



Estudo da diversidade e estruturação genética das populações de lobo (*Canis lupus*) em Portugal

Relatório Final



Dezembro 2007

Este relatório enquadra-se no protocolo de colaboração entre o CIBIO, Centro de Investigação em Biodiversidade e Recursos Genéticos (Universidade do Porto) e o ICNB, Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, que decorreu no triénio 2005-2007. Os trabalhos nele descritos foram também co-financiados por fundos próprios do CIBIO.

Equipa de Trabalho

INVESTIGADORES

Raquel Godinho

Nuno Ferrand

EQUIPA TÉCNICA

Susana Lopes

Sofia Mourão

Paula Cruz

COLABORADORES

Francisco Álvares, Diana Castro, Rita Oliveira, Pedro Silva, Pedro Tarroso

Capa:

O arranjo gráfico da capa deste relatório é da autoria de Ricardo Freitas, realizado a partir de uma fotografia de Rita Oliveira.

O presente relatório deverá ser citado como:

GODINHO R, S LOPES & N FERRAND (2007). *Estudo da diversidade e estruturação genética das populações de lobo (Canis lupus) em Portugal*. Relatório Final. CIBIO/UP. 56 pp.

ÍNDICE

1. Introdução	1
1.1 Os marcadores moleculares	2
1.2 O Lobo	5
1.3 Objectivos	6
2. Material & Métodos	8
2.1 Recepção e armazenamento das amostras	9
2.2 Extracção de DNA	9
2.3 Amplificação e genotipagem de microssatélites	17
2.4 Determinação molecular do sexo	19
2.5 Amplificação e sequenciação de DNA mitocondrial	19
2.6 Análise de dados	19
3. Resultados	23
3.1 Filiação específica e detecção de hibridação entre lobo e cão	23
3.2 Determinação do número de populações de lobo	24
3.3 Estruturação genética e distribuição geográfica das populações de lobo	24
3.4 Diversidade genética e diferenciação das populações de lobo	30
3.5 Determinação do Tamanho Efectivo das populações	34
3.6 Determinação molecular do sexo	35
3.7 Análise da diversidade e da estruturação geográfica dos marcadores uni-parentais: mtDNA e cromossoma Y	36
4. Discussão	43
5. Considerações finais	48
6. Referências bibliográficas	52

1. INTRODUÇÃO

1. Introdução

O ritmo acelerado de extinção de muitas espécies nas últimas décadas e o agravamento das ameaças a muitas mais torna a Biologia da Conservação uma ciência crucial nos tempos actuais, estudando as populações afectadas pela perda de habitat, exploração ou por alterações ambientais, e contribuindo desta forma para a tomada de decisões que assegurem a sobrevivência futura dessas populações (Stockwell *et al*, 2003).

As possibilidades de manutenção futura de uma população ou espécie estão intimamente relacionadas, entre outros factores, com a sua diversidade genética: uma reduzida variabilidade pode comprometer a sua capacidade de adaptação a alterações ambientais (Stockwell *et al*, 2003) ou levar ao seu declínio devido à ocorrência de consanguinidade (Reed *et al.*, 2007). Os recentes avanços técnicos permitem agora medir mais precisamente essa diversidade, bem como esclarecer outras questões, de âmbito mais geral ou mais restrito, dificilmente investigadas pelas técnicas ecológicas tradicionais. Podem ainda ser esclarecidas as relações evolutivas (isto é, a proximidade ou divergência histórica) entre espécies ou populações, pode ser verificada a existência de trocas de genes ou indivíduos ou estimados diversos parâmetros da população, tais como o número de indivíduos (reprodutores) e reduções ou aumentos populacionais (Avice, 2004). Estas técnicas permitem também a identificação individual ou da proveniência, com aplicações forenses ou à conservação. Para muitas destas técnicas é possível recorrer a amostragens não invasivas, em que amostras de material biológico são recolhidas sem contactar com os animais (Taberlet & Waits, 1998; Waits & Paetkau 2005). A área da Genética da Conservação surge assim como sendo a aplicação de técnicas moleculares e de princípios da Genética ao estudo e gestão das populações ameaçadas (Hedrick, 2001).

As técnicas de análise molecular recorrem à variação encontrada no material genético dos organismos que podem depois ser interpretadas com o auxílio de ferramentas estatísticas e informáticas. Os locais no genoma em que essa variação é analisada são usualmente denominados marcadores moleculares (Avice, 2004). No entanto, o tipo de informação obtida depende da região genómica a analisar: diferentes marcadores moleculares têm modos de evolução diferentes, variando por isso no nível de informatividade e nas possíveis interpretações posteriores.

1.1 Os marcadores moleculares

Um dos primeiros marcadores moleculares a ser utilizado no estudo genético das populações foi a molécula de DNA mitocondrial (mtDNA), que constitui o material genético dos compartimentos celulares responsáveis pela produção de energia, as mitocôndrias (Avise, 2004) (Figura 1). Esta molécula é facilmente amplificada e analisada pois cada célula possui centenas de mitocôndrias, o que facilita a obtenção de quantidades razoáveis de DNA mesmo em amostras degradadas ou naturalmente pobres em material genético. O mtDNA é transmitido por via materna aos descendentes, possuindo cada indivíduo apenas um tipo de molécula (haplótipo) que recebeu da sua progenitora. Consequentemente, estes haplótipos são transmitidos à descendência apenas pelas fêmeas, não recombinação com outro material genético. Este modo particular de transmissão permite assim definir linhagens maternas (o que é útil para a definição de grupos/populações e relações de proximidade entre eles). Esta região genética apresenta ainda a vantagem de evoluir, em geral, de um modo neutral, isto é, a sua diversidade não é limitada ou enviesada pela selecção natural (Avise 1987).

A molécula de mtDNA é circular e relativamente pequena quando comparada com o material genético existente no núcleo das células. Contudo, possui várias regiões que têm diferentes taxas de variação e que, por isso, permitem estudos de diferente alcance temporal. Uma região muito utilizada em estudos populacionais é a região de controlo que, por não codificar proteínas, ao contrário das restantes regiões, é altamente variável. Esta região tem sido universalmente utilizada em análises populacionais de cães e lobos (Vilà *et al*, 1997), pelo que a sua utilização neste estudo permite a comparação da informação obtida para as populações portuguesas com a informação disponível para as outras populações ibéricas e mundiais.

A análise do mtDNA pode também ser utilizada como uma primeira ferramenta no estudo da hibridação entre lobos e cães (Vilà & Wayne, 1999). Para este tipo de estudos verifica-se se há correspondência entre a morfologia de um indivíduo e o seu haplótipo mitocondrial: um lobo com material genético mitocondrial típico de cão será provavelmente um híbrido. A transmissão materna da molécula de mtDNA é no entanto limitante nestes casos pois apenas se detectariam híbridos resultantes do cruzamento entre uma fêmea de cão e um macho de lobo.

A transmissão unicamente materna do mtDNA pode, por outro lado, limitar as interpretações decorrentes da análise desta molécula, já que apenas a história das linhagens maternas é reconstruída. Para complementar os dados mitocondriais pode recorrer-se à análise do cromossoma Y, o cromossoma masculino dos mamíferos. Este marcador está apenas presente nos machos, sendo por isso sempre transmitido por via paterna, permitindo completar a informação obtida para as linhagens maternas. Porém, ao contrário do que acontece com o DNA mitocondrial, que é grandemente utilizado, os estudos que incorporam informação do cromossoma Y são ainda escassos, e no que respeita ao par cão/lobo, embora já existam estudos publicados (e.g. Bannasch *et al.* 2005; Vilà *et al.* 2003a), a sua utilização ainda não é generalizada o que dificulta possíveis comparações com o presente trabalho.

Como foi referido, tanto o mtDNA como o cromossoma Y, embora muito úteis na reconstrução de grupos e linhagens, são limitativos por serem de transmissão uniparental. Além disso, a sua taxa de variabilidade não permite, normalmente, estudos a um nível mais detalhado do que o populacional nem, por exemplo, a identificação individual. Este tipo de informação pode ser obtida recorrendo a marcadores moleculares muito variáveis que se localizam ao longo dos cromossomas, no DNA do núcleo das células: os microssatélites ou STRs (*Short Tandem Repeats*) (Figura 1). Estas regiões são constituídas por pequenas sequências repetitivas que variam no número de repetições (Ellegren, 2004). A sua variabilidade é também muito elevada, pelo que, analisando algumas destas regiões num grupo de indivíduos, facilmente se obtém uma combinação única para cada um, podendo por isso ser utilizados para a identificação individual. Como estes marcadores são herdados de ambos os progenitores, podem também ser úteis no estabelecimento de filiação biológica. O seu pequeno tamanho facilita, também, a sua amplificação a partir de amostras degradadas. Os microssatélites permitem ainda complementar informação obtida com outros marcadores sobre diversos parâmetros populacionais, tais como a existência de estruturação, identificação de fluxo génico ou de indivíduos migrantes, ou ainda fazer a atribuição de indivíduos a uma dada população.

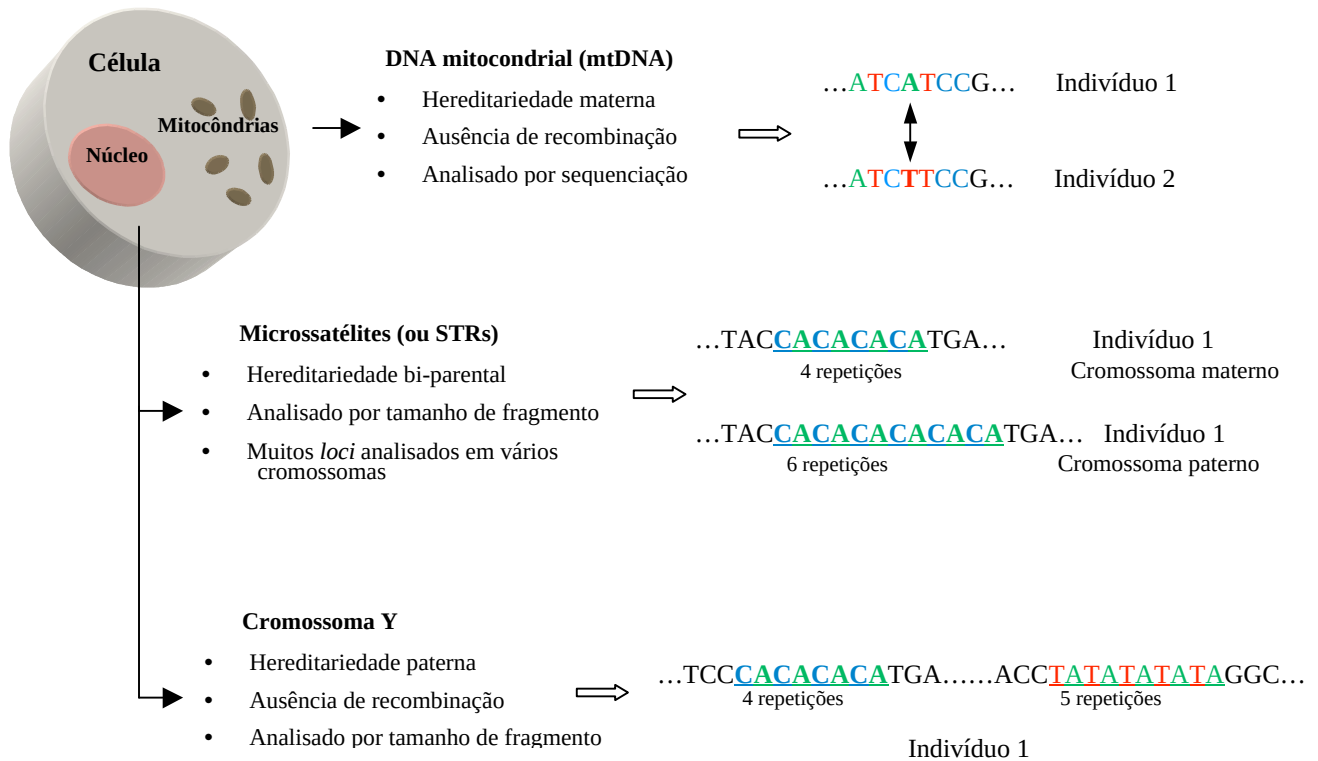


Figura 1. Comparação dos três tipos de marcadores genéticos utilizados neste trabalho. O DNA mitocondrial é analisado por sequenciação. A comparação das sequências permite identificar diferentes haplótipos (são apresentados dois haplótipos que diferem por uma mutação A ↔ T). Os alelos dos microsatélites diferem no número de motivos de repetição e podem ser identificados por diferenças de tamanho não tendo de ser sequenciados. Estes *loci* são abundantes em todos os cromossomas de animais e plantas (são apresentados dois alelos do mesmo indivíduo, um herdado do pai e outro da mãe, que diferem no número de repetições). O cromossoma Y também é analisado aqui pela variabilidade dos seus microsatélites, mas neste caso, devido à ausência de recombinação, a informação de todo o cromossoma é herdada em bloco, permitindo construir haplótipos, tal como no DNA mitocondrial (é apresentado um haplótipo construído com dois microsatélites de 4 e 5 motivos repetidos, respectivamente).

1.2 O Lobo

Depois do Homem, o lobo (*Canis lupus*) é o mamífero terrestre com a maior área de distribuição mundial em tempos históricos recentes, essencialmente porque é uma espécie altamente adaptável e grandemente distribuída em ecossistemas do Velho e Novo Mundo, que vão desde o Ártico aos desertos da Arábia (Mech 1970).

A presente distribuição europeia da espécie está grandemente reduzida se comparada com a passada. As perseguições exercidas pelo Homem através da caça, destruição do habitat e diminuição das presas naturais causaram a extinção da espécie em muitos países (Delibes 1990), que incluíram quase todos os da Europa central e do norte. A maior população actual de lobo na Europa vive entre os países dos Balcãs e de Leste, mas três pequenas populações sobreviveram isoladas da área de distribuição principal: a população da Península Ibérica, a da Península Itálica e a da Escandinávia (Boitani 2003)

A diversidade fenotípica da espécie (tamanho, coloração e peso) é muito grande (Mech 1970), e com base nessa variabilidade Nowak (1995) e Nowak & Federoff (2002) propuseram um conjunto de seis subespécies para a Eurásia, afirmando que mais quatro poderiam existir, mas não consideram a existência da subespécie proposta por Cabrera (1907) para a Península Ibérica, *Canis lupus signatus*. Esta subespécie distinguir-se-ia das restantes pela existência de faixas longitudinais negras nos membros dianteiros e por uma mancha dorsal negra na parte superior da cauda, sendo a restante pelagem normalmente de cor castanha, variando individualmente para tonalidades mais claras ou escuras.

O lobo (*Canis lupus*) é uma das espécies mais emblemáticas da fauna ibérica e constitui o último grande predador da fauna portuguesa. Em Portugal, à semelhança do que aconteceu no resto da Europa, o lobo sofreu grandes fragmentações e reduções populacionais, desde uma distribuição praticamente contínua em todo o território nacional, no início do século passado, até uma presença actual contínua apenas a norte do rio Douro, sendo excepção a esta situação a ocorrência de uma pequena população isolada numa área restrita a sul do rio Douro (Petrucchi-Fonseca 1990; Pimenta et al. 2005). O mais recente Censo Nacional do Lobo (Pimenta et al. 2005) contabilizou cerca de 300 indivíduos em território nacional distribuídos por 65 alcateias.

O trabalho aqui apresentado é o primeiro que se propôs avaliar detalhadamente a diversidade genética da população portuguesa de lobo recorrendo a múltiplos marcadores moleculares, e os seus resultados poderão ser aplicados directamente na conservação da espécie em Portugal.

1.3 Objectivos

O protocolo realizado entre o CIBIO e o ICNB teve como principal objectivo fazer uma caracterização genética das amostras de lobo recolhidas através do Sistema de Monitorização de Lobos Mortos (SMLM) de forma a avaliar a diversidade genética e a estruturação da espécie em Portugal. Para cumprir essa meta, foram definidos os seguintes objectivos:

- 1) Avaliar a integridade das populações de lobo em Portugal através da investigação da possibilidade de ocorrência de hibridação entre lobo e cão;
- 2) Determinar o número de populações de lobo em Portugal e avaliar a sua diversidade genética, bem como a diferenciação interpopulacional;
- 3) Estudar os padrões geográficos de distribuição de diversidade genética de lobo em Portugal através da análise de perfis genéticos individuais baseados em microsatélites autossómicos e do cromossoma Y, e através de haplótipos mitocondriais;
- 4) Estimar o tamanho efectivo das populações de lobo em Portugal;
- 5) Fazer a identificação molecular do sexo das amostras de lobo em análise.

2. MATERIAL & MÉTODOS

2. Material & Métodos

O número total de amostras recebidas pelo CIBIO ao longo dos três anos em que decorreu o protocolo CIBIO/ICNB foi de 67. A este número, o CIBIO adicionou um conjunto de oito amostras que tinham sido anteriormente recolhidas por técnicos do ICNB em diversas circunstâncias e que, em apenas dois casos, vieram posteriormente a fazer parte do SMLM (SMLM1 e SMLM31), ficando um total de 73 amostras disponíveis para análise. A descrição das amostras, bem como a informação relevante para a análise genética disponibilizada pelo ICNB, encontra-se listada na Tabela 1 e a sua distribuição geográfica é representada na Figura 2. É de salientar nesta tabela a imprecisão na localização das amostras quando da sua recolha, mesmo nos indivíduos recolhidos recentemente, e após ter sido solicitado ao ICNB pelo CIBIO que a localização dos animais fosse registada com coordenadas GPS. A precisão na localização da recolha dos indivíduos é fundamental para a realização de determinadas análises, não só em termos genéticos como para outras áreas do conhecimento, pelo que seria muito benéfico para o estudo do lobo em Portugal que essa regra fosse implementada. Devido à importância que o CIBIO atribui a esse factor, foi feito um esforço, essencialmente da responsabilidade do Dr. Francisco Álvares, para se reunir a informação da coordenada geográfica do ponto de recolha de cada lobo. Esta informação é agora pela primeira vez fornecida ao ICNB no âmbito deste relatório, e está agrupada na Tabela 2.

No total de 73 amostras, foi possível processar 55, para as quais serão apresentados todos os resultados obtidos ao longo dos 3 anos de protocolo. As 18 amostras excluídas da análise estão listadas na Tabela 3, onde são especificados os motivos que levaram a essa decisão. Na sua maioria, a exclusão de amostras prendeu-se com estados avançados de decomposição em que a amostra foi recolhida ou por existirem apenas disponíveis amostras de pêlo e/ou osso. Em ambos os casos, a análise torna-se muitíssimo mais complicada tecnicamente e muito mais custosa financeiramente, situações que não estavam abrangidas pelo protocolo estabelecido entre as duas instituições. Ainda assim, é de salientar que todas estas amostras passaram pelo processo de extracção de DNA num total de cinco vezes, e que foram tentativamente processadas para os diversos marcadores moleculares até um máximo de cinco vezes, sempre sem um sucesso que se coadune com a exigência das análises em questão (a utilização de um grande número de microsatélites que permite inferências muito mais robustas mas para a qual é necessária uma qualidade mínima de DNA). As amostras eliminadas da análise pertenciam na sua maioria à

população situada a Norte do Douro (n=14), não tendo sido igualmente possível analisar quatro amostras da população do Sul do Douro. Esta exclusão não se aplica, em alguns casos, à análise do mtDNA ou à determinação molecular do sexo, que são de processamento mais fácil.

2.1 Recepção e armazenamento das amostras

O procedimento aplicado a cada amostra após a sua chegada aos laboratórios do CIBIO consistiu na passagem de uma parte da amostra para álcool e de outra para tubos de congelação a -20°C, sendo cada amostra armazenada nos dois ambientes.

Toda a informação que acompanha cada amostra constante nas fichas de campo e de laboratório de registo de lobos mortos do ICNB foi transferida para uma base de dados informática.

2.2 Extracção de DNA

A extracção de DNA foi realizada pela aplicação do método salino descrito por Sambrook *et al.* (1989) e, quando necessário, foi igualmente realizada através do kit comercial para extracção de DNA a partir de tecidos (Qiagen Tissue Kit).

O DNA extraído de cada amostra foi processado independentemente para quatro tipos de marcadores moleculares: microssatélites autossómicos, microssatélites do cromossoma Y, DNA mitocondrial e *loci* nos cromossomas sexuais para determinação do sexo.

Tabela 1. Amostras recebidas ao abrigo do protocolo entre o CIBIO e o ICNB. São indicadas as informações constantes das fichas de campo e de laboratório de registo de lobos mortos do ICNB que acompanham cada amostra e o tipo de tecido recebido.

Código SMLM	Código CIBIO	Sexo	Data de recolha	Localidade	Distrito	Tipo de amostra	Observações
02	Lobo05	F	24-05-1996	Montesinho	Bragança	E	Mãe do 65 (Lobo 06)
03	Lobo04	M	11-09-1996	Montesinho	Bragança	E	
65	Lobo06	M	25-05-1997	Aveleda, Bragança	Bragança	E	
1 sp	Lobo01	M	01-10-1997	Allariz, Zamora	Espanha	F, M, R	
2 sp	Lobo02	F		A Lama, Pontevedra	Espanha	F, R	
-	Lobo07	?	01-01-1999	Mezio, Soajo	Viana do Castelo	VS	Atropelamento
SMLM 1	Lobo54	M	26-02-1998	Ungilde, Zamora	Espanha	M, S	
SMLM 2	Lobo43	M	15-02-1999	Sendim-Mogadouro, Mogadouro	Bragança	F	
SMLM 3	Lobo44	M	02-02-1998	Milhão, Bragança	Bragança	C	
SMLM 4	Lobo45	M	08-02-1999	Salsas, Bragança	Bragança	F	
SMLM 5	Lobo46	F	18-02-1995	Palaçoulo, Miranda do Douro	Bragança	C, F	
SMLM 6	Lobo09	F	02-02-2000	Vale Verde, Mirandela	Bragança	C, F, O, P, R	
SMLM 7	Lobo10	F	24-02-2000	Covelães, Montalegre	Vila Real	B, C, F, O, P, R	
SMLM 8	Lobo11	?	22-04-1999	Pitões das Júnias, Montalegre	Vila Real	O, P	
SMLM 9	Lobo12	F	29-09-1999	Capela, Prado S. Miguel, Vila Verde	Braga	O, P	CIPA 54
SMLM 10	Lobo13	F	22-12-1997	Salamonde, Montalegre	Vila Real	B, C, F, O, P, R	CIPA 744=C.familiaris
SMLM 11	Lobo14	M	11-11-1999	Nogueira, Bobadela, Boticas	Vila Real	C, F, O, P, R	
SMLM 12	Lobo15	?	18-05-1998	Morgade, Montalegre	Vila Real	O, P	
SMLM 13	Lobo16	F	08-03-2000	PF11, Romãs, Sátão	Viseu	C, O, P, R, S	
SMLM 14	Lobo17	F	05-03-2000	Babe, Bragança	Bragança	C, F, O, P, R	
SMLM 15	Lobo18	M	01-09-2000	S.Cabreira, Agra, Vieira do Minho	Braga	O, Pe	IPA=C. familiaris
SMLM 16	Lobo19	F	01-04-2000	Serra do Oural, Codeceda, Vila Verde	Braga	O	IPA= C. familiaris
SMLM 17	Lobo20	M	11-01-2002	Pendão, Angueira, Vimioso	Bragança	C, Fe, F, O, P, R, S	
SMLM 18	Lobo21	M	09-04-2002	Cuide de Vide, S ^{ta} Marinha Oriz, V.Verde	Braga	C, Fe, F, O, P, R, S	
SMLM 19	Lobo22	M	25-09-2002	Rio de Freitas, Covide, Terras de Bouro	Braga	C, F, O, P	
SMLM 20	Lobo23	F	30-10-2002	Calcado, Gavieira, Arcos de Valdevez	Viana do Castelo	M, O, P, S	
SMLM 21	Lobo24	F	03-01-2003	Sabuzedo, Mourilhe, Montalegre	Vila Real	C, F, O, P, R	
SMLM 22	Lobo25	M	08-05-2001	Leomil, Moimenta da Beira	Guarda	C, Fe, F, O, P, R, S	
SMLM 24	Lobo27	M	28-11-2001	Vila Nova Paiva	Viseu	C, Fe, F, O, P, R, S	
SMLM 25	Lobo28	M	01-12-1999	Alto Velão, Ermelo, Mondim de Basto	Vila Real	C, F, O, P, R	
SMLM 26	Lobo29	F	19-04-2003	Vilarinho-Parranheiras, Chaves	Vila Real	C, Fe, F, O, P, R, S	
SMLM 27	Lobo30	M	04/04/2002	Sanhoane, Mogadouro	Bragança	C, O, P	

Tabela 1. Continuação

Código SMLM	Código CIBIO	Sexo	Data de recolha	Localidade	Distrito	Tipo de amostra	Observações
SMLM 28	Lobo31	?	22-05-2003	Moinho Velho, Tourém, Montalegre	Vila Real	O	
SMLM 29	Lobo32	F	06-08-2003	Serradela, Vieira do Minho	Braga	O, Pe	
SMLM 30	Lobo102	M	03-04-2000	Agueiras, Mirandela	Bragança	C, F, M, O, P, R, S	Traumatismo
SMLM 31	Lobo47	M	18-02-1996	Pena Branca, Miranda do Douro	Bragança	M	
SMLM 32	Lobo52	M	25-03-1996	Santulhão, Vimioso	Bragança	C, M, P, O	
SMLM 33	Lobo53	M	05-09-1996	Milhão, Bragança	Bragança	C, M, P, O	
SMLM 34	Lobo48	M	10-02-2003	Qta do Lima, Reboleiro, Trancoso	Guarda	O, P	
SMLM 35	Lobo49	M	18-11-1997	Paredes da Beira, S. Joao da Pesqueira	Viseu	O, P	
SMLM 36	Lobo50	M	2004	Sul do Douro		C, F M, P	
SMLM 37	Lobo51	M	10-02-2004	Pêva, Vila Nova de Paiva	Viseu	C, F, M, O, P, S	
SMLM 38	Lobo83	M	15-03-2004	Castelões, Vieira do Minho	Braga	B, C, F, M, P, S	Tiro
SMLM 39	Lobo84	M	18-03-2004	Lindoso, Ponte da Barca	Viana do Castelo	C, F, M, P	Atropelamento
SMLM 40	Lobo85	F	03-04-2002	Pêva, Moimenta da Beira	Viseu	C, F, M, P	Atropelamento
SMLM 41	Lobo86	M	25-01-2002	Touro, Vila Nova de Paiva	Viseu	C, F, M, P, R	Atropelamento
SMLM 42	Lobo87	M	-	Entregue pelo PNSE		C, M, P	Traumatismo
SMLM 43	Lobo88	M	03-06-2004	Pitões das Júnias, Montalegre	Vila Real	C, M, O, P, R S	Envenenamento (?)
SMLM 44	Lobo89	F	08-04-2004	Sta. Marta, Vila Pouca de Aguiar	Vila Real	C, O, P	Atropelamento
SMLM 45	Lobo90	M	21-02-2004	Celas, Vinhais	Bragança	C, F, M, P, S	Laço
SMLM 46	Lobo91	F	09-09-2004	Serapicos, Vimioso	Bragança	C, F, M, P, S	
SMLM 47	Lobo92	M	12-10-2004	Proença a Velha, Idanha a Nova	Castelo Branco	C, M, P	Envenenamento (?)
SMLM 48	Lobo93	M	06-11-2004	Fronteira do Larouco, Montalegre	Vila Real	C, F, M, O, P, S	Atropelamento
SMLM 50	Lobo103	F	01-09-2002	Quintã, Vila Real	Vila Real	C, M, P	
SMLM 51	Lobo104	F	07-02-2003	EN2/Telões, Vila Pouca Aguiar	Vila Real	C, M, P, F	Traumatismo
SMLM 52	Lobo105	F	17-03-2005	São João Campo/Terras Bouro	Braga	C, F, M, S	
SMLM 53	Lobo121	F	05-10-2005	Veade, Montalegre	Vila Real	C, F, O, P, Pe	Putrefacto
SMLM 54	Lobo122	M	25-07-2005	Souto da Velha, Torre de Moncorvo	Bragança	F, M, O, P, Pe	
SMLM 55	Lobo123	?	16-08-2005	Souto da Velha, Torre de Moncorvo	Bragança	O, P, Pe	Putrefacto
SMLM 57	Lobo124	M	15-10-2004	IP4, Alfaião, Bragança	Bragança	C, F, P, Pe, S	Atropelamento
SMLM 58	Lobo125	M	24-02-2006	Quebrada, Sistelo, Arcos de Valdevez	Viana do Castelo	C, F, P, Pe, S	Tiro
SMLM 59	Lobo296	F	16-11-2005	Lagarota, Deilão	Bragança	C, M, P, S	Atropelamento
SMLM 60	Lobo297	M	01-08-2006	Castro d'Aire	Viseu	O, P	Laço
SMLM 61	Lobo298	M	24-08-2005	EN2 Km27, Bornes de Águia	Vila Pouca Aguiar	M, Or	Laço(?). Putrefacto.
SMLM 62	Lobo299	?	11-03-2005	Campos Cravelos, Covide	Braga	O, P	Laço. Lobo (?)
SMLM 63	Lobo300	?	22-05-2005	Batateiro/branda Aveleira	Viana do Castelo	O, P	Veneno? Lobo (?)

Tabela 1. Continuação

Código SMLM	Código CIBIO	Sexo	Data de recolha	Localidade	Distrito	Tipo de amostra	Observações
SMLM 64	Lobo301	?	?	?	?	O, P	Mau estado. Lobo (?)
SMLM 65	Lobo302	?	15-01-2007	Mogadouro (PF89760)	Bragança	O	Lobo (?)
SMLM 66	Lobo303	F	16-05-2005	Jorjais/Perafita Km118.100m, Vila Verde	Alijó, Vila Real	C, M, O, Or, P	Traumatismo
SMLM 67	Lobo304	M	26-04-2005	Vila Frade, Lamadarcos, Chaves	Vila Real	C, M, O, P	Laço. Putrefacto
SMLM 70	Lobo322	M	13-02-2008	Carvalhal, cabreiro, Arcos de Valdevez	Viana do Castelo	M, Or	
SMLM 71	Lobo316	M	29-02-2008	Alto Cotão, Abedim, Monsão	Viana do Castelo	C, F, Or	
SMLM 73	Lobo324	F	06-05-2008	IP4 (Km 186,25), Quintela Lapaços	Bragança	M, Or	

E-Eritrócitos; C-Coração; F-Fígado; Fe-Fezes; R-Rim; M-Músculo; O-Osso; P-Pele; Pe-Pêlo; B-Baço; S-Sangue; Or-Orelha; VS-Vestígios de Sangue

Tabela 2. Georeferenciação das amostras do SMLM, com informação da alcateia associada à amostra. ¹ - Captura; ² - Morte

Código SMLM	Código CIBIO	Distrito	Concelho	Freguesia	UTM 10x10km	UTMx	UTMy	Alcateia
02	Lobo05	Bragança ¹	Bragança ¹	Aveleda/Rio de Onor ¹	PG94 ¹			Rachas
03	Lobo04	Bragança ¹	Bragança ¹	Milhão ¹	PG92/93? ¹			Milhão
65	Lobo06	Bragança ¹	Bragança ¹	Aveleda ¹	PG94 ¹			Rachas
1 sp	Lobo01	Ourense (Galiza)?	Allariz		NG97?			
2 sp	Lobo02	Pontevedra (Galiza)	A Lama		NG59?			
-	Lobo07	Viana do Castelo	Arcos de Valdevez	Soajo	NG53	557000	4637000	Soajo
SMLM 1	Lobo54	Bragança ¹ Castilla y León ²	Bragança ¹ Zamora ²	Aveleda/Rio de Onor ¹ Ungilde ²	PG94 ¹ PG95 ²			Rachas
SMLM 2	Lobo43	Bragança	Mogadouro	Penas Róias	QF08	701000	4581000	Mogadouro Norte
SMLM 3	Lobo44	Bragança	Bragança	Milhão	PG92	697000	4627000	Milhão
SMLM 4	Lobo45	Bragança	Bragança	Salsas	PG81	680000	4612000	Nogueira (?)
SMLM 5	Lobo46	Bragança	Miranda do Douro	Palaçoulo	QF19	715000	4591000	Palaçoulo
SMLM 6	Lobo09	Bragança	Mirandela	Valverde	PF48/PF58			Sta Comba (?)
SMLM 7	Lobo10	Vila Real	Montalegre	Covelaes	NG93	590000	4630000	Pitões
SMLM 8	Lobo11	Vila Real	Montalegre	Pitões das Júnias	NG83	584000	4633000	Pitões
SMLM 9	Lobo12	Braga	Vila Verde	Prado (Sao Miguel)	NG41	546000	4618000	Vila Verde
SMLM 10	Lobo13	Vila Real	Montalegre	Cabril	NG71	579000	4616000	-
SMLM 11	Lobo14	Vila Real	Boticas	Bobadela	PG12	613000	4622000	Leiranco
SMLM 12	Lobo15	Vila Real	Montalegre	Morgade	PG02	606000	4624000	Leiranco
SMLM 13	Lobo16	Viseu	Sátão	Romãs	PF11	616875	4512250	Lapa
SMLM 14	Lobo17	Bragança	Bragança	Babe	PG93			Rachas / Milhão
SMLM 15	Lobo18	Braga	Vieira do Minho	Anjos	NG70	578000	4607000	-
SMLM 16	Lobo19	Braga	Vila Verde	Codeceda	NG42	545000	4620000	-
SMLM 17	Lobo20	Bragança	Vimioso	Angueira	QG10	714177	4609769	Avelanoso
SMLM 18	Lobo21	Braga	Vila Verde	(Oriz) Santa Marinha	NG51	553000	4619000	Vila Verde
SMLM 19	Lobo22	Braga	Terras de Bouro	Covide	NG61	565000	4619000	Gerês
SMLM 20	Lobo23	Viana do Castelo	Arcos de Valdevez	Gavieira	NG54	559000	4646000	Vez / Soajo
SMLM 21	Lobo24	Vila Real	Montalegre	Mourilhe	NG93	597000	4634000	Larouco
SMLM 22	Lobo25	Viseu	Moimenta da Beira	Leomil	PF13	611075	4534950	Leomil
SMLM 24	Lobo27	Viseu	Vila Nova Paiva	Touro	PF02	605500	4525450	Leomil
SMLM 25	Lobo28	Vila Real	Mondim de Basto	Pardelhas	NF97	593000	4575000	Vaqueiro
SMLM 26	Lobo29	Vila Real	Chaves	Vilarinho das Paranhos	PG11	618990	4613125	Nogueira da Montanha
SMLM 27	Lobo30	Bragança	Mogadouro	Sanhoane	QF08	702550	4585000	Mogadouro Norte

Tabela 2. Continuação

Código SMLM	Código CIBIO	Distrito	Concelho	Freguesia	UTM 10x10km	UTMx	UTMy	Alcateia
SMLM 28	Lobo31	Vila Real	Montalegre	Tourem	NG93	591000	4639000	Larouco / Pitões
SMLM 29	Lobo32	Braga	Vieira do Minho	Cantelaes	NG71	577000	4611000	Cabreira
SMLM 30	Lobo102	Bragança	Mirandela	Aguieiras	PG51/PG52			Tuela-Vale d'Fontes
SMLM 31	Lobo47	Bragança	Miranda do Douro	Miranda do Douro	QG20			Paradela (?)
SMLM 32	Lobo52	Bragança	Vimioso	Santulhao	PG90?			Talhinhas (?)
SMLM 33	Lobo53	Bragança	Bragança	Milhão	PG92	693000	4628000	Milhão
SMLM 34	Lobo48	Guarda	Trancoso	Reboleiro	PF32	634000	4521000	Trancoso
SMLM 35	Lobo49	Viseu	S. João da Pesqueira	Paredes da Beira	PF24			Penedono
SMLM 36	Lobo50	Viseu	Vila Nova de Paiva	Fráguas	PF02	601500	4520875	Leomil / Lapa
SMLM 37	Lobo51	Viseu	Moimenta da Beira	Pêva	PF02	609825	4525950	Leomil
SMLM 38	Lobo83	Braga	Vieira do Minho	Cantelaes	NG71	578000	4610000	Cabreira
SMLM 39	Lobo84	Viana do Castelo	Ponte da Barca	Lindoso	NG63	568000	4636000	Amarela
SMLM 40	Lobo85	Viseu	Moimenta da Beira	Pêva	PF12	613250	4528100	Leomil / Lapa
SMLM 41	Lobo86	Viseu	Vila Nova de Paiva	Touro	PF02	607650	4528600	Leomil
SMLM 42	Lobo87	Viseu	Moimenta da Beira	Pêva	PF12	613250	4528100	Leomil / Lapa
SMLM 43	Lobo88	Vila Real	Montalegre	Pitões das Júnias	NG83	586000	4634000	Pitões
SMLM 44	Lobo89	Vila Real	Vila Pouca de Aguiar	S ^{ta} Marta da Montanha	PF09	605650	4595318	Minhéu
SMLM 45	Lobo90	Bragança	Vinhais	Celas	PG71/PG72			Nogueira
SMLM 46	Lobo91	Bragança	Vimioso	Vale de Frades	QG11			Avelanoso
SMLM 47	Lobo92	Castelo Branco	Idanha-a-Nova	Proença-a-Velha	PE42	648946	4425034	-
SMLM 48	Lobo93	Vila Real	Montalegre	Padornelos	PG03	603000	4638000	Larouco
SMLM 50	Lobo103	Vila Real	Vila Real	Quintã	NF97	596556	4572040	Vaqueiro
SMLM 51	Lobo104	Vila Real	Vila Pouca de Aguiar	Teloas	PF19	611513	4590536	Sombra
SMLM 52	Lobo105	Braga	Terras de Bouro	Campo do Geres	NG62	566000	4621000	Gerês
SMLM 53	Lobo121	Vila Real	Montalegre	Viade de Baixo	NG92	594000	4626000	Larouco / Barroso
SMLM 54	Lobo122	Bragança	Torre de Moncorvo	Souto da Velha	PF76	675000	4565000	Souto da Velha
SMLM 55	Lobo123	Bragança	Torre de Moncorvo	Souto da Velha	PF76	674000	4566000	-
SMLM 57	Lobo124	Bragança	Bragança	Alfaião	PG92	692000	4628000	Milhão
SMLM 58	Lobo125	Viana do Castelo	Arcos de Valdevez	Sistelo	NG44	549000	4647000	Vez (?)
SMLM 59	Lobo296	Bragança	Bragança	Deilao	QG03?			Maças (?)
SMLM 60	Lobo297	Viseu	Castro d'Aire	Castro D'Aire	NF93	592527	4530619	Montemuro
SMLM 61	Lobo298	Vila Real	Vila Pouca de Aguiar	Sabroso de Aguiar	PG10	617230	4603574	Padrela
SMLM 62	Lobo299	Braga	Terras de Bouro	Covide	NG61	564000	4617000	Gerês
SMLM 63	Lobo300	Viana do Castelo	Melgaço	Gave	NG64	560323	4648848	-

Tabela 2. Continuação

Código SMLM	Código CIBIO	Distrito	Concelho	Freguesia	UTM 10x10km	UTMx	UTMy	Alcateia
SMLM 64	Lobo301	Viana do Castelo	Monção	Riba de Mouro	NG55	557000	4650000	Vez
SMLM 65	Lobo302	Bragança	Mogadouro	Mogadouro	PF87	689375	4576380	-
SMLM 66	Lobo303	Vila Real	Alijó	Vila Verde	PF28	621530	4581499	Alijó
SMLM 67	Lobo304	Vila Real	Chaves	Lama de Arcos	PG33	634018	4631264	Mairos
SMLM 70	Lobo322	Viana do Castelo	Arcos de Valdevez	Cabreiro	NG54	555174	4644251	Soajo
SMLM 71	Lobo316	Viana do Castelo	Monção	Abedim	NG44	540528	4646930	Boulhosa
SMLM 73	Lobo324	Bragança	Bragança	Quintela de Lampaças	PG70	676160	4608549	Limãos

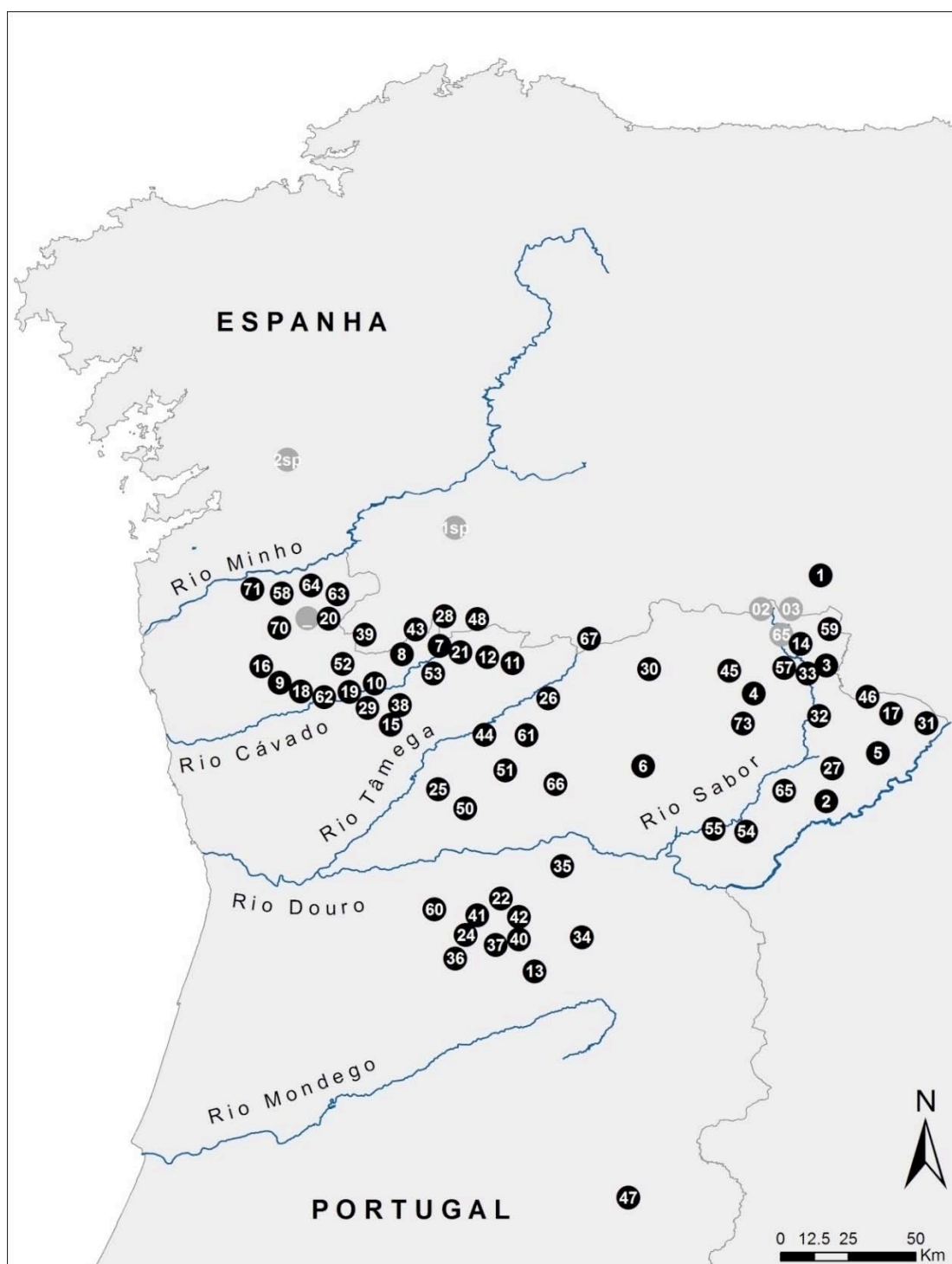


Figura 2. Localização geográfica de todas as amostras de lobo recebidas pelo CIBIO durante os três anos de protocolo com o ICNB. A preto assinalam-se as amostras com código SMLM e a cinzento assinalam-se as amostras anteriores ao SMLM.

Tabela 3. Amostras do SMLM excluídas do processo final de análise genética após cinco tentativas de extracção de DNA e de amplificação dos marcadores moleculares, e motivo da exclusão.

Código SMLM	Código CIBIO	Motivo da exclusão
SMLM 8	Lobo11	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso e pele)
SMLM 10	Lobo13	DNA muito degradado
SMLM 11	Lobo14	DNA muito degradado
SMLM 12	Lobo15	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso e pele)
SMLM 15	Lobo18	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso e pêlo)
SMLM 16	Lobo19	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso)
SMLM 22	Lobo25	DNA muito degradado
SMLM 28	Lobo31	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso)
SMLM 29	Lobo32	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso e pêlo)
SMLM 34	Lobo48	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso e pele)
SMLM 35	Lobo49	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso e pele)
SMLM 44	Lobo89	Amostra putrefacta, DNA muito degradado
SMLM 50	Lobo103	DNA muito degradado
SMLM 52	Lobo105	DNA muito degradado
SMLM 55	Lobo123	Amostra putrefacta
SMLM 60	Lobo297	Quantidades vestigiais de DNA (apenas osso e pele)
SMLM 64	Lobo301	Quantidades vestigiais de DNA
SMLM 67	Lobo304	Amostra putrefacta, DNA muito degradado

2.3 Amplificação e Genotipagem de Microssatélites

As amostras foram processadas para um total de 39 microssatélites autossómicos e seis microssatélites do cromossoma Y (no caso dos machos). Os *loci* amplificados e utilizados para a construção dos genótipos individuais foram os indicados na Tabela 4, onde se inclui a informação da respectiva localização cromossómica.

O processo de genotipagem decorreu através de Reacção em Cadeia da Polimerase (PCR) em quatro reacções *multiplex* (amplificação conjunta de vários *loci*) e a separação dos fragmentos amplificados foi executada num sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems). A leitura dos resultados foi realizada no software GeneMapper 4.0 (Applied Biosystems), sendo todos os resultados verificados manualmente. As tentativas de amplificação destes 45 microssatélites (39 autossómicos + 6 ligados ao cromossoma Y) foram realizadas até um máximo de cinco vezes.

Tabela 4. Microsatélites analisados com respectiva localização cromossómica, motivo de repetição e referência bibliográfica.

Microssatélite	Localização cromossómica	Motivo de repetição	Referência
AHT103	4	Di	Holmes <i>et al.</i> 1995
AHT111	2	Di	Holmes <i>et al.</i> 1993
AHT121	13	Di	Holmes <i>et al.</i> 1995
AHT137	11	Di	Holmes <i>et al.</i> 1995
AHT171	6	Di	Finnzymes, Inc
AHT260	16	Composto	Finnzymes, Inc
AHTk211	26	Di	Thomas <i>et al.</i> 1997
AHTk253	23	Di	Thomas <i>et al.</i> 1997
C04.140	4	Di	Ostrander <i>et al.</i> 1993
C09.173	9	Di	Ostrander <i>et al.</i> 1993
C13.758	13	Di	Mellersh <i>et al.</i> 1997
C14.866	14	Di	Mellersh <i>et al.</i> 1997
C20.253	20	Di	Ostrander <i>et al.</i> 1993
C22.279	22	Di	Ostrander <i>et al.</i> 1993
CPH14	5	Di	Fredholm & Wintero 1995
Dbar1	24	Composto	Kerns <i>et al.</i> 2004
Dbar2	24	Di	Kerns <i>et al.</i> 2004
FH2001	23	Tetra	Francisco <i>et al.</i> 1996
FH2010	24	Tetra	Francisco <i>et al.</i> 1996
FH2054	12	Tetra	Francisco <i>et al.</i> 1996
FH2079	24	Tetra	Francisco <i>et al.</i> 1996
FH2848	2	Di	Finnzymes, Inc
INRA21	21	Di	Mariat <i>et al.</i> 1996
INU005	33	Di	Finnzymes, Inc
INU030	12	Di	Finnzymes, Inc
INU055	10	Di	Finnzymes, Inc
MS34A	Y	Di	Olivier <i>et al.</i> 1999
MS34B	Y	Di	Olivier <i>et al.</i> 1999
MS41B	Y	Di	Olivier <i>et al.</i> 1999
PEZ1	7	Tetra	Neff <i>et al.</i> 1999
PEZ12	3	Composto	Neff <i>et al.</i> 1999
PEZ20	22	Tetra	Neff <i>et al.</i> 1999
PEZ3	19	Tri	Neff <i>et al.</i> 1999
PEZ5	12	Tetra	Neff <i>et al.</i> 1999
PEZ6	27	Composto	Neff <i>et al.</i> 1999
PEZ8	17	Composto	Neff <i>et al.</i> 1999
REN162C04	7	Di	Guyon <i>et al.</i> 2003
REN169D01	14	Di	Guyon <i>et al.</i> 2003
REN169O18	29	Di	Guyon <i>et al.</i> 2003
REN247M23	15	Di	Guyon <i>et al.</i> 2003
REN54P11	18	Di	Guyon <i>et al.</i> 2003
VWF	27	Hexa	Shibuya <i>et al.</i> 1994
650-79.2	Y	Di	Bannasch <i>et al.</i> 2005
650-79.3	Y	Di	Bannasch <i>et al.</i> 2005
990-35	Y	Di	Bannasch <i>et al.</i> 2005

2.4 Determinação molecular do sexo

A determinação molecular do sexo foi realizada a partir da técnica descrita em Seddon (2005) como específica para canídeos, e que se baseia na diferença na composição cromossómica entre machos e fêmeas. Assim, enquanto os machos são portadores de um cromossoma X e um cromossoma Y, as fêmeas apresentam dois cromossomas X. Esta técnica permite a amplificação simultânea de regiões homólogas nos cromossomas X e Y, nomeadamente o gene DBX e DBY, sendo o resultado de interpretação directa: duas amplificações significa que se está perante um macho enquanto uma única amplificação significa que se trata de uma fêmea.

2.5 Amplificação e Sequenciação de DNA mitocondrial

O haplótipo de DNA mitocondrial foi determinado para todas as amostras através de amplificação por PCR de um fragmento de 425 bp da região de controlo usando os primers THR-L e DL-H (Vilà *et al.* 1999), seguida de sequenciação. A sequenciação seguiu o protocolo ABI PrismBigBye *Terminator Cycle sequencing* e foi realizada num sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems). A leitura e o alinhamento das sequências foram realizados no software SeqScape 2.5 (Applied Biosystems).

A região do mtDNA amplificada é correspondente à utilizada internacionalmente na maioria dos trabalhos sobre lobo (por exemplo Vilà *et al.* (1999) e Lucchini *et al.* (2002)) para facilitar possíveis comparações com outras populações distribuídas globalmente.

2.6 Análise de Dados

A primeira análise realizada referiu-se à investigação da possibilidade de hibridação entre lobo e cão. Esta opção permitiu retirar do grupo de amostras eventuais amostras de cão que tivessem sido identificadas como potenciais lobos e incorporadas no SMLM. Esta análise foi executada com base nos perfis genéticos individuais obtidos para o lobo em Portugal (constituídos pela informação resultante da análise dos *loci* autossómicos) em conjunto com a base de dados de genótipos de cão pertencente ao CTM/CIBIO, que inclui mais de 250 cães de várias raças, incluindo todas as raças de cão de gado autóctones portuguesas e também um número

significativo de cães sem raça (rafeiros). Esta análise foi realizada no *software* Structure 2.0 (Pritchard *et al.*, 2000) que utiliza uma metodologia Bayesiana de cálculo. O programa foi executado sem definir, *a priori*, a origem específica de cada amostra. Para cada corrida, foram efectuadas 10^6 cadeias Markov Monte Carlo (MCMC) após 10^4 cadeias MCMC de minimização dos efeitos da configuração inicial. Foram executadas três réplicas e comparados os valores obtidos.

A análise de estruturação populacional foi realizada com base nos genótipos constituídos pela informação resultante da análise dos *loci* autossómicos, e foi igualmente executada no *software* Structure 2.0 (descrito anteriormente). Este *software* foi inicialmente utilizado para calcular o número mais provável de populações presentes na amostra, tendo sido efectuadas análises para números de populações entre 1 e 6. Depois de estimado o número mais provável de populações, o mesmo *software* foi utilizado para estimar o valor de miscigenação individual, q_k^i (a proporção de genoma do indivíduo i que é originária da população k) e ainda para inferências da proporção de genoma individual dos ancestrais de primeira e segunda geração de cada indivíduo (no caso da partição em duas populações). O programa foi sempre executado sem definir, *a priori*, a origem geográfica de cada amostra. Para cada corrida, foram efectuadas 10^6 cadeias Markov Monte Carlo (MCMC) após 10^4 cadeias MCMC de minimização dos efeitos da configuração inicial. Em todos os casos foram executadas três réplicas e comparados os valores obtidos.

A análise clássica da diversidade genética das populações foi realizada com base nas frequências alélicas dos microsatélites autossómicos. Foram calculadas medidas de variabilidade genética como o número de alelos, a riqueza alélica (rarefeita para 4 indivíduos genotipados por população) e a heterozigotia observada (fracção de indivíduos que apresentam alelos distintos para um mesmo *locus* por contagem directa) e esperada (fracção de indivíduos que apresentam alelos distintos para um mesmo *locus* utilizando uma previsão teórica baseada no conhecimento das frequências alélicas) por população, utilizando o *software* Fstat 2.9.3 (Goudet 1995, 2001). Para esta análise foram considerados apenas os indivíduos que pertencessem a uma população com uma probabilidade posterior acima dos 80%.

As estimativas de diferenciação populacional foram obtidas pelo cálculo dos valores de F_{st} (Weir & Cockerham 1984) entre pares de populações e também para o conjunto de todas as populações utilizando o programa Genetix 4.05 (Belkhir *et al.* 2004). Foram ainda calculadas as distâncias genéticas D_s de Nei (1972) e D_c de Cavalli-Sforza & Edwards (1967) com as quais se construiu uma árvore pelo método *Neighbor-Joining* (Saitou & Nei 1987). Este procedimento foi executado no *software* Population (Langella 1999).

Os genótipos individuais obtidos pela análise dos microssatélites autossómicos foram ainda utilizados para o cálculo de estimativas do tamanho efectivo das populações, utilizando o método baseado no desequilíbrio de ligação gamética (LD), ou seja, na associação não aleatória entre alelos de *loci* diferentes. Este método é uma formulação matemática que envolve o conhecimento *a priori* das frequências alélicas dos vários *loci* e apenas uma amostragem da população, e assume que o grau de associação entre os alelos nos vários *loci* se deve apenas a deriva génica e não envolve selecção nem migração (para uma explicação compreensível da derivação matemática, ver Wang 2005). Para este cálculo, assumiu-se ligações permanentes entre pares de indivíduos, i.e., monogamia para a vida, e foram considerados na análise todos os alelos com frequência superior a 1%. O método implementado foi o disponível no *software* LDNE 1.31 (Waples & Do, 2008).

3. RESULTADOS

3. Resultados

3.1 Filiação específica e detecção de hibridação entre lobo e cão

A incerteza da origem específica de três das 55 amostras analisadas (SMLM62, 63 e 65), nomeadamente a possibilidade de serem amostras de cão e não de lobo, foi analisada em primeiro lugar para que possíveis amostras de cão não influenciassem posteriores análises de diversidade genética nas populações de lobo. Adicionalmente, esta análise permite também detectar hibridação entre cão e lobo, fenómeno não confirmado para Portugal mas presente em Espanha em áreas de expansão recente de lobo (Llaneza *et al.*, 2005; Llaneza *et al.*, dados não publicados), e que é muito importante avaliar nas populações portuguesas. Assim, o conjunto das 55 amostras com perfil genético individual caracterizado foi submetido a análise e foi possível confirmar a suspeita de que as amostras SMLM63 e SMLM65 são de cão, o mesmo não sendo verdade para a amostra SMLM62, a qual provem efectivamente de um lobo (Figura 3).

Na análise de detecção de hibridação entre lobo e cão, e com o poder que a análise de um grande número de marcadores nucleares oferece, não foi identificado nenhum indivíduo híbrido entre lobo e cão, tendo todas as amostras em análise apresentado valores de associação ao genoma de lobo muito próximos de 100%.

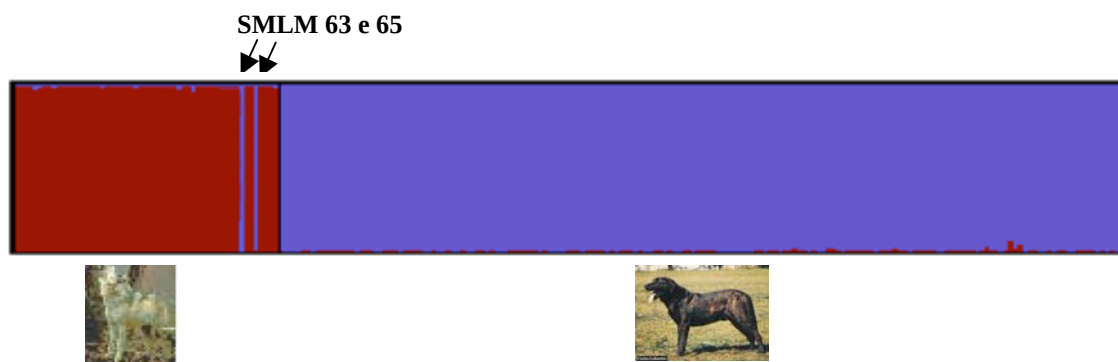


Figura 3. Gráfico que sumaria as filiações probabilísticas dos indivíduos às populações parentais Lobo (vermelho) e Cão (azul) determinadas por análise bayesiana realizada no *software* Structure. Cada indivíduo é representado por uma linha vertical separada em duas secções (vermelho e azul) que correspondem à contribuição de cada uma das duas espécies para o genoma de cada indivíduo. Os dois cães do SMLM são assinalados.

3.2 Determinação do número de populações de lobo

Na estimativa do número mais provável de populações de lobo em Portugal, realizada por métodos Bayesianos implementados no *software* Structure através da utilização de marcadores nucleares autossómicos, foi obtido um valor de quatro populações (Figura 4). Este valor, diferente do apresentado em relatórios anteriores deste projecto, justifica-se pelo incremento de mais 25 novos marcadores na análise, que aumentaram muito o seu poder.

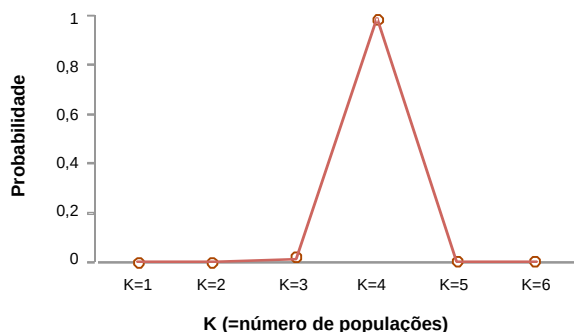


Figura 4. Probabilidade do número de populações (K) presente na amostra de lobos portugueses.

3.3 Estruturação genética e distribuição geográfica das populações de lobo

Uma vez definido o número de populações de uma espécie numa determinada região, é necessário conhecer qual a relação genética entre essas populações, como se filiam os indivíduos nas várias populações encontradas e, finalmente, qual a distribuição geográfica desses grupos de indivíduos. Para isso, estimou-se a probabilidade posterior de filiação do genoma de cada indivíduo quando se força a correspondência das amostras a duas, três e quatro populações e fez-se a projecção geográfica desses agrupamentos. Desta forma, é possível perceber quais os dois grupos de indivíduos mais diferenciados, e que correspondem aos que se separam imediatamente quando se força a existência de apenas duas populações; qual o grupo de indivíduos que se separa de

seguida e de que população das duas anteriores é ele proveniente, quando se força a divisão da amostra em três populações; e finalmente quais os indivíduos que se separam em último lugar e de onde saem, quando se realiza a análise para o número de populações igual a quatro. Os resultados desta análise são apresentados nas Figuras 5, 6 e 7, respectivamente, para duas, três e quatro populações, e, na Tabela 5, são detalhados quanto à proporção de genoma de cada indivíduo correspondente às várias populações para $K=4$.

O resultado da partição em duas populações (Figura 5) permitiu verificar que o rio Douro separa os dois grupos de lobo mais diferenciados geneticamente em Portugal. Este resultado era previsivelmente esperado, uma vez que o mesmo se verificava quando o número de marcadores moleculares em análise era cerca de metade do actual (ver relatórios anteriores deste projecto). Assim, confirma-se a considerável diferenciação genética que existe entre as populações localizadas a Norte e a Sul do rio Douro. A análise efectuada para a partição em três populações (Figura 6) teve como resultado uma subdivisão da população a Norte do rio Douro, que se separa em duas entidades genéticas distintas localizadas na região Noroeste e na região Nordeste, respectivamente. No entanto, quando a mesma análise é repetida para o número mais provável de populações ($K=4$; Figura 7 e Tabela 5), a população do Noroeste subdivide-se em Noroeste Minhoto e Noroeste Transmontano, aproximadamente. Este resultado é surpreendente e de elevada importância porque mostra que no interior da Área Protegida do Parque Nacional da Peneda-Gerês existem duas populações de lobo geneticamente distintas e que essa área é assim detentora de uma diversidade genética muito apreciável. Esta diversidade contrasta com a uniformidade que parece estar presente na população lupina de todo o Nordeste português a Norte do rio Douro.

Nos resultados da análise de partição (em duas, três e quatro populações) é sempre possível verificar a existência de um indivíduo (SMLM42), recolhido a Sul do Douro (EN323, Pêva, Moimenta da Beira), mas que apresenta uma percentagem significativa (43%) de filiação na população a norte do rio Douro, e em particular ao Nordeste Transmontano. Perante este caso, testou-se a probabilidade de se tratar de um indivíduo com ancestrais recentes (de 1ª e/ou de 2ª geração) na população do Norte do Douro e verificou-se uma probabilidade posterior de 78% de este indivíduo ter um ascendente de 2ª geração (um avô) nessa população. Este resultado realça a possibilidade de migração esporádica de Norte para Sul.

É de salientar a filiação do lobo encontrado em Idanha-a-Nova na população do Nordeste, o que permite assegurar com elevado nível de confiança que se trata de um indivíduo migrante proveniente da população do Nordeste transmontano/Castilla y León, e não de um indivíduo dispersante originário da população portuguesa a Sul do Douro.

K=2

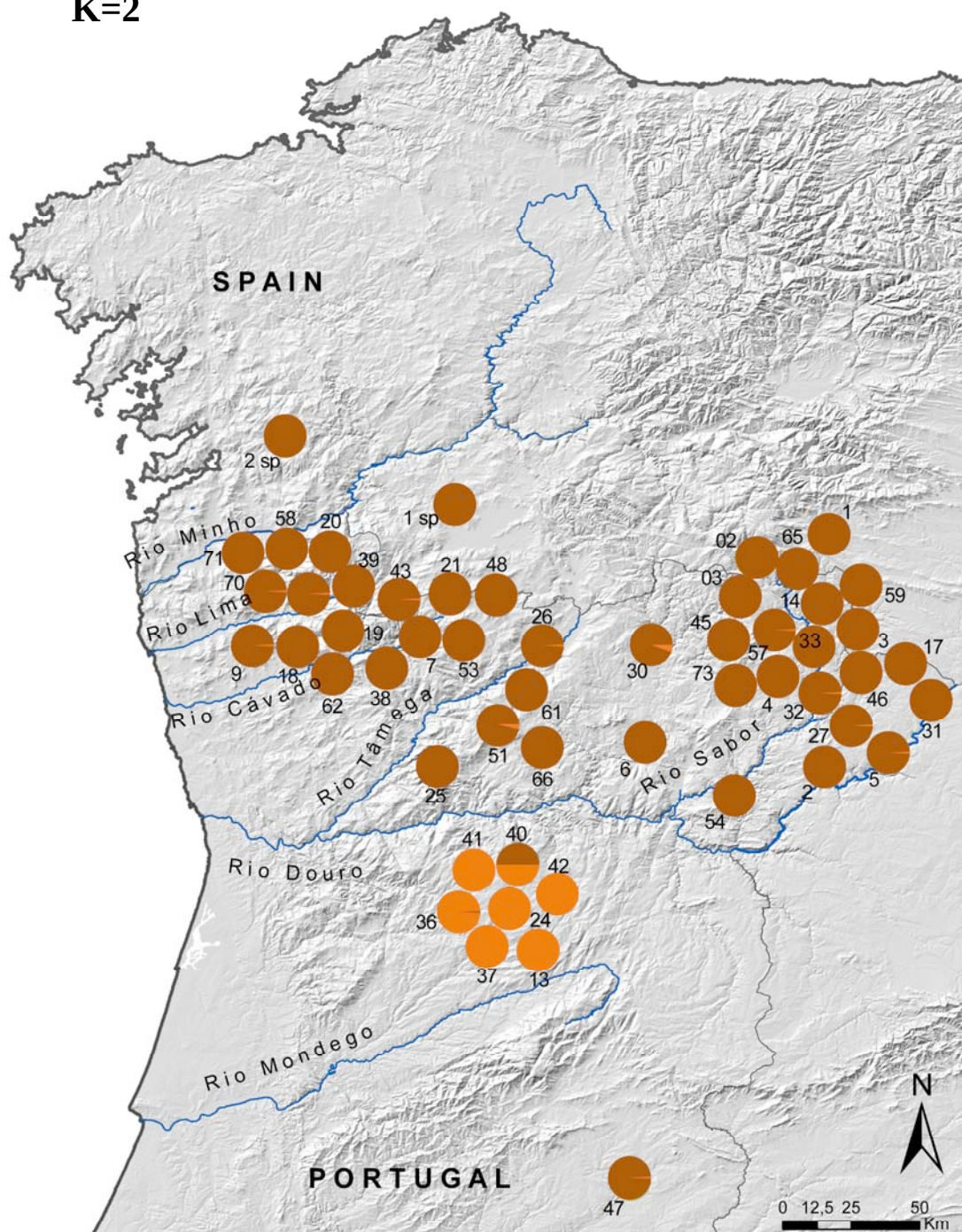


Figura 5. Distribuição geográfica da estruturação genética de lobo em Portugal quando as 53 amostras em análise são divididas em duas populações (K=2). Cada amostra é representada por um círculo com secções laranja e castanha que correspondem à probabilidade posterior de filiação do genoma de cada indivíduo a cada uma das duas populações.

K=3

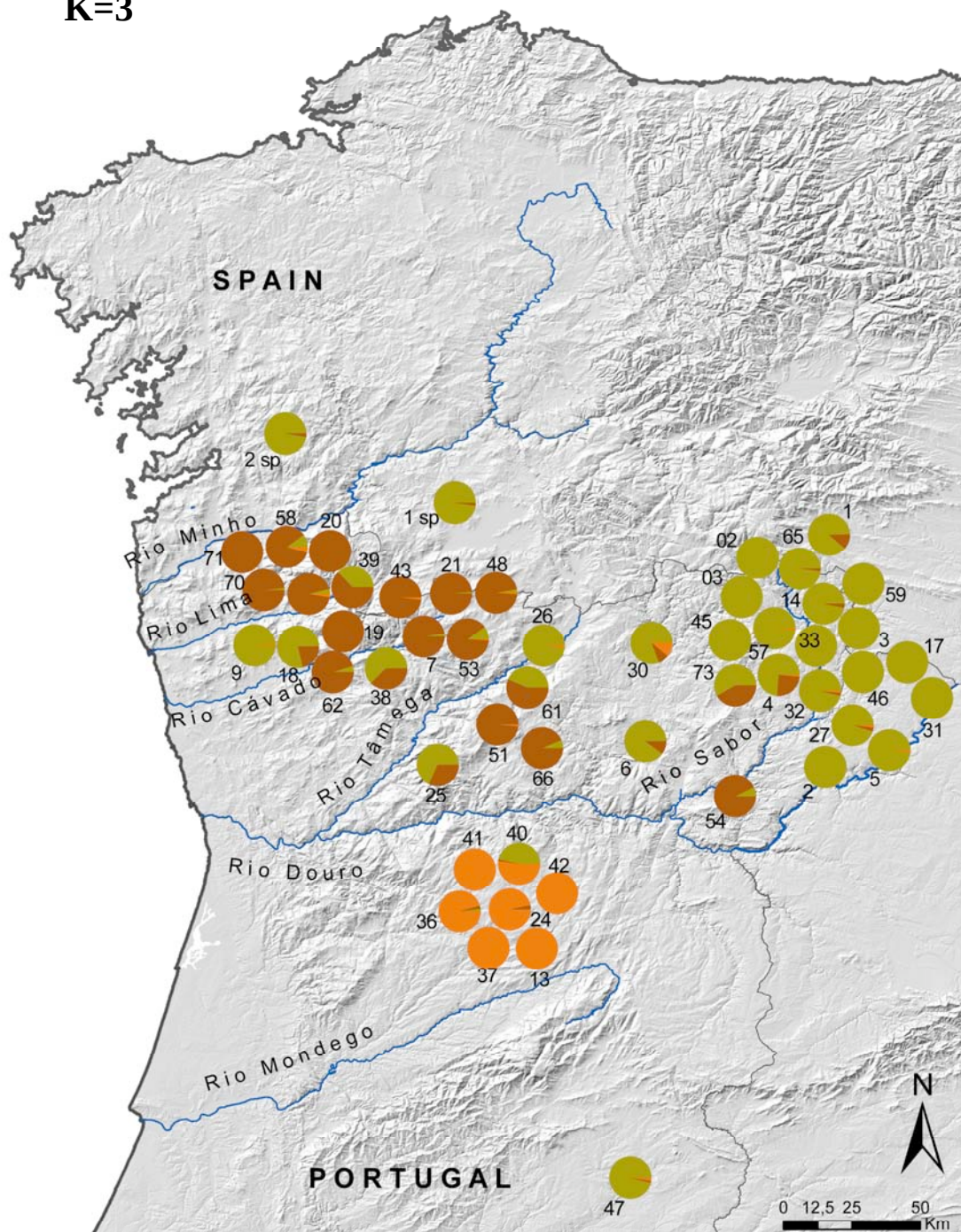


Figura 6. Distribuição geográfica da estruturação genética de lobo em Portugal quando as 53 amostras em análise são divididas em três populações (K=3). Cada amostra é representada por um círculo com secções laranja, castanha e verde que correspondem à probabilidade posterior de filiação do genoma de cada indivíduo a cada uma das três populações.

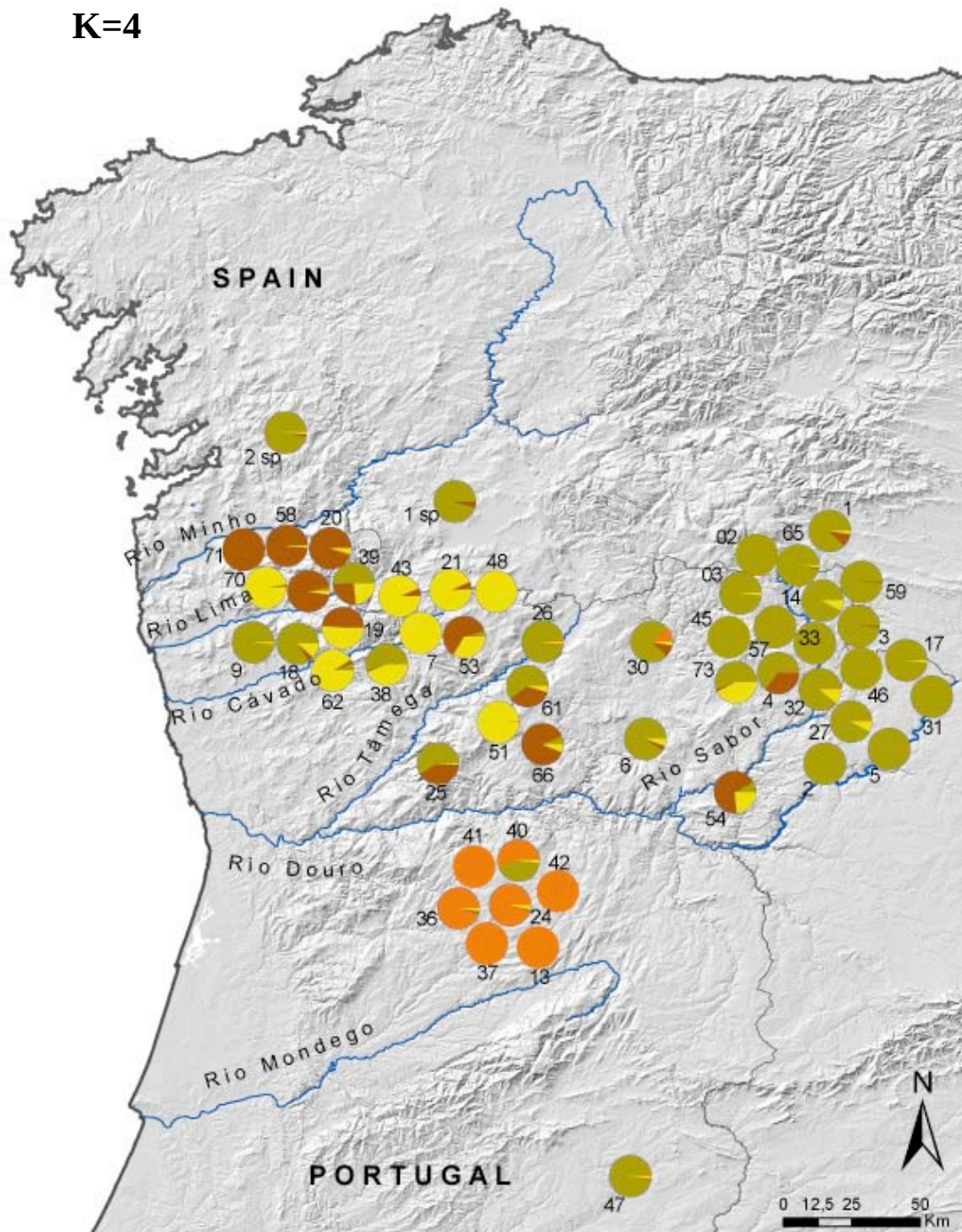
K=4

Figura 7. Distribuição geográfica da estruturação genética de lobo em Portugal quando as 53 amostras em análise são divididas em quatro populações (K=4, o número mais provável de populações para este grupo de amostras). Cada amostra é representada por um círculo com secções laranja, castanha, verde e amarela que correspondem à probabilidade posterior de filiação do genoma de cada indivíduo a cada uma das quatro populações.

Tabela 5. Probabilidade de filiação do genoma de 53 indivíduos nas quatro populações de lobo observadas em Portugal.

Código SMLM	Localidade	Sul	Nordeste	Noroeste Minhoto	Noroeste Transmont
02	Montesinho	0.003	0.979	0.003	0.015
03	Montesinho	0.006	0.982	0.004	0.008
65	Aveleda, Bragança	0.007	0.962	0.016	0.015
1 sp	Allariz, Zamora	0.003	0.941	0.049	0.007
2 sp	A Lama, Pontevedra	0.002	0.963	0.022	0.012
-	Gerês	0.016	0.022	0.938	0.024
SMLM 1	Ungilde, Zamora	0.003	0.869	0.103	0.025
SMLM 2	Sendim-Mogadouro, Mogadouro	0.009	0.981	0.005	0.005
SMLM 3	Milhão, Bragança	0.004	0.981	0.011	0.004
SMLM 4	Salsas, Bragança	0.017	0.620	0.353	0.010
SMLM 5	Palaçoulo, Miranda do Douro	0.017	0.970	0.005	0.007
SMLM 6	Vale Verde, Mirandela	0.005	0.901	0.039	0.056
SMLM 7	Covelães, Montalegre	0.004	0.005	0.004	0.988
SMLM 9	Capela, Prado S. Miguel, Vila Verde	0.013	0.969	0.007	0.011
SMLM 13	PF11, Romãs, Sátão	0.981	0.010	0.004	0.005
SMLM 14	Babe, Bragança	0.007	0.911	0.007	0.074
SMLM 17	Pendão, Angueira, Vimioso	0.005	0.976	0.003	0.015
SMLM 18	Cuide de Vide, S ^{ta} Marinha Oriz, V.Verde	0.004	0.836	0.046	0.113
SMLM 19	Rio de Freitas, Covide, Terras de Bouro	0.002	0.009	0.484	0.505
SMLM 20	Calcado, Gavieira, Arcos de Valdevez	0.002	0.003	0.950	0.045
SMLM 21	Sabuzedo, Mourilhe, Montalegre	0.004	0.013	0.051	0.932
SMLM 24	Vila Nova Paiva	0.993	0.003	0.002	0.002
SMLM 25	Alto Velão, Ermelo, Mondim de Basto	0.004	0.586	0.399	0.011
SMLM 26	Vilarinho-Parranheiras, Chaves	0.026	0.956	0.004	0.014
SMLM 27	Sanhoane, Mogadouro	0.020	0.896	0.010	0.074
SMLM 30	Aguierras, Mirandela	0.119	0.766	0.087	0.029
SMLM 31	Pena Branca, Miranda do Douro	0.008	0.979	0.006	0.007
SMLM 32	Santulhão, Vimioso	0.016	0.869	0.004	0.111
SMLM 33	Milhão, Bragança	0.003	0.985	0.005	0.006
SMLM 36	Sul do Douro	0.945	0.016	0.020	0.019
SMLM 37	Pêva, Vila Nova de Paiva	0.947	0.004	0.015	0.034
SMLM 38	Castelões, Vieira do Minho	0.011	0.538	0.014	0.437
SMLM 39	Lindoso, Ponte da Barca	0.003	0.504	0.259	0.234
SMLM 40	Pêva, Moimenta da Beira	0.985	0.008	0.002	0.005
SMLM 41	Touro, Vila Nova de Paiva	0.990	0.004	0.003	0.003
SMLM 42	Entregue pelo PNSE	0.543	0.429	0.010	0.018
SMLM 43	Pitões das Júnias, Montalegre	0.008	0.006	0.067	0.919
SMLM 45	Celas, Vinhais	0.003	0.982	0.009	0.006
SMLM 46	Serapicos, Vimioso	0.003	0.987	0.003	0.008
SMLM 47	Proença a Velha, Idanha a Nova	0.024	0.947	0.012	0.018
SMLM 45	Celas, Vinhais	0.003	0.982	0.009	0.006
SMLM 46	Serapicos, Vimioso	0.003	0.987	0.003	0.008
SMLM 47	Proença a Velha, Idanha a Nova	0.024	0.947	0.012	0.018

Tabela 5. Continuação.

Código SMLM	Localidade	Sul	Nordeste	Noroeste Minhoto	Noroeste Transmont
SMLM 48	Fronteira do Larouco, Montalegre	0.004	0.006	0.005	0.984
SMLM 51	EN2/Telões, Vila Pouca Aguiar	0.011	0.007	0.008	0.974
SMLM 53	Veade, Montalegre	0.009	0.048	0.610	0.333
SMLM 54	Souto da Velha, Torre de Moncorvo	0.008	0.085	0.675	0.232
SMLM 57	IP4, Alfaião, Bragança	0.014	0.976	0.005	0.006
SMLM 58	Quebrada, Sistelo, Arcos de Valdevez	0.002	0.007	0.981	0.010
SMLM 59	Lagarota, Deilão	0.007	0.977	0.010	0.007
SMLM 61	EN2 Km27, Bornes de Águia	0.005	0.603	0.346	0.047
SMLM 62	Campos Cravelos, Covide	0.006	0.059	0.029	0.905
SMLM 66	Jorjais/Perafita Km118.100m, Vila Verde	0.006	0.065	0.867	0.062
SMLM 70	Carvalhal, cabreiro, Arcos de Valdevez	0.016	0.013	0.006	0.965
SMLM 71	Alto Cotão, Abedim, Monsão	0.004	0.005	0.987	0.004
SMLM 73	IP4 (Km 186,25), Quintela Lampaços	0.007	0.555	0.019	0.419

Os indivíduos presentes na região central a norte do rio Douro (nomeadamente na área do Parque Natural do Alvão e áreas envolventes) apresentam genomas maioritariamente miscigenados entre os três grupos populacionais identificados a norte do rio Douro (dois na região do Noroeste, e outro na região do Nordeste). Este resultado, que pode ser considerado inesperado tendo em consideração a descrição de três núcleos populacionais estáveis presentes no Norte de Portugal (Pimenta *et al.*, 2005), parece indicar que esta é uma região onde as alcateias se mantêm essencialmente pela assimilação de indivíduos migrantes/dispersantes. De facto, a sua composição genómica só pode ser explicada através da contribuição das três populações anteriormente referidas, que constituem os núcleos populacionais “Peneda-Gerês” e “Bragança”, conforme descritos em Pimenta *et al.* (2005).

3.4 Diversidade genética e diferenciação das populações de lobo

A diversidade genética das quatro populações de lobo em Portugal foi analisada através das frequências alélicas observadas nos microssatélites autossómicos, do número de alelos observados e número de alelos privativos, da riqueza alélica, e ainda dos valores encontrados para a heterozigotia (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Número de alelos observados na análise das quatro populações de lobo em Portugal, a partir da análise de 39 microssatélites. Entre parêntesis apresenta-se o número de alelos privativos de cada população.

Microssatélite	Nordeste	Noroeste Minhoto	Noroeste Transmontano	Sul do Douro	Total
AHT103	2 (0)	2 (1)	2 (0)	2 (0)	3
AHT111	4 (0)	2 (0)	3 (0)	2 (0)	4
AHT121	9 (4)	2 (0)	3 (0)	2 (0)	10
AHT137	6 (3)	2 (0)	2 (0)	2 (0)	6
AHT171	5 (2)	2 (0)	3 (0)	2 (1)	6
AHT260	8 (4)	2 (0)	2 (0)	3 (0)	8
AHTk211	2 (0)	2 (0)	2 (0)	2 (0)	2
AHTk253	4 (1)	2 (0)	3 (0)	2 (0)	4
C04.140	5 (2)	2 (0)	2 (0)	3 (0)	5
C09.173	3 (1)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	4
C13.758	3 (0)	3 (0)	3 (1)	2 (0)	5
C14.866	3 (1)	1 (0)	1 (0)	2 (0)	3
C20.253	6 (1)	3 (0)	4 (0)	3 (0)	6
C22.279	4 (0)	3 (0)	3 (0)	2 (0)	4
CPH14	5 (1)	2 (0)	2 (0)	4 (0)	5
Dbar1	1 (0)	1 (0)	1 (0)	2 (1)	2
Dbar2	3 (1)	2 (0)	2 (0)	3 (1)	4
FH2001	5 (0)	3 (0)	3 (0)	4 (0)	5
FH2010	3 (1)	2 (0)	2 (0)	3 (1)	4
FH2054	5 (3)	2 (0)	2 (0)	3 (1)	6
FH2079	2 (0)	2 (0)	2 (0)	3 (1)	3
FH2848	4 (0)	3 (0)	3 (0)	2 (0)	4
INRA21	6 (3)	3 (0)	2 (0)	3 (0)	6
INU005	3 (0)	2 (1)	3 (0)	1 (0)	4
INU030	4 (1)	1 (0)	3 (0)	2 (0)	5
INU055	4 (0)	3 (0)	2 (0)	4 (1)	5
PEZ1	7 (2)	4 (0)	1 (0)	4 (1)	8
PEZ12	8 (2)	4 (0)	3 (0)	4 (0)	8
PEZ20	3 (0)	2 (1)	3 (0)	3 (1)	5
PEZ3	7 (1)	6 (3)	3 (0)	6 (2)	12
PEZ5	5 (1)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	5
PEZ6	10 (5)	3 (0)	3 (0)	2 (0)	11
PEZ8	6 (0)	3 (0)	3 (0)	6 (1)	7
REN162C04	4 (3)	1 (0)	2 (1)	1 (0)	5
REN169D01	5 (2)	3 (0)	3 (0)	3 (0)	5
REN169O18	6 (1)	2 (0)	3 (0)	5 (0)	6
REN247M23	5 (2)	3 (1)	3 (1)	2 (1)	8
REN54P11	3 (0)	3 (0)	2 (0)	2 (0)	3
VWF	3 (0)	3 (0)	2 (0)	2 (0)	3
Total	181 (48)	97 (7)	97 (3)	109 (13)	209

É necessário, em primeiro lugar, fazer referência à elevada assimetria existente no número de amostras disponíveis para a população do Nordeste (n=25) e as restantes (n=5 ou 7), e à dificuldade que daí resulta na comparação dos valores obtidos. É, no entanto, de destacar um

maior número de alelos encontrados na população do Nordeste, e sobretudo, uma maior riqueza alélica, parâmetro rarefeito para a diferença no número de amostras (Tabela 6). Nestes dois parâmetros, as duas populações do Noroeste e a população do Sul do Douro apresentam valores muito semelhantes, apesar de a população do sul parecer ligeiramente mais diversa. É de salientar que, quando as duas populações do Noroeste são combinadas numa única amostra, estes dois parâmetros sobem ligeiramente de valor ($N=12$; $N_a=103$, $R_a=2,89$) mas não atingem o valor da população do Nordeste. Quanto à heterozigotia, os valores observados para todas as populações estão muito próximos, sendo o valor do Noroeste Transmontano ligeiramente superior. Os valores de heterozigotia esperada e observada diferem um pouco nas três populações com um reduzido número de amostras, essencialmente devido ao efeito do tamanho da amostra no cálculo destes parâmetros, e não é por isso de esperar que estas diferenças se mantenham no caso de a amostra ser aumentada.

Tabela 7. Parâmetros de diversidade genética calculados a partir de 39 microssatélites nas quatro populações de lobo em Portugal. N-tamanho da amostra; N_a – número de alelos encontrado; R_a – riqueza alélica; H_e -Heterozigotia esperada; H_o – heterozigotia observada.

População	N	N_a	R_a	H_e	H_o
Nordeste	25	181	3.32	0,551	0,581
Noroeste Minhoto	5	97	2.52	0,422	0,529
Noroeste Transmontano	7	97	2.53	0,430	0,590
Sul do Douro	7	109	2.78	0,396	0,462

A diferenciação genética das populações foi estudada através dos valores de F_{st} , estatística standardizada para a frequência alélica de cada alelo entre populações (Tabela 8) e pelas distâncias genéticas D_s (Nei 1972) e D_c (Cavalli-Sforza & Edwards 1967) entre as populações (Figura 8). Numa perspectiva geral, pode-se observar que todas as populações apresentam valores relativamente elevados de diferenciação genética (entre 9% e 30%). Tanto a população a Sul do Douro como a população do Noroeste Minhoto aparecem como as que mais se diferenciam das restantes e é a população do Nordeste a que, sistematicamente, aparece como a mais próxima de todas as outras. Quando se observa o resultado da distância genética entre pares de populações traduzido na Figura 8, e apesar de estes valores não terem tido suporte estatístico usando o

método *bootstrap* e terem, assim, de ser interpretados com precaução, verifica-se que são as populações do Sul do Douro e do Noroeste Minhoto as que aparecem como mais derivadas (as que apresentam ramos maiores), sugerindo a existência de maiores valores de deriva genética. O valor global encontrado para a diferenciação entre as quatro populações foi moderado ($F_{st}=0,160$, com intervalo de confiança entre 0,133 e 0,188).

Tabela 8. Estimativas de diferenciação interpopulacional nas quatro populações de lobo em Portugal baseadas nos valores de F_{st} . Os intervalos de confiança são indicados entre parêntesis.

	NO Minhoto	NO Transmontano	Sul Douro
Nordeste	0.148 (0.105-0.195)	0.102 (0.069-0.136)	0.168 (0.125-0.219)
NO Minhoto	-	0.211 (0.129-0.283)	0.274 (0.193-0.345)
NO Transmontano	-	-	0.223 (0.159-0.288)

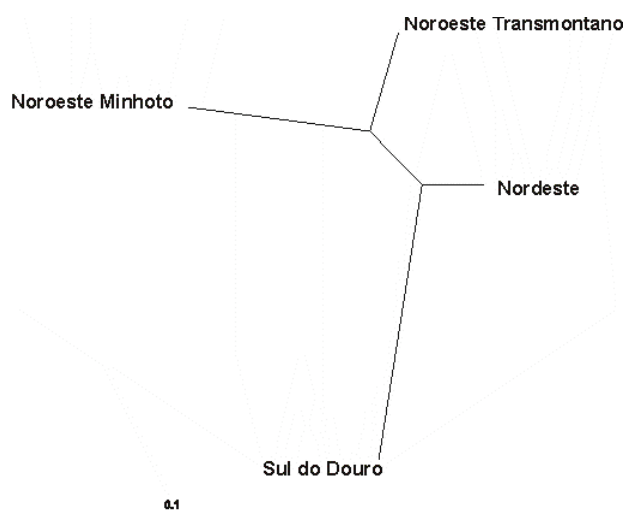


Figura 8. Árvore *Neighbour-joining* construída a partir de uma matrix de distâncias genéticas de Nei (1972) para as quatro populações de lobo em Portugal. O suporte obtido por *bootstrap* é inferior a 50% e não está representado.

3.5 Determinação do Tamanho Efectivo das populações

O Tamanho Efectivo de uma População (N_e) é o número médio de indivíduos numa população que efectivamente contribui com descendentes (com genes) para a geração seguinte. Num censo ecológico, o tamanho de uma população (N) é geralmente encontrado pela contagem do número de adultos. No entanto, em genética das populações, o que conta é a possibilidade de duas cópias de um gene serem amostradas quando a geração seguinte é produzida. Na prática, N_e é geralmente menor, ou muito menor, do que N , sendo essa redução essencialmente devida a i) proporções diferentes na reprodução dos dois sexos; ii) proporções diferentes na reprodução dos indivíduos; iii) qualquer acontecimento passado que tenha afectado o tamanho da população, e que pode resultar na perda aleatória de diversidade genética (Ridley 2004). O método aqui utilizado para estimar o tamanho efectivo da população foi o de Waples & Do (2008) baseado no desequilíbrio gamético e que implementa uma recente correcção de enviesamento para quando o tamanho da amostra é menor do que o verdadeiro (desconhecido) tamanho efectivo da população (Waples 2006). Este método não requer qualquer assunção de cruzamento aleatório entre os indivíduos, e permite assumir ligações permanentes de reprodução entre pares de indivíduos.

As estimativas de N_e foram inicialmente executadas para as quatro populações descritas anteriormente, mas devido ao muito reduzido número de amostras nas duas populações do Noroeste, não foi possível obter estimativas credíveis. Assim, optou-se por apresentar estimativas para toda a população portuguesa de lobos situada a Norte do Douro e também, tentativamente, para a população localizada a Sul do Douro (Tabela 9).

Tabela 9. Estimativas do Tamanho Efectivo da População (N_e) nas populações a Norte e a Sul do Rio Douro, utilizando o método do desequilíbrio gamético e alelos com frequência $\geq 1\%$.

População	Estimativa de N_e	Intervalo de Confiança (95%)
Norte do Douro	98,2	81,3 - 121,9
Sul do Douro	52,4	16,6 - ∞

A estimativa encontrada para o tamanho efectivo da população a Norte do rio Douro foi de 98 indivíduos. Este valor está essencialmente de acordo com o que seria esperado porque se trata de, aproximadamente, 1/3 da estimativa do tamanho populacional determinado no Censo Nacional 2002/2003 (290 indivíduos, quando considerada uma média entre as estimativas encontradas para a Primavera e o Outono; Pimenta *et al.* 2005). No entanto, a estimativa do tamanho efectivo populacional a Sul do Douro (52 indivíduos) não deverá estar próximo do real, uma vez que se conhece bem a fragilidade desta população em número de indivíduos, e onde foram apenas confirmadas 6 alcateias, num máximo estimado de 9 alcateias (Pimenta *et al.* 2005). Este desfasamento estará certamente relacionado com o tamanho muito reduzido da amostra (apenas 7 indivíduos) que condiciona o resultado e, concomitantemente, as estimativas do intervalo de confiança. Neste caso, foi possível obter um valor mínimo para o intervalo de confiança, mas não um valor máximo.

3.6 Determinação molecular do sexo

A determinação molecular do sexo foi realizada com sucesso para a maioria das amostras de lobo provenientes do SMLM, sendo os resultados apresentados na Tabela 10, independentemente de algumas destas amostras terem sido excluídas das análises com marcadores nucleares. Como é possível verificar, foi encontrada uma inconsistência (realçada a amarelo) entre os dados apresentados na ficha de campo e os resultados obtidos pela técnica molecular. Para este indivíduo (SMLM9) foram realizadas três extracções de DNA e três amplificações independentes das regiões dos cromossomas sexuais em análise, e foi confirmado de que se trata de um macho. Adicionalmente, foi também possível determinar o sexo de um lobo da área do Parque Nacional Peneda-Gerês (vítima de atropelamento em Janeiro de 1999 e que fugiu antes de ser correctamente identificado) e também de um outro lobo (SMLM62) para o qual se desconhecia o sexo. Estas últimas duas amostras são assinaladas na Tabela 10 a azul.

Tabela 10. Resultados obtidos na determinação molecular do sexo dos lobos e informação contida nas fichas referentes a cada lobo do SMLM. A azul são assinaladas as amostras cujo sexo era desconhecido e a amarelo é assinalada uma inconsistência entre a informação na ficha SMLM e a identificação molecular.

Código SMLM	Informação nas fichas SMLM	Sexo	Código SMLM	Informação nas fichas SMLM	Sexo
02	F	F	SMLM 32	M	M
03	M	M	SMLM 33	M	M
65	M	M	SMLM 34	M	M
1 sp	M	M	SMLM 36	M	M
2 sp	F	F	SMLM 37	M	M
-	?	M	SMLM 38	M	M
SMLM 1	M	M	SMLM 39	M	M
SMLM 2	M	M	SMLM 40	F	F
SMLM 3	M	M	SMLM 41	M	M
SMLM 4	M	M	SMLM 42	M	M
SMLM 5	F	F	SMLM 43	M	M
SMLM 6	F	F	SMLM 45	M	M
SMLM 7	F	F	SMLM 46	F	F
SMLM 9	F	M	SMLM 47	M	M
SMLM 13	F	F	SMLM 48	M	M
SMLM 14	F	F	SMLM 51	F	F
SMLM 17	M	M	SMLM 53	F	F
SMLM 18	M	M	SMLM 54	M	M
SMLM 19	M	M	SMLM 57	M	M
SMLM 20	F	F	SMLM 58	M	M
SMLM 21	F	F	SMLM 59	F	F
SMLM 24	M	M	SMLM 61	M	M
SMLM 25	M	M	SMLM 62	?	M
SMLM 26	F	F	SMLM 66	F	F
SMLM 27	M	M	SMLM 70	M	M
SMLM 30	M	M	SMLM 71	M	M
SMLM 31	M	M	SMLM 73	F	F

3.7 Análise da diversidade e da estruturação geográfica dos marcadores uni-parentais: mtDNA e cromossoma Y

A análise das linhagens uni-parentais e da sua distribuição geográfica é uma importante documentação para a avaliação da diversidade e da estruturação das populações naturais (Avise 2004). Até à data, apenas um trabalho (Vilà *et al.* 1997) descreveu a variabilidade de DNA

mitocondrial de lobo na Península Ibérica, no qual são descritas duas linhagens presentes nos lobos portugueses, e nenhum trabalho tinha anteriormente documentado a variabilidade genética ao nível do cromossoma Y do lobo na Península Ibérica.

No estudo das linhagens do cromossoma Y foram utilizados seis microssatélites que permitiram detectar quatro linhagens paternas num conjunto de 26 machos, nomeadas Y_A a Y_D. Três das linhagens parecem ser relativamente comuns, surgindo com frequências de 38% (Y_B), 27% (Y_A) e 23% (Y_D). A quarta linhagem de lobo detectada (Y_C) está representada com uma frequência inferior às anteriores (12%) (Tabela 11). A distribuição geográfica dos haplótipos (informação conjunta para os seis microssatélites) encontrados no cromossoma Y está representada na Figura 9, onde se pode observar que as linhagens Y_A e Y_B não apresentam qualquer estruturação geográfica, apesar de a linhagem Y_A surgir apenas a Norte do rio Douro. Ao contrário, as linhagens Y_C e Y_D parecem apresentar uma tendência para surgir mais localizadas a Noroeste e a Nordeste, respectivamente, o que poderá ser um sinal de estruturação ao nível do cromossoma masculino. O lobo proveniente de Idanha-a-Nova é portador da linhagem Y_D que parece estar mais associada à população Nordeste, constituindo mais uma evidência que suporta a proveniência deste lobo a partir dessa população.

Tabela 11. Linhagens do cromossoma Y encontradas nos lobos machos.

Código SMLM	Linhagem Y	Código SMLM	Linhagem Y
65	Y_A	SMLM 32	Y_D
1sp	Y_D	SMLM 33	Y_B
SMLM 1	Y_B	SMLM 38	Y_A
SMLM 2	Y_B	SMLM 39	Y_B
SMLM 3	Y_A	SMLM 41	Y_B
SMLM 4	Y_A	SMLM 42	Y_B
SMLM 17	Y_D	SMLM43	Y_A
SMLM 18	Y_A	SMLM 45	Y_B
SMLM 19	Y_B	SMLM 47	Y_D
SMLM 24	Y_B	SMLM 48	Y_A
SMLM 25	Y_C	SMLM 58	Y_C
SMLM 30	Y_D	SMLM 61	Y_D
SMLM 31	Y_B	SMLM 71	Y_C

Na análise do fragmento da região de controlo do mtDNA foram encontradas seis linhagens mitocondriais num conjunto de 55 amostras, nomeadas de A a F. Destas seis linhagens, três foram anteriormente descritas como características de lobo, tendo duas delas sido já descritas para a população portuguesa de lobo (Linhagem A, que corresponde ao haplótipo W1 em Vilà *et al.*, 1997 e linhagem C, que corresponde ao haplótipo W3 em Vilà *et al.*, 1997). A terceira linhagem, a linhagem B, surgiu unicamente na amostra de Pontevedra que foi incluída neste trabalho, e tinha sido já precisamente descrita para Espanha por Randi *et al.* (2000). A linhagem D foi encontrada pela primeira vez neste trabalho, e é claramente derivada da linhagem A, da qual se diferencia por apenas por uma mutação pontual (ver relatórios anteriores deste projecto). Esta linhagem mitocondrial foi detectada unicamente no indivíduo SMLM 25 de Mondim de Basto. A linhagem E, encontrada em diversas regiões da Europa (Roménia, Rússia, Grécia, Suécia, e outros países por Vilà *et al.*, 1997, 1999 e Randi *et al.*, 2000, entre outros) corresponde a um dos haplótipos descritos simultaneamente para lobo e cão. Esta linhagem foi encontrada unicamente na amostra SMLM 34 de Trancoso (amostra excluída do processo de análise para o DNA nuclear), e é de salientar que está também presente em raças portuguesas de cães de gado como sejam o Serra da Estrela, o Rafeiro do Alentejo e o Cão de Gado Transmontano (Ferrand *et al.*, não publicado). Finalmente, foi ainda encontrada a linhagem denominada F, que estava até muito recentemente descrita na literatura como exclusiva de cão. Inclusivamente, Randi *et al.* (2000) encontraram-na em supostos lobos originários da Bulgária e da Eslováquia e, interpretando a presença desta linhagem como um possível sinal de hibridação com cão, retiraram esses indivíduos da sua análise. Porém, recentemente, Pilot *et al.* (2006) voltaram a encontrar esta linhagem em lobos da Lituânia e da Rússia e incluíram-na como pertencente a lobo. Nos lobos portugueses, a linhagem F foi exclusivamente encontrada no indivíduo SMLM 37 de Vila Nova de Paiva, e foi também encontrada por Ferrand *et al.* (não publicado) em cães das raças Serra da Estrela e Cão de Gado Transmontano, e na análise deste indivíduo para o genoma nuclear não foi detectado qualquer sinal de hibridação. A presença das várias linhagens foi encontrada em frequências muito diferentes. Como já se salientou, as linhagens B, D, E e F foram observadas em apenas um indivíduo, enquanto as linhagens A e C apareceram com uma frequência de 76% e 16%, respectivamente. Os resultados da análise do mtDNA apresentam-se na Tabela 12 para todos os indivíduos possíveis, independentemente de alguns terem sido excluídos das análises com marcadores nucleares.

A distribuição geográfica dos haplótipos mitocondriais encontra-se representada na Figura 10, onde se pode observar que a linhagem A, a mais comum em Portugal (e também em Espanha), se encontra em toda a área de distribuição de lobo. A linhagem C, frequente em Espanha (Vilà *et al.*, 1997), parece encontrar-se em Portugal com uma distribuição muito estruturada, localizada

apenas na população do Nordeste, e em particular, nas regiões limítrofes com o território espanhol. Curiosamente, o lobo encontrado em Idanha-a-Nova é também portador desta linhagem C, sendo este mais um aspecto que associa esta amostra à população de Castilla y León/Nordeste Transmontano, tal como acontecia com a análise dos marcadores nucleares. Os restantes haplótipos que aparecem em frequências muito reduzidas (apenas num único indivíduo), surgem tanto a Norte (haplótipos B e D) como a Sul do rio Douro (haplótipos E e F).

Tabela 12. Haplótipos mitocondriais observados nas amostras de lobo. A nomenclatura apresentada foi atribuída pelo CIBIO (ver texto para comparação com a literatura).

Código SMLM	Linhagem mitocondrial	Código SMLM	Linhagem mitocondrial
02	C	SMLM 33	A
03	C	SMLM 34	E
65	C	SMLM 36	A
1sp	A	SMLM 37	F
2sp	B	SMLM 38	A
-	A	SMLM 39	A
SMLM 1	A	SMLM 40	A
SMLM 2	A	SMLM 41	A
SMLM 3	C	SMLM 42	A
SMLM 4	A	SMLM 43	A
SMLM 5	A	SMLM 44	A
SMLM 6	A	SMLM 45	A
SMLM 7	A	SMLM 46	C
SMLM 9	A	SMLM 47	C
SMLM 13	A	SMLM 48	A
SMLM 14	C	SMLM 51	A
SMLM 17	A	SMLM 52	A
SMLM 18	A	SMLM 53	A
SMLM 19	A	SMLM 54	A
SMLM 20	A	SMLM 57	A
SMLM 21	A	SMLM 58	A
SMLM 24	A	SMLM 59	A
SMLM 25	D	SMLM 62	A
SMLM 26	A	SMLM 66	A
SMLM 27	C	SMLM 70	A
SMLM 30	A	SMLM 71	A
SMLM 31	C	SMLM 73	A
SMLM 32	A		

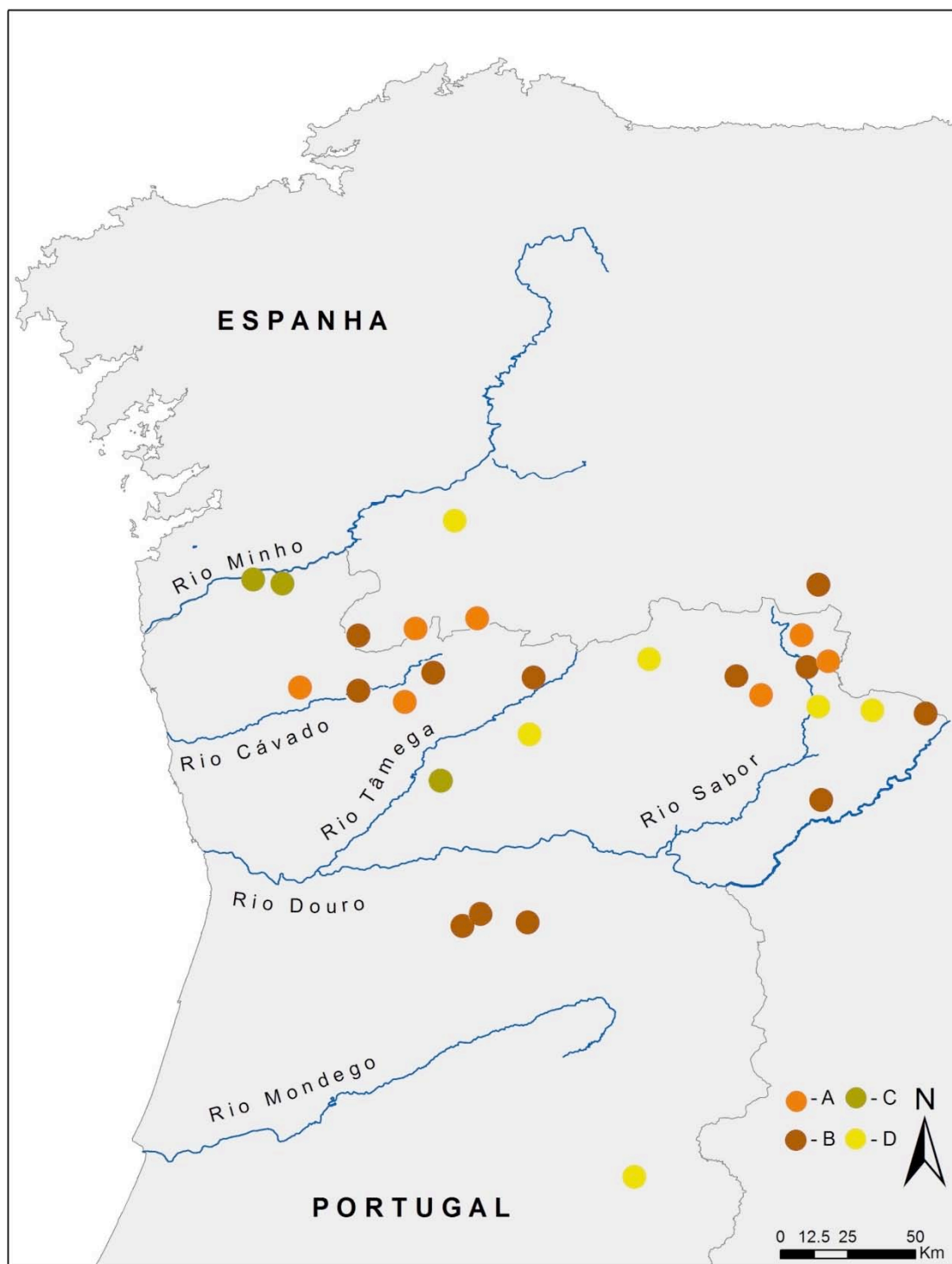


Figura 9. Distribuição geográfica das quatro linhagens ligadas ao cromossoma Y observadas nas populações de lobo.

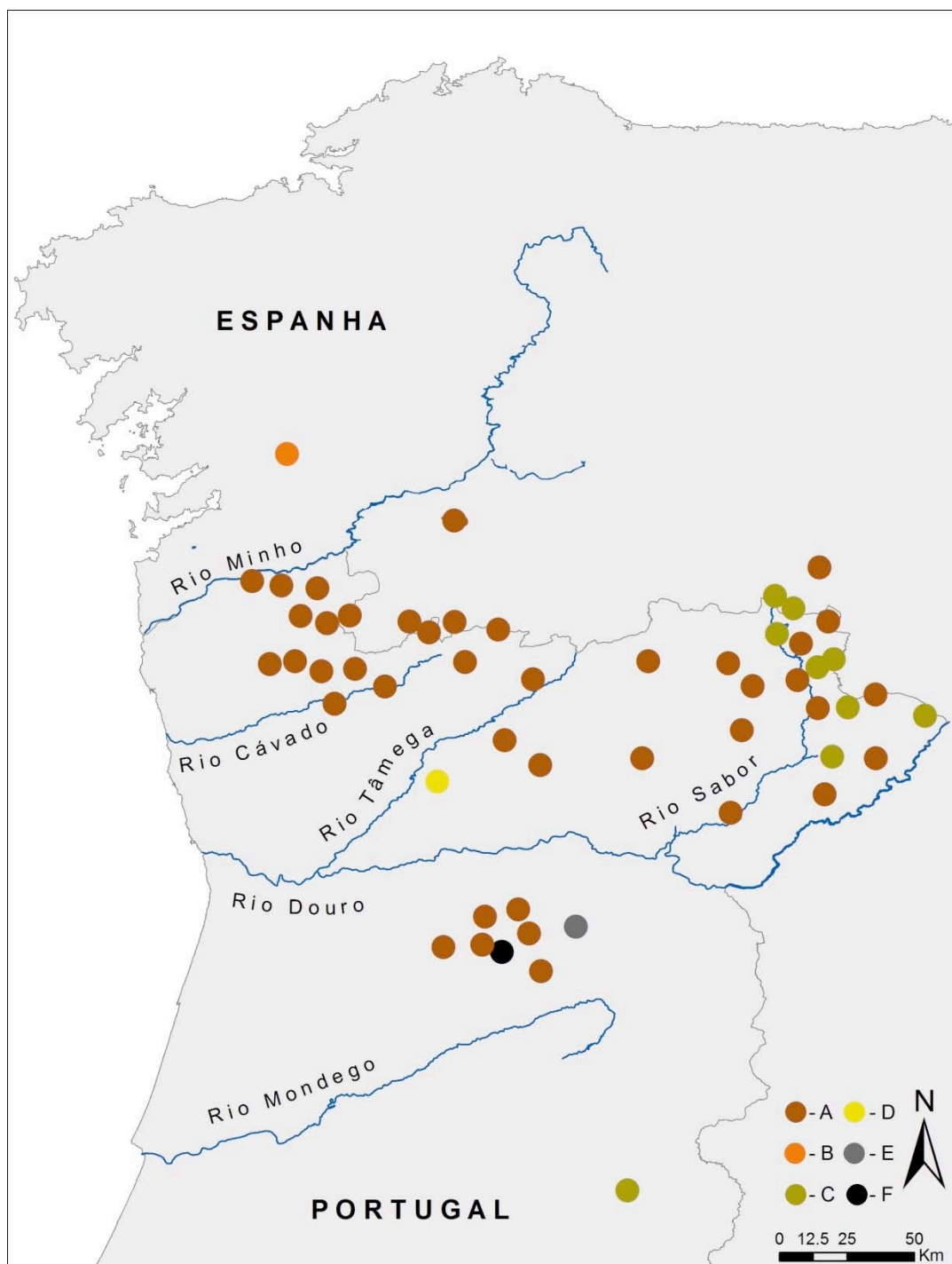


Figura 10. Distribuição geográfica dos seis haplótipos mitocondriais encontrados nas populações de lobo.

4. DISCUSSÃO

4. Discussão

O presente trabalho constitui a primeira evidência de que os lobos portugueses são geneticamente bem diferenciados dos cães, e podem ser classificados com confiança em grupos distintos quando se utiliza um número considerável de marcadores nucleares. A totalidade dos lobos amostrados em Portugal não exibiu qualquer evidência de hibridação com cão e a introgressão de genes domésticos nas populações selvagens é, aparentemente, inexistente.

O número de populações de uma espécie é um parâmetro muito importante para a sua conservação e, sobretudo, para a definição de possíveis unidades de gestão (Moritz 1994, mas ver também Paetkau, 1999). Embora a determinação das populações seja classicamente baseada na origem geográfica das amostras, a estrutura genética das populações nem sempre reflecte a proximidade genética dos indivíduos. Populações com distribuições aparentemente contínuas podem ser geneticamente discriminadas devido a barreiras ao fluxo génico não identificadas *a priori*. Adicionalmente, grupos de indivíduos com localizações geográficas distintas não são, necessariamente, diferenciados geneticamente. Nos últimos anos foram desenvolvidos métodos muito eficazes para delinear grupos de indivíduos baseados nos seus perfis genéticos individuais usando para isso métodos baseados em modelos e uma aproximação Bayesiana. Estes modelos procuram a presença do equilíbrio de Hardy-Weinberg (numa população mendeliana, e em determinadas condições, as frequências genotípicas são simplesmente determinadas pelas frequências alélicas) introduzindo uma componente de estruturação de populações, e tentam encontrar os agrupamentos de indivíduos que minimizem os desvios àquele equilíbrio (Pritchard *et al.* 2000). Estes métodos inferem a probabilidade posterior para cada número de populações (uma população, duas, três, etc), o que permite estimar o número mais provável de populações nos dados obtidos.

As populações de lobo não são verdadeiras populações mendelianas porque as regras na reprodução são estabelecidas a partir de hierarquias bem definidas, e não ao acaso. No entanto, muitos estudos têm mostrado que as populações estáveis de lobo se encontram em equilíbrio de Hardy-Weinberg (e.g. Carmichael *et al.* 2001; Aspi *et al.* 2006; Fabri *et al.* 2007; Vonholdt *et al.* 2008) o que sustenta a adequabilidade destes métodos. Neste trabalho foi encontrada evidência para a existência de quatro populações de lobo em Portugal, e embora seja recomendada a aplicação de bom senso nesta decisão pelos próprios autores do método (Pritchard *et al.* 2000), o

facto de outras análises neste trabalho terem sido consistentes com diferenciação genética elevada entre essas populações, levou-nos a aceitar este resultado.

A projecção geográfica das probabilidades de filiação de cada indivíduo às diferentes populações permitiu explicar, em primeiro lugar, e como esperado, que a Sul do Douro existe uma população lupina bastante diferenciada, mas que não está completamente isolada da população a Norte do Douro uma vez que foi detectada a presença de um indivíduo com ancestrais recentes migrantes do Norte. A Norte do Douro existem seguramente duas populações bem diferenciadas mas, mais provavelmente, existirão três populações que se distribuem i) por todo o Nordeste, ii) na região do Noroeste Minhoto e iii) na região do Noroeste Transmontano. A observação de duas populações no Noroeste é certamente o resultado menos esperado desta divisão, e uma vez que ele é fundamentado pelos índices F_{st} de diferenciação populacional, seria muito interessante conhecer as condições que permitiram a separação e isolamento dessas populações, as quais se incluem no que Pimenta *et al.* (2005) denominaram de Núcleo Populacional da Peneda/Gerês. A presença de duas populações de lobo geneticamente bem diferenciadas dentro do Parque Nacional da Peneda-Gerês implica uma extrema responsabilidade na gestão desta área, uma vez que a população lupina aí presente é detentora de um património genético muito importante. É ainda de salientar que a obtenção de dados genéticos inéditos para as populações de lobo na Galiza permitiu separá-las também das populações portuguesas (Godinho *et al.* não publicado), pelo que as populações presentes no Noroeste parecem ser, efectivamente, de dimensão reduzida.

A população do Nordeste (coincidente com o que Pimenta *et al.* (2005) designam por Núcleo Populacional de Bragança) apresentou os maiores valores de alguns parâmetros de diversidade, e isso estará certamente relacionado com o facto de esta população estar em contacto directo com a população espanhola de Castilla y León, formando uma grande população naquela região que se manteve menos permeável à deriva genética (Godinho *et al.*, dados não publicados). Com base nos resultados obtidos através da análise dos vários marcadores nucleares e mitocondriais, o lobo encontrado na região de Idanha-a-Nova é originário desta grande população, a qual tem sofrido uma recente expansão populacional em território espanhol. Na região central a Norte do Douro, que Pimenta *et al.* (2005) designam por Núcleo Populacional de Alvão/Padrela, a presença de lobo é assegurada por indivíduos que apresentam um genoma miscigenado entre as três populações do Norte. Este resultado, aparentemente inesperado uma vez que se conhecem alcateias estabelecidas nesta região, pode reflectir a presença de habitat sem capacidade de assegurar taxas de natalidade sustentáveis. Uma situação deste tipo, eventualmente gerada por ausência de recursos suficientes e/ou intensa perseguição ilegal, pode traduzir-se numa zona com elevada capacidade de recepção de migrantes das outras populações.

A diversidade genética dentro de uma população representa o seu reservatório de “combustível” que a permitirá evoluir e mudar em resposta a alterações das condições ambientais. Ou seja, se a persistência a longo termo de uma população é um objectivo, é da maior importância preservar a sua variabilidade genética. Os valores de diversidade genética encontrados para as populações de lobo em Portugal são semelhantes aos encontrados em outras populações isoladas na Europa, como Itália ($H_e=0,50$; Randi & Lucchini 2002) e Escandinávia ($H_e=0,55$; Vilà *et al.* 2003b), mas são inferiores aos geralmente descritos nas grandes populações contínuas de lobo, como o Noroeste da Rússia ($H_e=0,77$; Vilà *et al.* 2003b), o Norte dos Estados Unidos ($H_e=0,67$; Roy *et al.* 1994) ou o Noroeste do Canadá ($H_e=0,72$; Roy *et al.* 1994).

As perdas de diversidade genética a nível populacional resultam, essencialmente, de três fenómenos principais que são i) a ocorrência de *bottlenecks*, ii) a deriva genética, e iii) a consanguinidade (Hartl & Clark 2007). Como se sabe, as populações de lobo sofreram durante os últimos séculos uma enorme redução de efectivo, levando à extinção de muitas populações ou a casos extremos, como o da Escandinávia, onde a população ficou reduzida a dois indivíduos (Vilà *et al.* 2003b). Este tipo de situações, conhecidas como *bottlenecks*, reduzem a diversidade genética de uma população a níveis muito baixos, a partir dos quais é, depois, muito difícil recuperar. A situação em Portugal não é, obviamente, tão extrema, mas os valores encontrados de heterozigotia indicam que a diversidade das populações portuguesas é relativamente baixa quando comparada com as populações de grande efectivo. Neste contexto, não deixa de ser interessante referir que a população localizada a sul do rio Douro, que se sabe ser actualmente muito pequena (Pimenta *et al.* 2005), apresentou valores de diversidade genética próximos dos das restantes populações. A explicação mais plausível para esta observação poderá estar relacionada com uma diminuição muito rápida do efectivo populacional, eventualmente conduzindo à extinção regional do lobo, sem que tal se traduza numa apreciável diminuição da diversidade genética em virtude da falta de tempo para se poderem detectar os efeitos da deriva génica.

O lobo em Portugal está estruturado em quatro populações que exibem valores de diferenciação genética moderadamente elevados ($F_{st}=0,16$), e a maior parte da variação genética encontra-se no seio das populações. Os valores encontrados para a diferenciação populacional entre pares de populações são relativamente elevados ($0,106 < F_{st} < 0,274$). A observação de valores elevados de F_{st} entre as populações do Sul do Douro e do Noroeste Minhoto e as restantes está de acordo com o facto de estas populações serem as mais derivadas na árvore que relaciona as populações, e deverá ficar a dever-se à maior fixação de alelos devido, eventualmente, a maior deriva genética e à sua situação periférica. Tal como esperado, e também como tinha já sido observado quando se separaram os indivíduos nas várias populações, as populações do Noroeste parecem ser as que estão mais próximas geneticamente, de acordo com a interpretação possível da árvore de relações genéticas.

A importância do tamanho efectivo de uma população para os estudos de genética da conservação é facilmente compreendida através da equação que traduz a proporção de variabilidade genética que permanece numa população por geração ($1-1/2Ne$). É possível ver desta equação que se Ne é muito grande, a maior parte da variabilidade genética mantém-se em cada geração. Ao contrário, se Ne é muito pequeno, há uma proporção grande da variabilidade genética que é removida da população a cada geração, levando a uma diminuição da diversidade da população.

A estimativa encontrada para o tamanho efectivo da população a Norte do rio Douro (98 indivíduos) é, aproximadamente, 1/3 da estimativa do seu tamanho populacional encontrada no Censo Nacional 2002/2003 (Pimenta *et al.* 2005). Este valor de 98 indivíduos, corresponde, literalmente, a 49 casais (49 fêmeas + 49 machos que se reproduzem anualmente e que efectivamente contribuem com genes para a geração seguinte), o que poderá estar muito próximo do valor real para esta população, onde foram confirmadas 45 alcateias e se estima existirem um máximo de 54 alcateias. Assumindo que cada alcateia tem um casal reprodutor, esperaríamos ter um tamanho efectivo populacional de 90 a 108 lobos, valores que se aproximam muito da estimativa aqui apresentada para os intervalos de confiança do tamanho efectivo populacional a Norte do rio Douro.

O estudo das linhagens materna (mtDNA) e paterna (cromossoma Y) apresentou um padrão bastante similar entre as duas. Por um lado, a existência de linhagens ubíquas sem qualquer estruturação e que aparecem tanto a norte como a sul do rio Douro, por outro, a presença de linhagens que apresentam estruturação, pelo menos aparentemente, uma vez que o número de amostras é pequeno para a realização de inferências. Neste último caso, a estruturação foi detectada coincidentemente entre uma linhagem do cromossoma Y (Y_D) e uma linhagem do mtDNA (linhagem C), e embora estas linhagens não sejam exclusivas nesta região, a sua presença dá consistência à interpretação de uma população com um grau de diferenciação elevado. Também na região do Noroeste surgiu a linhagem Y_C do cromossoma Y que aparenta ter alguma concordância geográfica com a população do Noroeste Minhoto apesar de existir um indivíduo na região de Mondim de Basto que também apresenta este haplótipo. No entanto, o facto de este indivíduo (SMLM25), quando analisado para os *loci* nucleares, apresentar um genoma miscigenado entre as duas populações do Noroeste, dá-lhe suporte para ser originário da população de Noroeste Minhoto.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

5. Considerações Finais

Quando se iniciou o protocolo de colaboração entre o CIBIO e o ICNB no ano de 2005, praticamente nada era conhecido sobre a diversidade genética e a estruturação das populações de lobo em Portugal. Durante este triénio (2005-2007), o trabalho desenvolvido no âmbito do protocolo CIBIO/ICNB, e adicionalmente apoiado por fundos próprios do CIBIO, permitiu desenvolver investigação sobre a diversidade e estruturação das populações portuguesas de lobo utilizando um elevado número de marcadores moleculares, sem paralelo em estudos idênticos levados a cabo nesta espécie noutras regiões do globo. Por esta razão, a quantidade e qualidade das inferências obtidas foram apreciáveis e poderão vir a revelar-se determinantes na gestão e conservação de populações portuguesas de lobo. As principais conclusões obtidas descrevem-se sumariamente em seguida.

1. Em Portugal, é possível diferenciar geneticamente o lobo e o cão com um grau de confiança muito elevado.
2. As populações portuguesas de lobo não apresentam qualquer evidência de hibridação com cão.
3. O número mais provável de populações geneticamente distintas de lobo em Portugal é quatro, estando geograficamente localizadas i) a Sul do rio Douro, ii) no Noroeste Transmontano, iii) no Noroeste Minhoto, e iv) no Nordeste.
4. Os valores de diversidade genética das quatro populações de lobo são próximos dos estimados para outras populações isoladas na Europa, mas inferiores aos descritos em populações de lobo grandes e estáveis.
5. A diferenciação interpopulacional encontrada é relativamente elevada, sendo as populações do Sul do Douro e do Noroeste Minhoto as que mais se diferenciam das restantes.

6. A população situada a Sul do rio Douro apresenta um elevado nível de diferenciação, mas aparenta não estar completamente isolada da população a Norte do Douro uma vez que foi detectada a presença de um indivíduo com ancestrais recentes migrantes do Norte, e a presença de um outro animal, fora da área de distribuição regular da espécie, possivelmente proveniente da população do Nordeste transmontano/Castilla y León.
7. A identificação de duas populações de lobo geneticamente bem diferenciadas no Noroeste de Portugal e, em particular, na região do Parque Nacional da Peneda-Gerês, é especialmente interessante e poderá ter importantes consequências nas estratégias de conservação da espécie.
8. As estimativas do tamanho efectivo de toda a população situada a Norte do rio Douro sugerem valores de cerca de 100 indivíduos. Este valor é consideravelmente inferior ao obtido no Censo Nacional (n=300) e realça a importância da utilização de métodos genéticos na estimativa do número de indivíduos que efectivamente se reproduz em cada geração.
9. As linhagens maternas e paternas estudadas, respectivamente, através do DNA mitocondrial e do cromossoma Y, apresentam alguma estruturação geográfica que, no entanto, está longe de fornecer o tipo e qualidade de informação obtido através da utilização de microsatélites autossómicos.

A obtenção destas conclusões, que se consideram muito relevantes para a conservação da espécie em Portugal, não obvia a continuação da necessária monitorização genética da espécie no país. A ausência de hibridação com cão é certamente um resultado muito animador do ponto de vista de conservação das populações portuguesas de lobo, mas é da maior importância prosseguir esta investigação, uma vez que a fragmentação das populações e os processos de contracção e expansão populacionais associados poderão proporcionar a ocorrência de hibridação, tal como acontece noutras populações europeias e, muito particularmente, em Espanha. Por outro lado, seria de todo o interesse garantir o aumento do número de amostras das populações situadas a sul do rio Douro e no Noroeste de forma a incrementar o poder das análises estatísticas. Uma vez que a recolha anual de animais mortos é reduzida, deverá ser considerada a possibilidade de recolha de amostras através de técnicas não invasivas (excrementos e pêlos), que são hoje muito utilizadas em estudos de monitorização de longo prazo.

Os resultados descritos neste Relatório Final e as condições de investigação actualmente existentes nos laboratórios do CIBIO permitem-nos, também, sugerir a sua aplicação futura na correcta identificação dos animais responsáveis pelos ataques a gado doméstico. Em Portugal, as indemnizações pagas por ataques de lobo alcançam valores muito consideráveis, reconhecendo-se, no entanto, que uma fracção significativa desses ataques poderá dever-se a cães assilvestrados. A aplicação dos marcadores moleculares desenvolvidos no âmbito deste trabalho poderá vir a revelar-se de extrema utilidade na distinção entre ataques de lobo e de cão. O eventual sucesso na aplicação desta metodologia inovadora poderia contribuir para diminuir consideravelmente os actuais encargos do ICN com o pagamento de prejuízos causados em gado doméstico.

6.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

6. Referências Bibliográficas

- Aspi J, Roininen E, Ruokonen M, Kojala I, Vilà C (2006). Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Molecular Ecology*, **15**, 1561–1576
- Avice JC (2004). *Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer Associates Inc., US, 2th edition
- Avice JC, Arnold J, Ball RM Jr, *et al.* (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, **18**, 489-522
- Bannasch DL, Bannasch MJ, Ryun JR, Famula TR & Pedersen N (2005). Y chromosome haplotype analysis in purebred dogs. *Mammalian Genome*, **16**, 273-280
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (1996-2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)
- Blanco JC, Reig S, Cuesta L (1992). Distribution, status and conservation problems of the wolf *Canis lupus* in Spain. *Biological Conservation*, **60**, 73-80
- Boitani L (2003). Wolf conservation and recovery. In *Wolves*, pp 317-340. (Eds Mech LD & Boitani L). University of Chicago Press, Chicago and London
- Carmichael LE, Nagy JA, Larter NC & Strobeck C (2001). Prey specialization may influence patterns of gene flow in wolves of the Canadian Northwest. *Molecular Ecology*, **10**, 2787-2798
- Cavalli-Sforza LL, Edwards AWF (1967). Phylogenetic analysis: Models and estimation procedures. *Evolution*, **32**, 550-570
- Delibes M (1990). Status and conservation needs of the wolf in the Council of Europe member States. *Nature and Environment Series*, **47**, 1-46

- Ellegren H (2004). Microsatellites: simple sequences with complex evolution. *Nature Genetics Reviews*, **5**, 435-445
- Fabri E, Miquel C, Lucchini V, et al. (2007). From the Apennines to the Alps: colonization genetics of the naturally expanding Italian wolf (*Canis lupus*) population. *Molecular Ecology*, **16**, 1661–1671
- Francisco LV, Langston AA, Mellersh CS, Neal CL, Ostrander EA (1996) A class of highly polymorphic tetranucleotide repeats for canine genetic mapping. *Mammalian Genome*, **7**, 359–362.
- Goudet J (1995) fstat: a computer program to test F-statistics. *Journal of Heredity*, **86**, 485–486
- Goudet J (2001) fstat: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from Goudet (1995)
- Guyon R, Lorentzen TD, Hitte C, Kim L, Cadieu E, et al. (2003). A 1-Mb resolution radiation hybrid map of the canine genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **100**, 5296-5301.
- Hartl DL, Clark AG (2007). Principles of Population Genetics. Sinauer and Associates, Sunderland, MA, 4th Edition
- Hedrick PW (2001). Conservation genetics: where are we now? *Trends in Ecology and Evolution*, **16**, 629-636
- Holmes NG, Dickens HF, Parker HL, Binns MM, Mellersh CS, et al. (1995). Eighteen canine microsatellites. *Animal Genetics*, **25**, 132–133.
- Holmes NG, Mellersh CS, Humphreys SJ, Binns MM, Holliman A, et al. (1993) Isolation and characterization of microsatellites from the canine genome. *Animal Genetics*, **24**, 289–292.
- Kerns JA, Newton J, Berryere TG, Rubin EM, Cheng J-F, Schmutz SM, Barsh GS (2004). Characterization of the dog Agouti gene and a nonagouti mutation in German Shepherd Dogs. *Mammalian Genome*, **15**, 798–808.
- Langella O (1999). Populations 1.2.28: a population genetic software. CNRS UPR9034. Available at <http://www.pge.cnrs-gif.fr/bioinfo/populations/index.php>.
- Llaneza L, Godinho R, Lopes S, Ferrand N (2005). Evidência de ocorrência de hibridação entre lobo (*Canis lupus*) e cão (*Canis familiaris*) no limite da distribuição NW das Astúrias (Espanha). Congresso Luso-Espanhol sobre o lobo ibérico (Castelo Branco, Portugal). Poster.

- Lucchini V, Fabbri E, Marucco F, Ricci S, Boitani L, Randi E (2002). Noninvasive molecular tracking of colonizing wolf (*Canis lupus*) packs in the western Italian Alps. *Molecular Ecology*, **11**, 857-868.
- Mariat D, Kessler JL, Vaiman D, Panthier JJ (1996). Polymorphism characterization of five canine microsatellites. *Animal Genetics*, **27**, 434-435.
- Mech LD (1970). *The wolf: the ecology and behaviour of an endangered species*. Natural History Press, N.Y. 1st Edition
- Mellersh CS, Langston AA, Acland GM, Fleming MA, Ray K, *et al.* (1997). A linkage map of the canine genome. *Genomics*, **46**, 326-336.
- Moritz C (1994). Defining 'evolutionary significant units' for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, **9**, 373-375
- Neff MW, Broman KW, Mellersh CS, Ray K, Acland GM, *et al.* (1999). A second-generation genetic linkage map of the domestic dog, *Canis familiaris*. *Genetics*, **151**, 803-820.
- Nei M (1972). Genetic distance between populations. *American Naturalist*, **106**, 283-291
- Nowak RM (1995). Another look at wolf taxonomy. In *Ecology and conservation of wolves in a changing world*, pp 375-398. (Eds Carbyn LN, Fritts SH & Seip DR). Canadian Circumpolar Institute, Edmonton
- Nowak RM, Federoff NE (2002). The systematic status of the Italian wolf. *Acta Theriologica*, **47**, 333-338
- Olivier M, Breen M, Binns MM, Lust G (1999). Localization and characterization of nucleotide sequences from the canine Y chromosome. *Chromosome Research*, **7**, 223-2332
- Ostrander EA, Sprague GF, Rine J. (1993). Identification and characterization of dinucleotide repeat (ca)n markers for genetic-mapping in dog. *Genomics*, **16**, 207-213.
- Paetkau D (1999). Using Genetics to Identify Intraspecific Conservation Units: a Critique of Current Methods. *Conservation Biology*, **13**, 1507-1509
- Pilot M, Jedrzejewski W, Branicki W, *et al.* (2006). Ecological factors influence population genetic structure of European grey wolves. *Molecular Ecology*, **15**, 4533-4553
- Petrucchi-Fonseca F (1990). O lobo (*Canis lupus signatus* Cabrera, 1907) em Portugal. Problemática da sua conservação. Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa para a obtenção do grau de Doutor, Lisboa, 392 pp

- Pimenta V, Barroso I, Alvares F, et al. (2005). *Situação populacional do lobo em Portugal: resultados do Censo Nacional 2002/2003*. Relatório Técnico. Instituto da Conservação da natureza / Grupo Lobo. Lisboa, 158 pp + Anexos
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, **155**, 945-959
- Randi E, Lucchini V, Christensen MF, et al. (2000). Mitochondrial DNA variability in Italian and East European wolves: detecting the consequences of small population size and hybridization. *Conservation Biology*, **14**, 464-473
- Randi E, Lucchini V (2002). Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. *Conservation Genetics*, **3**, 31-45
- Reed DH, Nicholas AC, Stratton GE (2007). Genetic stochasticity, mean fitness of individuals and population dynamics. *Animal Conservation*, **10**, 291-292
- Ridley M (2004). *Evolution*. Blackwell Science, Oxford. 3rd edition
- Roy MS, Geffen E, Smith D, Ostrander EA, Wayne RK (1994). Patterns of differentiation and hybridization in North American wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Molecular Biology and Evolution*, **11**, 553-570
- Saitou N, Nei M (1987). The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*, **4**, 406-425
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbour Press, New York
- Seddon JM (2005). Canid-specific primers for molecular sexing using tissue or non-invasive samples. *Conservation Genetics*, **6**, 147-149
- Shibuya H, Collins BK, Huang TH, Johnson GS (1994). A polymorphic (AGGAAT)_n tandem repeat in an intron of the canine von Willebrand factor gene. *Animal Genetics*, **25**, 122
- Stockwell CA, Hendry AP, Kinnison MT (2003) Contemporary evolution meets conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, **18**, 94-101
- Taberlet P & Waits LP (1998) Non-invasive genetic sampling. *Trends in Ecology and Evolution*, **13**, 26-27
- Thomas R, Holmes NG, Fischer PE, Dickens HF, Breen M, Sampson J, Binns MM (1997). Eight canine microsatellites. *Animal Genetics*, **28**, 153-154.

- Vilà C, Savolainen P, Maldonado JE, et al. (1997). Multiple and Ancient Origins of the Domestic Dog. *Science*, **276**, 1687-1689
- Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, et al. (1999). Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, **8**, 2089-2103
- Vilà C, Wayne RK (1999). Hybridization between wolves and dogs. *Conservation Biology*, **13**, 195-198
- Vilà C, Sundqvist A-K, Flagstad Ø, et al. (2003b) Rescue of a severely bottlenecked wolf (*Canis lupus*) population by a single immigrant. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, **270**, 91-97.
- Vilà C, Walker C, Sundqvist A-K, et al. (2003a). Combined use of maternal, paternal and bi-parental genetic markers for the identification of wolf-dog hybrids. *Heredity*, **90**, 17-24.
- Vonholdt BM, Stahler DR, Smith DW, Earl DA, Pollinger JP, Wayne RK (2008). The genealogy and genetic viability of reintroduced Yellowstone grey wolves. *Molecular Ecology*, **17**, 252-274.
- Waits, LP, Paetkau D (2005). New non-invasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, **69**, 1419-1433
- Wang J (2005). Estimation of effective population sizes from data on genetic markers. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, **360**, 1395-1409.
- Waples RS (2006). A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics*, **7**, 167-184.
- WaplesRS, Do C (2008) LDNe: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources*, **8**, 753-756.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.