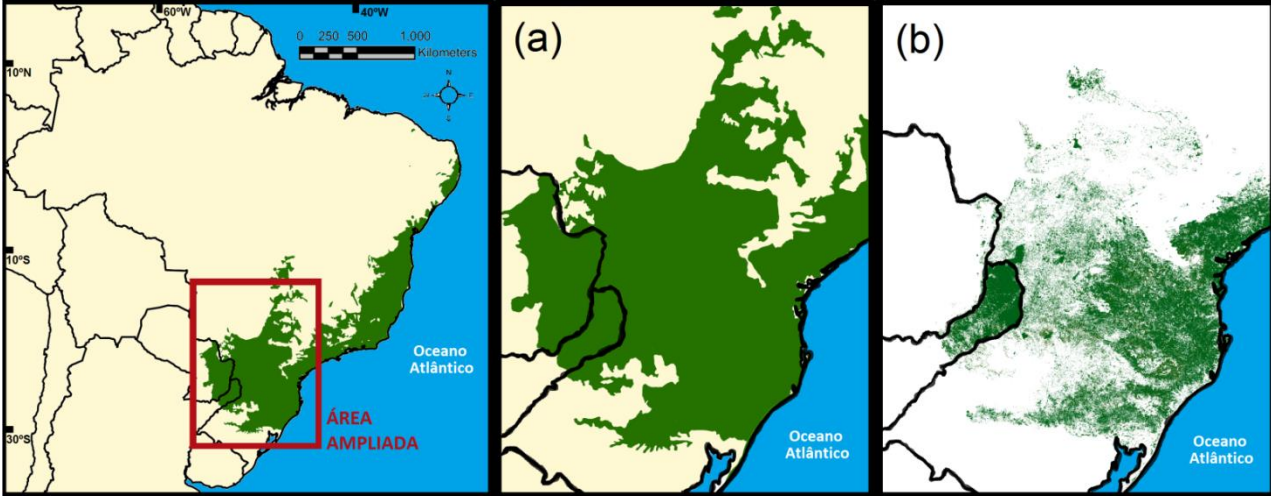


Figura 6.



Material Suplementar

Apêndice S1 – Lista das amostras utilizadas no estudo.

Espécie	População	Número de identificação da amostra	Origem geográfica	Coordenadas geográficas Lat. / Long,	Instituição / Coletor
<i>Lycalopex vetulus</i>	Norte	bPve02	Bahia (BA) - Brasil	-13,252 / -45,769	UEMA / L.Tchaicka
		bPve13	Balsas, Maranhão (MA) - Brasil	-7,534 / -46,037	C.B.Kasper
		bPve14	Benedito Leite, Maranhão (MA) - Brasil	-7,217 / -44,567	C.B.Kasper
		bPve15	Loreto, Maranhão (MA) - Brasil	-7,083 / -45,150	C.B.Kasper
		bPve16	Piauí (PI) - Brasil	-7,122 / -42,346	C.B.Kasper
		bPve321	Barras, Piauí (PI) - Brasil	-4,249 / -42,299	C.B.Kasper
		LcaMA01	Maranhão (MA) - Brasil	-7,340 / -47,439	UEMA / L.Tchaicka
		1941	Aliança do Tocantins, Tocantins (TO) - Brasil	-11,325 / -48,946	M.Repenning
		1943	Ponte Alta do Tocantins, Tocantins (TO) - Brasil	-10,693 / -47,817	M.Repenning
		Centro	bPve04	Goiás (GO) - Brasil	-16,662 / -49,305
	bPve05		Goiás (GO) - Brasil	-16,651 / -49,344	R.Portela
	bPve06		Goiás (GO) - Brasil	-16,714 / -49,222	R.Portela
	bPve07		Goiás (GO) - Brasil	-16,653 / -49,172	R.Portela
	bPve10		Goiás (GO) - Brasil	-15,850 / -48,949	F.Grazzione e A.Garda
	bPve18		Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,703 / -52,331	CENAP
	bPve301		Planaltina, Distrito Federal (DF) - Brasil	-15,624 / -47,671	CENAP / F.H.G.Rodrigues
	bPve302		Planaltina, Distrito Federal (DF) - Brasil	-15,625 / -47,670	CENAP / F.H.G.Rodrigues
	bPve305		Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,701 / -52,338	CENAP / J.Dalponete
	bPve306		Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,695 / -52,326	CENAP / J.Dalponete
	bPve307	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,685 / -52,334	CENAP / J.Dalponete	
bPve308	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,697 / -52,336	CENAP / J.Dalponete		
bPve309	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,698 / -52,335	CENAP / J.Dalponete		

	bPve310	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,698 / -52,334	CENAP / J.Dalponete
	bPve311	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,697 / -52,348	CENAP / J.Dalponete
	bPve312	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,682 / -52,352	CENAP / J.Dalponete
	bPve313	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,705 / -52,344	CENAP / J.Dalponete
	bPve314	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,702 / -52,341	CENAP / J.Dalponete
	bPve315	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,692 / -52,341	CENAP / J.Dalponete
	bPve316	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,689 / -52,345	CENAP / J.Dalponete
	bPve317	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,694 / -52,339	CENAP / J.Dalponete
	bPve318	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,681 / -52,339	CENAP / J.Dalponete
	bPve319	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,680 / -52,348	CENAP / J.Dalponete
	bPve320	Nova Xavantina, Mato Grosso (MT) - Brasil	-14,686 / -52,330	CENAP / J.Dalponete
Centro	bPve365	Cumari, Goiás (GO) - Brasil	-18,268 / -48,150	CENAP / R.Arrais, F.G.Lemos e F.Cavalcanti
	bPve366	Cumari, Goiás (GO) - Brasil	-18,266 / -48,149	CENAP / R.Arrais, F.G.Lemos e F.Cavalcanti
	bPve369	Araguari, Minas Gerais (MG) - Brasil	-18,655 / -48,150	CENAP / R.Arrais, F.G.Lemos e F.Cavalcanti
	bPve370	Cumari, Goiás (GO) - Brasil	-18,268 / -48,147	CENAP / R.Arrais, F.G.Lemos e F.Cavalcanti
	bPve373	Cumari, Goiás (GO) - Brasil	-18,266 / -48,147	CENAP / R.Arrais, F.G.Lemos e F.Cavalcanti
	1933	Chapada dos Guimarães, Mato Grosso (MT) - Brasil	-15,432 / -55,786	M.Repenning
	1947	Arinos, Minas Gerais (MG) - Brasil	-15,958 / -46,367	M.Repenning
	1948	Coromandel, Minas Gerais (MG) - Brasil	-18,320 / -47,136	M.Repenning
Sul	bPve03	Minas Gerais (MG) - Brasil	-19,633 / -43,883	UFRGS / L.Tchaicka
	bPve08	São Paulo (SP) - Brasil	-21,473 / -47,471	C.Prada e D.Sana
	bPve09	São Paulo (SP) - Brasil	-22,564 / -53,035	C.Prada e D.Sana
	bPve17	São Roque de Minas, Minas Gerais (MG) - Brasil	-20,245 / -46,365	F.L.Rocha e R.Arrais
	bPve322	Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) - Brasil	-20,448 / -54,616	CENAP / R.M.Passos
	bPve323	Sorocaba, São Paulo (SP) - Brasil	-23,483 / -47,449	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve324	Sorocaba, São Paulo (SP) - Brasil	-23,494 / -47,424	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve325	Sorocaba, São Paulo (SP) - Brasil	-23,509 / -47,453	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve326	Presidente Epitacio, São Paulo (SP) - Brasil	-21,765 / -52,100	CENAP / Joares e R.Teixeira

	bPve327	Ribeirão Preto, São Paulo (SP) - Brasil	-21,184 / -47,817	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve328	São José do Rio Preto, São Paulo (SP) - Brasil	-20,800 / -49,383	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve329	São José do Rio Preto, São Paulo (SP) - Brasil	-20,835 / -49,360	CENAP / Joares e R.Teixeira
Sul	bPve330	São José do Rio Preto, São Paulo (SP) - Brasil	-20,793 / -49,350	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve351	São Carlos, São Paulo (SP) - Brasil	-22,019 / -47,894	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve353	Piracicaba, São Paulo (SP) - Brasil	-22,716 / -47,633	CENAP / Joares e R.Teixeira
	bPve367	Araguari, Minas Gerais (MG) - Brasil	-18,657 / -48,156	CENAP / R.Arrais, F.G.Lemos e F.Cavalcanti
	172	Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) - Brasil	-20,483 / -54,154	A.L.J. Desbiez
	173	Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) - Brasil	-20,588 / -52,445	A.L.J. Desbiez
	178	Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) - Brasil	-20,470 / -54,086	A.L.J. Desbiez
	219	Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS) - Brasil	-20,445 / -52,854	A.L.J. Desbiez
	bPgy07	Capão do Leão, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-31,777 / -52,461	UFRGS / T.C.Trigo e A.P.Brandt
	bPgy17	Tapes, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-30,674 / -51,445	M.F.Correa
	bPgy18	Aparados, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-29,065 / -49,999	M.F.Correa
	bPgy30	Taim, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,569 / -52,558	UFLA / A.Bager
	bPgy33	Taim, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,583 / -52,563	UFLA / A.Bager
	bPgy40	Taim, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,487 / -52,579	UFLA / A.Bager
	bPgy41	Taim, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,489 / -52,567	UFLA / A.Bager
	bPgy42	Taim, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,480 / -52,571	UFLA / A.Bager
	bPgy50	Porto Alegre, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-29,963 / -57,192	J.Koeneman
	bPgy52	Camaquã, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-30,753 / -51,637	C.B.Kasper e M.F.Rodrigues
	bPgy53	Capão do Leão, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-31,885 / -52,643	C.B.Kasper e M.F.Rodrigues
	bPgy55	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,321 / -50,716	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy56	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,315 / -50,716	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy57	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,305 / -50,714	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy58	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,318 / -50,710	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy59	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,325 / -50,730	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy60	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,321 / -50,709	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy61	Campo Belo do Sul, Santa Catarina (SC) - Brasil	-27,868 / -50,808	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy62	Rio Grande, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,174 / -52,416	C.B.Kasper

***Lycalopex
gymnocercus***

	bPgy63	Arroio Grande, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,137 / -52,955	C.B.Kasper
	bPgy64	Jaguarão-Pelotas, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-31,798 / -52,490	C.B.Kasper e M.F.Rodrigues
	bPgy66	Arroio Grande, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-32,239 / -53,064	C.B.Kasper
	bPgy67	Arapoti, Paraná (PR)	-24,144 / -49,819	F.Braga
	bPgy72	Anita Garibaldi, Santa Catarina (SC)	-27,699 / -51,111	H.Figueiró
	bPgy73	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,313 / -50,722	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy77	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,312 / -50,716	BAESA / C.B.Kasper e M.Piccoli
	bPgy80	Bom Jesus, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-28,321 / -50,709	C.B.Kasper
	bPgy83	Alegrete, Rio Grande do Sul (RS) - Brasil	-29,811 / -55,748	C.B.Kasper e M.F.Rodrigues
<i>Lycalopex sechurae</i>	bPse04	Peru		F.Angulo e L.Oliveira
<i>Cerdocyon thous</i>	bCth82	Parque Itapuã		M.F.Correa

Apêndice S2 – Lista dos indivíduos analisados de acordo com os resultados obtidos para os diferentes marcadores utilizados no estudo.

Fenótipo	ID	Origem	População	mtDNA	Microssatélites	
					Cluster 1 (<i>L. gymnocercus</i>)	Cluster 2 (<i>L. vetulus</i>)
<i>L. vetulus</i>	bPve02	BA		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve13	MA		<i>L. vetulus</i>	0.0050	0.9950
<i>L. vetulus</i>	bPve14	MA		<i>L. vetulus</i>	0.0050	0.9950
<i>L. vetulus</i>	bPve15	MA		<i>L. vetulus</i>	0.0122	0.9878
<i>L. vetulus</i>	bPve16	PI	Norte	<i>L. vetulus</i>	0.0322	0.9678
<i>L. vetulus</i>	bPve321	PI		<i>L. vetulus</i>	0.0130	0.9870
<i>L. vetulus</i>	LcaMA01	MA		<i>L. vetulus</i>	0.0092	0.9908
<i>L. vetulus</i>	1941	TO		<i>L. vetulus</i>	0.0060	0.9940
<i>L. vetulus</i>	1943	TO		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve04	GO		<i>L. vetulus</i>	0.0069	0.9931
<i>L. vetulus</i>	bPve05	GO		<i>L. vetulus</i>	0.0059	0.9941
<i>L. vetulus</i>	bPve06	GO		<i>L. vetulus</i>	0.0050	0.9950
<i>L. vetulus</i>	bPve07	GO		<i>L. vetulus</i>	0.0090	0.9910
<i>L. vetulus</i>	bPve10	GO		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve18	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve301	DF		<i>L. vetulus</i>	0.0100	0.9900
<i>L. vetulus</i>	bPve302	DF	Centro	<i>L. vetulus</i>	0.0090	0.9910
<i>L. vetulus</i>	bPve305	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve306	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0299	0.9701
<i>L. vetulus</i>	bPve307	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve308	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0315	0.9685
<i>L. vetulus</i>	bPve309	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve310	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0046	0.9954
<i>L. vetulus</i>	bPve311	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA

<i>L. vetulus</i>	bPve312	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0130	0.9870
<i>L. vetulus</i>	bPve313	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0149	0.9851
<i>L. vetulus</i>	bPve314	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0070	0.9930
<i>L. vetulus</i>	bPve315	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve316	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve317	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve318	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0070	0.9930
<i>L. vetulus</i>	bPve319	MT		<i>L. vetulus</i>	0.0057	0.9943
<i>L. vetulus</i>	bPve320	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve365	GO	Centro	<i>L. vetulus</i>	0.0090	0.9910
<i>L. vetulus</i>	bPve366	GO		<i>L. vetulus</i>	0.0071	0.9929
<i>L. vetulus</i>	bPve369	MG		<i>L. vetulus</i>	0.0050	0.9950
<i>L. vetulus</i>	bPve370	GO		<i>L. vetulus</i>	0.0070	0.9930
<i>L. vetulus</i>	bPve373	GO		<i>L. vetulus</i>	0.0060	0.9940
<i>L. vetulus</i>	1933	MT		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	1947	MG		<i>L. vetulus</i>	0.0059	0.9941
<i>L. vetulus</i>	1948	MG		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve03	MG		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve08	SP		<i>L. vetulus</i>	0.0478	0.9522
<i>L. vetulus</i>	bPve09	SP		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve17	MG		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	bPve322	MS		<i>L. vetulus</i>	0.0174	0.9826
<i>L. vetulus</i>	bPve323	SP		<i>L. gymnocercus</i>	0.3587	0.6413
<i>L. vetulus</i>	bPve324	SP		<i>L. gymnocercus</i>	0.3267	0.6733
<i>L. vetulus</i>	bPve325	SP	Sul	<i>L. gymnocercus</i>	0.2469	0.7531
<i>L. vetulus</i>	bPve326	SP		<i>L. vetulus</i>	0.0056	0.9944
<i>L. vetulus</i>	bPve327	SP		<i>L. vetulus</i>	0.0050	0.9950
<i>L. vetulus</i>	bPve328	SP		<i>L. gymnocercus</i>	0.0195	0.9805
<i>L. vetulus</i>	bPve329	SP		<i>L. vetulus</i>	0.0412	0.9588
<i>L. vetulus</i>	bPve330	SP		<i>L. vetulus</i>	0.0130	0.9870

<i>L. vetulus</i>	bPve351	SP		<i>L. vetulus</i>	0.2990	0.7010
<i>L. vetulus</i>	bPve353	SP		<i>L. gymnocercus</i>	0.0553	0.9447
<i>L. vetulus</i>	bPve367	MG		<i>L. vetulus</i>	0.0050	0.9950
<i>L. vetulus</i>	172	MS	Sul	<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	173	MS		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	178	MS		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. vetulus</i>	219	MS		<i>L. vetulus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy07	RS		<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy17	RS		NA	0.9412	0.0588
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy18	RS		NA	0.9848	0.0152
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy30	RS		NA	0.9910	0.0090
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy33	RS		NA	0.9940	0.0060
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy40	RS		NA	0.9900	0.0100
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy41	RS		NA	0.9889	0.1111
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy42	RS		NA	0.9939	0.0061
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy50	RS		<i>L. gymnocercus</i>	0.9767	0.0233
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy52	RS		<i>L. gymnocercus</i>	0.9190	0.0810
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy53	RS		<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy55	RS		<i>L. gymnocercus</i>	0.9924	0.0076
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy56	RS		NA	0.9735	0.0265
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy57	RS		<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy58	RS		<i>L. gymnocercus</i>	0.9573	0.0427
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy59	RS		NA	0.9822	0.0178
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy60	RS		NA	0.9776	0.0224
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy61	SC		<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy62	RS		<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy63	RS		<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy64	RS		<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA

<i>L. gymnocercus</i>	bPgy66	RS	<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy67	PR	<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy72	SC	<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy73	RS	<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy77	RS	<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy80	RS	<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA
<i>L. gymnocercus</i>	bPgy83	RS	<i>L. gymnocercus</i>	NA	NA

REFERÊNCIAS:

- Arbogast, B.S., e Kenagy, G.J. 2001. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. *Journal of Biogeography*. 28:819-825.
- Avise, J.C., Arnold, J., Ball, R.M. 1988. Current VS. historical population size in vertebrates species with high gene flow: a comparison based on mitochondrial DNA lineages and inbreeding theory for neutral mutations. *Molecular Biology and Evolution*. 5:331-344.
- Avise, J.C., et al. 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of ecology and systematics*. 18:449-522.
- Avise, J.C., Neigel, J.E., e Arnold, J. 1984. Demographic influences in mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*. 20:99-105.
- Avise, J.C., Walker, D., e Johns, G.C. 1998. Speciation durations and Pleistocene effects on Vertebrate Phylogeography. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 265:1707–1712.
- Avise, J.C. 2000. *Phylogeography: the history and formation of species*. Harvard University Press, Cambridge. USA.
- Bermingham, E., e Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology*. 7:367-369.
- Bernardi, F., Nadin-Davis, S.A., Wandeler, A.I., Armstrong, J., Gomes, A.A.B., Lima, F.S., Nogueira, F.R.B., e Ito, F.H. 2005. Antigenic and genetic characterization of rabies viruses isolated from domestic and wild animals of Brazil identifies the hoary fox as a rabies reservoir. *Journal of General Virology*. 86:3153–3162.
- Bernatches, L., e Wilson, C.C. 1998. Comparative phylogeography of Nearctic and Palearctic fishes. *Molecular Ecology*. 7:431-452.
- Berta, A. 1987. Origin, diversification, and zoogeography of the South American Canidae *Fieldiana Zoology*. 39:455–471.
- Bocchiglieri, A., Mendonça, A.F., e Henriques, R.P.B. 2010. Composition and diversity of medium and large size mammals in the Cerrado of central Brazil. *Biota Neotropica*. 10:169-176.
- Brown, W.M., Prager, E.M., Wang, A., e Wilson, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: Tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*. 18:225-239.
- Carmichael, L.E., Krizan, J., Nagy, J.A., Dumond, M., Johnson, D., Veitch, A., e Strobeck, C. 2008. Northwest passages: conservation genetics of Arctic Island wolves. *Conservation Genetics*. 9:879-892.

- Cherem, J.J., et al. 2004. Lista dos mamíferos de Santa Catarina, sul do Brasil. *Mastozoología Neotropical*. 11:151-184.
- Chiarello, A.G., et al. 2008. Mamíferos ameaçados de extinção no Brasil. Páginas 681-885 in A.B.M. Machado, G.M. Drummond e P. Paglia, editores. Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção. MMA, Fundação Biodiversitas. Brasil.
- Costa, C.H.N., e Courtenay, O. 2003. A new record of the hoary fox *Pseudalopex vetulus* in north Brazil. *Mammalia*. 67:593-594.
- Courtenay, O., MacDonald, D.W., Gillingham, S., Almeida, G., e Dias, R. 2005. First observation on South America's large insectivorous canid: the hoary fox (*Pseudalopex vetulus*). *Journal of Zoology*. 268:45-54.
- Dálen, L., et al. 2005. Population history and genetic structure of a circumpolar species: the arctic fox. *Biological Journal of the Linnean Society*. 84:79-89.
- Dalponete, J.C. 1997. Diet of hoary fox, *Lycalopex vetulus*, in Mato Grosso, Brazil. *Mammalia*. 61:537-546.
- Dalponete, J.C., e Lima, E.S. 1999. Disponibilidade de frutos e dieta de *Lycalopex vetulus* (Carnivora – Canidae) em um cerrado de Mato Grosso, Brasil. *Revista Brasileira de Botânica*. 22:325-332.
- Dalponete, J., e Courtenay, O. 2004. Hoary Fox *Pseudalopex vetulus* (Lund, 1842). Páginas 72-75 in C. Sillero-Zubiri, M. Hoffmann e D.W. MacDonald, editors. *Canids: foxes, wolves, jackals and dogs: status survey and conservation action plan*. IUCN, Gland, Switzerland e Cambridge, UK.
- Dalponete, J., e Courtenay, O. 2008. *Pseudalopex vetulus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível de www.iucnredlist.org (Acessado em Outubro 2014).
- Dalponete, J.C. 2009. *Lycalopex vetulus* (Carnivora: Canidae). *Mammalian Species*. 847:1-7.
- De Vivo, M., Carmignotto, A.P. 2004. Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. *Journal of Biogeography*. 31:943-957.
- Eizirik, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação, e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. *Brazilian Journal of Genetics*. 19:23-29.
- Eizirik, E., Johnson, W.E., e O'Brien, S.J. 2006. Definindo unidades evolutivamente significativas e unidades de manejo para a conservação de carnívoros neotropicais. Páginas 47-66 In R.G. Morato, et al. *Manejo e conservação de carnívoros neotropicais*. Ibama. São Paulo, Brasil.
- Favarini, M.O. 2011. Relações filogenéticas entre espécies do gênero *Lycalopex* (Mammalia, Canidae) inferidas com o uso de marcadores do

DNA mitocondrial. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

- Flynn, J.J., e Nedbal, M.A. 1998. Phylogeny of the Carnivora (Mammalia): congruence vs. incompatibility among multiple data sets. *Molecular Phylogeny & Evolution*. 9:414-426.
- Fontoura-Rodrigues, M.L., e Eizirik, E. 2014. Evolutionary and conservation genetics of the maned Wolf. Páginas 77-86 in A.G. Consorte-McCrea e E.F.Santos, editores. *Ecology and conservation of the maned Wolf: multidisciplinary perspectives*. CRC Press.
- Gaubert, P., Bloch, C., Benyacoub, S., Abdelhamid, A., Pagani, P., Djagoun, C.A.M.S., Couloux, A., e Dufour S. 2012. Reviving the African Wolf *Canis lupus lupaster* in North and West Africa: A mitochondrial lineage ranging more than 6,000 km wide. *Plos One*. 7:1-10.
- Geffen, E., et al. 1992. Phylogeny of the Fox-like canids: analysis of mtDNA restriction fragment, site and cytochrome b sequence data. *Journal of Zoology London*. 228:27-39.
- Geffen, E., e McDonald, D.W. 1992a. Small size and monogamy: spatial organization of the Blanford's Fox *Vulpes cana*. *Animal Behavior*. 44:1123-1130.
- Goldstein, P.Z., Salle, R., Amato, G., et al. 2000. Conservation genetics at the species boundary. *Conservation Biology*. 14:120-131.
- Hahn, A.T. 2011. Filogeografia global da tartaruga oliva (*Lepidochelis olivacea*). Porto Alegre. Tese (Doutorado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Jácomo, A.T.A., Silveira, L., e Diniz-Filho, J.A.F. 2004. Niche separation between the maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*), the crab-eating fox (*Dusicyon thous*) and the hoary fox (*Dusicyon vetulus*) in the Cerrado of Central Brazil. *Journal of Zoology*. 262:99-106.
- Jiménez, J.E., Lucherini, M., e Novaro, A.J. 2008. *Pseudalopex gymnocercus*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível de www.iucnredlist.org (Acessado em Outubro 2014).
- Jorde, L.B., Watkins, W.S., Kere, J., Nyman, D., e Eriksson, A.W. 2000. Gene mapping in isolated populations: New roles for old friends? *Human Heredity* 50:57-65.
- Juarez, K.M., e Marinho-Filho, J. 2002. Diet, habitat use and home range of sympatric canids in central Brazil. *Journal of Mammalogy*. 83:925-933.
- Langguth, A. 1975. *Ecology and evolution in the South American canids*. Litton Educational Publishing. New York, USA.
- Lehman, N., Eisenhauer, A., Hansen, K., Mech, L.D., Peterson, L.O., Gogan, P.J.P., e Wayne, R.K. 1991. Introgression of coyote mitochondrial DNA

- into sympatric North American gray wolf populations. *Evolution*. 45:104-119.
- Lemos, F.G., Azevedo, F.C., Costa, H.C.M., e May Jr., J.A. 2011. Human threats to hoary and crab-eating foxes in central Brazil. *Canid News*. 14:1-6.
- Lemos, F.G., e Facure, K.G. 2011. Seasonal variation in foraging group size of crab-eating foxes and hoary foxes in the Cerrado biome, Central Brazil. *Mastozoología Neotropical*. 18:239-245.
- Lemos, F.G., Azevedo, F.C. de, Beisiegel, D. de M., Jorge, R.P.S., Paula, R.C., Rodrigues, F.H.G., e Rodrigues, L. de A. 2013. Avaliação do risco de extinção da Raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Lund, 1842) no Brasil. *Revista Científica Biodiversidade Brasileira*. 3:160-171.
- Lindblad-Toh, K., et al. 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature*. 438:803-819.
- Lucherini, M., e Vidal, E.L. 2008. *Lycalopex gymnocercus*. *Mammalian Species*. 820:1-9.
- Lunt, D.H., Whipple, L.E., e Hyman, B.C. 1998. Mitochondrial DNA variable number tandem repeats (VNTRs): Utility and problems in molecular ecology. *Molecular Ecology*. 7:1441-1455.
- MacDonald, D.W., e Sillero-Zubiri, C. 2004. *Biology and conservation of wild canids*. Oxford University Press. New York, USA.
- Machado, S. 2011. Filogeografia do bugio ruivo, *Alouatta guariba* (Primates, Atelidae). Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- MacHugh, D.E., Shriver, M.D., Loftus, R.T., Cunningham, P., e Bradley, D.G. 1997. Microsatellite DNA variation and the evolution, domestication and phylogeography of taurine and zebu cattle (*Bos taurus* and *Bos indicus*). *Genetics*. 146:1071-1086.
- Magnus, T. 2011. Filogeografia do muriqui do sul, *Brachyteles arachnoides* (Primates, Atelidae). Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Maldonado, J.E., et al. 1997. Relationships of the endangered Mexican kit fox (*Vulpes macrotis zinseri*) to North American arid-land foxes based on mitochondrial DNA sequence data. *The Southwestern Naturalist*. 42:460-470.
- Markgraf, V. 1993. Paeloenvironments and paleoclimates in Tierra del Fuego and southernmost Patagonia, South America. *Palaeogeography, Palaeoclimatology and Palaeoecology*. 102:53-68.

- Martinez, P.A., Zurano, J.P., Molina, W.F., e Bidau, C.J. 2013. Applications and implications of phylogeography for canid conservation. *Mastozoología Neotropical*. 20:61-74.
- McMillan, W.O., e Palumbi, S.R. 1997. Rapid rate of control-region evolution in Pacific butterflyfishes (Chaetodontidae). *Journal of Molecular Evolution*. 45:473-484.
- Medel, R.G., Jiménez, J.E., Jaksic, F.M. 1990. Discovery of a continental population of the rare Darwin's fox, *Dusicyon fulvipes* (Martin,1837) in Chile. *Biological Conservation*. 51:71-77.
- Mercure, A., et al. 1993. Genetic subdivision among small canids: mitochondrial DNA differentiation of swift, kit and arctic foxes. *Evolution*. 47:1313-1328.
- Mikich, S.B., e Bérnils, R.S. 2004. Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná. Disponível de <http://www.iap.pr.gov.br/> (Acessado em Outubro 2014).
- Mills, L.S., Citta, J.J., Lair, K.P., e Schwartz, M.K. 2000. Estimating animal abundance using non-invasive sampling: promise and pitfalls. *Ecological Applications*. 10:283-294.
- Mittermeier, R.A., et al. 2005. Hotspots revisited: Earth's biologically richest and most threatened terrestrial ecoregions. Conservation International. Cemex, México.
- Moritz, C. 1994. Defining "evolutionary significant units" for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*. 9:373-375.
- Moura, A.E., Tsingarska, E., Dabrowski, M.J., Czarnomska, S.D., Jedrzejewska B., e Pilot M. 2014. Unregulated hunting and genetic recovery from a severe population decline: the cautionary case of Bulgarian wolves. *Conservation Genetics*. 15:405-417.
- Nelson, G., e Ladiges, P.Y. 1996. Paralogy in cladistic biogeography and analysis of paralogy-free subtrees. *American Museum Novitates*. 3167.
- Nowak, R.M. 1999. *Walker's Mammals of the World*. The John Hopkins University Press. Baltimore, USA.
- Olifiers, O., e Delciellos, A.C. 2013. New record of *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) in Northeastern Brazil. *Oecologia Australis*. 17:533-537.
- Oliveira, T.G. 2006. Research in terrestrial carnívora from Brazil: current knowledge and priorities for the millennium. Páginas 38-45 in R.G. Morato, et al. *Manejo e conservação de carnívoros neotropicais*. Ibama. São Paulo, Brasil.
- Perini, F.A., Russo, C.A.M., e Schrago, C.G. 2010. The evolution of South American endemic canids: a history of rapid diversification and morphological parallelism. *Journal of Evolutionary Biology*. 23:311-322.

- Pilot, M., et al. 2010. Phylogeographic history of grey wolves in Europe. *BMC Evolutionary Biology*. 10:104.
- Pires, C.B. 2012. Diversidade genética e filogeografia de *Puma yagouaroundi* (Mammalia, Carnivora, Felidae). Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Prevosti, F.J. 2010. Phylogeny of the large extinct South American Canids (Mammalia, Carnivora, Canidae) using a “total evidence” approach. *Cladistics*. 26:456-481.
- Ramos Jr., V.A., Pessutti, C., e Chieregatto, C.A.F.S. 2003. Guia de identificação dos canídeos silvestres brasileiros. JoyJoy Studio Ltda: Comunicação Ambiental. Sorocaba, Brasil
- Randi E., et al. 2014. Multilocus Detection of wolf x dog hybridization in Italy, and guidelines for marker selection. *Plos One*. 9:1-13.
- Redford, K.H., e Eisenberg, J.F. 1992. Mammals of the Neotropics. The Southern Cone. Volume 2. University of Chicago. Chicago, USA.
- Riddle, B.R., Hafner, D.J., Alexander, L.F., e Jaeger, J.R. 2000. Cryptic vicariance in the historical assembly of a Baja California peninsular desert biota. *Proceedings of the National Academy of Sciences United States of America*. 97:14438-14443.
- Rocha, E.C., Silva, E., Feio, R.N., Martins, S.V., e Lessa, G. 2008. Densidade populacional de raposa-do-campo *Lycalopex vetulus* (Carnivora, Canidae) em áreas de pastagem e campo sujo, Campinópolis, Mato Grosso, Brasil. *Iheringia, Série Zoologia*. 98:78-83.
- Rodrigues, M.L.F. 2009. Diversidade genética e estrutura populacional do lobo-guará. Porto Alegre. Dissertação (Mestrado em Zoologia). Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.
- Schneider, C.J., Cunningham, M., e Moritz, C. 1998. Comparative phylogeography and the history of endemic vertebrates in the Wet Tropics rainforests of Australia. *Molecular Ecology*. 7:487-498.
- Slater, J.S., et al. 2009. Evolutionary history of the Falklands wolf. *Current Biology*. 19:937-938.
- Spíndola, R.O., Machado, L.M., Carrieri, M.L., e Kotait, I. 2008. Characterization of rabies vírus isolated from canids and identification of the main wild canid host in Northeastern Brazil. *Virus Ressearch*. 131:33-46.
- Taberlet, P., e Bouvet, J. 1994. Mitochondrial DNA polymorphism, phylogeography and conservation genetics of the brown bear *Ursus actos* in Europe. *Proceedings of the Royal Society*. 255:195-200.

- Taylor, B.L., Chivers, S.J., Sexton, S., e Dizon, A.E. 2000. Evaluating dispersal estimates using mtDNA data: comparing analytical and simulation approaches. *Conservation Biology*. 14:1287-1297.
- Tchaicka, L. 2006. Abordagens filogenéticas, filogeográficas e populacionais em canídeos Sul-americanos. Porto Alegre. Tese (Doutorado em Ciências). Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Tchaicka, L., Eizirik, E., Oliveira, T.G., e Freitas, T.R. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*. 16:819-838.
- Van Valkenburgh, B. 1999. Major patterns in the history of carnivorous mammals. *Annual Review of Earth and Planetary Science*. 27:463-493.
- Vilà, C., Amorim, I.R., Leonard, J.A., Posada, D., Castroviejo, J., Petrucci – Fonseca, F., Crandall, K.A., Ellegrem, H., e Wayne, R.K. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*. 8:2089-2103.
- Vilà, C., e Wayne, R.K. 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology*. 13:195-198.
- vonHoldt, B.M., et al. 2011. A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research*. 21:1294-1305.
- Wayne, R.K., Allard, M.W., e Honeycutt, R.L. 1992. Mitochondrial DNA variability of the gray wolf: genetic consequences of populations decline and habitat fragmentation. *Conservation Biology*. 6:559-569.
- Wilson, G.M., Thomas, W.K., e Beckenbach, A.T. 1985. Intra- and inter-specific mitochondrial DNA sequence divergence in salmo rainbow, steelhead and cutthroat trouts. *Canadian Journal of Zoology*. 63:2088-2094.
- Wozencraft, W.C. 2005. Mammal species of the world: A taxonomic and geographic reference. 3ª edição. Johns Hopkins University Press. Baltimore, USA.
- Yahnke, C.J., et al. 1996. Darwin's Fox: A distinct endangered species in a vanishing habitat. *Conservation Biology*. 10:366-375.
- Zunino, G.E., Vaccaro, O.B., Canevari, M., e Gardner, A. 1995. Taxonomy of the genus *Lycalopex* (Carnivora, Canidae) in Argentina. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 108:729-747.