

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CAMPUS DE JABOTICABAL

**RELAÇÕES ENTRE ESTRUTURA SÓCIO-ESPACIAL E
FLUXOS GÊNICOS EM UMA POPULAÇÃO DE MOUFLONS
MEDITERRÂNEOS (*Ovis gmelini*)**

Newton Tércio Netto

Orientador: Prof. Dr. **Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa**

**Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Câmpus
de Jaboticabal como parte das exigências para
obtenção do título de Doutor em Genética e
Melhoramento Animal**

JABOTICABAL – SÃO PAULO - BRASIL

Maio de 2011

Netto, Newton Tércio
T315r Relações entre estrutura sócio-espacial e fluxos gênicos em uma
população de mouflons mediterrâneos (*Ovis gmelini*) / Newton Tércio
Netto. -- Jaboticabal, 2011
v, 99 f.; il; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2011

Orientador: Mateus José Rodrigues Paranhos da Costa
Banca examinadora: Reinaldo Otávio A. Alves de Brito, José
Maurício Barbanti Duarte, Paulo Bahiense Ferraz Filho, Henrique
Nunes de Oliveira
Bibliografia

1. Filopatria. 2. Dispersão. 3. Sistemas de Acasalamento. I. Título.
II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.3:636.082

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação – Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

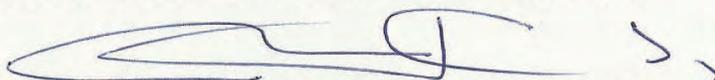
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: RELAÇÕES ENTRE ESTRUTURA SÓCIO-ESPACIAL E FLUXOS GÊNICOS EM UMA POPULAÇÃO DE MOUFLONS MEDITERRÂNEOS (*Ovis gmelini*)

AUTOR: NEWTON TÉRCIO NETTO

ORIENTADOR: Prof. Dr. MATEUS JOSE RODRIGUES PARANHOS DA COSTA

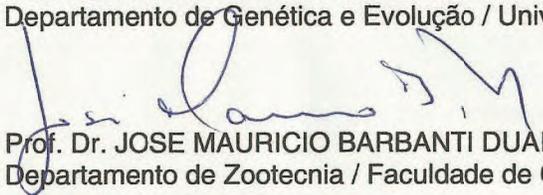
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL , pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. MATEUS JOSE RODRIGUES PARANHOS DA COSTA
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. REINALDO OTÁVIO ALVARENGA ALVES DE BRITO
Departamento de Genética e Evolução / Universidade Federal de São Carlos



Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. PAULO BAHIENSE FERRAZ FILHO
Departamento de Ciências Naturais / Universidade Federal de Mato Grosso do Sul / Tres Lagoas/MS



Prof. Dr. HENRIQUE NUNES DE OLIVEIRA
Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 23 de maio de 2011.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

NEWTON TÉRCIO NETTO – nascido aos 02 de julho de 1969, na cidade de São Paulo, SP, filho de Heidi Galli Netto e Newton Netto Segundo. Formado em Medicina Veterinária pela Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia – UNESP, Botucatu – SP em dezembro de 1992. Obteve o grau de Mestre em Psicologia: Teoria e Pesquisa do Comportamento pela Universidade Federal do Pará, em 2007, defendendo Dissertação intitulada Interações Sociais, Dimorfismo Comportamental e Segregação Sexual em Veado Campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*). Atuou junto à Secretaria de Estado de Meio Ambiente do Mato Grosso do Sul, como Médico Veterinário do CRAS (Centro de Reabilitação de Animais Silvestres) entre dezembro de 2001 e julho de 2004. Atua como Fiscal Federal Agropecuário do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento desde agosto de 2004 até o presente. Atualmente é também coordenador da Comissão Permanente de Saúde Ambiental do Conselho Regional de Medicina Veterinária do Mato Grosso do Sul – CRMV-MS.

*"Os fatos não são fragmentos de
informação puros e imaculados"*

S. J. Gould

À Cláudia, que me acompanhou nessa empreitada

Aos filhos, Cauê e Mariuá

AGRADECIMENTOS

Incontáveis são as pessoas que contribuíram para a realização desse trabalho. Por esse motivo seria impossível incluir nominalmente todas elas. Mas é de extrema importância que todas se sintam aqui incluídas.

Ao CNPq, pela bolsa de Doutorado que permitiu a realização desse trabalho.

Ao IRGM - *Institut de Recherche sur les Grands Mammifères* (atualmente CEFS – *Comportement et Ecologie de La Faune Sauvage*), pela acolhida na França, oferecendo toda a infra-estrutura e logística necessárias para a realização da parte experimental desse estudo.

A Dominique Pépin, diretor do IRGM no período em que foram realizados os trabalhos de campo.

Ao Departamento de Genética Animal do INRA de Toulouse, onde foram realizados os procedimentos laboratoriais desse estudo.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, pela oportunidade de conclusão desse trabalho.

À Profa. Dra Lúcia Galvão de Albuquerque, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal.

Ao Prof. Dr. Mateus Paranhos da Costa, pela confiança em mim depositada e pela orientação.

A Stéphane Aulagnier e Marie-Line Maublanc, pela orientação dos trabalhos durante minha estadia na França.

A Nathalie Ianuccelli, pela dedicação e apoio durante os trabalhos no laboratório de Genética.

A Richard Bon, com quem, de certo modo, tudo começou.

Às estagiárias portuguesas Ana Borges e Ana Martins, pelo auxílio na coleta de dados a campo e, particularmente à Ana Martins, pelas aventuras vividas juntos nas Montanhas do Caroux.

A todos aqueles que coletaram e disponibilizaram dados sobre os mouflons do Caroux antes de mim, a grande maioria completamente anônimos para mim, mas nem por isso menos merecedores de meus agradecimentos.

Aos outros pesquisadores e técnicos do IRGM, pela acolhida, pelo apoio e pelas inúmeras contribuições dadas ao trabalho: Jeff, Bruno, Mark, Nathalie, Jean, Georges Gonzalez, Hélène, Eric e todos os outros.

Aos colegas pós-graduandos no IRGM: Cristophe (e Florence), Pierre-Cyril, Colete, Farah, Nicolas... que fizeram bem mais animados os momentos passados no IRGM (e não só nele).

Aos amigos, brasileiros ou não, da Brastoulouse, por tornar mais fácil e divertida a vida na França, favorecendo a integração de brasileiros à comunidade tolosana.

Aos vizinhos franceses (já um tanto brasileiros) muito mais que amigos Pierre e Marie-Jo.

Aos colegas pós-graduandos de Jaboticabal.

A todo o pessoal da Seção de Pós-Graduação da UNESP de Jaboticabal, mas especialmente a Rodrigo, Diego, Nina e Karina.

Aos colegas do ETCO, com quem tantas vezes dividi o espaço e troquei idéias:
Aline, Adriana, Claudia, Julia, Adriano, Daiana...

Ao Murilo e Henrique, e mais recentemente ao pessoal da República Tia Méri,
por me oferecerem mais que um teto em Jaboticabal.

Aos familiares, que por tantas vezes se viram privados da minha presença e que,
por tantas outras, foram obrigados a conviver com algum grau de mau-humor.

A todos aqueles que, diretamente ou indiretamente, deram sua colaboração, o
meu

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO	iv
SUMMARY	v
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	1
Comportamento Socio-espacial	1
Estrutura de populações	2
Dispersão e Filopatria	4
Sistemas de Acasalamento em ungulados selvagens	6
Estrutura Genética	9
Marcadores genéticos	9
Microsatélites	11
O Mouflon do caroux-Espinouse	12
Objetivos	14
MATERIAL E MÉTODOS	15
Local de estudo	15
A população de mouflons do Caroux-Espinouse	18
Capturas, coletas e monitoramento dos animais	20
TRATAMENTO DE DADOS	25
Comportamento espacial das fêmeas	25
Sobreposição entre os domínios:	25
Distância entre centros aritméticos:	26
Sobreposição entre localizações :	28
Comportamento espacial dos machos	28
Distribuição dos centros aritméticos:	29
Freqüentação das unidades de fêmeas:	29
Distribuição das localizações de diferentes anos:	31

ESTUDOS GENÉTICOS	31
Extração de ADN	31
Amplificação das seqüências microssatélites	32
Identificação dos alelos	33
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	34
Estruturação espacial da população	36
Atribuição de indivíduos a uma unidade de população	38
RESULTADOS	38
Comportamento espacial das fêmeas	38
Sobreposição entre os domínios	38
Distância entre centros aritméticos	40
Sobreposição entre localizações:	41
Comportamento espacial dos machos	41
Distribuição dos centros aritméticos	41
Freqüentação das unidades de fêmeas	45
Distribuição das localizações de diferentes anos:	48
ESTUDOS GENÉTICOS	51
Efetivo total da população	51
Polimorfismo e heterozigose	51
Equilíbrio de Hardy-Weinberg	51
Atribuição de mouflons às unidades espaciais	51
Estruturação espacial em três unidades	53
Heterozigose e Equilíbrio de Hardy-Weinberg	53
Comparações por pares de populações	55
Atribuição dos indivíduos a uma unidade de população	55
Estruturação espacial em quatro unidades	55
Heterozigose e Equilíbrio de Hardy-Weinberg	55
Comparação por pares de unidades de população	56
Correlação entre distâncias genéticas e espaciais:	57
Atribuição de indivíduos a uma unidade de população	57

DISCUSSÃO	58
Comportamento espacial das fêmeas	58
Comportamento espacial dos machos	61
Implicações Genéticas	64
CONCLUSÃO	67
REFERÊNCIAS	69
APÊNDICES	91
APÊNDICES A: Soluções utilizadas na extração de ADN a partir de sangue - Método de extração ao sal (NaCL 6M)	92
APÊNDICE B: Protocolo de amplificação de seqüências microsátélites por PCR	93
APÊNDICE C: Migração dos produtos da amplificação sobre gel de acrilamida	94

RELAÇÕES ENTRE ESTRUTURA SÓCIO-ESPACIAL E FLUXOS GÊNICOS EM UMA POPULAÇÃO DE MOUFLONS MEDITERRÂNEOS (*Ovis gmelini*)

RESUMO – Estudos recentes revelaram a estruturação de diversas populações de vertebrados a um nível local. Essa estruturação tem sido relacionada aos sistemas de acasalamento e padrões de filopatria-dispersão das espécies. Esse estudo objetivou estudar como a organização espacial contribui para a estruturação genética de uma população. Avaliamos os papéis da filopatria e da dispersão a partir do comportamento espacial e da estrutura genética de uma população de mouflons mediterrâneos. Localizações obtidas por radiotelemetria foram utilizadas para descrever o comportamento espacial de ambos os sexos durante o período reprodutivo. Fêmeas mostraram-se filopátricas e revelaram uma estruturação sócio-espacial em unidades de população. Parte dos machos manteve-se fiel ao domínio reprodutivo de um ano a outro, enquanto outros dispersaram para outro domínio. Domínios reprodutivos de machos não sobrepõem apenas uma unidade de fêmeas. Inferimos sobre os fluxos gênicos promovidos pelos machos que se deslocam entre as unidades, a partir do polimorfismo de microsátélites. O teste de Hardy-Weinberg sugeriu uma população em desequilíbrio. Os testes de diferenciação gênica e genotípica e o F_{ST} confirmaram a estruturação genética da população. Mas não houve perda de heterozigose a nível da população ou no interior das unidades. O comportamento individual dos animais aparece como um fator importante da estruturação genética da população. Fêmeas mostram-se fortemente filopátricas e a aleatoriedade dos acasalamentos parece assegurada por um sistema reprodutivo baseado na promiscuidade. O fluxo gênico é mantido pela dispersão de parte dos machos, mantendo a panmixia no interior das unidades.

Palavras-chave: Filopatria, dispersão, sistemas de acasalamento, estrutura genética

SOCIO-SPATIAL STRUCTURE AND GENE FLOW IN A MEDITERRANEAN MOUFLON SHEEP (*Ovis gmelini*) POPULATION

SUMMARY - Recent studies revealed the presence of fine-scale genetic structure in wild vertebrate populations. This structure has been related to breeding systems and specie's philopatry-dispersal pattern. The objective of this study was to examine how the spatial organization contributes to the genetic structure of a population. The role of philopatry and dispersion was evaluated from the spatial behaviour and genetic structure of a mouflon sheep population. Radio-tracking data was used to describe spatial behavior for both sexes during rut. Ewes were found to be partitioned in socio-spatial units o which they were faithful. Movements patterns of rams were much more variable: some males remain faithful to the breeding area from one year to another, while others dispersed to other domain. Male rutting range can overlap more than once unit. We can infer about the male gene flow promoted by moving between the units from the polymorphism of microsatellites. Hardy-Weinberg test suggested disequilibrium in population. Genic and genotypic differentiation tests and F_{ST} confirmed the genetic structure of population. But there was no loss of heterozigosys neither at the population level nor within the units. The individual behavior of animals appears an important factor of population genetic structuring. Females are strongly phylopatrics. Randomness of matings would be assured by a reproductive system based on promiscuity. The gene flow between units and panmixia inside the units are maintained by some dispersal males.

Key-words: Philopatry, dispersal, breeding systems, genetic structure

INTRODUÇÃO

Define-se população como sendo um grupo de indivíduos de uma mesma espécie que vive numa área geográfica suficientemente restrita para que qualquer um dentre eles tenha uma probabilidade equivalente de se reproduzir com qualquer outro do sexo oposto (HARTL 1988). Nos mamíferos, nem a dispersão, nem as relações sociais ocorrem de maneira aleatória, pelo contrário, elas respeitam uma "estrutura social", que pode mudar ou se manter segundo uma dinâmica social baseada em comportamentos inter-individuais (CROOK *et al.* 1976).

A população de mouflons do Caroux-Espinouse resulta de quatro introduções sucessivas (CUGNASSE & HOUSSIN 1993) e é, atualmente, uma das mais florescentes da França. Aspectos ecológicos e demográficos dessa população vêm sendo estudados desde 1974 e, mais recentemente, também aspectos comportamentais

Dados obtidos a partir da observação direta e da radiotelemetria de animais permitem estudar as relações sócio-espaciais entre os indivíduos de mesmo sexo e de sexos opostos. Marcadores genéticos constituem uma importante ferramenta para identificar indivíduos ou grupos ou para a gestão da diversidade genética intra ou inter-populações.

O presente trabalho procurou associar esses dois aspectos, descrevendo a organização sócio-espacial da população de Mouflons do maciço do Caroux-Espinouse e inferindo sobre os fluxos gênicos decorrentes dessa organização sócio-espacial.

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

COMPORTAMENTO SÓCIO-ESPACIAL

As preferências sociais de cada animal determinam seus movimentos, que por sua vez são responsáveis por diferenças sexuais na utilização espacial dos animais

(PÉREZ-BARBERÍA & YEARSLEY 2010). Os movimentos diários de um animal definem sua área de vida (COSSE, 2010). A análise do uso do espaço é fundamental para identificar sistemas sociais e de acasalamento em mamíferos. O grau de sobreposição entre domínios vitais de diferentes indivíduos pode oferecer informação indireta sobre as interações sociais (CLUTTON-BROCK 1989; CHAVERRI *et al.* 2007).

O uso do espaço pode ser abordado sob diferentes escalas espaço-temporais, que refletem os movimentos dos animais em diferentes etapas de sua história de vida. Análises dos deslocamentos diários podem identificar locais de alimentação e descanso, p. ex. Os padrões de utilização de espaço ao longo do ano contemplam as variações sazonais na utilização das diferentes paisagens. Por fim, o registro do uso do ambiente desde o nascimento até a morte do animal, incluindo as fases de dispersão e reprodução, consiste na área de vida (COSSE 2010).

ESTRUTURA DE POPULAÇÕES

Guilhem (2000) utilizou o termo "organização social" num sentido muito próximo ao da "estrutura social" definida por (CROOK *et al.* 1976): tamanho e composição de grupos sociais em classes de sexo e idade, bem como as relações sociais entre os indivíduos dentro de uma dimensão espacial. Podemos falar, então, de uma organização ou estrutura sócio-espacial. Foram descritos diferentes modos de organização sócio-espacial, indo de um sistema territorial, caracterizado por um mosaico de domínios, cada qual defendido por indivíduos isolados, até um vasto domínio ocupado por animais que formariam um único rebanho e passando por diversos sistemas intermediários, conforme a espécie estudada, a idade dos animais ou o período do ano (GUILHEM 2000).

Populações naturais são frequentemente subdivididas geograficamente em sub-populações mais ou menos isoladas conforme as barreiras espaciais ou comportamentais. Essas sub-populações podem se constituir de unidades de reprodução ou *demes*, cujo nível de diferenciação genética depende dos efetivos das sub-populações e das taxas de dispersão (HARTL 1988).

Essa diferenciação genética pode ser proveniente da deriva genética e/ou do acúmulo de mutações, mas também, particularmente no caso de metapopulações, da colonização de espaços livres por animais provenientes de sub-populações diferentes (WADE & MCCAULLEY 1988). Em cada caso, as sub-populações só atingem e mantém essa diferenciação em situações de baixo fluxo gênico (PARIETTI 1997).

Mutações também são fonte de nova variabilidade genética, provocando um rearranjo dos alelos existentes no interior e entre populações, alterando assim a frequência dos mesmos (LACY 1987). Mutações poderiam compensar os efeitos da deriva, mas não nas taxas de mutação normalmente observadas em qualquer população natural. Entretanto as mutações têm influência mais ampla e indireta sobre as frequências gênicas nas populações, pois são fontes originais de variação e fornecem alelos alternativos.

Na deriva genética, a amostragem ao acaso de genes que ocorre durante a transmissão de uma geração a outra, leva a flutuações aleatórias nas frequências alélicas, que ocorrem em populações finitas. Essas flutuações são maiores quanto mais reduzido o número de alelos transmitido a cada geração. Assim, a perda de variabilidade genética por deriva tende a ser bem maior nas pequenas populações do que nas grandes, nas quais seu efeito pode ser negligenciável (LACY 1987). A deriva genética pode ou não levar à fixação de um único alelo e, conseqüentemente, à homozigose naquele locus. Mas a fixação é muito mais propensa a ocorrer em populações muito pequenas do que em grandes populações reprodutivamente efetivas. Em pequenas populações reprodutivamente ativas, a deriva genética agirá em todos os *loci* representados por dois ou mais alelos, mas a direção e a magnitude do efeito podem ser diferentes em cada *locus*. Há que se considerar ainda que, em uma população, a fração reprodutivamente ativa pode ser muito menor do que o total de indivíduos, pois muitos não se reproduzem, podendo haver isolamento em unidades reprodutivas (*demes*). O fator acaso contribui apreciavelmente para a variabilidade em pequenas populações de organismos intercruzantes (GARDNER & SNUSTAD 1986).

O termo metapopulação foi proposto por Levins (1970), referindo-se a um conjunto de populações capazes de interagir entre si e com uma duração finita de vida

(HANSKI & GILPIN 1991). O conceito de metapopulação está estreitamente ligado ao processo de sucessão de populações, isto é, extinção e estabelecimento de uma nova população. Levins (1970 apud HANSKI & GILPIN 1991) fez a distinção entre a dinâmica de uma única população e aquela de um conjunto de populações locais.

DISPERSÃO E FILOPATRIA

A dispersão consiste no movimento de uma área de vida para outra e é um fenômeno potencialmente de grande importância para a demografia e a dinâmica evolutiva das populações (STENSETH & LIDICKER 1992).

A principal consequência genética da dispersão é que ela usualmente resulta em fluxo gênico (BARTON, 1987). Fluxo gênico tem sido definido como “movimento de genes com subsequente incorporação dentro de um novo conjunto de genes” (ENDLER 1977, GAINES & MCCLENAGHAN 1980).

É comum que a dispersão desempenhe uma função reprodutiva. A reprodução é um fator motivacional que pode claramente ser tanto proximal quanto último (LIDICKER & STENSETH 1992). Ela pode estar relacionada à aquisição precoce de maturação sexual, busca de parceiros sexuais disponíveis (tanto em quantidade como em qualidade) ou ainda aumentar as chances de sobrevivência da prole (LIDICKER & STENSETH 1992).

Um forte controle genético está implicado nas espécies em que a dispersão apresenta um forte viés sexual ou ocorrem particularmente em uma determinada idade ou estágio de desenvolvimento. Nesses casos, motivações proximais podem ser largamente intrínsecas, determinadas pelo sistema neuroendócrino. Devido ao viés sexual, tem sido sugerido que a redução dos acasalamentos consangüíneos estaria implicada nesse processo. Assim a dispersão e a filopatria desempenhariam também papéis fundamentais sobre a estruturação genética de uma população (SHIELDS 1987), alimentando a hipótese clássica que prevê uma baixa variabilidade genética no interior das unidades de população, com uma divergência genética entre essas diferentes unidades (CHESSER 1991).

O termo filopatria é usado quando um indivíduo ocupa de forma permanente uma área correspondente ao seu local de nascença ou arredores (WASER & JONES 1983, HALPIN 1987), de forma a permitir a interação entre os pais e seus descendentes adultos (SHIELDS 1987). A dispersão natal caracteriza-se pelo movimento de um indivíduo em sentido único, sem direção pré-determinada, para fora de seu domínio ou grupo de nascimento (SHIELDS 1987, BARTON 1992, MCSHEA & MADISON 1992, SINCLAIR 1992, STENSETH & LIDICKER 1992). A dispersão se diferencia da migração ou de pequenas excursões pelo seu caráter permanente (BARTON 1992, STENSETH & LIDICKER 1992).

Nos mamíferos poligínicos, a filopatria é geralmente atribuída somente às fêmeas, enquanto a dispersão natal seria mais freqüente para os machos (GREENWOOD 1980; CLUTTON-BROCK *et al.* 1982, BUNNEL & HARESTAD 1983, NELSON & MECH 1984, FESTA-BIANCHET 1986 a, b, CEDERLUND *et al.* 1987, CEDERLUND & SAND 1992, HÖLZENBEIN & MARCHINGTON 1992, DUBOIS *et al.* 1993, 1994a). Entretanto, os ungulados freqüentemente mostram um forte apego ao seu domínio vital (JARMAN 1970), especialmente pela área onde tenham sido criados (CHESSER & RYMAN 1986) e são particularmente fiéis à área onde se reproduzem (DUBOIS *et al.* 1993).

A poliginia poderia assim favorecer a dispersão dos machos graças à exclusão dos jovens machos, que dispersariam a fim de aumentar suas chances de acesso aos recursos e, conseqüentemente, suas chances de acasalamento. Por outro lado, a filopatria das fêmeas reforçaria a cooperação entre indivíduos aparentados no interior de grupos ou unidades sociais (SHIELDS 1987, COCKBURN 1992, LINNELL *et al.* 1998).

O parentesco entre as fêmeas de uma mesma unidade de população seria suficiente para explicar as divergências genéticas consecutivas à subdivisão (CHESSER 1991). O aumento da consangüinidade dentro dos grupos sociais seria compensado pela imigração de um macho reprodutor, que resultaria em um aumento da heterozigose dentro dos grupos sociais. Assim, a dispersão de jovens machos permitiria que se evitasse a consangüinidade, que teria conseqüências desfavoráveis

para as populações tais como a depressão consangüínea (CLUTTON-BROCK *et al.* 1982). Por outro lado, a filopatria das fêmeas permitiria manter um nível adaptativo de consangüinidade ou reduzir os custos decorrentes da exogamia (SHIELDS 1987, WOOLARD & HARRIS 1990).

SISTEMAS DE ACASALAMENTO EM UNGULADOS SELVAGENS

A organização social de certas espécies, especialmente seus sistemas de acasalamento, contribui fortemente ao estabelecimento e à manutenção da estrutura genética das populações, mesmo na ausência de barreiras geográficas (SHIELDS 1987, MATHEWS & PORTER 1993).

Os sistemas de acasalamento dos mamíferos podem caracterizar-se pela monogamia, quando um mesmo macho se acasala com uma mesma fêmea, e apenas com ela, por diversas vezes; pela poliginia, quando um mesmo macho se acasala com diversas fêmeas pertencentes a um mesmo grupo; ou pela promiscuidade, quando um macho se acasala com qualquer fêmea que esteja receptiva, sem qualquer tipo de laço mais durável após a cópula. Esses sistemas estão associados a quatro tipos de defesa de recursos: a defesa individual de fêmeas enquanto elas são receptivas; a defesa de um território contendo recursos alimentares que se sobreponha em parte ou completamente a domínios de fêmeas ou de grupos de fêmeas; a defesa de grupos de fêmeas durante a estação reprodutiva ou durante todo o ano, sem defesa de um território; ou a defesa de territórios reprodutivos, dispersos ou não, mas que contenham porções de domínios de fêmeas (CLUTTON-BROCK 1989).

Da parte das fêmeas, pode-se incluir a monogamia de longo prazo, i.e, com vínculos exclusivos, ou quase, com um só macho durante a maior parte da vida; a monogamia em série, quando as fêmeas se acasalam com um só macho por estação, mas podendo se acasalar com diversos machos durante toda a vida; a poliandria, quando se acasalam com um mesmo grupo de machos durante estações reprodutivas sucessivas; ou a promiscuidade, quando se acasalam com diferentes machos enquanto estejam reprodutivas (CLUTTON-BROCK 1989).

Cursos machos adultos apresentam intensa territorialidade, em ambiente de vegetação fechada e em condições de baixa densidade populacional. Eles excluem outros machos, mesmo os mais jovens, permitindo a presença apenas de fêmeas. Esses machos mostram-se muito fiéis a seus territórios de um ano a outro e, se a densidade é baixa, as distâncias de dispersão são reduzidas, tanto para os machos como para as fêmeas (MAUBLANC *et al.* 1991, PRIOR 1995, HARTL *et al.* 1998; HEWISON *et al.* 1998, LIBERG *et al.* 1998). A estabilidade territorial pode levar a uma estabilidade de relações macho-fêmea entre indivíduos espacialmente próximos, o que pode favorecer os cruzamentos entre indivíduos aparentados e a perda de variabilidade genética (HEWISON *et al.* 1998). O risco de cruzamentos consangüíneos seria minimizado pela ausência de sobreposição espacial entre irmãos (BIDEAU *et al.* 1987), além de certo grau de monogamia. Por outro lado, o curso dos campos ou das montanhas apresenta um territorialismo muito menos pronunciado, com territórios menos estáveis, acompanhado de um maior gregarismo (HARTL *et al.* 1998; HEWISON *et al.* 1998). Comparando a variabilidade genética de populações fortemente territoriais com aquela de populações menos estáveis, Kurt *et al.* (1993) encontraram uma tendência a valores de coeficiente de consangüinidade (F_{IS}) mais positivos para os primeiros, ainda que não tenham encontrado diferenças nem para a heterozigose média, nem para o polimorfismo.

Hirth (1977) também descreveu diferentes sistemas reprodutivos para o veado da cauda branca (*Odocoileus virginianus*), segundo o tipo de meio. Esse autor defende que é o tamanho das agregações de fêmeas que determina o sistema de acasalamento nos cervídeos. Entretanto, o tamanho dessas agregações seria largamente influenciado pelo tipo de habitat, particularmente no que diz respeito à cobertura vegetal. Os veados de cauda branca de áreas mais florestadas são bem menos gregários e têm um sistema de acasalamento baseado em casais. Já os animais de áreas de vegetação mais abertas formam aglomerações maiores e os machos adotam um comportamento reprodutivo que se assemelha ao de haréns. Nelson & Mech (1987) descreveram, para uma população de veados da cauda branca do Minnessota, uma divisão em subpopulações que constituem *demes*. As fêmeas utilizam uma área de vida no interior ou

muito próxima de seu domínio de nascimento e animais adultos de cada uma das sub-populações utilizam domínios que se recobrem muito pouco com domínios de indivíduos de sub-populações vizinhas. Estudos com outras espécies de cervídeos americanos também sugeriram a existência de unidades genéticas nas populações (MATHEWS & PORTER 1993). Em alces (*Alces alces*) também foi evidenciada uma estruturação genética de populações em uma escala geográfica menor que a prevista (CHESSER *et al.* 1982).

O Cervo Vermelho é um mamífero altamente poligínico, caracterizado pela filopatria das fêmeas e dispersão preferencial dos machos (CLUTTON-BROCK *et al.* 1982, PÉREZ-ESPONA *et al.* 2010). As fêmeas raramente dispersam e freqüentemente permanecem em sua área natal, formando grupos matrilineares de fêmeas aparentadas (CLUTTON-BROCK *et al.* 1982). Machos, ao contrário, permanecem nos grupos de fêmeas apenas até o estado juvenil, deixando sua área natal em busca de uma nova área de vida entre os 2 e 4 anos de idade (CLUTTON-BROCK *et al.* 1982; CLUTTON-BROCK & ALBON 1989). Estudos genéticos revelaram que o parentesco entre fêmeas foi significativamente mais alto que entre os machos a distâncias menores de 500 m, tornando-se ainda mais altos a distâncias menores de 100 m e declinando conforme a distância aumenta, enquanto o parentesco entre machos não desviou de zero num intervalo de 2 Km (NUSSEY *et al.* 2005).

As espécies do gênero *Ovis* são gregárias e organizam-se em diferentes “unidades de população”, constituídas de associações pouco estáveis entre indivíduos que têm domínios vitais sobrepostos (GEIST 1971, DUBOIS *et al.* 1993).

Observa-se uma segregação social entre os sexos que é mais evidente quanto maior a idade dos machos (GEIST 1971, BON & CAMPAN 1989, DUBOIS 1993). Essa segregação social pode estar acompanhada de uma segregação espacial, quando há diferenças na maneira como machos e fêmeas ocupam o espaço.

Observações de *bighorns* (*Ovis canadensis*) marcados (FESTA-BIANCHET 1986 b), assim como a radiotelemetria de mouflons (DUBOIS *et al.* 1993) sugeriram que a maior parte dos machos seria fiel ao seu local de nascimento durante o período reprodutivo, podendo reproduzir-se, quando não impedidos por outros congêneres,

como sugerido por Bideau *et al.* (1993) para o corso (*Capreolus capreolus*). Então, a “dispersão natal” dos machos não seria mais do que uma migração sazonal que poderia estar diretamente relacionada a uma segregação espacial entre os sexos. Essa segregação é um processo que se intensifica com a idade e não corresponderia a um fenômeno para evitar a consangüinidade ou favorecer a exogamia.

Assim, pode-se levantar a hipótese de que não apenas as fêmeas, mas também os machos seriam fundamentalmente filopátricos (DUBOIS *et al.* 1993, PETIT 1994). Essa filopatria levaria a um aumento da consangüinidade, com um nível de heterozigose mais baixo que o esperado pelo modelo de Hardy-Weinberg no interior de cada uma das unidades sócio-espaciais, uma vez que, provavelmente, um número muito reduzido de machos realiza a maior parte dos cruzamentos (CHESSER 1991), sendo esperado ainda que a filopatria dos dois sexos leve a uma deriva genética entre as unidades sócio-espaciais.

ESTRUTURA GENÉTICA

A distância genética entre populações pode se basear nas informações obtidas a partir das freqüências alélicas de diferentes *loci*. Distribuições alélicas muito diferentes, por deriva, seleção e/ou mutação, indicam um distanciamento genético entre as populações (BOICHARD *et al.* 1998). Pode-se assim reconstituir a história de migrações passadas e as relações entre sub-populações de uma mesma espécie (HARTL 1988, BONHOMME *et al.* 1995).

O polimorfismo genético pode ser muito útil nos estudos sobre as relações entre sub-populações de uma mesma espécie. O princípio é que os alelos sejam partilhados pelas sub-populações graças à migração e a similaridade das freqüências alélicas possa ser utilizada para se estimar as taxas de migração (HARTL 1988).

Marcadores Genéticos

O estudo da Genética de Populações progrediu muito com o desenvolvimento dos marcadores moleculares (HARTL, 1988, BONHOMME *et al.* 1995, HEWISON *et al.*

1996). A informação genética é armazenada dentro de cada célula sob a forma de longas moléculas de ácido desoxirribonucléico (ADN), que constitui o genoma. Os marcadores genéticos são fragmentos de ADN que servem para identificar a transmissão de um segmento de cromossomo de uma geração a outra (BOICHARD *et al.* 1998). Na verdade, as macromoléculas que constituem o genoma se diferenciam sob os efeitos de mutações e de recombinações, o que leva a uma variabilidade ou polimorfismo que evolui sob os efeitos de fenômenos estocásticos, de movimentos de indivíduos dentro da população (migração/dispersão) e da seleção natural, quando essas modificações influenciam a vida ou a reprodução dos indivíduos que as portam (BONHOMME *et al.* 1995, BOICHARD *et al.* 1998).

O polimorfismo genético nos permite conhecer a origem genética do *locus* em questão, seja a nível individual, seja a nível de populações. Ele pode ser utilizado para identificar indivíduos ou grupos ou para a gestão da diversidade genética intra ou interpopulações. O controle de filiação é uma das aplicações mais antigas dos marcadores genéticos (BOICHARD *et al.* 1998). O acúmulo de mutações em uma linhagem molecular pode caracterizar uma medida do tempo passado desde o surgimento dessa linhagem. A distância genética entre duas populações pode se basear nas informações reveladas pelas freqüências alélicas dos diferentes *loci*. Distribuições muito diferentes de alelos, seja por deriva, seleção ou mutação, indicam populações distantes (BOICHARD *et al.* 1998). Pode-se reconstituir assim laços de parentesco entre espécies ou entre populações de uma mesma espécie e assim retrazar a história de migrações passadas e as relações entre sub-populações de uma mesma espécie (HARTL *et al.* 1998, BONHOMME *et al.* 1995).

Existem diferentes tipos de marcadores genéticos. A análise dos grupos sanguíneos e a eletroforese de proteínas originaram os estudos sobre diferenciação genética. Com as descobertas sobre a estrutura do ADN, novas técnicas foram desenvolvidas e novos marcadores, tais como os RAPDs (ADN polimórfico amplificado aleatoriamente), os RFLPs (polimorfismo do tamanho do fragmento de restrição), os AFLPs (polimorfismo do tamanho de fragmentos amplificados), os minisatélites e,

sobretudo, os microssatélites foram descobertos (BONHOMME *et al.* 1995, BOICHARD *et al.* 1998, MUELLER & WOLFENBARGER 1999).

Microssatélites

São marcadores genéticos baseados sobre a reprodução em tandem de seqüências de ADN cujo motivo de base é muito curto, não ultrapassando os seis pares de bases (LITT & LUTY 1989, WEBER & MAY 1989, BRUFORD & WAYNE 1993, BOICHARD *et al.* 1998, COSSE 2010). Esses segmentos redundantes facilmente provocam erros de replicação, produzindo um polimorfismo do número de cópias apresentado pelos diferentes alelos. Esses alelos variam então pelo comprimento, permitindo que o polimorfismo seja detectado sobre um gel de eletroforese (BONHOMME *et al.* 1995, BOICHARD *et al.* 1998).

Os microssatélites são muito abundantes e distribuídos aleatoriamente nos genomas dos eucariotos (WEBER & MAY 1989; LUTY *et al.* 1990; MOORE *et al.* 1991; BRUFFORD & WAYNE 1993), o que nos permite dispor de um número elevado de marcadores não ligados geneticamente. Além disso, eles dispõem de uma combinação de características muito vantajosas em relação a outros marcadores, tornando-os muito interessantes para diferentes tipos de pesquisas. Os microssatélites são *loci* de alelos codominantes com transmissão mendeliana gerando um perfil muito fácil de interpretar, de uma ou duas bandas respectivamente para homozigotos e heterozigotos (EDWARDS *et al.* 1991; QUELLER *et al.* 1993). São, em geral, neutros face à seleção natural, pois entram muito raramente na composição de seqüências codantes (EDWARDS *et al.* 1991; QUELLER *et al.* 1993), o que possibilita a validação de certos cálculos tais como aqueles dos índices de Wright (NEI 1977; BONHOMME *et al.* 1995). Os microssatélites podem ainda ser muito polimórficos e, conseqüentemente, dar origem a elevadas taxas de heterozigose (HEWISON *et al.* 1996).

Finalmente, o pequeno comprimento de suas seqüências permite uma fácil amplificação dos microssatélites, graças à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR). A probabilidade de rompimento ao nível do microssatélites é também muito

baixa, permitindo a utilização, para a PCR, de ADN “degradado” ou em quantidades muito baixas (BRUFORD & WAYNE 1993; QUELLER *et al.* 1993).

Os microssatélites são geralmente bem conservados entre *taxa* próximos, notadamente entre os bóvidos, o que torna possível a utilização de 70 % a 80 % de *primers* identificados para o mapa genético bovino para outras espécies da mesma família (MOORE *et al.* 1991; KEMP *et al.* 1993, BARENDSE *et al.* 1994; PÉPIN *et al.* 1995; VAIMAN *et al.* 1994, ENGEL *et al.* 1996, KÜHN *et al.* 1996). Além disso, *loci* microssatélites já foram seqüenciados também para carneiros domésticos (e.g. BUCHANAN *et al.* 1993), incluindo o carneiro de Soay (BANCROFT *et al.* 1995).

Todas as vantagens aqui apresentadas fizeram dos microssatélites os marcadores genéticos de escolha para a realização desse estudo.

O Mouflon do Caroux-Epinouse

O Mouflon mediterrâneo (*Ovis gmelinii*) é um *Artiodactyla* da família dos Bovídeos. Foi introduzido na Europa continental a partir de populações naturais da Córsega e da Sardenha (CUGNASSE 1994). Uma terceira população natural existe na ilha de Chipre (PFEFFER 1967).

Para alguns autores, o mouflon teria contribuído para a origem do carneiro doméstico (PFEFFER 1967, KRAFT 1990). Outros autores defendem que essa espécie teria se originado do retorno ao estado selvagem (asselvajamento) de carneiros introduzidos nas ilhas do Mediterrâneo durante o período Neolítico, pouco tempo após sua domesticação (POPLIN 1979, VIGNE 1992). De qualquer maneira, o critério da fertilidade sugere uma proximidade genética muito importante entre o carneiro doméstico, as formas eurásianas do mouflon e o mouflon *Pachyceros* do Extremo-Oriente e da América do Norte (PFEFFER 1967). Quase todas as formas selvagens foram cruzadas com carneiros, diretamente ou por inseminação artificial, dando origem a híbridos fecundos em todos os casos (PFEFFER 1967, LAUVERGNE *et al.* 1977, NAITANA *et al.* 1990). Estudos baseados em marcadores genéticos também confirmaram essa proximidade entre o mouflon e o carneiro doméstico (LAUVERGNE *et al.* 1977, NGUYEN & BUNCH 1980, NAITANA *et al.* 1990). Poplin (1979) situa o

mouflon da Córsega entre os mouflons do Oriente Médio e Próximo e as raças domésticas modernas.

É um animal de porte médio, as fêmeas medem de 70 a 75 cm de altura (medida no garrote), e os machos de 75 a 80 cm; o peso varia de 30 a 40 Kg para as fêmeas e de 40 a 60 Kg para os machos (PFEFFER 1967; BON *et al.* 1991). A pelagem, de cor canela a chocolate escuro sobre o dorso e branca no ventre, é marcada, nos machos, por uma sela branca e um jabô negro durante o inverno. Os machos possuem cornos que crescem ao longo dos anos, podendo atingir 75 cm, enrolando-se sobre eles próprios atrás da cabeça. Algumas fêmeas também possuem cornos, mas eles são mais finos e muito mais curtos que os dos machos, não ultrapassando 18 cm (Figura 1). A proporção de fêmeas com cornos varia conforme a população (PFEFFER 1967).



Figura 1. Foto de um mouflon macho, à esquerda, e, na foto, à direita, uma fêmea (no nível mais baixo e à esquerda na foto) e um macho de mouflon (à direita e mais alto na foto).

O mouflon é um pequeno ruminante de regime alimentar eclético, com predominância de gramíneas, o que faz dele uma espécie muito adaptável (FALIU *et al.* 1990, CRANSAC *et al.* 1997). Procura meios de relevo moderado, com grandes espaços abertos, ou menos acidentados, de solo cascalhado e bem drenado. É indiferente à altitude, a não ser pela presença de um manto de neve invernal, que não deve ultrapassar os 30 cm de profundidade (PFEFFER 1967, CORTI *et al.* 1993).

É uma espécie social, que vive normalmente em grupos de composição variável (PFEFFER 1967), que apresenta segregação espacial e social entre os sexos fora do período reprodutivo (PFEFFER 1967, PFEFFER & GENEST 1969, BON & CAMPAN 1989, BON 1991).

O período reprodutivo se dá durante o outono, entre meados de outubro e meados de dezembro, com pico no início de novembro, conduzindo, após uma gestação de cinco meses, a um período de nascimentos que vai de março a maio, com pico no início de abril. Cada fêmea tem apenas um filhote, sendo os partos gemelares extremamente raros (PFEFFER 1967, CUGNASSE *et al.* 1985, BON *et al.* 1991). Machos de um ano e meio já apresentam uma espermatogênese suficiente para fecundar uma fêmea, mas é apenas aos dois anos e meio que ela vai estar idêntica à dos machos mais velhos (PFEFFER 1967). A participação dos machos na reprodução depende sobretudo da competição entre eles. O primeiro estro das fêmeas ocorre geralmente a um ano e meio de idade e a primeira parição aos dois anos de idade (PFEFFER 1967, CUGNASSE *et al.* 1985).

OBJETIVOS

Dar continuidade aos estudos realizados desde 1993 (PETIT 1994, PETIT *et al.* 1997 a, b, PARIETTI 1997), para melhor caracterizar a estrutura espacial da população de mouflons do Caroux-Espinouse e sua influência sobre a estrutura genética da população, testando as seguintes hipóteses:

1. A população em questão divide-se em unidades espaciais distintas. Essas unidades correspondem a unidades reprodutivas, já que machos e fêmeas apresentam filopatria aos seus domínios reprodutivos, tendo-se em conta as seguintes predições: a) é possível colocar em evidência a existência de unidades espaciais a partir da observação das relações espaciais entre fêmeas e b) os machos, mas não as fêmeas, deixam essas unidades espaciais ao fim do período de acasalamento.
2. As fêmeas, e também os machos, utilizam sempre o mesmo domínio reprodutivo.
3. As diferentes unidades espaciais são também geneticamente diferentes.
4. As unidades espaciais diferem geneticamente, segundo um gradiente de distanciamento geográfico, sugerindo uma dispersão por contigüidade espacial e um fluxo gênico maior entre unidades vizinhas, considerando-se as seguintes predições: a) as diferenças genéticas são maiores entre unidades distantes, b) existe uma correlação positiva entre a distância espacial e a distância genética das unidades.

MATERIAL E MÉTODOS

Local de Estudo

O Maciço do Caroux-Espinouse situa-se na extremidade sul do Maciço Central (43° 38' N, 2° 58' E), que pertence ao Maciço de Agoût e faz parte dos maciços agrupados sob o nome de Montanha Negra (*Montagne Noire*) (AUVRAY 1982, 1983). Fica localizado no Departamento de Hérault (34), na região de Languedoc-Roussillon, Sudoeste da França (Figura 2). Cobre uma área de 20.000 ha, tem seu ponto culminante (*sommet de l'Espinouse*) a 1124 m acima do nível do mar e é entalhado por vales profundos, cujo fundo chega a 600m, orientados Norte-Sul ou Nordeste-Sudoeste, por vezes isolando unidades geográficas muito nítidas, tais como o Platô do Caroux (PFEFFER & GENEST 1969, AUVRAY 1982, 1983).

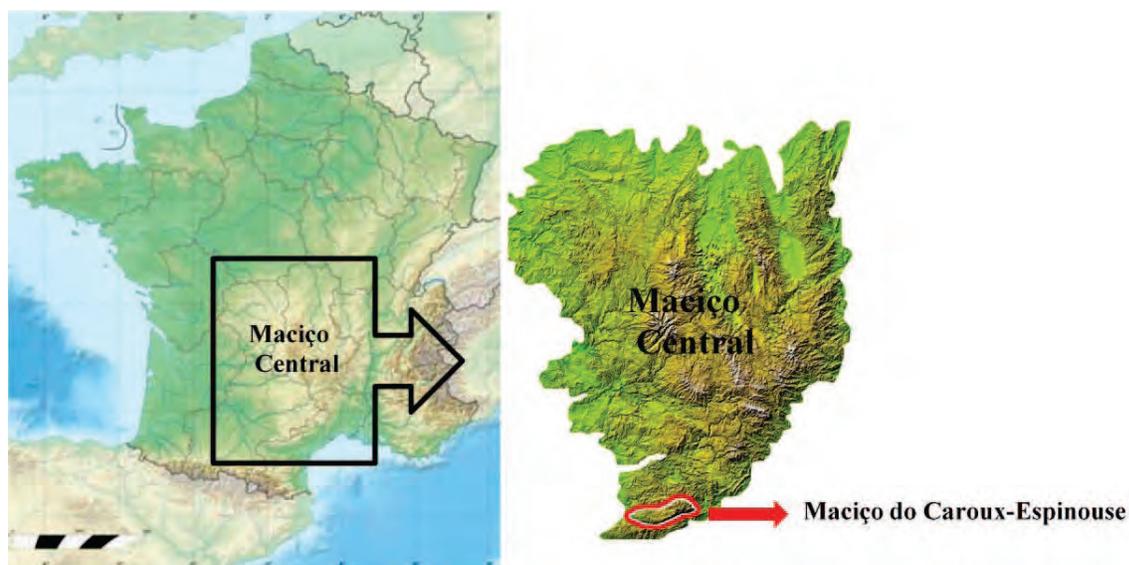


Figura 2. Localização Geográfica do Maciço do Caroux-Espinouse

Auvray (1982) distinguiu diferentes zonas topográficas, a saber: as grandes vertentes, áreas abruptas e recortadas, ao Norte e ao Sul, que são entalhadas por vertentes secundárias de 260m a 1000m de altitude; os platôs, acima dessas vertentes, a aproximadamente 1000m de altitude; os vales profundos, dos quais o maior é o Vale do Vialais, de eixo Norte-Sul; a zona de vales a leste, com inclinações mais leves, pequenos vales, menos acidentados que os anteriores e com diferentes exposições.

Graças à situação geográfica do maciço, no limite entre duas regiões climáticas, seu clima alterna-se entre um regime mediterrâneo, seco no verão (julho), e um regime oceânico de montanha. As temperaturas são bastante constantes entre um ano e outro, mas a pluviometria pode variar, segundo a predominância de uma ou de outra tendência (AUVRAY 1982). A neve cai, em geral, entre dezembro e abril. A cobertura de neve é variável conforme o ano, mas limita-se essencialmente aos platôs e, em geral, não persiste por muito tempo.

Influenciada por essa transição geográfica e climática, bem como pela topografia, a vegetação também revela grande diversidade, a qual também poderia condicionar a repartição dos animais, já que ela não se distribui de forma regular por toda a região (AUVRAY 1982). Os meios florestados dominam o Sul e, sobretudo, o Oeste. Na

vertente Norte, as taxas de cobertura vegetal são ainda elevadas, ainda que os ambientes sejam mais abertos, mas caem pela metade no Vale do Vialais e tornam-se muito baixas na porção leste da zona de estudo.

O Maciço do Caroux-Espinouse faz parte do Parque Natural Regional do Haute Languedoc e tem no seu interior a Reserva Nacional de Caça e de Fauna Selvagem, criada após a introdução dos mouflons (MASSOL 1991; CUGNASSE & HOUSSIN 1993). Essa reserva é centrada no Vale do Vialais e cobre 1784 ha e é gerida conjuntamente pelo Escritório Nacional de Caça e Fauna Selvagem (*Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage – ONCFS*), que se encarrega de estudar a fauna e a flora locais, e pelo Escritório Nacional de Florestas (*Office National de Forêts – ONF*), encarregado pela gestão propriamente dita da reserva. Ao redor da reserva somam-se ainda 114 ha de área tampão pertencentes ao ONCFS (Figura 3).

No exterior da reserva os mouflons são caçados entre os meses de Setembro a Fevereiro (CUGNASSE 1982). Além do impacto sobre o efetivo e a estrutura da população, essa caça pode ter impacto também sobre o comportamento espacial dos animais. Foi observada uma maior visibilidade dos animais no interior da reserva durante o período aberto à caça (MAUBLANC *et al.* 1992). Fora a caça, não há grandes predadores naturais para o mouflon no maciço, mas os cordeiros muito jovens podem sofrer ataques de raposas (*Vulpes vulpes*), águias (*Aquila chrysaetos*) e, principalmente, de cães domésticos (*Canis familiaris*).

O maciço é pouco povoado, mas o turismo é particularmente desenvolvido durante o verão (AUVRAY 1982). Os turistas afastam-se pouco dos caminhos e aparentemente não influenciam na repartição dos mouflons (MAUBLANC *et al.* 1992, MARTINETTO *et al.* 1998), apenas a presença de cães pode modificar o comportamento dos mouflons (MARTINETTO & CUGNASSE 1999). Durante o outono, além das perturbações provocadas pelas batidas de caça, o maciço é submetido a uma forte pressão de coleta de cogumelos, caracterizada, ao contrário do turismo de verão, pela penetração do maciço fora dos caminhos.

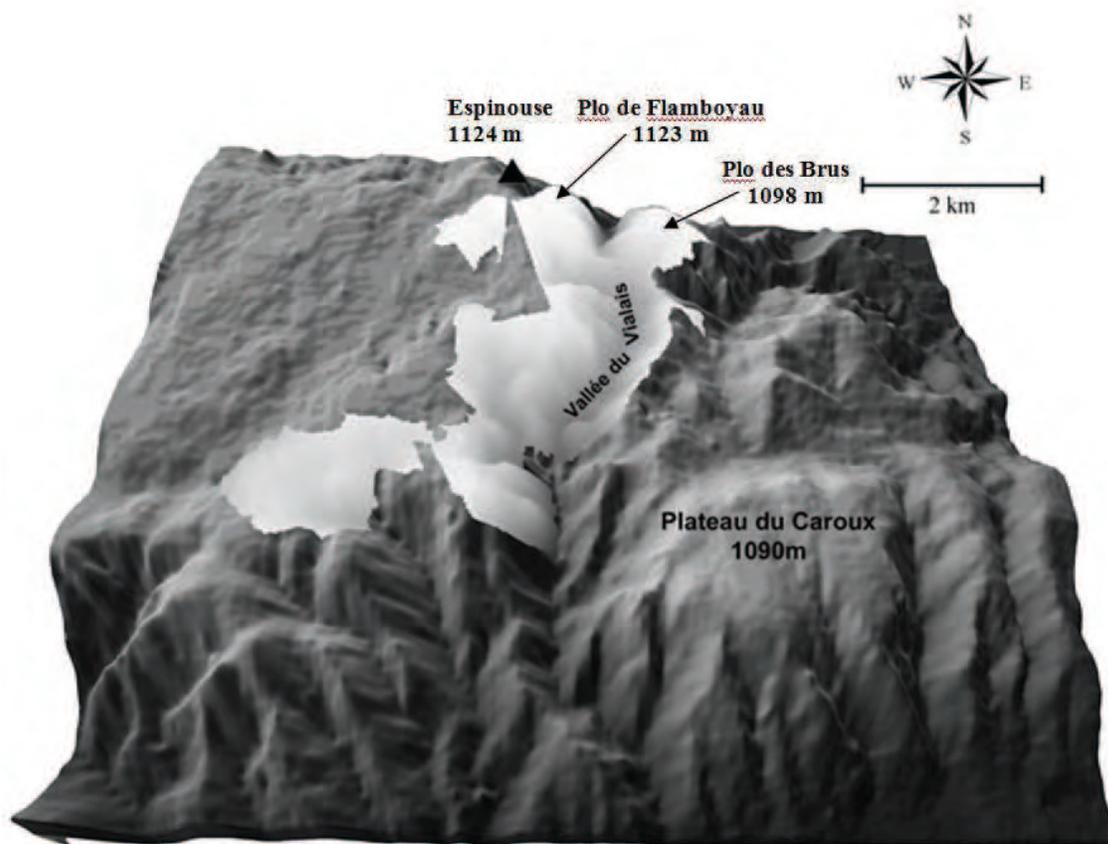


Figura 3. Representação tridimensional do Maciço do Caroux-Espinouse e da Reserva Nacional de Caça e Fauna Selvagem (zona mais clara). A superfície representada corresponde à área de extensão atual da população de mouflons (segundo GAREL 2006).

A população de Mouflons do Caroux-Espinouse

A população de mouflons do Caroux-Espinouse resulta de quatro introduções sucessivas (CUGNASSE & HOUSSIN 1993). A primeira data de 12 de março de 1956: duas fêmeas e dois machos, provenientes da população cativa de Cadarache. Aos 15 de fevereiro de 1959, realizou-se uma segunda soltura de dois machos e duas fêmeas, também provenientes de Cadarache. Duas outras introduções realizaram-se durante o ano de 1960: aos dois de março, três fêmeas e dois machos, originários da

Tchecoslováquia e, aos 23 de outubro, três fêmeas e três machos vindos da população cativa de Chambord (Figura 4).

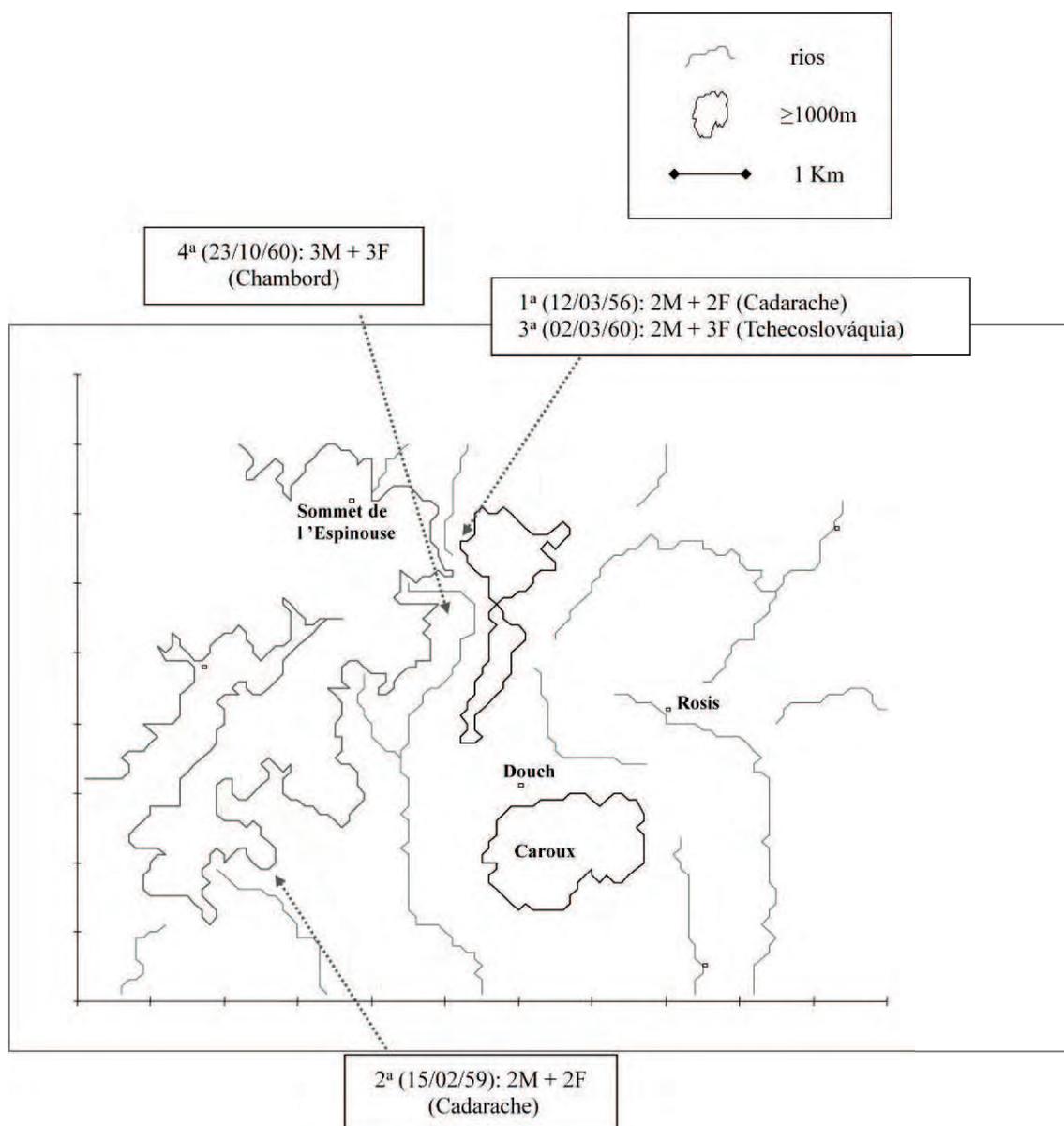


Figura 4. Introduções de mouflons na Reserva Nacional de Fauna do Caroux-Espinouse. As flechas indicam a localização aproximada das solturas. Os quadros mostram a data, o número de machos e de fêmeas e a origem dos animais soltos.

A população atual do maciço, que é uma das mais florescentes da França, com um total de mais de 2000 indivíduos em 1995 (HEWISON, comunicação pessoal) teve origem assim de um total de 19 mouflons e não se comunica com nenhuma outra população (CUGNASSE 1993). Estudos sobre essa população são realizados desde 1974 pelo ONCFS em colaboração com gestores locais e parceiros científicos tais como o IRGM-INRA, que desenvolveu estudos entre 1986 e 1998 (BOURGOIN 2008).

Um estudo baseado na radiotelemetria de 15 fêmeas colocou em evidência a existência de três unidades geográficas ao centro do maciço: Vialais, Mascar e Plos de Brus (posteriormente denominada Lauze) (MAUBLANC *et al.* 1994). A estabilidade dos domínios das fêmeas de um ano a outro e a fidelidade das fêmeas jovens ao domínio das mães fazem essas unidades espaciais estáveis no tempo (DUBOIS *et al.* 1994b).

A radiotelemetria e observação direta dos machos durante o período reprodutivo sugerem que eles seriam fiéis ao mesmo domínio de um ano a outro. Para os animais que foram marcados suficientemente jovens, verificou-se que esse domínio pode corresponder ao seu local de nascimento (DUBOIS *et al.* 1993, 1994a, b, DUBOIS *et al.* 1996).

A população de mouflons do Caroux seria então estruturada em unidades espaciais de fêmeas e os machos adultos freqüentariam, durante o período de acasalamento, sua própria unidade de nascimento. Dessa forma, essa população seria caracterizada pela filopatria dos dois sexos.

Capturas, coletas e monitoramento dos animais

As campanhas de captura de marcação dos animais são organizadas pelo Escritório Nacional da Caça (ONC) e ocorrem todos os anos entre os meses de junho a agosto. Os animais são capturados em armadilhas tipo jaulas (Figura 5), atraídos por pedras de sal (CUGNASSE & GARCIA 1982, CUGNASSE & HOUSSIN 1993). Essas armadilhas foram distribuídas na reserva conforme mostra a Figura 6.



Figura 5. Armadilhas utilizadas para a captura de mouflons no Maciço do Caroux-Espinouse.

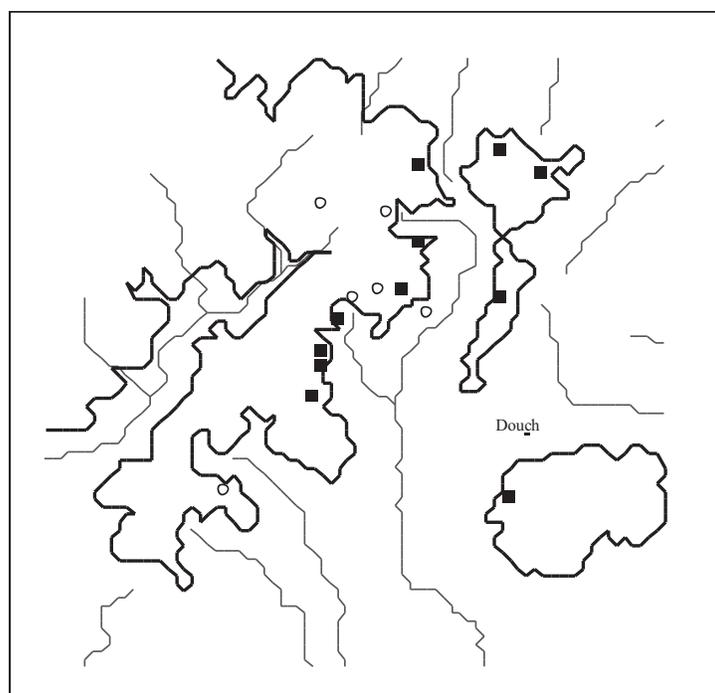


Figura 6. Distribuição das armadilhas para a captura de mouflons na área de estudo. ■ armadilhas que capturaram e ○ armadilhas que não capturaram fêmeas monitoradas por rádio-telemetria. O traço mais escuro indica a linha de 1000 m de altitude e os traços mais finos, os cursos d'água.

O pessoal da reserva realiza uma ronda diária, todos os dias pela manhã bem cedo, para verificar as armadilhas e evitar que os animais capturados se machuquem contra as grades. Alguns animais são exportados, a fim de criar ou reforçar outras populações. Outros são soltos, equipados com colares que permitem a identificação à distância, a maior parte é identificada com caracteres alfa-numéricos que permitem a identificação visual a partir de observações realizadas com o auxílio de binóculos ou telescópios. Mas, desde 1987 uma parcela dos indivíduos capturados vem sendo equipada com rádio-colares, para um monitoramento por radiotelemetria. Esses colares também são codificados por cores, para permitir a identificação visual.

Objetivando estudar a estrutura genética da população, 323 mouflons capturados entre os anos de 1993 e 1998 foram submetidos a coleta de sangue (3,0 a 9,0 ml coletados da veia jugular), por guardas do ONC e estagiários veterinários. O sangue foi recolhido em EDTA, para evitar sua coagulação, e congelado a -18°C . A distribuição dessas coletas, conforme a classe de idade e sexo, bem como o ano de captura está descrita na Tabela 1.

As observações de mouflons foram feitas pelo pessoal e estagiários do IRGM (Instituto de Pesquisa sobre Grandes Mamíferos) e da OMC (Secretaria Nacional de Caça e da Fauna Selvagem), a partir de itinerários pré-estabelecidos. Além disso, toda observação ocasional de animais marcados foi anotada. As localizações por rádio-telemetria foram feitas pelo IRGM o mais regularmente possível, a partir de um veículo e com o auxílio de um receptor e de uma antena direcional de recepção. O sinal era obtido sucessivamente de pelo menos dois pontos de recepção distintos, de localização conhecida, no menor espaço de tempo possível. A direção do sinal era obtida com o auxílio de uma bússola, sendo a localização do animal determinada por triangulação (KENWARD 1987).

A radiotelemetria foi feita no período do meio do dia, quando a atividade dos mouflons é menor (BON *et al.* 1991), a fim de minimizar os erros provocados pelo deslocamento dos indivíduos entre duas tomadas sucessivas de sinal.

A precisão da radiotelemetria foi testada a partir da localização de transmissores colocados em seis pontos conhecidos, a partir de vários pontos de recepção (DUBOIS 1990; DUBOIS *et al.* 1994b). A distribuição do erro angular ficou compreendida em um

intervalo de 20° em 90 % dos casos, o que determina um polígono de erro de 15ha para uma distância de 500m entre o receptor e a fonte. Sendo as localizações dos animais plotadas em um mapa em escala 1:25.000, utilizando-se uma grade de 125m x 125m, esse erro teórico corresponde a aproximadamente nove quadrantes.

Tabela 1: Número de amostras de sangue coletadas por ano, sexo e classe de idade do animal.

Ano	Sexo	Classe de idade	Número de amostras	Ano	Sexo	Classe de idade	Número de amostras
1993	Machos	Cordeiros	15	1996	Machos	Cordeiros	16
		Juvenis	2			Juvenis	2
		Adultos	6			Adultos	7
	Fêmeas	Cordeiros	13		Fêmeas	Cordeiros	10
		Juvenis	2			Juvenis	3
		Adultos	4			Adultos	4
1994	Machos	Cordeiros	8	1997	Machos	Cordeiros	23
		Juvenis	6			Juvenis	1
		Adultos	22			Adultos	4
	Fêmeas	Cordeiros	7		Fêmeas	Cordeiros	17
		Juvenis	5			Juvenis	3
		Adultos	10			Adultos	5
1995	Machos	Cordeiros	15	1998	Machos	Cordeiros	22
		Juvenis	5			Juvenis	0
		Adultos	8			Adultos	5
	Fêmeas	Cordeiros	23		Fêmeas	Cordeiros	18
		Juvenis	3			Juvenis	1
		Adultos	14			Adultos	12
	indeterminados	indeterminados	2				

A probabilidade de localização do animal em cada um desses nove quadrantes foi estimada em 0,2 para o quadrante central (DUBOIS 1990; DUBOIS *et al.* 1994b), 0,11 para cada um dos quadrantes laterais e 0,06 para cada um dos quadrantes situados nos cantos (Figura 7). A probabilidade de presença no conjunto de nove

quadrantes totaliza 0,88, o que significa que ainda existe uma pequena probabilidade do animal encontrar-se fora do polígono de erro teórico.

Caracterizou-se a ocupação do espaço por um indivíduo a partir das probabilidades acumuladas de sua presença em cada um dos quadrantes (Figura 8). O valor acumulado de cada quadrante foi transformado em proporção em relação à soma das probabilidades de presença em todos os quadrantes ocupados pelo animal. Desta forma pode-se comparar a ocupação do espaço entre indivíduos dos quais se obteve números de localizações diferentes.

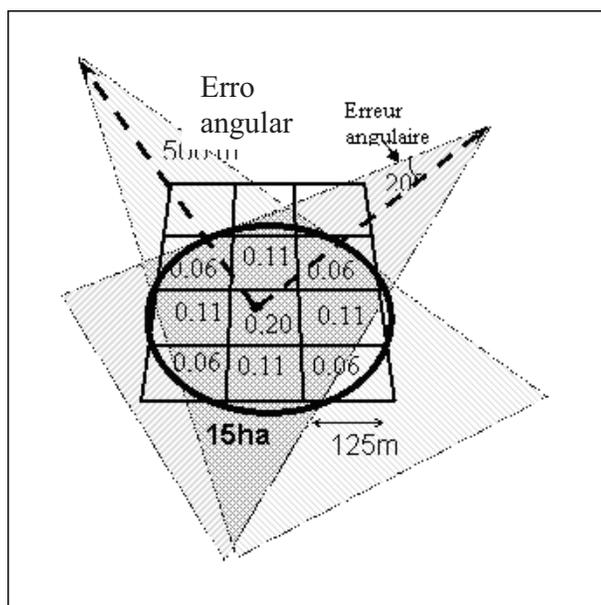


Figura 7. Representação do erro teórico relacionado à precisão da rádio-telemetria, segundo Dubois1990 e Dubois *et al.* 1994b.

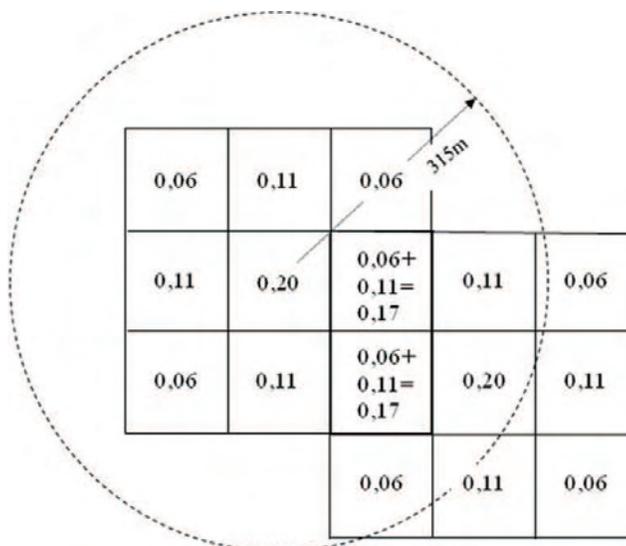


Figura 8. Cálculo das probabilidades de presença acumuladas para um indivíduo dentro de cada quadrante, utilizado para caracterizar sua ocupação do espaço. O raio pontilhado circular representa a distância máxima entre centros aritméticos para que um animal seja considerado geograficamente estável, segundo Dubois1990 e Dubois *et al.* 1994b.

TRATAMENTO DE DADOS

Comportamento espacial das fêmeas

As localizações obtidas por rádio-telemetria foram utilizadas para caracterizar o domínio de outono, que corresponde à estação reprodutiva, sendo considerados três diferentes parâmetros para avaliar as relações espaciais entre as fêmeas:

1. Sobreposição entre os domínios:

Os domínios individuais foram determinados pela técnica do Mínimo Polígono Convexo. Essa técnica produz, em geral, curvas mais lisas em relação a outros métodos (HARRIS *et al.* 1990). Esses autores propõem que se trabalhe com um número fixo de localizações, a partir do qual a maioria dos indivíduos apresentaria uma estabilização de seus domínios.

Para esse trabalho, foram traçadas curvas relacionando a superfície do domínio e o número de localizações, com o objetivo de se determinar o número de localizações a partir do qual a inclusão de novas localizações não provocou um aumento da área do domínio superior a 15%, o que indicaria uma estabilização. A partir dos resultados obtidos, decidiu-se trabalhar com um número fixo de 30 localizações para determinar os domínios outonais das fêmeas, o que nos permitiu obter domínios para 16 fêmeas. No caso de fêmeas terem sido localizadas mais de 30 vezes durante o outono, eram sorteadas aleatoriamente 30 localizações do total de localizações disponíveis.

O cálculo das taxas de sobreposição fez-se com o auxílio da seguinte fórmula:

$$R_{x,y} = \frac{S_x \cap S_y}{S_x + S_y - S_x \cap S_y},$$

onde: S_x et S_y são as áreas dos domínios x e y e $S_x \cap S_y$ corresponde à área comum aos dois domínios. As taxas de sobreposição espacial entre fêmeas duas a duas foram então utilizadas como medida de proximidade entre elas, numa classificação hierárquica ascendente por agrupamento dos vizinhos mais próximos, baseada em uma distância euclidiana (SPSS *software*).

2. Distância entre centros aritméticos:

Os centros aritméticos foram calculados a partir da média aritmética de todas as coordenadas x e y para cada fêmea. Ainda que esse parâmetro limite o domínio a apenas um ponto, ele pode ser muito interessante nos casos em que o número de localizações por animal e por estação seja muito reduzido (levando-se em conta que as fêmeas são bastante filopátricas).

A correlação entre as distâncias entre centros aritméticos e as taxas de sobreposição para os mesmos domínios foi testada utilizando-se um teste Z de Mantel (programa R Package® de Legendre & Vaudor 1991). Esse teste revelou uma forte correlação negativa ($Z=6175$, $p<0,001$, 8000 permutações) entre esses dois parâmetros, indicando que domínios que têm centros aritméticos mais próximos entre si também apresentam maior sobreposição. Para aqueles animais que não apresentam

nenhuma sobreposição de domínios, a distância entre os centros aritméticos acaba por melhor descrever a distribuição espacial dos indivíduos.

Com o objetivo de aumentar o número de localizações utilizáveis para cada fêmea, verificou-se a estabilidade espacial das fêmeas entre anos sucessivos (DUBOIS *et al* 1994a). A distância média entre centros aritméticos de outonos sucessivos foi de $409,1 \pm 10,8$ m para oito fêmeas localizadas, cada uma, entre 16 e 51 vezes por outono, o que confirma essa estabilidade.

Também foi calculado o número de localizações necessários para se obter uma boa estimativa do centro aritmético, realizando-se 1000 tiragens aleatórias de 10, 15 e 20 localizações para seis fêmeas localizadas, cada uma, entre 55 e 122 vezes. Cada centro obtido ao longo dessas 3000 tiragens foi comparado ao centro calculado a partir do total de localizações. O resultado foi considerado satisfatório quando o centro se situava num raio de 315 m ao redor do centro de referência. Esse valor foi determinado pelo fato de que um centro situado a até dois quadrantes de distância do centro de referência, em qualquer direção, tem obrigatoriamente um polígono de erro que se sobrepõe ao polígono de erro do centro de referência. Entretanto, essa distância de “dois quadrantes” não é a mesma em todas as direções, podendo variar de 250 a 353,55 m. Para facilitar os cálculos matemáticos foi adotado o valor aproximado de 315 m como raio (ver Figura 8). As proporções de centros aritméticos dentro desse raio foram de 88,1; 95,2 e 97,0 % respectivamente para 10, 15 e 20 localizações. Optou-se então por trabalhar com centros obtidos a partir de pelo menos 15 localizações, o que nos permitiu, agrupando-se as localizações de anos sucessivos, incluir 32 fêmeas nas análises.

Foram testados ainda, utilizando o teste do vizinho mais próximo (CLARKE & EVANS 1954), se a distribuição dos centros aritméticos das fêmeas poderia corresponder a uma distribuição aleatória. Esse teste compara a distância média observada entre os centros dos vizinhos mais próximos em uma dada densidade com a distância esperada para as mesmas condições de densidade. Para eliminar os efeitos de borda, a densidade foi calculada da seguinte maneira: calculou-se a superfície a partir de uma média entre a área do polígono delimitado pelos 32 centros aritméticos e

a área do polígono delimitado pelos 25 centros restantes quando se eliminam aqueles centros periféricos que delimitaram o primeiro polígono. A densidade foi então calculada dividindo-se 25 (que é o número de centros “interiores”) por essa média das superfícies.

A distribuição espacial das fêmeas foi analisada pela mesma técnica de classificação ascendente hierárquica por agrupamento dos vizinhos mais próximos baseada em uma distância euclidiana (SPSS *software*), tomando-se em conta as distâncias entre os centros aritméticos como medida de proximidade.

3. Sobreposição entre localizações :

Para as mesmas 32 fêmeas, localizadas entre 15 e 122 vezes cada, foram calculados índices de freqüentação de cada quadrante, dividindo-se a soma das probabilidades de presença da fêmea num quadrante, pela soma das probabilidades de presença da fêmea no conjunto dos quadrantes utilizados. Os valores foram então transformados em freqüências, permitindo que fossem comparados animais com diferentes números de localizações. Uma classificação hierárquica por agrupamento dos vizinhos mais próximos, baseada em uma distância do χ^2 (SPSS *software*) foi realizada para agrupar os indivíduos segundo seu perfil de utilização dos diferentes quadrantes da área utilizada pelo conjunto de fêmeas monitoradas.

Em todas as classificações, foram utilizadas as distâncias entre os ramos para determinar os agrupamentos de fêmeas.

Comportamento espacial dos machos

O comportamento espacial dos machos durante o período de acasalamentos também foi analisado a partir de diferentes parâmetros: os centros aritméticos dos domínios, as taxas de freqüentação das unidades de fêmeas e a distribuição das localizações de diferentes anos. Considerando-se que os machos não são tão estáveis quanto as fêmeas, cada período outonal foi considerado individualmente, permitindo-nos confirmar ou não essa instabilidade espacial.

1. Distribuição dos centros aritméticos:

Os centros aritméticos dos domínios de machos foram calculados da mesma maneira que os das fêmeas. O número de localizações obtido para o cálculo dos domínios foi pequeno, o que nos levou a calcular os centros aritméticos a partir de um mínimo de 10 localizações. A confiabilidade da posição dos centros aritméticos dos machos obtidos com 10 localizações também foi testada como para as fêmeas. A partir de 1000 tomadas aleatórias de 10 localizações para 10 domínios de machos (38 a 49 localizações cada um), obteve-se uma proporção de 76,2% dos centros situados a menos de 315 m do centro de referência. Foram considerados assim 58 centros aritméticos de 41 machos diferentes, identificando-se sobre qual(is) unidade(s) de fêmeas localizou-se cada um desses centros.

Para 13 machos, foram obtidos centros aritméticos correspondentes a diferentes anos (dois anos para Gan, Ker, Kin, Lut, Kuh, Mal, Yva, Son, Moz, Tar; três anos para Klu e Mar; quatro anos para Nin). Isso nos permitiu verificar se esses indivíduos apresentam uma possível fidelidade ao domínio reprodutivo ou, ao contrário, uma instabilidade espacial, baseando-nos nas distâncias aritméticas entre os centros dos domínios reprodutivos sucessivos de um mesmo macho.

2. Freqüentação das unidades de fêmeas:

A probabilidade de associação de um macho a uma fêmea pertencente a cada uma das unidades foi calculada multiplicando-se as proporções de freqüentação de cada quadrante pelo macho em questão pelas probabilidades de associação do mesmo quadrante a cada uma das unidades de fêmeas. A soma dos valores obtidos para cada unidade foi utilizada como indicativo da freqüentação dessas unidades pelo macho em questão. Esse cálculo foi repetido para cada estação reprodutiva, objetivando-se comparar os índices de associação de um mesmo macho às diferentes unidades ao longo de diferentes anos. Para os machos caracterizados por um único domínio reprodutivo procuramos verificar se eles se associam preferencialmente a uma só unidade de fêmeas ou se estão associados a duas ou mais unidades. Consideramos que um macho apresentou associação preferencial a uma unidade de fêmeas quando

sua taxa de freqüentação a essa unidade foi superior a 70 % e quando as taxas de freqüentação a qualquer outra unidade foram inferiores a 25 %.

Se as unidades de fêmeas não apresentassem nenhuma sobreposição entre si, a freqüentação de uma unidade i por um macho k poderia ser estimada simplesmente pela fórmula:

$$(1) \quad F_{i,k} = \sum_{x,y} p_{k,x,y} \cdot w_{i,x,y}$$

onde $p_{k,x,y}$ é a probabilidade estimada para um macho k estar num quadrante (x,y) , e $w_{i,x,y}$ é uma função cujo valor é igual a 1 quando a unidade i ocupa o quadrante (x,y) ou igual a zero em caso contrário. Nesse caso, e se a zona situada fora das unidades de fêmeas fosse tratada como uma unidade suplementar $n+1$, teríamos:

$$(2) \quad \sum_{i=1}^{i=n+1} F_{i,k} = 1$$

Entretanto as unidades de fêmeas se sobrepõem. Assim, para que a equação acima seja satisfeita, a função $w_{i,x,y}$ deve ser substituída na equação (1) por uma função $w'_{i,x,y}$ tal que em qualquer quadrante (x, y) :

$$(3) \quad \sum_{i=1}^{i=n+1} w'_{i,x,y} = 1$$

Para isso calculamos primeiramente a probabilidade $\pi_{i,x,y}$ da unidade i ocupar o quadrante (x, y) . Essa probabilidade corresponde à probabilidade média das fêmeas da unidade i serem encontradas no quadrante (x, y) . Além disso, continuamos a considerar a zona exterior às unidades de fêmeas como uma unidade suplementar e não

sobreposta, tendo $\pi_{n+1,x,y} = 0$ para cada quadrante incluído em pelo menos uma unidade de fêmeas e $\pi_{n+1,x,y} = 1$ para os quadrantes não incluídos em nenhuma das unidades de fêmeas. Dessa forma, a função $w'_{i,x,y}$ ficou definida assim:

$$(4) \quad w'_{i,x,y} = \pi_{i,x,y} / \sum_{j=1}^{j=n+1} \pi_{j,x,y}$$

que nada mais é que a probabilidade de uma fêmea presente num quadrante (x, y) pertencer à unidade i . Vale ressaltar que $w'_{i,x,y}$ reduzir-se-ia a $w_{i,x,y}$ se não houvesse sobreposição entre as unidades de fêmeas. Entretanto, como as unidades de fêmeas se sobrepõem $w'_{i,x,y}$ satisfaz a equação (3) e, conseqüentemente, $F_{i,k}$ calculado com $w'_{i,x,y}$ no lugar de $w_{i,x,y}$, satisfaz a equação (2).

3) Distribuição das localizações de diferentes anos:

A distribuição das localizações de um mesmo macho durante anos diferentes foi representada graficamente, como complemento dos cálculos descritos anteriormente, proporcionando uma melhor visualização das relações espaciais de cada macho com as unidades de fêmeas.

ESTUDOS GENÉTICOS

Extração de ADN

O ADN foi extraído a partir de sangue total, utilizando-se um método de extração ao sal (NaCL 6M), realizado em quatro etapas principais descritas a seguir (todas as soluções utilizadas estão descritas no Apêndice A):

- 1) Lise e eliminação dos glóbulos vermelhos: adicionar 25 ml de solução de lise fria e estéril (NH₄CL 150 mM, KCL 10 mM, EDTA 0,1 mM) por 10 ml de

sangue coletado em EDTA a 5 %. Deixar no gelo durante 30 minutos, até a lise dos glóbulos vermelhos. Depois centrifugar a 4000 rpm a 4°C e finalmente eliminar o sobrenadante com o auxílio de uma pipeta.

- 2) Lise dos glóbulos brancos, que liberam a molécula de ADN: ressuspender o sedimento com uma pipeta Pasteur e lavar duas vezes em 10 ml de solução salina (NaCl 140 mM, KCl 0,5 mM, Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM pH 7.4. Centrifugar a 3200 rpm durante 5 minutos após cada lavagem.
- 3) Ação de uma proteinase, a fim de purificar o ADN: ressuspender o sedimento em 9 ml de TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM pH 7), adicionar 100 µl de proteinase K (10 mg/ml descongelada ou preparada imediatamente antes do uso), 0,5 ml de EDTA 0,5 M pH 8, 0,5 ml de SDS 10 % e agitar tudo. Deixar em banho maria 37° C durante toda a noite.
- 4) Extração em NaCl e precipitação do ADN utilizando-se etanol puro seguida de diluição em solução tampão: adicionar 4,3 ml de solução de NaCl saturada e agitar vigorosamente durante pelo menos 30 segundos. Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos, mantendo a 4° C. Colocar o sobrenadante (contendo o ADN) em um Becker. Adicionar 30 ml de etanol a 100 % e recuperar o ADN com uma haste de plástico e colocá-lo em 1 ml de TE (10/0,1). Deixar homogeneizando durante pelo menos 12 horas, até a dissolução do ADN.

Amplificação das seqüências microssatélites

Após a extração do ADN, esse foi amplificado por PCR (do inglês *Polymerase Chain Reaction* = reação em cadeia da polimerase), a qual se realiza pela repetição de três etapas a saber:

- 1) Desnaturação térmica, a 94° C, do ADN que vai servir de matriz: a ação do calor quebra as ligações hidrogenadas não covalentes existentes entre as bases e as duas fitas de ADN que servirão de matrizes são separadas.
- 2) Durante a fase de hibridação, a uma temperatura que varia entre 54 ° C e 63° C conforme o locus, os *primers* se ligam à fita simples do ADN complementar em função da seqüência de oligonucleotídeos

- 3) A síntese a 72° C do ADN complementar à matriz de ADN a partir dos *primers* pela enzima termoestável *Taq polimerase* constitui a fase de alongação.

Esse ciclo se repete entre 30 e 40 vezes, promovendo o aumento exponencial do número de moléculas, pois a cada ciclo multiplica-se por dois a quantidade de fragmentos amplificados. Pode-se obter assim, a partir de uma única molécula de ADN, 2ⁿ fragmentos após n ciclos.

A duração de cada uma das três etapas é função do ADN a amplificar e dos aparelhos utilizados. Assim, diversos parâmetros, tais como temperatura de hibridização ou concentração de *primers* devem ser ajustados conforme a necessidade.

Os aparelhos utilizados para esse estudo foram um termociclador Omnigene com óleo (Hybaid). As PCRs foram realizadas em um volume final de 25 µl contendo 50 ng de ADN e 2,5 µl de tampão PCR 10X (200 mM Tris HCL, 500 mM KCL), 1,5 ; 2 ou 3 mM de MgCl₂, 0,5 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies) e 100 µM de cada dNTP. A concentração final do *primer* utilizada aqui foi de 0,5 µM.

Onze pares de *primers* foram utilizados com sucesso (Tabela 2). Os protocolos de amplificação estão descritos no Apêndice B.

Identificação dos alelos:

Os alelos dos *loci* microsatélites se diferenciam por seu tamanho. Assim, sua migração sobre gel leva ao surgimento de bandas que se distinguem pela distância percorrida a partir dos pontos onde estes foram depositados.

Foram usados três fluoróforos (Hex = amarelo, 6-Fam = azul e Tet = verde) para marcar um dos dois *primers* que amplificam o microsatélite. Após a amplificação, os marcadores foram agrupados em multiplex, ou seja, diferentes combinações de marcadores foram desenvolvidas aproveitando-se os diferentes tamanhos dos alelos e as diferentes cores dos fluoróforos. Os produtos das PCRs foram então misturados de maneira a serem colocados num mesmo ponto do gel de acrilamida até 6 microsatélites diferentes para um mesmo animal. As misturas foram constituídas de 2 µl de cada produto PCR mais 2 µl de um marcador de tamanho Genescam-500

TAMRA. O marcador de tamanho serve de referência para a leitura do comprimento dos alelos. O comprimento dos fragmentos amplificados foi colorido por um fluoróforo e medido por um seqüenciador automático ABIPRISM 377 (Perkin Elmer) com o auxílio do programa Genescan (Perkin Elmer Corp.).

Os resultados obtidos foram estocados em uma base de dados Gemma (IANNUCCELLI *et al.* 1996) contendo as informações sobre os animais, sobre as amostras coletadas e concentrações de ADN disponíveis, os marcadores, protocolos, as condições de PCR, as seqüências dos *primers*, as composições das placas de PCR e dos géis de migração e os resultados das tipagens. Essa base também permite a gestão dos dados, a organização e a interpretação dos resultados das tipagens.

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

As freqüências gênicas e genóticas permanecem constantes de uma geração a outra nas populações de organismos diplóides que se reproduzam de forma sexuada, acasalando-se aleatoriamente, sem sobreposição de gerações e na ausência de pressões seletivas. Pode-se supor que as freqüências relativas se mantêm na ausência de fatores tais como seleção natural, mutação, migrações, deriva genética ou desvio meiótico. O equilíbrio das freqüências genóticas se mantêm graças aos acasalamentos aleatórios, e as freqüências absolutas dos genótipos são determinadas pelas freqüências alélicas. Se as freqüências alélicas não se alteram e os acasalamentos são aleatórios, as proporções genóticas se mantêm inalteradas (OTTO 2000, COSSE 2010).

A deriva genética é o principal fator de perda de variabilidade genética. A imigração pode reduzir, deter ou até inverter a perda de variação genética, mesmo com a influência de apenas um ou poucos imigrantes por geração (LACY 1987). Assim, o equilíbrio de Hardy-Weinberg é a hipótese nula de onde se parte para que se possa compreender os processos que afetam uma população real submetida a diferentes forças evolutivas (COSSE 2010).

Tabela 2: primers utilizados para a caracterização do polimorfismo na população de mouflons do maciço do Caroux-Espinouse.

Locus	Repetição	°C	Referência	Cromossomo	Carneiro alelos tamanho	Soay alelos tamanho equipe	Bighorn alelos tamanho equipe	Mouflon alelos tamanho equipe
*INRA006	(AC)13	54	Vaiman et al. 1992	1				
*INRA011	(CA)8TA(CA)9	54	Vaiman et al. 1992	1				
*INRA023	(AC)21	54	Vaiman et al. 1994b	1				
*INRA026	(AC)21	54	Vaiman et al. 1994a	19				
*INRA127	(TG)9	54	Vaiman et al. 1994a	8				
MAF209	(TG)2TC(TG)4AA(TG)24	63	Buchanan & Crawford 1992a	17	8 (12) 109-135		10 109-135 Forbes et al.	4 107-132 I.R.G.M
MAF33	(AC)19	58	Buchanan & Crawford 1992b	9	10 121-141		7 121-139 Forbes et al.	6 120-141 I.R.G.M
MAF45	(GT)25	57	Swarbrick et al. 1992	Xpa	12 143-165	5 130-166 Bancroft et al.	8 149-169 I.R.G.M	8 149-169 I.R.G.M
MAF65	(AC)20	60	Buchanan et al. 1991	15	6 (12) 123-135	4 124-132 Bancroft et al.	8 119-135 Forbes et al.	4 125-131 I.R.G.M
OarFCB128	(GT)6GC(GT)15	63	Buchanan & Crawford 1993	2	8 (9) 99-131		9 99-127 Forbes et al.	5 113-131 I.R.G.M
OarFCB304	(TC)6GC(TC)4GC(TC)4GC(TC)11(AC)15	63	Buchanan & Crawford 1993	19	9 (17) 150-188		14 142-192 Forbes et al.	5 151-180 I.R.G.M

Considerando todo o efetivo populacional amostrado, foi calculada a taxa de heterozigose para cada *locus* e foram realizados testes sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg: um teste exato de Fisher para os *loci* apresentando menos de cinco alelos (LOUIS & DEMPSTER 1987) ou pelo método da cadeia de Markov (GUO & THOMPSON 1992) para os restantes.

Estruturação espacial da população

Os índices de fixação de Wright (F), podem estimar a redução da heterozigose devida à endogamia. F representa a probabilidade de serem encontrados juntos num mesmo zigoto dois alélos idênticos, originários de um ancestral comum aos dois progenitores. São três os índices propostos por Wright (1951) e que são largamente utilizados para estimar a existência de estruturação da população (NAGYLAKI 1998, COSSE 2010):

F_{IS} : mede o grau de endogamia da população, ou seja, verifica se existe um excesso de homozigotos em relação ao esperado para uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. É calculado segundo a fórmula:

$$F_{IS} = \frac{(H_s - H_i)}{H_i}$$

onde H_s é a heterozigose média esperada entre e H_i é a heterozigose média observada as subpopulações. Varia de 0 (sem endogamia) a 1 (completa endogamia). Valores negativos indicam um excesso de heterozigotos.

F_{IT} : avalia o quão distante uma população está do equilíbrio de Hardy-Weinberg, estimando a divergência entre as freqüências alélicas dos demes a partir da seguinte fórmula:

$$F_{IT} = \frac{(H_t - H_i)}{H_t}$$

onde H_t representa a heterozigosidade esperada na população total.

F_{ST} : estima o grau de estruturação de uma população com a seguinte fórmula:

$$F_{IT} = \frac{(H_t - H_s)}{H_t}$$

Os valores podem variar de 0 (sem estruturação) a 1 (populações totalmente separadas). Considera-se que valores acima de 0,2 sejam indicativos de forte estruturação da população (COSSE 2010).

Foram detalhadamente analisadas as duas situações de subdivisão da população identificadas pelas análises dos dados da radiotelemetria de 32 fêmeas: em três ou quatro subunidades. Com o auxílio dos programas GENEPOP (RAYMOND & ROUSSET 1995) e GENETIX (BELKHIR *et al.* 2000) foram realizados:

- os cálculos de freqüências alélicas a cada locus em cada unidade;
- os cálculos das taxas de heterozigose para cada locus em cada unidade;
- testes sobre o Equilíbrio de Hardy-Weinberg: um teste exato de Fisher para os *loci* apresentando menos de cinco alelos (LOUIS & DEMPSTER 1987) ou pelo método da cadeia de Markov (GUO & THOMPSON 1992) para os restantes. Esse teste, que responde sobre o estado panmítico da população;
- os cálculos de F_{IS} e F_{ST} segundo o método de Weir & Cockerham (1984). Esse procedimento fornece uma estimativa do F_{IS} médio sobre o conjunto da população e do F_{ST} calculado a partir de um modelo em ilhas onde todas as populações são equivalentes e representam uma realização particular do equilíbrio migração/deriva.
- comparações entre as distribuições alélicas por toda a população e para unidades consideradas duas a duas (teste de diferenciação por pares de Raymond & Rousset, 1995);
- finalmente, com a ajuda do programa Genetix, foram realizados cálculos das distâncias genéticas entre unidades e testes de Mantel para verificar a existência de correlação entre as matrizes de distâncias genéticas e de distâncias geográficas entre as unidades.

Atribuição de indivíduos a uma unidade de população

O programa GENECLASS, de Piry & Cornuet (1999) permitiu a realização de um teste baseado em probabilidades para a atribuição dos indivíduos às unidades de população pré-estabelecidas. O método da frequência (PAETKAU *et al.* 1995) atribui um indivíduo à população onde seu genótipo teria a ocorrência mais provável. Esse método consiste de três etapas:

- 1) Calcular as frequências alélicas para todas as populações em potencial;
- 2) Calcular as probabilidades de ocorrência do genótipo multiloci do indivíduo em cada uma das populações;
- 3) Atribuir o indivíduo à população em que a probabilidade de encontrar seu genótipo é a mais elevada.

RESULTADOS

Comportamento espacial das fêmeas

1. Sobreposição entre os domínios

A superfície média dos domínios de outono estimada pelo método do Mínimo Polígono Convexo foi de 231 ± 84 ha. A superfície dos domínios variou de 130,7 a 377,3 ha. A sobreposição máxima entre domínios de fêmeas (256 combinações) foi de 76%, entre Rag e Car (Figura 9a). Seis pares de fêmeas apresentaram sobreposições de domínios superiores a 50% e 203 pares não mostraram nenhuma sobreposição.

A classificação automática dessas fêmeas a partir das taxas de sobreposição de domínios evidenciou dois grupos, com quatro (Ros, Cha, Fan et Hel) e seis (Pep, Maa, Mad, Mia, Kez, Mae) fêmeas; dois pares de fêmeas (Rag, Car e Bea, Gal) e ainda duas fêmeas isoladas (Equ et Bal) (Figura 9a). As taxas médias de sobreposição de domínios nesses grupos foram de 36, 37, 59 e 76%, respectivamente.

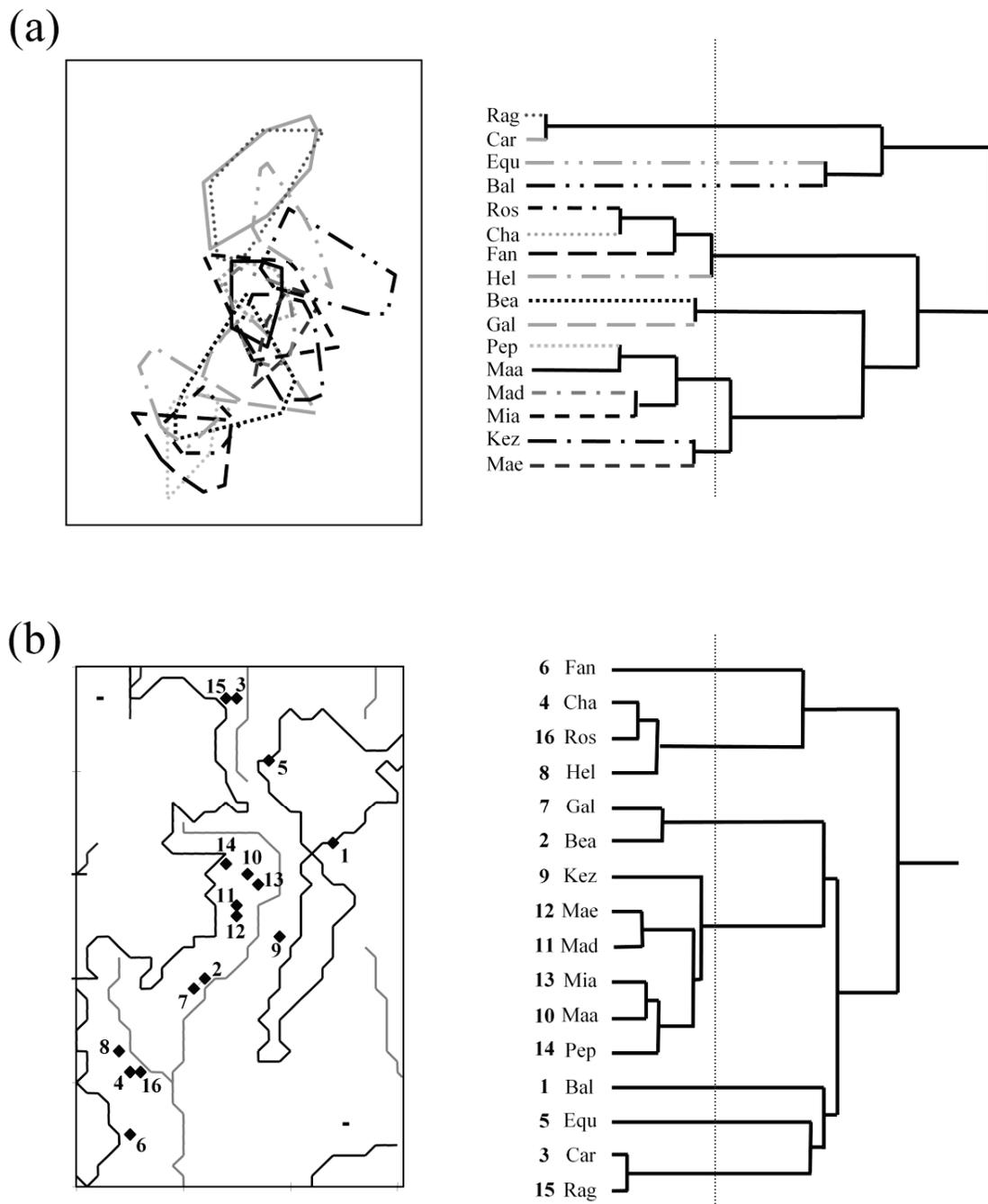


Figura 9. (a) distribuição dos domínios de 16 fêmeas e classificação automática a partir das taxas de sobreposição entre esses domínios; (b) distribuição dos centros aritméticos dos domínios das mesmas 16 fêmeas e respectiva classificação automática.

2. Distância entre centros aritméticos

Primeiramente utilizamos os dados obtidos para as mesmas 16 fêmeas, para poder comparar a classificação obtida a partir das distâncias entre os centros aritméticos com aquela obtida a partir das taxas de sobreposição entre domínios. A maior distância entre os 16 centros foi de 5397 m, entre Fan e Car e a menor foi de 125 m, entre Rag e Car; Ros e Cha; Mae e Mad.

O teste de vizinho mais próximo (CLARK & EVANS 1954) revelou um grau de agregação significativo ($R = 0,686$; $z = 1,992$; $p < 0,05$) e a classificação permitiu distinguir sete grupos, compreendendo de uma a seis fêmeas, cada um (Figura 9b): Bal, Equ e Fan apareceram isoladas; Gal e Bea, assim como Car e Rag agruparam-se em dois pares; Cha, Ros e Hel constituíram uma tríade; o último grupo foi composto por Kez, Mae, Mad, Mia, Maa, Pep. As distâncias médias entre os centros das fêmeas mais próximas, dentro de cada grupo, foram de 125,0; 176,8; 294,6 e 202,3 m. A distância média entre os centros das fêmeas mais próximas de grupos adjacentes (incluindo as fêmeas isoladas) foi de $972,9 \pm 80,8$ m. Essa distância intergrupos, muito superior à distância intragrupos, pode ser interpretada como um indício de estruturação espacial das fêmeas em unidades de população.

Em seguida, utilizamos a mesma análise considerando-se 32 fêmeas localizadas ao menos 15 vezes. A maior distância, nesse caso, foi de 5870 m, entre Fan e Cor, e três fêmeas (Chi, Jil e Lis) apresentaram o mesmo centro aritmético de domínio. O teste do vizinho mais próximo confirmou uma agregação significativa dos 32 centros aritméticos ($R = 0,68$; $z = -3,063$; $p = 0,002$).

A classificação automática permitiu distinguir oito “grupos” de fêmeas (Figura 10a), sendo cinco fêmeas isoladas (Cor, Bal, Mic, Fan et Amn) e três unidades, denominadas Lauze, Vialais et Mascar, e compreendendo nove (Rag, Car, Mag, Ora, Gil, Chi, Lis, Equ, Bir), doze (Pep, Maa, Mia, Mad, Mae, Mel, Kez, Blu, Ind, Bea, Gal, Ven) e seis (Fon, Gra, Hel, Cal, Cha, Ros) fêmeas respectivamente (Figura 10a). A distância média entre os centros das fêmeas mais próximas, dentro de cada unidade, foi respectivamente $123,4 \pm 36,8$; $188,9 \pm 20,6$ e $150,9 \pm 11,6$ m. A distância média

entre vizinhas mais próximas de grupos adjacentes (incluindo as fêmeas isoladas) foi de $906,2 \pm 55,0$ m.

3. Sobreposição entre localizações:

O conjunto de localizações das 32 fêmeas cobriu 1311 quadrantes da área de estudo. A classificação automática dessas fêmeas, obtida a partir da frequência de utilização de cada um dos quadrantes, identificou quatro grupos (Lauze, Vialais N, Vialais S e Mascar), com 9 (Ora, Mag, Chi, Jil, Lis, Equ, Bir, Car, Rag), 4 (Pep, Maa, Mia, Mad) ou 6 (Mae, Blu, Ven, Ind, Bea, Gal et Gra, Fon, Cal, Ros, Hel, Cha) fêmeas (Figura 10b). A esses quatro grupos, somam-se uma dupla mãe-filha e outras 5 fêmeas isoladas. As fêmeas isoladas são as mesmas da análise anterior, assim como as fêmeas dos grupos Lauze e Mascar. Apenas o grupo central, Vialais, subdividiu-se em dois grupos (Vialais N e Vialais S) mais a dupla mãe-filha. A superfície total ocupada pelas quatro unidades foi de 2048 ha, sendo $458,6 \pm 38,9$ ha a superfície média de cada unidade.

Comportamento espacial dos machos

1. Distribuição dos centros aritméticos:

As distâncias entre os centros aritméticos de domínios reprodutivos sucessivos permitiram agrupar os machos em duas categorias: fiéis ao domínio reprodutivo, com distâncias inferiores a 500 m (Lut, Kuh, Moz, Mal, Tar, Mar, durante três anos; Nin, durante cinco anos e Klu, entre o terceiro e o quarto anos de idade), e não fiéis ao domínio reprodutivo, com distâncias superiores a 1200 m (Yva, Son, Gan, Kin et Klu, entre dois e três anos de idade). Somente um dos machos (Ker) apresentou uma distância intermediária (858 m) entre os centros de seus domínios reprodutivos quando tinha três e seis anos de idade (tabela 3).

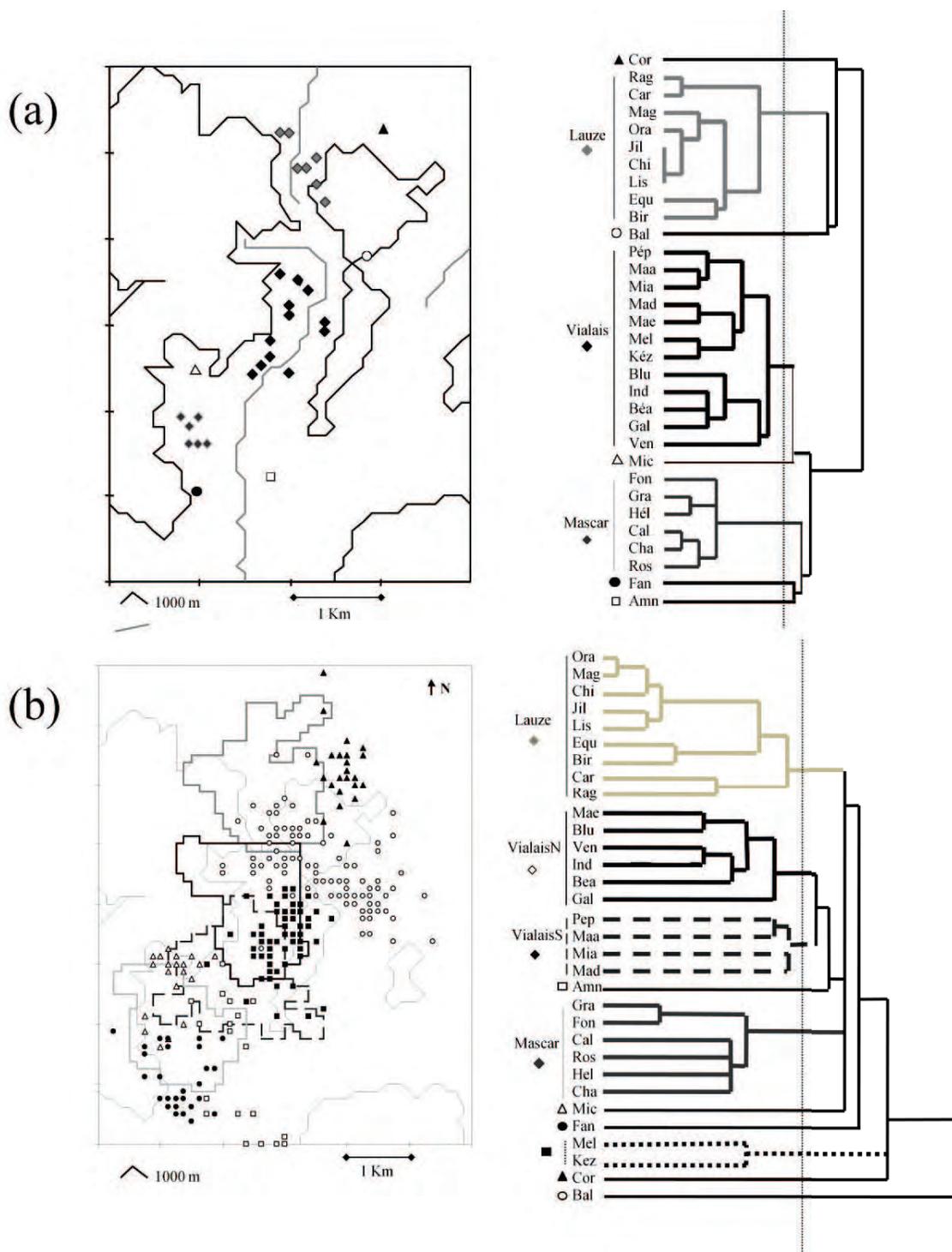


Figura 10. (a) distribuição dos centros aritméticos domínios de 32 fêmeas e respectiva classificação automática; (b) utilização de quadrantes da área de estudo pelas mesmas 32 fêmeas e classificação automática dessas fêmeas a partir da freqüência de utilização desses quadrantes.

Tabela 3. Distâncias (em metros) entre centros aritméticos de domínios reprodutivos sucessivos de diferentes machos conforme suas idades.

INDIVÍDUO	IDADE (anos)	DISTÂNCIA	COMPORTAMENTO
Lut	1a - 2a	259 m	FIÉIS
Kuh	cordeiro – 1a	286 m	
Moz	2a – 3a	454 m	
Mal	> 5a	472 m	
Tar	cordeiro – 1a	473 m	
Mar	cordeiro – 1a	101 m	
	1a – 2a	427 m	
Nin	cordeiro – 2a	185 m	
	2a – 3a	39 m	
	3a – 4a	154 m	
Ker	3a – 6a	858 m	NÃO - FIÉIS
Yva	cordeiro – 2a	1229 m	
Son	2a – 3a	1383 m	
Gan	cordeiro – 2a	1430 m	
Kin	2a – 4a	1772 m	
Klu	2a – 3a	1214 m	
	3a – 4a	339 m	

Entre os machos que se mostraram fiéis aos seus domínios reprodutivos, apenas um teve o centro do seu domínio em uma unidade de fêmea diferente de um ano a outro (Moz, cujo centro do domínio saiu do Vialais N para o exterior das unidades de fêmeas) (Figura 11). Entre os machos classificados não-fiéis a um domínio reprodutivo, ao contrário, apenas um (Yva) não mudou seu centro de unidade de fêmeas, mesmo com uma distância de 1229 m em relação ao centro do domínio reprodutivo do ano anterior.

Dos seis machos cujos centros de domínios reprodutivos se deslocaram mais de 500 m, cinco (Gan, Yva, Son, Klu e Kin) se deslocaram em direção ao exterior da reserva de caça e fauna selvagem e apenas um (Ker) deslocou-se para o interior da reserva (Figura 11). Sete machos mostraram-se fiéis a um mesmo domínio reprodutivo durante dois (Lut, Kuh, Moz, Mal e Tar), três (Mar) ou mesmo cinco anos (Nin).

Outros 28 machos tiveram calculados apenas um centro de domínio reprodutivo, distribuídos entre as unidades de fêmeas da seguinte maneira: nove (Aus, Bar, Cly, Cor, Cre, Fel, Igy, Jim e Rao) na unidade denominada Lauze; seis (Kam, Val, Lbh, Ric,

Con e Mal) na unidade Vialais N; quatro (Pis, Orf, Far e Tuo) na área comum às unidades Vialais N e Vialais S, um (Ped) na unidade Vialais S; dois (Ast e Cho) na unidade do Mascar; seis no entorno das unidades (Che, muito próximo dos limites da unidade da Lauze ; Nai, próximo ao Vialais S ; Rik, próximo ao Mascar, e ainda Mod, Leo e Mor).

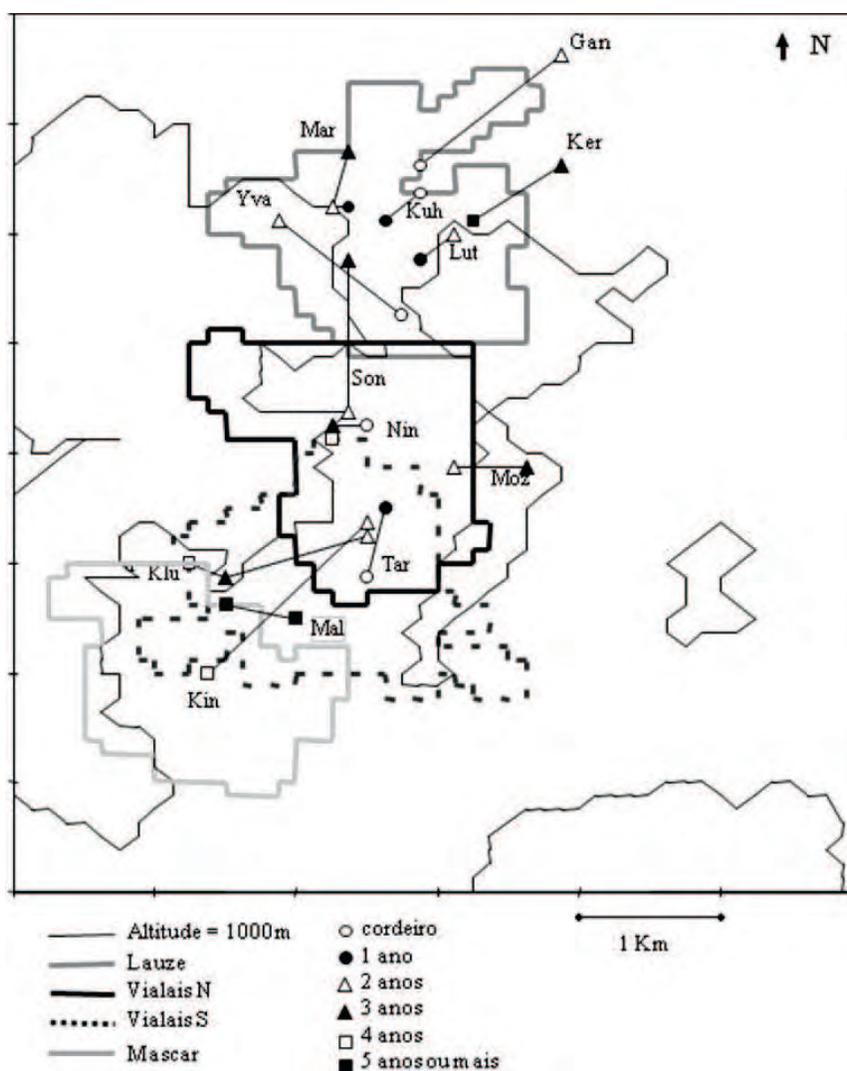


Figura 11. Localização dos centros de domínios dos diferentes machos em diferentes anos, em relação às unidades de fêmeas.

2. Freqüentação das unidades de fêmeas:

Os índices de freqüentação de unidades de fêmeas mostraram-se muito estáveis para dois machos (Tabela 4): Kuh foi bastante fiel à unidade Lauze (0,91 e 1,00) e Moz manteve uma freqüentação dividida entre o Vialais N e o exterior das unidades de fêmeas (respectivamente 0,60 e 0,29 aos 2 anos de idade e 0,57 e 0,36 aos 3 anos de idade). Dois outros machos tiveram índices de freqüentação de unidades de fêmeas bastante estáveis, mas revelando uma ligeira tendência ao deslocamento: Nin, que reduziu ligeiramente seu índice de freqüentação da unidade Vialais N (respectivamente 0,87; 0,88; 0,76 e 0,70) enquanto aumentou seu índice de freqüentação do Vialais S (respectivamente 0,08; 0,12; 0,07 e 0,24) e Tar, que freqüentou as unidades do Vialais N (0,28 e 0,50) e Vialais S (0,56 e 0,45), mas inverteu a unidade mais freqüentada de um ano a outro.

Os outros machos mostraram mudanças mais importantes nos seus índices de freqüentação de unidades de fêmeas: Mal aumentou seu índice de freqüentação da área externa às unidades (de 0,08 a 0,24) e do Vialais N (de 0,02 a 0,16), reduzindo seus índices de freqüentação do Vialais S (de 0,52 a 0,33) et do Mascar (0,37 a 0,27). Mar reduziu pouco a pouco seus índices de freqüentação da unidade Lauze (0,87; 0,77 et 0,63), passando de uma freqüentação quase exclusiva a uma freqüentação compartilhada entre a Lauze e o exterior das unidades (0,13 ; 0,23 et 0,37). Um deslocamento parecido foi observado para Lut, que reduziu sua freqüentação da Lauze de 0,93 a 0,73, aumentando a freqüentação do exterior das unidades de 0,07 a 0,27 e ainda mais nitidamente para Yva (Lauze: 0,98 e 0,55 e exterior das unidades: 0,00 et 0,43). Gan mudou claramente sua freqüentação, da Lauze (0,82 durante seu primeiro ano de vida) para o exterior das unidades (0,88 aos dois anos de idade). Ker, ao contrário, reduziu a freqüentação da área externa às unidades (de 0,74 para 0,02) concentrando suas atividades na unidade Lauze (de 0,26 para 0,98). Son também aumentou sua taxa de freqüentação da unidade Lauze (de 0,03 para 0,51), mas reduzindo sua freqüentação sobre o Vialais N (de 0,85 para 0,39). Kin passou de uma utilização distribuída entre as unidades do Vialais N (0,48) e Vialais S (0,43) aos dois anos de idade, para uma utilização exclusiva do Mascar (0,81) aos quatro anos de

idade. Klu substituiu a freqüentação do Vialais N (0,38; 0,09 e 0,00) pela do Mascar (0,00; 0,45 e 0,48), mantendo elevadas taxas de freqüentação do Vialais S (0,58; 0,45 e 0,40).

Tabela 4. Índices de freqüentação das unidades de fêmeas pelos machos durante diferentes anos.

Indivíduo (idade)	Lauze	Vialais N	Vialais S	Mascar	Exterior	Comportamento	
Gan (0)	0.82	0.00	0.00	0.00	0.18	Não-fiéis	
Gan (2)	0.12	0.00	0.00	0.00	0.88		
Ker (3)	0.26	0.00	0.00	0.00	0.74		
Ker (6)	0.98	0.00	0.00	0.00	0.02		
Kin (2)	0.00	0.48	0.43	0.04	0.05		
Kin (4)	0.00	0.02	0.17	0.81	0.00		
Klu (2)	0.00	0.38	0.58	0.00	0.03		
Klu (3)	0.00	0.09	0.45	0.45	0.02		
Klu (4)	0.00	0.00	0.40	0.48	0.12		
Son (2)	0.03	0.85	0.09	0.00	0.04		
Son (3)	0.51	0.39	0.00	0.00	0.10		
Yva (0)	0.98	0.02	0.00	0.00	0.00		
Yva (2)	0.55	0.00	0.02	0.00	0.43		
Kuh (0)	0.91	0.00	0.00	0.00	0.09		Fiéis
Kuh (1)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00		
Lut (1)	0.93	0.00	0.00	0.00	0.07		
Lut (2)	0.73	0.00	0.00	0.00	0.27		
Mal (5)	0.00	0.02	0.52	0.37	0.08		
Mal (6)	0.00	0.16	0.33	0.27	0.24		
Mar (1)	0.87	0.00	0.00	0.00	0.13		
Mar (2)	0.77	0.00	0.00	0.00	0.23		
Mar (3)	0.63	0.00	0.00	0.00	0.37		
Moz (2)	0.01	0.60	0.09	0.00	0.29		
Moz (3)	0.00	0.57	0.06	0.00	0.36		
Nin (0)	0.03	0.87	0.08	0.00	0.02		
Nin (2)	0.00	0.88	0.12	0.00	0.00		
Nin (3)	0.09	0.76	0.07	0.00	0.08		
Nin (4)	0.04	0.71	0.24	0.00	0.01		
Tar (0)	0.00	0.28	0.56	0.08	0.08		
Tar (1)	0.03	0.50	0.45	0.00	0.02		

Entre os 28 machos para os quais não obtivemos mais que um domínio reprodutivo, 14 freqüentaram apenas uma unidade de fêmea (Tabela 5): oito

permaneceram na Lauze (Aus, Bar, Cly, Cre, Fel, Igy, Jim e Rao), quatro (Con, Lbh, Ric e Val) no Vialais N, um (Far) no Vialais S e um (Ast) no Mascar. Quatro machos freqüentaram duas unidades de fêmeas, três (Orf, Pis e Tuo) deslocando-se entre o Vialais N e Vialais S e um (Ped), entre o Vialais S e o Mascar. Seis machos utilizaram uma das unidades e a área externa às unidades. Esta unidade foi a Lauze para dois desses machos (Che e Cor), o Vialais N para outros dois (Kam e Mak), o Vialais S para um (Nai) e o Mascar para o último (Cho). Por fim, quatro machos (Leo, Mod, Mor e Rik) apresentaram índices indicando uma freqüentação quase exclusiva da área externa às unidades de fêmeas consideradas.

Tabela 5. Índices de freqüentação das unidades de fêmeas pelos machos monitorados durante um só ano.

Indivíduo (idade)	Lauze	Vialais N	Vialais S	Mascar	Exterior
Ast (0)	0.00	0.00	0.03	0.85	0.12
Aus (1)	0.70	0.13	0.01	0.00	0.16
Bar (2)	0.98	0.02	0.00	0.00	0.00
Che (2)	0.53	0.00	0.00	0.00	0.47
Cho (6)	0.00	0.00	0.05	0.64	0.31
Cly (0)	0.98	0.00	0.00	0.00	0.02
Con (1)	0.01	0.78	0.21	0.00	0.00
Cor (4)	0.50	0.00	0.00	0.00	0.50
Cre (0)	1.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Far (2)	0.00	0.17	0.80	0.02	0.00
Fel (2)	0.80	0.00	0.00	0.00	0.20
Igy (0)	0.88	0.06	0.00	0.00	0.06
Jim (0)	0.91	0.00	0.00	0.00	0.09
Kam (4)	0.04	0.65	0.11	0.00	0.19
Lbh (0)	0.05	0.84	0.07	0.00	0.04
Leo (1)	0.08	0.18	0.01	0.00	0.73
Mak (3)	0.01	0.65	0.15	0.00	0.19
Mod (4)	0.00	0.00	0.00	0.00	1.00
Mor (7)	0.00	0.11	0.07	0.00	0.82
Nai (0)	0.00	0.06	0.37	0.06	0.51
Orf (0)	0.00	0.69	0.27	0.00	0.03
Ped (0)	0.00	0.09	0.44	0.47	0.00
Pis (4)	0.00	0.64	0.36	0.00	0.00
Rao (2)	0.87	0.04	0.01	0.00	0.07
Ric (0)	0.05	0.81	0.13	0.00	0.02
Rik (1)	0.00	0.00	0.00	0.20	0.80
Tuo (1)	0.00	0.37	0.55	0.01	0.07
Val (1)	0.10	0.73	0.09	0.00	0.08

3. Distribuição das localizações de diferentes anos:

Um dos machos (Kuh) mostrou uma nítida redução da superfície total de seu domínio reprodutivo, mesmo com um número muito similar de localizações entre um ano e outro (respectivamente 20 e 19) (Figura 12a). Esta redução esteve ligada a uma forte concentração de localizações, que ficaram limitadas a uma zona situada no interior da unidade Lauze. Um outro macho (Tar) também mostrou a mesma tendência a concentrar as localizações (Figura 12b), embora a redução da área de seu domínio seja menos nítida, talvez em função do número de localizações utilizado para o cálculo do segundo domínio reprodutivo ser bem maior (50) que aquele utilizado no cálculo do primeiro (26). Entretanto, algumas localizações periféricas, situadas mais ao Sul, na unidade Mascar e fora das unidades de fêmeas estabelecidas, não se repetiram durante o 2º ano, quando se observou uma intensificação da utilização da zona situada na intersecção entre as unidades Vialais N e Vialais S.

Três machos revelaram um ligeiro deslocamento de seus domínios reprodutivos: o domínio de Lut deslocou-se um pouco para o Norte e para o Leste (Figura 12c), com algumas localizações fora das unidades de fêmeas; Mar deslocou-se gradualmente para o Norte (Figura 12d), aumentando o número de suas localizações fora das unidades de fêmeas; Nin deslizou seu domínio pouco a pouco em direção ao Sul (Figura 12e), mas manteve-se fiel à unidade Vialais N durante os cinco anos de radiotelemetria a que foi submetido; Dois machos apresentaram grandes domínios reprodutivos: as localizações de Mal (Figura 12f) aparecem bastante afastadas umas das outras aos cinco anos de idade e, aos seis anos, seu domínio estendeu-se ainda mais, provavelmente influenciado por um número maior de localizações obtidas (31, contra 13 do ano anterior); os domínios reprodutivos de Moz (Figura 12g) aparecem fragmentados, com uma concentração importante de pontos na unidade Vialais N e uma segunda nuvem de pontos no exterior das unidades de fêmeas. Aos três anos de idade, essa segunda nuvem de pontos se afasta ainda mais da porção do domínio situada na unidade Vialais N.

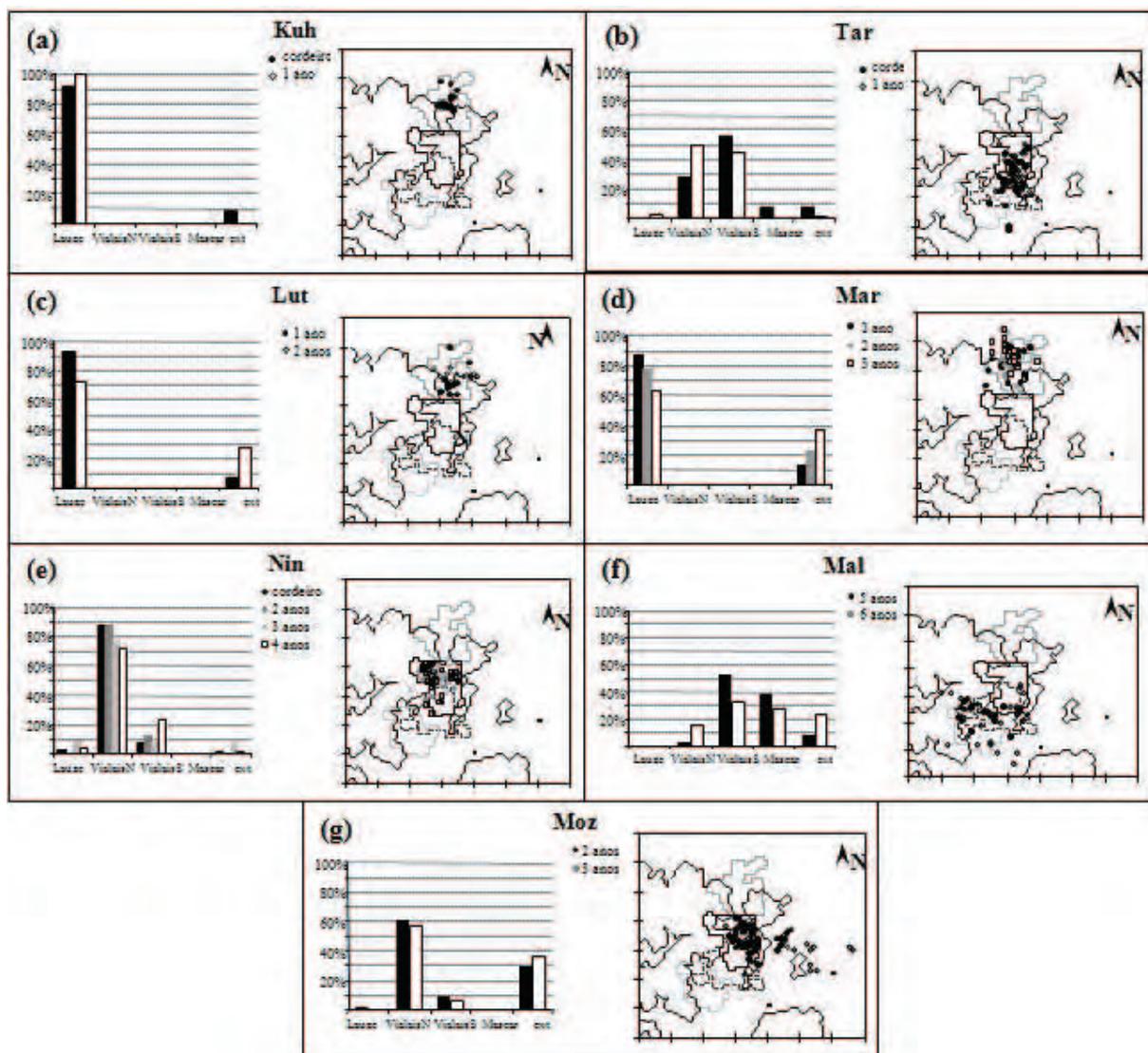


Figura 12. Distribuição das localizações dos machos filopátricos (a) Kuh, (b) Tar, (c) Lut, (d) Mar, (e) Nin, (f) Mal e (g) Moz em relação às unidades de fêmeas em períodos reprodutivos de diferentes anos.

Os outros seis machos mudaram nitidamente seus domínios reprodutivos de um ano a outro: Yva saiu do Vialais rumo ao Norte e ao Leste (Figura 13a) e seus dois domínios reprodutivos sucessivos não se sobrepõem; Gan deslocou-se da unidade Lauze em direção ao Noroeste (Figura 13b), com algumas localizações fora das unidades e alguma sobreposição entre as localizações de seus domínios, obtidos em

dois anos diferentes; Ker fez um movimento inverso (Figura 13c), entrando na unidade Lauze, reduzindo claramente o tamanho de seu domínio no segundo ano sem sobrepô-lo ao domínio do ano anterior; Son (Figura 13d) saiu de um domínio que se distribuía entre as unidades Vialais N e Vialais S, com localizações bem espaçadas, para utilizar exclusivamente o Vialais N, com localizações bem mais próximas umas das outras. Klu (Figura 13e) e Kin (Figura 13f) ocupavam domínios situados na intersecção entre as unidades Vialais N e Vialais S e mudaram seus domínios reprodutivos entre os dois e três anos de idade: o primeiro deslocou-se até os limites entre as unidades do Mascar e do Vialais S e o segundo foi ainda mais longe, utilizando uma área totalmente localizada no Mascar.

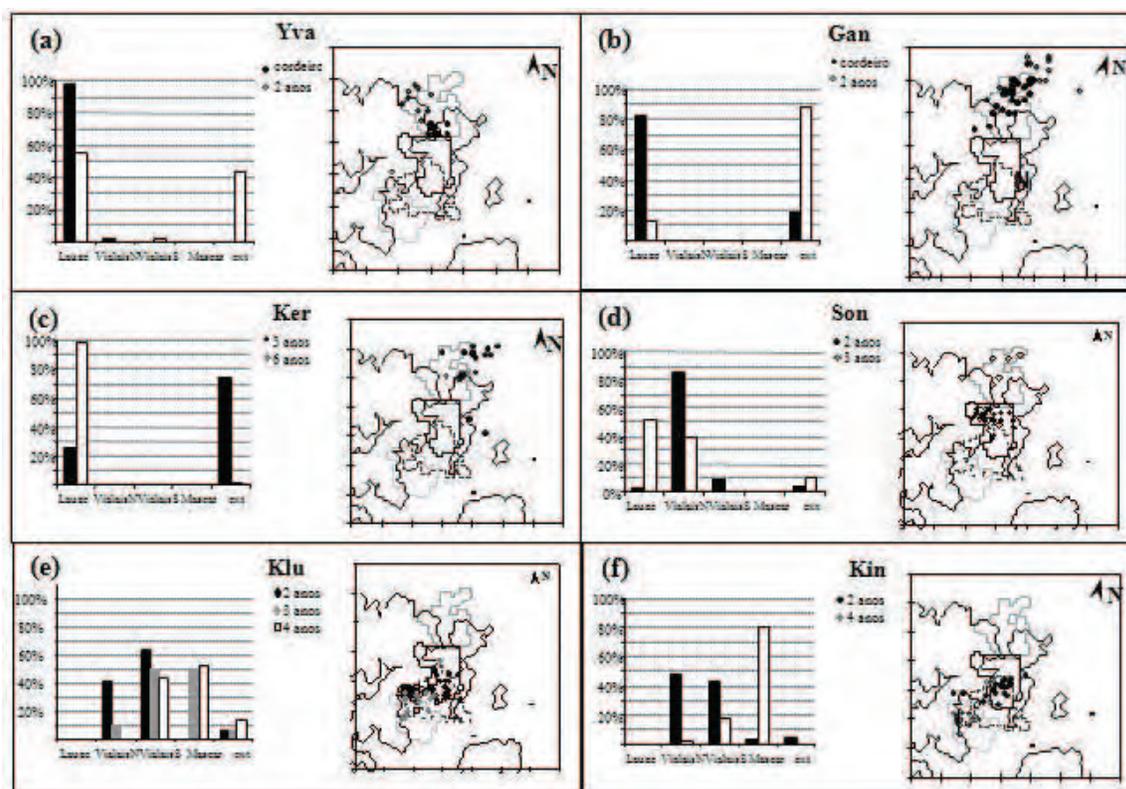


Figura 13. Distribuição das localizações dos machos dispersores (a) Yva, (b) Gan, (c) Ker, (d) Son, (e) Klu e (f) Kin em relação às unidades de fêmeas em períodos reprodutivos de diferentes anos.

ESTUDOS GENÉTICOS

Efetivo total da população

Polimorfismo e heterozigose

O número de alelos detectados por lóculos variou de 3 (INRA011 e OarFCB128) a 7 (INRA127) (tabela 6). A taxa de heterozigose global encontrada foi alta (0,57).

Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A probabilidade associada ao teste de Hardy-Weinberg para os 323 animais tipados na Reserva de Caça do Caroux-Espinouse mostrou-se baixa ($F_{IS}=0,011$; $p=0,012$), sugerindo uma população em desequilíbrio. A partir dessa visão geral sobre o efetivo total de mouflons, lançou-se um olhar mais detalhado sobre a população estudada, considerando-se sua estruturação em três ou quatro unidades, como sugerido pelas análises realizadas com 32 fêmeas monitoradas por rádio-telemetria.

Atribuição de mouflons às unidades espaciais:

Procuramos identificar uma estrutura genética da população a partir da estrutura espacial. Assim, nós atribuímos indivíduos suplementares às unidades definidas pela rádio-telemetria, considerando seu local de captura e as localizações obtidas por visualização direta ou rádio-telemetria. Desse modo, 165 animais, do total de 323, foram atribuídos a uma das quatro unidades: 48 na Lauze, 65 no Vialais N, 22 no Vialais S e 30 no Mascar. Considerando-se a divisão em apenas três unidades, a unidade do Vialais agrupa todos os indivíduos do Vialais N, Vialais S e ainda aqueles indivíduos localizados em áreas comuns a essas duas unidades e que, por esse motivo, não foram atribuídos nem a uma nem à outra. O total de indivíduos se eleva então a 186, sendo 108 na unidade do Vialais e nenhuma alteração nas unidades Lauze e Mascar.

... continuação						
MAF33						
Alélos	Pop (298)	Lauze (44)	Vialais N+S (99)	Vialais N (58)	Vialais S (20)	Mascar (24)
124	67%	53%	73%	71%	70%	65%
136	22%	31%	17%	16%	25%	21%
138	10%	13%	10%	14%	5%	13%
141	1%	3%	0%	0%	0%	2%
MAF45						
Alélos	Pop (294)	Lauze (43)	Vialais N+S (97)	Vialais N (56)	Vialais S (20)	Mascar (24)
148	7%	11%	6%	3%	13%	0%
152	13%	8%	12%	13%	10%	13%
156	60%	62%	62%	64%	60%	65%
158	14%	11%	13%	13%	13%	21%
164	7%	9%	7%	7%	5%	2%
MAF65						
Alélos	Pop (322)	Lauze(48)	Vialais N+S (107)	Vialais N (64)	Vialais S (22)	Mascar (30)
124	2%	0%	3%	2%	5%	0%
127	87%	92%	84%	81%	89%	88%
129	2%	1%	3%	4%	2%	2%
131	8%	7%	11%	13%	5%	10%
OarFCB128						
Alélos	Pop (291)	Lauze (44)	Vialais N+S (95)	Vialais N (54)	Vialais S (20)	Mascar (24)
113	18%	13%	20%	18%	28%	19%
125	39%	43%	33%	35%	25%	31%
127	43%	44%	47%	47%	48%	50%
OarFCB304						
(N)	Pop (297)	Lauze (44)	Vialais N+S (98)	Vialais N (57)	Vialais S (20)	Mascar (24)
151	58%	60%	54%	57%	50%	58%
153	8%	7%	10%	11%	10%	10%
165	25%	30%	23%	23%	18%	23%
172	9%	3%	14%	10%	23%	8%

Estruturação espacial em três unidades

Heterozigose e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

A heterozigose, considerando o efetivo populacional de 186 animais atribuídos a uma das três unidades foi de 0,58 para a população e variou de 0,57 a 0,58 no interior das unidades (tabela 7). A heterozigose para cada locus variou entre 0,26 (MAF065) e 0,73 (INRA023 e INRA026) (tabela 8). As taxas mais baixas de heterozigose (MAF065: 0,26 e MAF209: 0,39) podem ser explicadas pela predominância de um dos alelos: o alelo 127 para o MAF065 (74%) e o alelo 107 para o MAF209 (58 %).

O teste de Hardy-Weinberg não revelou desequilíbrio quando considerado o efetivo populacional de 186 animais ($F_{IS}=0,008$; $p=0,514$). Os valores de F_{IS} indicam uma panmixia também no interior de cada uma das unidades (Lauze: $F_{IS} =0,002$,

$p=0,667$; Vialais: $F_{IS} = 0,013$, $p=0,271$; Mascar: $F_{IS} = 0,003$, $p=0,778$). As probabilidades associadas ao teste de Hardy-Weinberg indicaram que não há desequilíbrio para nenhum dos *loci*.

Tabela 7. Probabilidades associadas às proporções de Hardy-Weinberg (p), índice de fixação (F_{IS}), para toda a população, e probabilidades para cada unidade sócio-espacial, no período de 1993 a 1998, considerando-se um efetivo de 186 mouflons distribuídos em 3 unidades espaciais (H_0 = equilíbrio de Hardy-Weinberg).

	p	h	F_{IS}	n
População	0,514	0,58	0,008	186
Lauze	0,667	0,57	-0,002	48
Vialais	0,271	0,58	0,013	108
Mascar	0,778	0,58	0,003	30

Tabela 8. Número de genótipos (n), número de alelos, heterozigose (h), probabilidades associadas ao teste de Hardy-Weinberg (p), índice de fixação de Wright (1951) (F_{IS} e F_{ST}) para cada *locus*. P é a probabilidade associada ao teste de diferenciação gênica (1) e genotípica (2), considerando-se uma estruturação da população em três unidades espaciais.

	INRA006	INRA011	INRA023	INRA026	INRA127	MAF209	MAF033	MAF045	MAF065	OARFCB128	OARFCB304
n	185	184	172	186	185	185	167	164	185	163	166
Alelos	4	3	5	4	7	4	4	5	4	3	4
h	0,67	0,58	0,73	0,73	0,68	0,39	0,49	0,63	0,26	0,61	0,54
p	0,662	0,135	0,317	0,895	0,121	0,620	0,589	0,786	0,995	0,086	0,722
F_{IS}	0,037	0,047	-0,024	-0,035	0,024	0,036	0,000	-0,097	-0,095	0,020	0,119
F_{ST}	0,002	0,014	0,002	0,014	0,018	0,002	0,029	-0,001	0,004	-0,001	0,000
P(1)	0,421	0,012	0,145	0,010	0,002	0,064	0,013	0,159	0,489	0,373	0,159
P(2)	0,499	0,019	0,101	0,010	0,002	0,039	0,008	0,071	0,206	0,382	0,167

A nível de unidades, a probabilidade de Hardy-Weinberg mais baixa foi encontrada para o *locus* INRA023 na unidade do Vialais, no limite da significância (0,052).

As probabilidades associadas aos testes de diferenciação gênica (0,000) e genotípica (0,000) sugerem uma estruturação da população e o F_{ST} (0,008) também foi significativo, confirmando essa estruturação.

Comparações por pares de populações

O teste de diferenciação gênica, baseado sobre todos os *loci*, foi significativo para todos os pares de populações (Lauze-Vialais: 0,000; Lauze-Mascar: 0,009; Vialais-Mascar: 0,046), o que revela que existe uma diferenciação entre essas unidades de população. Pode-se notar ainda que a probabilidade é mais alta entre as unidades do Vialais e do Mascar, que são as unidades que mais se sobrepõem.

Atribuição dos indivíduos a uma unidade de população

Sobre um efetivo de 186 animais, o método da frequência (PAETKAU *et al.* 1995) atribuiu 51,61 % dos indivíduos à sua unidade de origem (determinada pela localização de captura).

Estruturação espacial em quatro unidades

Heterozigose e Equilíbrio de Hardy-Weinberg

Os testes foram realizados sobre um efetivo de 165 mouflons, que puderam ser atribuídos a uma das quatro unidades. Os resultados foram muito parecidos àqueles encontrados quando consideradas apenas três unidades de população: a heterozigose encontrada foi de 0,56 para a população e variou entre 0,56 e 0,59 no interior de cada unidade (Tabela 9). A heterozigose para cada *locus* variou entre 0,26 (MAF065) e 0,75 (INRA026) (Tabela 10). O F_{IS} novamente não indicou o desequilíbrio da população amostrada ($F_{IS}=0,008$; $p=0,460$), mas revelou uma panmixia no interior de cada uma das unidades (Tabela 9).

As probabilidades associadas aos testes de diferenciação gênica (muito significativas) e genotípica (0,000) sugerem uma estruturação da população. O F_{ST} de 0,008 também foi muito significativo, confirmando essa estruturação.

O único *locus* que revelou uma baixa probabilidade associada ao teste de Hardy-Weinberg (0,025) foi o INRA127, que foi também o *locus* mais polimórfico, com sete alelos (tabela 10). Então, essa baixa probabilidade estaria provavelmente relacionada a

um maior número de alelos raros, conseqüente desse polimorfismo elevado. Nenhum dos outros *loci* apresentaram-se em desequilíbrio de Hardy-Weinberg.

A nível de unidades, as probabilidades de Hardy-Weinberg mais baixas apareceram na unidade Vialais S, para os *loci* INRA026 (0,050) e INRA127 (0,016). Essa unidade foi a que apresentou o mais baixo efetivo (22 indivíduos).

Tabela 9. Probabilidades associadas às proporções de Hardy-Weinberg (p), índice de fixação (F_{IS}), para toda a população, e probabilidades para cada unidade sócio-espacial, no período de 1993 a 1998, considerando-se um efetivo de 165 mouflons distribuídos em quatro unidades espaciais (H_0 = equilíbrio de Hardy-Weinberg).

	p	h	F_{IS}	n
Population	0,460	0,56	0,008	165
Lauze	0,644	0,56	-0,002	48
Vialais N	0,511	0,59	0,006	65
Vialais S	0,365	0,56	0,043	22
Mascar	0,777	0,57	0,003	30

Tabela 10. Número de genótipos (n), número de alelos, heterozigose (h), probabilidades associadas ao teste de Hardy-Weinberg (p), índice de fixação de Wright (1951) (F_{IS} e F_{ST}) para cada *locus*. P é a probabilidade associada ao teste de diferenciação gênica (1) e genotípica (2), considerando-se uma estruturação da população em quatro unidades espaciais.

	INRA006	INRA011	INRA023	INRA026	INRA127	MAF209	MAF033	MAF045	MAF065	OARFCB128	OARFCB304
n	164	163	151	165	164	164	146	143	164	142	145
Alelos	4	3	5	4	7	4	4	5	4	3	4
h	0,66	0,58	0,73	0,75	0,66	0,39	0,52	0,63	0,26	0,60	0,52
p	0,578	0,284	0,387	0,440	0,025	0,867	0,736	0,808	0,999	0,145	0,827
F_{IS}	0,049	0,046	-0,024	-0,070	0,034	0,040	-0,006	-0,108	-0,096	0,044	0,126
F_{ST}	0,002	0,019	0,004	0,008	0,029	0,003	0,015	-0,002	0,008	-0,001	-0,001
P(1)	0,352	0,008	0,084	0,059	0,000	0,084	0,081	0,141	0,253	0,353	0,167
P(2)	0,402	0,013	0,059	0,060	0,000	0,036	0,052	0,094	0,213	0,406	0,247

Comparação por pares de unidades de população

O teste de diferenciação gênica, baseado sobre todos os *loci*, foi significativo para todos os pares de unidades de população (Lauze-VialaisN : 0,000 ; Lauze-VialaisS : 0,000 ; Lauze-Mascar : 0,008 ; VialaisN-VialaisS : 0,025 ; VialaisN-Mascar : 0,020 ; VialaisS-Mascar : 0,022), o que indica uma diferenciação entre essas unidades.

Pode-se notar ainda que as probabilidades são ainda mais baixas entre a Lauze e qualquer outra unidade do que entre as três outras unidades entre elas mesmas.

O teste de diferenciação genotípica revelou probabilidades mais baixas associadas à unidade Mascar (Lauze-Mascar : 0,008 ; VialaisS-Mascar : 0,008 ; VialaisN-Mascar : 0,080), sendo duas delas significativas.

Correlação entre distâncias genéticas e espaciais:

Utilizamos um teste de Mantel para comparar uma matriz de distâncias espaciais com uma matriz de distâncias genéticas entre as unidades de população. A matriz de distâncias espaciais foi composta pelas distâncias entre os pares de centros geométricos das unidades, calculados a partir da média aritmética de todas as localizações atribuídas à unidade em questão. A matriz de distâncias genéticas constituiu-se dos valores das distâncias genéticas entre pares de populações calculadas segundo Reynolds *et al.* 1983. Uma segunda matriz de distâncias genéticas, calculadas conforme Nei 1978 também foi comparada à matriz de distâncias espaciais. Em nenhum dos dois casos ficou demonstrada a correlação entre as matrizes (respectivamente $Z=255,19$; Coef. Pearson $r=0,490$; $p=0,31$ e $Z=347,02$; Coef. Pearson $r=0,442$; $p=0,144$), apesar da similaridade entre as árvores de classificação obtidas a partir das diferentes distâncias consideradas.

Atribuição de indivíduos a uma unidade de população

Para os 165 indivíduos que foram atribuídos a uma das quatro unidades de população a partir do local de captura, obtivemos 45,45 % atribuídos à mesma unidade pelo método da frequência (PAETKAU *et al.* 1995).

DISCUSSÃO

Comportamento espacial das fêmeas

A classificação hierárquica baseada nos índices de sobreposição espacial dos domínios vitais de 16 fêmeas sugeriu uma estruturação sócio-espacial da população em 3 unidades espaciais de fêmeas. Entretanto essa análise apresentou duas limitações: a área dos domínios espaciais foi muito variável, em função do número de localizações, e o efetivo de fêmeas com um número satisfatório de localizações para o cálculo da área dos domínios foi reduzido.

O cálculo do centro aritmético dos domínios vitais mostrou-se menos variável que o polígono da superfície dos domínios em função do número de localizações. Assim, com um menor número de localizações foi possível aumentar o efetivo de animais para 32 fêmeas. A classificação automática com base nas distâncias entre os centros aritméticos de domínios de diferentes fêmeas mostrou-se um método adequado para descrever as relações espaciais entre as fêmeas. Quando comparamos os resultados obtidos pelos dois métodos com as mesmas 16 fêmeas, a classificação baseada nas distâncias entre centros aritméticos de domínios revelou a mesma estruturação espacial que aquela feita a partir das sobreposições de domínios, a não ser por uma fêmea (Fan), que se destacou do grupo Mascar. Considerando-se as distâncias entre os centros aritméticos de domínios das 32 fêmeas, a classificação automática evidenciou uma nítida organização em três unidades, com cinco das fêmeas aparecendo isoladas, ao redor e à distância dessas unidades.

Os cálculos de sobreposição espacial, obtidos a partir do Mínimo Polígono Convexo, bem como a distância entre os centros aritméticos dos domínios vitais, não levam em conta a frequência com que cada indivíduo utiliza o espaço da área sobreposta e, portanto, não revelam a real probabilidade dos indivíduos se encontrarem. Por esse motivo, Smith & Dobson (1994), defenderam a utilização de valores de sobreposição ponderados. Nesse estudo, utilizou-se um método simples para gerar valores de sobreposição ponderados, a partir do conjunto de todas as

localizações obtidas para as 32 fêmeas, considerando-se a probabilidade de cada uma dessas fêmeas utilizarem cada um dos quadrantes em que foi dividida a área de estudo.

Uma nova classificação hierárquica, baseada nesse último critério, mostrou-se coerente com as classificações obtidas anteriormente, mas evidenciou uma possível divisão da unidade central (Vialais) em 2 unidades (Vialais N e Vialais S), com o isolamento de um par mãe-filha em uma zona intermediária e que sobrepõe parcialmente a essas duas unidades. Essa subdivisão da unidade do Vialais já pôde ser identificada na classificação baseada nas distâncias entre centros aritméticos, porém a um nível inferior ao que foi considerado relevante agrupamentos e com o par mãe-filha incluído na parte Norte do Vialais. Na realidade, essas duas unidades (Vialais N e Vialais S) são bastante sobrepostas uma à outra, o que explicaria essa variação de resultados conforme a metodologia empregada. Essa similaridade entre as classificações obtidas a partir de diferentes parâmetros reforça a confiabilidade dos resultados obtidos. Além disso, qualquer que seja o método utilizado, a estruturação da população de mouflons do Maciço do Caroux-Espinouse em unidades sócio-espaciais de fêmeas, conforme descrita anteriormente por Maublanc *et al* (1994), parece se confirmar. Entretanto, na ausência de barreiras geográficas que impeçam os animais de se movimentar, unidades vizinhas podem apresentar diferentes níveis de sobreposição espacial.

Esse tipo de subdivisão da população já foi descrito também para outras espécies de ovinos selvagens ou domésticos em estado selvagem (BOYCE *et al.* 1997, 1999; GRUBB & JEWELL 1966; RUBIN *et al.* 1998) . A população de *bighorn* de *Peninsular Range* mostrou-se fragmentada em diversas e estáveis unidades de população (RUBIN *et al.* 1998), mas a uma escala diferente daquela descrita no Maciço do Caroux-Espinouse. No entanto, Boyce *et al.* (1999) também identificou, a partir de classificações baseadas em índices de associação e distâncias entre centros aritméticos de domínios, subdivisões em três dessas unidades. Essa última subdivisão é muito similar àquela encontrada no Maciço do Caroux-Espinouse e está de acordo

com o conceito de "domínio vital de grupo" (do inglês *home range groups*) proposto por Geist (1971).

Grubb & Jewell (1966) também descreveu uma estruturação em "domínios vitais de grupos" em uma população de carneiros domésticos em estado selvagem; e esse tipo de estruturação, no entanto, foi atribuído, ao menos em parte, a uma redução da mobilidade natural dos indivíduos provocada por barreiras geográficas conseqüentes de atividades humanas, bem como a uma distribuição em "ilhas" dos recursos alimentares. Entretanto, na reserva de caça do Caroux-Espinouse, essa relação entre a estrutura sócio-espacial da população e a estrutura fitogeográfica do ambiente não ficou evidenciada.

O terceiro fator determinante para a estruturação da população que foi proposto por Grubb & Jewell (1966) é o gregarismo e a filopatria, característicos das fêmeas nos ovinos. As cordeiras permanecem longo tempo em companhia de suas respectivas mães e adquirem, por aprendizagem ou imitação, uma utilização do espaço muito similar à de suas mães (GRUBB & JEWELL 1966, KEY & MCIVER 1980, FESTA-BIANCHET 1986A, LAWRENCE & WOOD-GUSH 1988, LAWRENCE 1990). Segundo Festa-Bianchet (1991), após dez anos de estudo, nenhuma ovelha havia imigrado ou emigrado em seu local de estudo. Nós tivemos a oportunidade de monitorar um par mãe-filha que utilizou o mesmo domínio vital. Além disso, a mãe, ou a filha, de outras sete fêmeas monitoradas por rádio-telemetria, receberam marcas visuais. Suas visualizações posteriores indicaram que duas das filhas utilizaram o mesmo domínio da mãe pelo menos até os cinco anos de idade.

Associando dados de localização espacial a coeficientes de parentesco calculados a partir do pedigree de ovinos domésticos, Nituch *et al* (2008) descreveram associações mais estreitas entre indivíduos com maior coeficiente de parentesco. Seja nos carneiros domésticos ou selvagens, as fêmeas são observadas nos mesmo grupos que suas mães mais que o esperado durante o primeiro ano de vida (LAWRENCE 1990, FESTA-BIANCHET 1991) e mesmo até os três anos de idade, como foi observado em uma pequena população por Le Pendu *et al.* (1995). A perpetuação do comportamento espacial das fêmeas por diversas gerações, a partir da aprendizagem

com a mãe, favorece a formação de grupos mais estáveis e particularmente uma estruturação da população do tipo "domínio vital de grupo". Festa-Bianchet (1986a) não observou mudanças definitivas de grupo por parte de fêmeas, ainda que fêmeas de diferentes "domínios espaciais de grupos" pudessem se agrupar em domínios de inverno sobrepostos. Esse autor sugere que as fêmeas são capazes de reconhecer os indivíduos de seu próprio grupo e não querem permanecer em um outro grupo.

A capacidade de reconhecimento é muito difícil de ser demonstrada em animais. Mas experimentos realizados com carneiros domésticos revelaram que as cordeiras preferem indivíduos não aparentados que lhe sejam familiares a indivíduos não-familiares (COUTINHO-NETTO *et al.* 2003). O gregarismo das fêmeas adultas permite que as cordeiras também permaneçam juntas, podendo criar alguns laços sociais mais duradouros (GRUBB & JEWELL 1966). Esses autores assinalam que, provavelmente, diferentes famílias dividem um mesmo "domínio vital de grupo". Assim, os laços sociais não dependeriam necessariamente de laços de parentesco. Dessa forma, as associações entre fêmeas seriam influenciadas mais pela disponibilidade de parceiras do mesmo sexo que pelos laços de parentesco (BOYCE *et al.* 1999).

Comportamento espacial dos machos

Os três parâmetros utilizados na análise do comportamento dos machos levaram a resultados similares e/ou complementares. A distribuição das localizações permitiu uma melhor compreensão do deslocamento dos centros aritméticos dos domínios reprodutivos dos machos, revelando a verdadeira relação espacial entre os domínios em questão. Os índices de freqüentação das unidades de fêmeas indicaram, sobretudo, a relação entre um macho e cada unidade de fêmeas. Dessa forma, a variação desses parâmetros para um mesmo macho em anos diferentes nos permitiu inferir sobre as conseqüências de seu deslocamento. Notou-se, entretanto, uma maior variabilidade nos índices de freqüentação das unidades de fêmeas que nos dois outros parâmetros, visto que as unidades de fêmeas se sobrepõem umas às outras e que os índices de presença de fêmeas também são variáveis no interior das unidades.

O comportamento espacial dos machos mostrou-se mais variável e mais imprevisível que o comportamento das fêmeas. Cerca de metade dos machos (sete) monitorados por radiotelemetria durante mais de um ano mostrou-se fiel a seus respectivos domínios reprodutivos, independentemente da idade. Um desses machos foi filopátrico pelo menos até os quatro anos de idade.

Entre os sete machos considerados fiéis aos seus domínios reprodutivos, três (Kuh, Moz e Nin) mostraram uma forte estabilidade também em relação às unidades de fêmeas. Os outros quatro machos apresentaram algumas variações nos seus índices de freqüentação de unidades de fêmeas. Essas variações podem ser devidas à freqüentação de áreas comuns a duas unidades de fêmeas vizinhas (Tar) onde cada quadrante pode representar um “peso” diferente para cada unidade. A freqüentação da periferia das unidades (Mar), que são áreas menos freqüentadas pelas fêmeas monitoradas, também pode causar variação nos índices de freqüentação de unidades. O aumento da área do domínio levou ao menos um macho (Mal) a ocupar uma unidade vizinha. Enfim, o número de localizações parece influenciar a variação dos índices de freqüentação das unidades de fêmeas. O macho Lut parece ter domínios reprodutivos bastante sobrepostos, mas suas localizações (11 no primeiro ano e 17 durante o segundo) não foram assim tão sobrepostas. Seu número de localizações na periferia das unidades, maior no segundo ano, pode ter amplificado a variação observada de seus índices de freqüentação das unidades de fêmeas.

Entre os carneiros de Soay estudados por Grubb & Jewell (1966), os machos foram muito fiéis a seus domínios reprodutivos e se instalaram, em geral, nas proximidades de seu local de nascimento. Entretanto, a estabilidade espacial dos machos não mostrou-se tão forte quanto a das fêmeas e alguns machos podem dispersar, afastando-se do domínio de suas mães. Festa-Bianchet (1991) também observou, em *bighorn*, uma importante fidelidade dos machos a seus domínios reprodutivos durante vários anos sucessivos. Em *Peninsular Range*, alguns movimentos de *bighorns* machos entre unidades de população distintas foram observados durante, e também fora do período reprodutivo (RUBIN *et al.* 1998).

Os estudos realizados no Maciço do Caroux-Espinouse anteriormente descreveram os mouflons machos como filopátricos e muito fiéis aos seus domínios sazonais (DUBOIS *et al.* 1993, 1994a, 1996, DUBOIS & LE PENDU 1993). Dubois *et al.* (1996) reobservou vários machos adultos que tinham sido marcados quando ainda cordeiros e supôs que seus domínios reprodutivos recobririam seus domínios de nascimento. A fidelidade dos machos aos seus domínios de nascimento é difícil de analisar, pois nossa amostragem foi muito reduzida. Entretanto, os dados aqui apresentados sugerem que alguns machos, mas não todos, podem permanecer fiéis aos seus domínios de nascimento. Entre os cinco machos monitorados desde o primeiro ano de vida, três ficaram (ou voltaram no período reprodutivo) sobre seus domínios de nascimento pelo menos até o terceiro ano de vida (Lut e Mar) e mesmo até os cinco anos de idade (Nin). Os outros dois (Yva e Gan) dispersaram antes de completar dois anos de idade

Os machos, diferentemente das fêmeas, ocupam em geral dois domínios distintos: um durante o período reprodutivo e outro fora dele (DUBOIS & LE PENDU 1993, DUBOIS *et al.* 1993). Esse comportamento é atribuído ao processo de segregação sexual característico dessa espécie, bem como de outras espécies de ungulados (GONZALEZ 1985, FESTA-BIANCHET 1986b, BON *et al.* 1993, LE PENDU *et al.* 1995). Com o fim do período reprodutivo, ao menos uma parte dos machos abandona seus domínios reprodutivos em direção a um domínio não reprodutivo. A motivação para esse movimento pode ser atribuída, ao menos em parte, pela atração por parceiros de mesma categoria de sexo e idade que é manifestada pelos machos (BON 1991, BON *et al.* 1993). Assim, a tendência dos machos de seguir outros machos seria mais forte que sua tendência a permanecer no domínio ao qual ele se apegou (FESTA-BIANCHET 1986). Com o início do período reprodutivo, essa tendência se inverteria e a maioria dos machos retornaria a seus domínios de nascimento (DUBOIS & LE PENDU 1993).

Dubois *et al.* (1993, 1996), sugeriram que os domínios não reprodutivos dos mouflons machos do Caroux-Espinouse não respeitariam os limites das unidades descritas por Maublanc *et al.* 1994. Entretanto, durante o período reprodutivo, os

machos permaneceriam apegados e fiéis a uma dessas unidades, que se constituiriam, assim, em unidades de reprodução (PETIT *et al.* 1997a).

Mas, no presente estudo, se cerca da metade dos machos apresentou algum grau de filopatria a seus respectivos domínios reprodutivos, mais da metade desses domínios reprodutivos ultrapassaram os limites de uma única unidade sócio-espacial de fêmeas. Isso possibilitaria que, mesmo tendo sido considerados filopátricos, os machos poderiam estar reproduzindo-se com fêmeas de unidades sócio-espaciais distintas num mesmo período reprodutivo. Além disso, a outra metade dos machos estudados (seis) foi classificada como não-fiel ao domínio reprodutivo. Cinco machos (Yva, Son, Gan, Kin, Klu) apresentaram distâncias entre centros aritméticos de domínios reprodutivos sucessivos superiores a 1000 m, seus domínios reprodutivos sucessivos se sobrepuseram nada ou muito pouco e seus índices de freqüentação das unidades de fêmeas revelaram importantes variações de um ano a outro. O macho Ker apresentou uma distância entre os centros de seus domínios reprodutivos inferior a 1000 m (858 m). Entretanto, seu domínio reprodutivo deslocou-se em relação às unidades de fêmeas e também em relação ao domínio anterior, ao qual não houve nenhuma sobreposição.

Quando considerados todos os domínios reprodutivos dos machos, incluindo tanto aqueles monitorados por um único ano como aqueles com mais de um domínio, obtivemos um total de 58 domínios reprodutivos para 41 diferentes machos. Apenas 28 desses 58 domínios localizaram-se em uma única unidade de fêmeas, 25 sobrepuseram-se a pelo menos duas unidades ou sobre uma unidade e uma área externa às unidades e quatro domínios situaram-se completamente fora das unidades de fêmeas. Esses resultados revelam que os domínios reprodutivos de machos não correspondem propriamente às unidades de fêmeas e que o comportamento espacial dos machos é, portanto, relativamente independente daquele apresentado pelas fêmeas.

Implicações Genéticas

No Caroux-Espinouse, a filopatria das fêmeas, associada ao retorno de parte dos machos à sua área de nascimento para se reproduzir, torna possível o acasalamento

entre indivíduos aparentados. Poderíamos então esperar um aumento de consangüinidade no interior de cada uma das unidades de população.

Um estudo genético preliminar sugeriu que cada uma das unidades de população do maciço do Caroux-Espinouse corresponderia a uma unidade genética distinta, mas sem perda de heterozigose no interior de cada uma das unidades (PETIT 1994, PETIT *et al.* 1997). Aumentando o número de marcadores microsátélites utilizados e também o efetivo de mouflons incluídos no estudo, encontramos uma população em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os testes realizados indicaram uma estruturação genética da população coerente com a estruturação espacial encontrada. Os resultados são muito similares quando se considera uma estruturação em três ou em quatro unidades de população e, em ambos os casos, essas unidades mostraram-se panmíticas.

Na população de *bighorn* de *Peninsular Ranges*, uma parcela significativa da variação do ADN mitocondrial foi dividida entre as diferentes subpopulações, sugerindo uma estruturação matrilinear da população (BOYCE *et al.* 1999). Entretanto, a variabilidade genética se manteve, também no interior dessas subpopulações, o que levou esses autores a concluírem que, no interior das subunidades, a associação entre fêmeas se daria mais pela disponibilidade de parceiras do que por laços matrilineares. Outros autores concordam que não há formação de linhagens sociais nos mouflons (FESTA-BIANCHET 1991, LE PENDU *et al.* 1995) e em outros ovinos selvagens (LAWRENCE 1990).

Em mamíferos com sistema social do tipo fissão-fusão, cuja estrutura de grupo é menos evidente, a correlação entre proximidade genética e distância espacial entre pares de indivíduos também revelou estruturação a uma escala mais refinada (COLTMAN *et al.* 2003, HAZLITT *et al.* 2004). Os grupos de mouflons são instáveis dentro das unidades sócio-espaciais de fêmeas e o sistema de acasalamento é baseado na promiscuidade, com fêmeas podendo acasalar-se com diversos machos numa mesma estação reprodutiva (GIBSON & JEWEL 1982, HOGG 1987, JEWELL *et al.* 1986, GUILHEM *et al.* 1997). O status de dominância dos machos está diretamente relacionado com a idade (GUILHEM *et al.* 1997). Se o período de dominância for curto e

as oportunidades de acasalamentos com mãe e irmãs forem raras, então acasalamentos consangüíneos seriam a exceção (RALLS *et al* 1987). Assim, os acasalamentos entre ovinos selvagens ocorreriam de forma aleatória no interior das unidades de população, o que seria suficiente para explicar os coeficientes de consangüinidade próximos a zero no interior das unidades sócio-espaciais de fêmeas do Maciço do Caroux-Espinouse. Por outro lado, a diferenciação genética entre as unidades de fêmeas corresponderia a um certo grau de consangüinidade a nível de população, decorrente da filopatria das fêmeas e de uma parcela dos machos e explicaria o desequilíbrio de Hardy-Weinberg apresentado quando considerado o efetivo total da população.

Quando considerada a estruturação espacial da população, seja em três, seja em quatro unidades, todas as unidades revelaram-se panmíticas e em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Mas tanto as probabilidades associadas aos testes de diferenciação gênica quanto o F_{ST} indicaram uma estruturação genética da população coerente com a estrutura espacial. O teste de diferenciação gênica baseado sobre todos os *loci* foi significativo para todos os pares de populações, o que revela que existe uma diferenciação entre essas unidades de população. Quando consideradas três unidades, essas probabilidades são mais altas entre as unidades que mais se sobrepõem (Vialais e Mascar). Quando consideradas quatro unidades, as probabilidades são mais baixas entre a Lauze e qualquer outra unidade do que entre qualquer outro par envolvendo apenas as outras três unidades. Esses resultados são coerentes com os dados espaciais, uma vez que a unidade da Lauze tem taxas de sobreposição com o Vialais (ou Vialais N) inferiores às taxas de sobreposição entre os outros pares de unidades. Entretanto, não foi demonstrada uma correlação entre distâncias genéticas e espaciais entre as unidades. O pequeno tamanho amostral (quatro unidades), uma medida pouco precisa da distância espacial entre as unidades (distâncias entre centros aritméticos) e a sobreposição observada entre unidades vizinhas, provavelmente tenham comprometido a precisão desse resultado.

Os resultados aqui apresentados indicam uma estruturação da população de mouflons do Caroux-Espinouse. Vários estudos recentes vêm revelando estruturas

populacionais a uma escala local, em populações de diversas espécies de vertebrados (GUTIÉRREZ-ESPELETA *et al* 2000; TAPIO *et al* 2005; NUSSEY *et al* 2005; ARCHIE *et al* 2008; NITUCH *et al* 2008). Estudos teóricos e empíricos têm relacionado tal estruturação genética aos sistemas de acasalamento e aos padrões de dispersão (CHESSER 1991; SUGG *et al* 1996; DOBSON 1998). No Caroux-Espinouse, as fêmeas e parte dos machos mostraram-se filopátricos. Mas outra parcela de machos revelou um comportamento espacial independente dos limites das unidades sócio-espaciais identificadas. O fluxo gênico promovido por esses machos deveria manter a população geneticamente homogênea e a estruturação da população de mouflons do Caroux-Espinouse em unidades espaciais geneticamente distintas não deve ser considerada um resultado definitivo.

CONCLUSÃO

A população de mouflons do Caroux-Espinouse constituiu-se a partir de um pequeno número de animais, trazidos de diferentes locais e ali introduzidos. A diversidade genética encontrada nessa população pode ser resultado da diversidade de origens desses animais, tendo sido preservada a despeito do pequeno número de fundadores.

O sistema social dessa espécie caracteriza-se por um forte gregarismo das fêmeas, que são também filopátricas. Assim, o monitoramento das fêmeas permitiu a identificação de uma estruturação espacial da população em diferentes unidades. As análises genéticas realizadas também apontaram uma estruturação da população de mouflons do Caroux-Espinouse. O retorno dos machos ao local de nascimento no momento da reprodução, poderia contribuir para a diferenciação entre essas unidades de população. Mas, no Caroux-Espinouse, parte dos machos movimenta-se livremente, podendo se reproduzir em uma unidade diferente da sua unidade de nascimento, ou mesmo em mais de uma unidade. Se esses machos podem efetivamente promover um

fluxo gênico entre as unidades sócio-espaciais, a estruturação genética da população não seria esperada.

A elevada proporção de machos filopátricos encontrada na população de mouflons do Caroux-Espinouse não é suficiente para explicar a estruturação genética sugerida pelas análises aqui realizadas. Outras análises podem ser realizadas buscando-se a confirmação dos resultados aqui apresentados. Essas análises podem, por exemplo, dar mais ênfase ao grau de parentesco. A utilização de marcadores mitocondriais também permitiria inferir sobre o real papel do comportamento das fêmeas na estruturação da população. Estudos comparando o sucesso reprodutivo de machos dispersores e filopátricos também podem ajudar a esclarecer as origens da estruturação genética da população em questão.

O presente estudo não confirma de maneira incontestável a estruturação da população de mouflons do Caroux-Espinouse. Mas outros trabalhos vêm descrevendo estruturações a uma escala geográfica local em populações selvagens de diversas espécies. O estudo do comportamento sócio-espacial dos animais, envolvendo a utilização de espaço, os agrupamentos sociais, o binômio filopatria-dispersão, os sistemas de acasalamento e suas conseqüências sobre a estruturação genética das populações ganha assim importância entre os aspectos que devem nortear as ações para a manutenção e conservação das espécies selvagens.

REFERÊNCIAS

ARCHIE, E. A., MALDONADO, J. E., HOLLISTER-SMITH, J.A., POOLE, J. H., MOSS, C. J., FLEISCHER, R. C., ALBERTS, S. C. Fine scale population genetic structure in a fission-fusion society. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 2666-2679. 2008.

AUVRAY, F. Le Massif du Caroux-Espinouse. **Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse**, v. 59, p. 11-14. 1982.

AUVRAY, F. **Recherches sur l'éco-éthologie du Mouflon (*Ovis ammon musimon*, Schreber 1782) dans le massif du Caroux-Espinouse (Hérault) en vue de définir de nouveaux sites d'accueil**. 1983. 175 f. Thèse de Doctorat -Université des Sciences et Techniques du Languedoc, Montpellier.

BANCROFT, D.R., PEMBERTON, J.M., KING, P. Extensive protein and microsatellite variability in an isolated, cyclic ungulate population. **Heredity**, v. 74, p. 326-336. 1995.

BARENDSE, W., ARMITAGE, S. M., KOSSAREK, L. M. SHALOM, A., KIRKPATRICK, B. W., RYAN, A. M. CLAYTON, D., LI, L., NEIBERGS, H. L., ZHANG, N. GROSSE, W. M., WEISS, J., CREIGHTON, P., MCCARTHY, F., RON, M., TEALE, A. J., FRIES, R., MCGRAW, R. A., MOORE, S. S., GEORGES, M., SOLLER, M., WOMACK, J. E., HETZEL, D. J. S. A genetic linkage map of the bovine genome. **Nature Genetics**, v. 6, p. 227-235. 1994.

BARTON, N. H. The probability of establishment of an advantageous mutation in a subdivided population. **Genetics Research**, v. 50, p. 35-40. 1987.

BARTON, N. H. The genetic consequences of dispersal. In: STENSETH, N. C., LIDICKER, JR W. Z., (Eds.) **Animal Dispersal – Small mammals as model**. London: Chapman & Hall. 1992, p. 37-59.

BELKHIR, K., P BORSA. L. CHIKHI. **GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations**. 2000. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000. Université de Montpellier II, Montpellier.

BIDEAU, E., GERARD, J.-F., VINCENT, J. P., MAUBLANC, M.-L. Effects of age and sex on space occupation by European roe deer. **Journal of Mammalogy**, v. 74, n. 3, p. 745-751. 1993.

BIDEAU, E., VINCENT, J. P., MAUBLANC, M.-L., GONZALEZ, G. Dispersion chez le jeune chevreuil (*Capreolus capreolus* L.) : une étude sur une population en milieu forestier. **Acta Oecologica-Oecologica Applied**, v. 8, p. 135–148. 1987.

BOICHARD, D., LE ROY, P., LEVEZIEL, H., ELSEN, J.-M. Utilisation des marqueurs moléculaires en génétique animale. **INRA Productions Animales**, v. 11, n. 1, p. 67-80. 1998.

BON, R. **Trajectoires sociales chez le Mouflon de Corse : rôle des processus d'attachement dans la sociogénèse**. 1991. 85 f + anexos. Thèse de Doctorat - Université Paul Sabatier, Toulouse.

BON, R., BADIA, J., MAUBLANC, M.-L., RECARTE, J. M. Social grouping dynamics ou Mouflon (*Ovis ammon*) during rut. **Z. Säugetierkunde**, v. 58, p. 294-301. 1993

BON, R., CAMPAN, R. Social tendencies of the Corsican Mouflon *Ovis ammon* musimon in the Caroux-Espinouse Massif (South of France). **Behavioural Processes**, v. 19, p. 57-78. 1989.

BON, R., CUGNASSE, J. M., DUBRAY, D., HOUARD, P.G.T., RIGAUD, P. Le Mouflon de Corse. **Revue d'Écologie (la Terre et la Vie)**, v. 6, p. 67-110. 1991.

BONHOMME, F., BOURSOT, P., DALLAS, J., et TABERLET, P. Les marqueurs moléculaires du flux génique et de la structuration spatiale. In: J. M. LEGAY, R. BARBAULT, (Ed.) **La révolution technologique en écologie**. Paris: Masson. 1995, p. 89-107.

BOURGOIN, G. **Etude des variations spatio-temporelles de l'activité et de l'utilisation des ressources par les herbivores. L'exemple du mouflon méditerranéen (*Ovis gmelini musimon* x *Ovis* sp.) et du chevreuil (*Capreolus capreolus*)**. 2008. 217 f. Thèse de Doctorat - Université Claude Bernard – Lyon 1.

BOYCE, W. M., HEDRICK, P. W., MUGGLI-COCKETT N.E., KALINOWSKI S., PENEDO M.C.T., RAMEY R.R. Genetic variation of major histocompatibility complex and microsatellite loci: a comparison in bighorn sheep. **Genetics**, v. 145, p. 421-433. 1997.

BOYCE, W. M., RAMEY, R. R., RODWELL, T. C., RUBIN, E. S., SINGER, R. S. Population subdivision among desert bighorn sheep (*Ovis canadensis*) ewes revealed by mitochondrial DNA analysis. **Molecular Ecology**, v. 8, p. 99-106. 1999.

BRUFORD, M. W., WAYNE, R. K. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Current Opinion in Genetics & Development**, v. 3, p. 939-943. 1993.

BUNNELL, F. L., HARESTAD, A. S. Dispersal and dispersion of black-tailed deer: models and observations. **Journal of Mammalogy**, v.64: p. 201-209. 1983

BUCHANAN, F. C., CRAWFORD, A. M. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF 209 locus. **Animal Genetics**, v. 23, p. 183. 1992a.

BUCHANAN, F. C., CRAWFORD, A. M. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF 33 locus. **Animal Genetics**, v. 23, p. 186. 1992b.

BUCHANAN, F. C., CRAWFORD, A. M. Ovine microsatellites OarFCB11, OarFCB128, OarFCB193, OarFCB266, and OarFCB304. **Animal Genetics**, v. 24, p. 145. 1993.

BUCHANAN, F. C., LITTLEJOHN, R. P., GALLOWAY, S. M., CRAWFORD, A. M. Microsatellites and associated repetitive elements in the sheep genome. **Mammalian Genome**, v. 4, p. 258-264. 1993.

BUCHANAN, F. C., SWARBRICK, P. A., CRAWFORD, A. M. Ovine dinucleotide repeat polymorphism at the MAF 65 locus. **Animal Genetics**, v. 23, p. 85. 1991.

BUNNELL, F. L., HARESTAD, A. S. Dispersal and dispersion of black-tailed deer: models and observations. **Journal of Mammalogy**, v. 64: p. 201-209. 1983

CEDERLUND, G. N., SAND, H. K. G. Dispersal of subadult moose (*Alces alces*) in nonmigratory population. **Canadian Journal of Zoology**, v. 70, p. 1309-1314. 1992.

CEDERLUND, G., SANDEGREN, F., LARSSON, K. Summer movements of female moose and dispersal of their offspring. **Journal of Wildlife Management**, v. 51, p. 342-352. 1987.

CHAVERRI, G., M. GAMBARRIOS, AND T. H. KUNZ. Range overlap and association patterns in the tent-making bat *Artibeus watsoni*. **Animal Behaviour**, v. 73, p. 157–164. 2007.

CHESSER, R. K., Gene diversity and female philopatry. **Genetics**, v. 127, p. 437-447. 1991.

CHESSER, R. K., REUTERWALL, C., RYMAN, N. Genetic differentiation of Scandinavian moose *Alces alces* populations over short geographical distances. **Oikos**, v. 39, p. 125-130. 1982.

CHESSER, R. K., RYMAN, N. Inbreeding as a strategy in subdivided populations. **Evolution**, v. 40, p. 616-624. 1986.

CLARKE, P. J., EVANS, F. C. Distance to nearest neighbor as a measure of spatial relationships in populations. **Ecology**, v. 35, n. 4, p. 445-453. 1954.

CLUTTON-BROCK, T. H. Mammalian mating systems. **Proceedings of the Royal Society London**, v. B 236, p. 339-372. 1989.

CLUTTON-BROCK, T.H. & ALBON, S.D. **Red Deer in the Highlands**. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1989. 260 p.

CLUTTON-BROCK, T. H., ALBON, S. D., GIBSON, R. M., GUINNESS, F. E. **Red deer: behaviour and ecology of two sexes**. Chicago: University of Chicago Press, 1982. 378 p.

COCKBURN, A., Habitat heterogeneity and dispersal: environmental and genetic patchiness. *In* In: STENSETH, N. C., LIDICKER, JR W. Z., (Eds.) **Animal Dispersal – Small mammals as model**. London: Chapman & Hall. 1992, p. 65-95.

COLTMAN, D. W., PILKINGTON, J. G. & PEMBERTON, J. M. Fine-scale genetic structure in a free-living ungulate population. **Molecular Ecology**, v. 12, p. 733—742. 2003:

CORTI, R., CUGNASSE, J. M. and DUBRAY, D. 1993. Le Mouflon de Corse. **Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse**, v. 185: notes techniques, fiche n° 23 (2ème édition révisée), 4 p.

COSSE, M. **Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis* – Pautas para su conservación.** 2010. 191 p. Tesis para acceder al Doctorado – Universidad de La Republica – Uruguay.

COUTINHO-NETTO, C. R. M, PARANHOS DA COSTA. M. J. R. P., NETTO, N. T., GERARD, J.-F., GOULARD. M, BON, R. Are lambs able to discriminate familiar from unfamiliar peers? **Revista de Etologia**, v. 5, p. 91-101. 2003.

CRANSAC, N., VALET, G., CUGNASSE, J.-M., RECH, J. Seasonal diet of mouflon (*Ovis gmelini*): comparison of population sub-units and sex-age classes. **Revue d'Écologie (la Terre et la Vie)**, v. 52, p. 21-36. 1997.

CROOK, J. H., ELLIS, J. E., GOSS-COSTARD, J. D. Mammalian social systems: structure and function. **Animal Behaviour**, v. 24, p. 261-274. 1976.

CUGNASSE, J. M. La réalisation du plan de chasse au mouflon dans le massif du Caroux – saison 1973-74 à 1980-81. **Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse**, v. 59, p. 28-31. 1982.

CUGNASSE, J. M. Résultats de l'enquête sur le Mouflon de Corse en France : statut et perspectives d'avenir. **Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse**, v. 182, p. 8-17. 1993.

CUGNASSE, J.-M. Révision taxonomique des mouflons des îles méditerranéennes. **Mammalia**, v. 58, p. 507-512. 1994.

CUGNASSE, J. M., GARCIA, M. La capture de mouflons par enclos-piège : bilan technique de 8 années d'experimentation dans la Réserve Nationale de Chasse du Caroux-Espinouse. **Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse**, v. 59, p. 20-23. 1982.

CUGNASSE, J. M., GARCIA, M., VEYRAC, T. Contribution à l'étude de la biologie de la reproduction du mouflon (*Ovis ammon musimon*), par examens post-mortem, dans le massif du Caroux-Espinouse. **Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse**, v. 89, p. 33-35. 1985.

CUGNASSE, J. M., HOUSSIN, H. Acclimatation du mouflon en France : la contribution des réserves de l'Office national de la chasse. **Bulletin Mensuel de l'Office National de la Chasse**, v. 183, p. 26-37. 1993.

DOBSON, F. S. Breeding groups and gene dynamics in a socially structured population of prairie dogs. **Journal of Mammalogy**, v. 79, p. 671-680. 1998

DUBOIS, M. Dynamique de l'occupation de l'espace du Mouflon dans le massif du Caroux-Espinouse. **Bulletin SFECA**, Tome 5, n.1, p. 77-82. 1990.

DUBOIS, M. **Autoréférence et investissement dans l'environnement de l'animal. Approche psycho-éthologique des divergences sexuelles du comportement sociospatial du mouflon.** 1993. 138 f. + annexes. Thèse de Doctorat - Université Paul Sabatier, Toulouse.

DUBOIS M., BON R., MAUBLANC M.-L. Dispersion patterns among ewes of Corsican mouflon: preponderance of age effect and proximate influences. **Applied Animal Behaviour Sciences**, v. 42, p. 29-40. 1994a.

DUBOIS M., GERARD J. F., VINCENT, J. P. Areas of concentrated use within seasonal ranges of Corsican mouflons: Importance of psychophysiological and ecological contexts in their modulation. **Behavioral Processes**, v. 32, p. 163-172. 1994b.

DUBOIS M., KHAZRAÏE K., GUILHEM C., MAUBLANC M.-L., LE PENDU Y., Philopatry in mouflon rams during the rutting season: Psycho-ethological determinism and functional consequences. **Behavioral Processes**, v. 35, p. 93-100. 1996.

DUBOIS M., LE PENDU Y. 1993. Dispersion and spatial attachment of mouflon rams. In: International Congress on Applied Ethology, 1993, Berlin. **Proceedings of the International Congress on Applied Ethology**, 1993. p. 399-402.

DUBOIS M., QUENETTE P.-Y., BIDEAU E., MAGNAC M.-P. Seasonal range use by European mouflon rams in medium altitude mountains. **Acta Theriologica**, v. 38, n.2, p. 185-198. 1993.

EDWARDS, A., CIVITELLO, A., HAMMOND, H. A., CASKEY, C. T. DNA typing and genetic mapping with trimeric and tetrameric tandem repeats. **American Journal of Human Genetics**, v. 49, p. 746-756. 1991.

ENDLER, J. A. **Geographic Variation, Speciation and Clines**. Princeton, New Jersey: Princeton University Press, 1977. 246 p.

ENGEL, S. A., LINN, R. A., TAYLOR, J. F., DAVIS, S. K. Conservation of microsatellite loci across species of Artiodactyls: implications for population studies. **Journal of Mammalogy**, v. 77, p. 504-515. 1996.

FALIU, L., CUGNASSE, J. M., AUVRAY, F., ORLIAC, D., RECH, J. Le régime alimentaire du Mouflon de Corse (*Ovis amon musimon*) dans le massif du Caroux-Espinouse d'après l'analyse du contenu de 125 panses. **Revue de Médecine Vétérinaire**, v. 141, p. 545-556. 1990.

FESTA-BIANCHET, M. Seasonal dispersion of overlapping mountain sheep ewe groups. **Journal of Wildlife Management**, v. 50, n.2, p. 325-330. 1986a.

FESTA-BIANCHET, M. Site fidelity and seasonal range use by bighorn rams. **Canadian Journal of Zoology**, v. 64, p. 2126-2132. 1986b.

FESTA-BIANCHET, M. The social system of bighorn sheep: grouping patterns, kinship and female dominance rank. **Animal Behaviour**, v. 42, p. 71-82. 1991.

GAINES, M. S., MCCLENAGHAN, L. R. Dispersal in small mammals. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 11, P. 163-196. 1980.

GARDNER, E. J., SNUSTAD, D. P. **Genética**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan , 1986. 497 pp. (Tradução do original: Principles of Genetics. John Willey & Sons, 1984).

GAREL, M. **Conséquences de la chasse et des contraintes environnementales sur la démographie des populations d'ongulés. L'exemple du mouflon méditerranéen (*Ovis gmelini musimon* × *Ovis* sp.) en France et de l'élan (*Alces alces*) en Norvège**. 2006. Thèse de Doctorat - Université Claude Bernard – Lyon I, Lyon, France.

GEIST, V. **Mountain sheep: a study in behavior and evolution**. Chicago: Univ. Chicago Press, 1971. 383 p.

GIBSON, R. M., JEWELL, P. A. Semen quality, female choice and multiple mating in domestic sheep: a test of Triver's sexual competence hypothesis. **Behaviour**, v. 80, p. 9-31. 1982.

GONZALEZ, G. Les groupes sociaux d'isards et de mouflons, au massif du Carlit (Pyrénées Orientales). **Gibier Faune Sauvage**, v. 4, p. 85-102. 1985

GREENWOOD, P. J. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. **Animal Behaviour**, v. 28, p. 1140-1162. 1980.

GRUBB P., JEWELL P.A. Social grouping and home range in feral Soay sheep. **Symposia of the Zoological Society of London**, v. 18, p. 179-210. 1966.

GUILHEM, C. **Sociogenèse et organisation sociale chez le mouflon méditerranéen (*Ovis gmelini*) : une approche structuraliste**. 2000. 140 f. + anexos. Thèse de Doctorat - Université Paul Sabatier, Toulouse.

GUILHEM, C., BIDEAU, E., MECHKOUR, F., BOISARD, J. J. Sexual behaviour, aggressive interactions and age in male Mediterranean mouflon (*Ovis gmelini*). In: 1st International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals. 1997. **Proceedings of the 1st International Symposium on Physiology and Ethology of Wild and Zoo Animals. Z. Säugetierk**, suppl. 2, p. 83-87.

GUO, S. W., THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372. 1992.

GUTIÉRREZ-ESPELETA, G. A., KALINOWSKI, S. T., BOYCE, W. M., HEDRICK, P. W. Genetic variation and population structure in desert bighorn sheep: implications for conservation. **Conservation Genetics**, v. 1, p. 3-15. 2000

HALPIN, Z. T. Natal dispersion and the formation of new social groups in a newly established town of black-tailed prairie dogs (*Cynomys ludovicianus*). In: CHEPKO-SADE, D., HALPIN, Z. T. (Eds.). **Mammalian Dispersal Patterns – The effects of social structure on population genetics**. Chicago: The University of Chicago Press. 1987, p. 104-118.

HANSKI, I., GILPIN, M. Metapopulation dynamics: brief history and conceptual domain. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 42, p. 3-16. 1991.

HARRIS, S., CRESSWELL, W. J., FORDE, P. G., TREWHELLA, W. J., WOOLARD, T., WRAY, S. Home-range analysis using radio-tracking data – a review of problems and techniques particularly as applied to the study of mammals. **Mammal Review**, v. 20, p. 97-123. 1990.

HARTL, D. L. A Primer of Population Genetics, 2nd Edition. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc. 1988. 305 p.

HARTL, G. B., HEWISON, A. J. M., APOLLONIO, M., KURT, F. and WIEHLER, J. Genetics of European roe deer. In: ANDERSEN, R., DUNCAN, P., LINNELL, J. D. C. (Eds). **The European Roe Deer: The Biology of Success**. Oslo - Stockholm - Copenhagen - Oxford – Boston: Scandinavian University Press. 1998, p. 71-90.

HAZLITT, S. L., ELDRIDGE, M. D. B., GOLDIZEN, A. W. Fine-scale spatial genetic correlation analyses reveal strong female philopatry within a brush-tailed rock-wallaby colony in southeast Queensland. **Molecular Ecology**, v. 13, 3621–3632. 2004.

HEWISON, A. J. M., PETIT, E., AULAGNIER, S. & CROAU-ROY, B. The application of highly polymorphic DNA markers (microsatellites) to problems of mouflon genetics. In: International Symposium on Mediterranean mouflon, 2., 1996. Nicosia-Cyprus. **Proceedings for the 2nd International Symposium on Mediterranean mouflon**. Nicosia-Cyprus, p. 101-149.

HEWISON, A. J. M., VINCENT, J. P. & REBY, D. Social organisation of European roe deer. In: ANDERSEN, R., DUNCAN, P., LINNELL, J. D. C. (Eds). **The European Roe Deer: The Biology of Success**. Oslo - Stockholm - Copenhagen - Oxford – Boston: Scandinavian University Press. 1998, p. 189-219.

HIRTH, D. H. Social behavior of white-tailed deer in relation to habitat. **Wildlife Monographs**, v. 53, 55 p. 1977.

HOGG, J. T. Intrasexual competition and mate choice in Rocky Mountain bighorn sheep. **Ethology**, v. 75, p. 119-144. 1987

HÖLZENBEIN, S., MARCHINGTON, R. L. Spatial integration of maturing-male white-tailed deer into the adult population. **Journal of Mammalogy**, v. 73, n.2, p. 326-334. 1992.

IANNUCELLI N, WOLOSZYN N, ARHAINX J, GELLIN J, and MILAN D, GEMMA: a database to manage and automate microsatellite genotyping. In: International Conference on Animal Genetics, 25., 1996, Tours, France. **Proceedings 25th International Conference on Animal Genetics. Animal Genetics**, v. 27, n. 2. 1996, p. 88.

JARMAN M.V. Attachment to home range in impala. **East African Wildlife Journal**, v. 8, p. 198-200. 1970.

JEWELL, P. A., HALL, S. J. B., ROSENBERG, M. M. Multiple mating and siring success during natural oestrus in the ewe. **Journal of reproduction & Fertility**, v. 77, p. 81-89 1986

KEMP, S. J., BREZINSKY, L., TEALE, A. J. A panel of bovine, ovine and caprine polymorphic microsatellites. **Animal Genetics**, v. 24, p. 363-365. 1993.

KENWARD R. **Wildlife Radio Tagging**. London: Academic Press, 1987. 222 p.

KEY C., McIVER R. M. The effects of maternal influences on sheep: breed differences in grazing, resting and courtship behaviour. **Applied Animal Ethology**, v. 6, p. 33-48. 1980.

KRAFT, H. Domestic sheep. In: **Grzimek's Encyclopedia of Mammal**. New York: McGraw-Hill Publishing Company, 1990, v. 5, p. 549-550.

KÜHN, R., ANASTASSIADIS, C., PIRCHNER, F. Transfer of bovine microsatellites to the cervinae (*Cervus elaphus*). **Animal Genetics**, v. 27, p. 199-201. 1996.

KURT, F., HARTL, G. B., VÖLK, F. Breeding strategies and genetic variation in European roe deer *Capreolus capreolus* populations. **Acta Theriologica**, v. 38, Suppl. 2, p. 187-194. 1993.

LACY, R. C. Loss of genetic diversity from managed populations: Interacting effects of drift, mutation, immigration, selection, and population subdivision. **Conservation Biology**, v. 1(2), p. 143-158. 1987.

LAUVERGNE, J.-J., DENIS, B., THERET, M. Hybridation entre un Mouflon de Corse (*Ovis ammon musimon* Schreber, 1872) et des brebis de divers génotypes : gènes pour la coloration pigmentaire. **Annales de génétique et de sélection animale**, v. 9, p. 151-161. 1977.

LAWRENCE A. B. Mother-daughter and peer relationships of Scottish hill sheep. **Animal Behaviour**, v. 39, p. 481-486. 1990.

LAWRENCE A. B., WOOD-GUSH D. G. M. Home range behaviour and social organization of Scottish Blackface sheep. **Journal of Applied Ecology**, v. 25, p. 25-40. 1988.

LE PENDU Y., BRIEDERMANN L., GERARD J.-F., MAUBLANC M.-L. Inter-individual associations and social structure of a mouflon population (*Ovis orientalis musimon*). **Behavioural Processes**, v. 34, p. 67-80. 1995.

LEGENBRE P., VAUDOR A. **The R Package: Multidimensional analysis, spatial analysis - CMS (IBM), VMX (VAX) and Macintosh Versions**. 1991. Université de Montreal. 142 p.

LEVINS, R., Extinction. In: GESTERNHABER, M. (Ed.), **Some Mathematical Problems in Biology**. Providence, Rhode Island: American Mathematical Society. 1970, p. 77-107.

LIBERG, O., JOHANSSON, A., ANDERSEN, R. & LINNELL, J. D. C. Mating system, mating tactics and the function of male territoriality in roe deer. In: ANDERSEN, R., DUNCAN, P., LINNELL, J. D. C. (Eds). **The European Roe Deer: The Biology of Success**. Oslo - Stockholm - Copenhagen - Oxford – Boston: Scandinavian University Press. 1998, p.221-256.

LIDICKER, W. Z. and N. C. STENSETH. 1992. To disperse or not to disperse: who does it and why? In: STENSETH, N. C., LIDICKER, JR W. Z., (Eds.) **Animal Dispersal – Small mammals as model**. London: Chapman & Hall. 1992, p. 21-36.

LINNELL, J. D. C., WAHLSTRÖM, K. and GAILLARD, J. M. From birth to independence: Birth, growth, neonatal mortality, hiding behaviour and dispersal. In: ANDERSEN, R., DUNCAN, P., LINNELL, J. D. C. (Eds). **The European Roe Deer: The Biology of Success**. Oslo - Stockholm - Copenhagen - Oxford – Boston: Scandinavian University Press. 1998, p.257–283.

LITT, M., LUTY, J. A. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 397-401. 1989.

LOUIS, E. J., DEMPSTER, E. R. An exact test for Hardy-Weinberg and multiple alleles. **Biometrics**, v. 43, p. 805-811. 1987.

LUTY, J. A., GUO, Z., WILLARD, H. F., LEDBETTER, D. H., LEDBETTER, S., LITT, M. Five polymorphic microsatellite VNTRs on the human X chromosome. **American Journal of Human Genetics**, v. 46, p. 776-783. 1990.

MARTINETTO, K., CUGNASSE, J. M., GILBERT, Y. La cohabitation du mouflon Méditerranéen (*Ovis gmelini musimon* X *Ovis sp.*) et des touristes dans le massif du Caroux-Espinouse (Hérault). **Gibier Faune Sauvage, Game Wildlife**, v.15, p. 905-919. 1998.

MARTINETTO, K., CUGNASSE, J. M. Sensibilité au dérangement lié à la randonnée et à la présence de chien chez le mouflon Méditerranéen. In **Forum des gestionnaires – Activités de pleine nature : comment concilier fréquentation et préservation**, 5. 1999. Paris, p. 21-27.

MASSOL, G. 1991. **La Réserve Nationale de Faune du Caroux-Espinouse**. Lamalou-les-Bains: Massol Ed. 203p.

MATHEWS, N. E., PORTER, W. F., Effect of social structure on genetic structure of free-ranging white-tailed deer in the Adirondack Mountains. **Journal of Mammalogy**, v. 74, p. 33-43. 1993.

MAUBLANC, M.-L., CIBIEN, C., GAILLARD, J. M., MAIZERET, C., BIDEAU, E., VINCENT, J.-P. Le chevreuil. **Revue d'Écologie (la Terre et la Vie)**, v. 6, p. 155-183. 1991.

MAUBLANC, M.-L., DUBOIS, M., BON, R., LE PENDU, Y. Spatial organization of a corsican mouflon population (*Ovis ammon musimon*) determined by individual space use. In: International Union of Game Biologists congress, 21., 1994, Halifax, Canada. **Proceedings International Union of Game Biologists XXI congress**, Halifax, Canada. 1994, p. 343-347.

MAUBLANC, M.-L., DUBOIS, M., TEILLAUD, P. & CUGNASSE, J. M.. Effects of recreational and hunting activities on the Mouflon (*Ovis ammon musimon*) population of Caroux-Espinouse. In SPITZ, F., JANEAU, G., GONZALEZ, G., AULAGNIER, S. (Eds.) **Ongulés / Ungulates 91**. Toulouse: S.F.E.P.M., I.R.G.M. 1992, p. 611-615.

MCSHEA, W. J., MADISON, D. M. Alternative approaches to the study of small mammal dispersal: insights from radiotelemetry. In: STENSETH, N. C., LIDICKER, JR W. Z., (Eds.) **Animal Dispersal – Small mammals as model**. London: Chapman & Hall. 1992, p. 319-332.

MOORE, S. S., SARGEANT, L. L., KING, T. J., MATTICK, J. S., GEORGES, M., HETZEL, D. J. S. The conservation of dinucleotide micro satellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. **Genomics**, v. 10, p. 654-660. 1991.

MUELLER, U. G., WOLFENBARGER L. L. AFLP genotyping and fingerprinting. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 14, p. 389-394. 1999.

NAGYLAKI, T. Fixation indices in subdivided populations. **Genetics**, v. 148, p. 1325-1332. 1998.

NAITANA, S., LEDDA, S., COCCO, E., MANCA, L., MASALA, B. Haemoglobin phenotypes of the wild European mouflon sheep living on the island of Sardinia. **Animal Genetics**, v. 21, p. 67-75. 1990.

NEI, M. F-statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. **Annals of Human Genetics**, v. 41, p. 225-233. 1977.

NEI, M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. **Genetics**, v. 89, p. 583-590. 1978.

NELSON, M. **Molecular Evolutionary Genetics**. New York: Columbia University Press. 1987. 512 p.

NELSON M. E., MECH L. D. Home range formation and dispersal of deer in northeastern Minnesota. **Journal of Mammalogy**, v. 65, p. 567-575. 1984.

NELSON M. E., MECH L. D. Demes within a northeastern Minnesota deer population. In: CHEPKO-SADE, D., HALPIN, Z. T. (Eds.). **Mammalian Dispersal Patterns – The effects of social structure on population genetics**. Chicago: The University of Chicago Press. 1987, p. 27-40.

NGUYEN, T. C., BUNCH, T. D. Blood groups and evolutionary relationships among domestic Sheep (*Ovis aries*), domestic Goat (*Capra hircus*), Aoudad (*Ammotragus lervia*) and european Mouflon (*Ovis musimon*). **Annales de Génétique et de Sélection Animale**, v. 12, p. 169-180. 1980.

NITUCH, L. A., SCHAEFER, J. A., MAXWELL, C. D. Fine-scale spatial organization reflects genetic structure in sheep. **Ethology**, v. 114, p. 711-717. 2008.

NUSSEY, D. H., COLTMAN, D. W., COULSON, T., KRUUK, L. E. B., DONALD, A., MORRIS, S. J., CLUTTON-BROCK, T. H., PEMBERTON, J. Rapidly declining fine-scale spatial genetic structure in female red deer. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 3395-3405. 2005.

OTTO, P. G. **Genética Básica para Veterinária – 3a Edição**, São Paulo: Editora Roca. 2000. 299 pp.

PAETKAU, D., CALVERT, W., STIRLING, I., STROBECK, C. Microsatellite analysis of population structure in Canadian polar bears. **Molecular Ecology**, v. 4, p. 347-354. 1995.

PARIETTI, C. **Structure génétique de la population de Mouflon méditerranéen (*Ovis gmelini*) introduite dans le massif du Caroux-Espinouse**. 1997. 28 f. Dissertação (Diplôme des Études Approfondés - D. E. A. - "Adaptation et survie en environnements extrêmes"), Université Claude Bernard, Lyon,

PÉPIN L., AMIGUES, Y., LEPINGLE, A., BERTHIER, J.-L., BENSALD, A., VIAMAN, D. Sequence conservation of microsatellites between *Bos taurus* (cattle), *Capra hircus* (goat), and related species. Examples of use in parentage testing and phylogeny analysis. **Heredity**, v. 74, p. 53-61. 1995.

PÉREZ-BARBERÍA, F. J., YEARSLEY, J. M. Sexual selection for fighting skills as a driver of sexual segregation in polygynous ungulates: an evolutionary model. **Animal Behaviour**, v. 80, p. 745-755. 2010.

PÉREZ-ESPONA, S., PÉREZ-BARBERÍA, F. J., JIGGINS, C. D., GORDON, I. J., PEMBERTON, J. M. Variable extent of sex-biased dispersal in a strongly polygynous mammal. **Molecular Ecology**, v. 19, p. 3101–3113. 2010

PETIT, E. **Fragmentation et Structure génétique d'une population d'ongulé philopatric : le Mouflon méditerranéen (*Ovis gmelini*)**. 1994. 47 f. Dissertação (Diplôme des Études Approfondés - D. E. A. - "Sciences du Comportement et Neurosciences Cognitives"). Université Paul Sabatier, Toulouse.

PETIT, E., AULAGNIER, S., BON, R., DUBOIS, M., CROUAU-ROY, B. Genetic structure of populations of the mediterranean mouflon (*Ovis gmelini*). **Journal of Mammalogy**, v. 78, p. 459-467. 1997a.

PETIT, E., AULAGNIER, S., VAIMAN, D., BOUISSOU, C., CROUAU-ROY, B. Microsatellite variation in an introduced mouflon population. **The Journal of Heredity**, v. 88, p. 517-520. 1997b.

PFEFFER P. Le mouflon de Corse. Position systématique, écologie et éthologie comparées. **Mammalia**, v. 31, p. 1-262. 1967.

PFEFFER P., GENEST, H. Biologie comparée d'une population de mouflons de Corse (*Ovis ammon musimon*) du Parc Naturel du Caroux. **Mammalia**, v. 33, p. 165-192. 1969.

PIRY, S., J. M. CORNUET. **GeneClass: A Program for Assigantion and Exclusion Using Molecular Markers. Version 1.0**, 1999. GBGP/INRA, Montpellier, France.

POPLIN, F. Origine du Mouflon de Corse dans une nouvelle perspective paléontologique : par marronage. **Annales de Génétique et de Sélection Animale**, v. 11, p. 133-143. 1979.

PRIOR, R. **The Roe Deer – Conservation of Native Species**, Swan Hill Press. 1995. 230 pp.

QUELLER, D. C., STRASSMAN, J. E., HUGHES, C. R. Microsatellites and kinship. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 8, n. 8, p. 285-288. 1993.

RALLS, K. HARVEY, P. H., LYLES, A. M. Imbreeding in natural populations of birds and mammals. In: SOULE, M. E. (Ed.). **Conservation Biology: the science of scarcity and diversity**. Sunderland, MA. Sinauer Associates. 1987, p. 35-56.

RAYMOND, M., ROUSSET, F. An exact test for population differentiation. **Evolution**, v. 49, p. 1280–1283. 1995.

REYNOLDS, J., WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. Estimation of the coancestry coefficient: basis for a short-term genetic distance. **Genetics**, v. 105: p. 767-779. 1983

RUBIN E., BOYCE W., JORGENSEN M., TORRES S., HAYES C., O'BRIEN C., JESSUP D. Distribution and abundance of bighorn sheep in the Peninsular Ranges, California. **Wildlife Society Bulletin**, v. 26, n. 3, p. 539-551. 1998.

SHIELDS W. M., 1987. Dispersal and Mating Systems: Investigating Their Causal Connections. In: CHEPKO-SADE, D., HALPIN, Z. T. (Eds.). **Mammalian Dispersal Patterns – The effects of social structure on population genetics**. Chicago: The University of Chicago Press. 1987, p.3-24.

SINCLAIR, A. R. E. Do large mammals disperse like small mammals. In: STENSETH, N. C., LIDICKER, JR W. Z., (Eds.) **Animal Dispersal – Small mammals as model**. London: Chapman & Hall. 1992, p. 229-242.

SMITH, A. T., DOBSON, F. S. A technique for evaluation of spatial data using asymmetrical weighted overlap values. **Animal Behaviour**, v. 48, p. 1285-1292. 1994.

STENSETH, N. C., LIDICKER, Jr W. Z. The study of dispersal: a conceptual guide. In: STENSETH, N. C., LIDICKER, JR W. Z., (Eds.) **Animal Dispersal – Small mammals as model**. London: Chapman & Hall. 1992, p. 8-20.

SUGG, D.W., CHESSER, R. K., DOBSON, F. S., HOOGLAND, J. L. Population genetics meets behaviour ecology. **Trends in Ecology & Evolution**, V. 11, P. 338–342. 1996

SWARBRICK, P. A., SCHMACK, A. E., CRAWFORD, A. M. MAF45, a highly polymorphic marker for the pseudoautosomal region of the sheep genome, is not linked to the FecX ϕ (Inverdale) gene. **Genomics**, v. 13, p. 849–851. 1992

TAPIO, I., TAPIO, M., GRISLIS, Z., HOLM, L.-E., JEPPSSON, S., KANTANEN, J., MICEIKIENE, I., OLSAKER, I., VIINALASS, H., EYTHORSDDOTTIR, E. Unfolding of population structure in Baltic sheep breeds using microsatellite analysis. **Heredity**, p. 1-9. 2005.

VAIMAM, D., IMAM-GHALI, M., MOAZAMI-GOUDARZI, K., GUERIN, G., GROHS, C., LEVEZIEL, H. AND SAIDI-MEHTAR, N. Conservation of a syntenic group of microsatellite loci between cattle and sheep. **Mammalian Genome**, v. 5, p. 310-314. 1994

VIGNE, J.-D. Zooarchaeology and the biogeographical history of the mammals of Corsica and Sardinia since the last ice age. **Mammal Review**, v. 22, p. 87-96. 1992.

WADE, M. J. AND MCCAULEY, D. F. Extinction and recolonization: their effects on the genetic differentiation of local populations. **Evolution**, v. 42, p. 995—1005. 1988.

WASER, P. M., JONES, W. T. Natal philopatry among solitary mammals. **The Quarterly Review of Biology**, v. 58, p. 355-390. 1983.

WEBER, J. L., MAY, P. E. Abundant class of human DNA polymorphism which can be typed using the polymerase chain reaction. **American Journal of Human Genetics**, v. 44, p. 388-396. 1989.

WEIR, B. S., COCKERHAM, C. C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370. 1984.

WOOLARD, T., HARRIS, S. A behavioural comparison of dispersing and non-dispersing foxes (*Vulpes vulpes*) and an evaluation of some dispersal hypotheses. **Journal of Animal Ecology**, v. 59, p. 709-722. 1990.

WRIGHT, S. The genetical structure of populations. **Annals of Eugenics**, v. 15, p. 323-354. 1951.

APÊNDICES

**APÊNDICE A: Soluções utilizadas na extração de ADN a partir de sangue
Método de extração ao sal (NaCl 6M)**

Volume de solução utilizado para 8 amostras	
160	ml Solução de lise
160	ml Solução salina
72	ml de TE 10/0,1
800	µl Proteinase K
4	ml EDTA 0,5M
4	ml SDS 10%
34,4	ml NaCl saturada
240	ml Etanol

Solução de lise (2 litros):

Produto	Quantidade	Concentração final
NH ₄ Cl	16,05 g	150 mM
KCL	1,5 g	10 mM
EDTA 250mM	800 µl	0,1 mM
H ₂ O	qsp 2 litros	

Solução Salina ou de Lavagem (2 litros):

Produto	Quantidade	Concentração final
NaCl	17,5 g	140 mM
KCL	0,1 g	0,5 mM
Tris-HCl 2M	10 ml	10 mM
EDTA 250 mM	800 µl	0,1mM
H ₂ O	qsp 2 litros	

Solução saturada de NaCl (6 M) (500 ml) :

Produto	Quantidade	Concentração final
NaCl	176 g	6 M
H ₂ O	qsp 500 ml	

Solução de TE 10/0,1 (1 litro) :

Produto	Quantidade	Concentração final
Tris-HCl 2M	5 ml	10 mM
EDTA 250mM	400 µl	0,1 mM
H ₂ O	qsp 1 litro	

APÊNDICE B: Protocolo de amplificação de seqüências microsátélites por PCR

Para um meio de reação de 20 µl por amostra, preparado sobre gelo com 5 µl de ADN resultando em uma concentração de 25 ng/µl

Reativos	Concentração	Volume
Tampão	1X	2 µL
MgCl ₂ , 25 mM	1,5 ou 2 mM	1,2 - 1,6 µl
dNTP, 1,25 mM	0,2 mM	3,2 µl
<i>Primer</i> , 50 µM	0,5 µM	0,2 µl
	0,5 µM	0,2 µl
Taq 5 unidades/µl		qsp
H ₂ O destilada		

Programa de Amplificação:

Predwell

Desnaturação 94°C 5 mn

Dwell

Desnaturação 94°C 45 s

Hibridação T°C 45 s

Elongação 72°C 45 s

Postdwell

Elongação final 72°C 5 mn

A temperatura de hibridação e o número de ciclos do programa *Dwell* variam conforme a natureza do microsátélite e a quantidade de ADN.

APÊNDICE C: Migração dos produtos da amplificação sobre gel de acrilamida

Composição do gel:

Uréia	20 g	
Acrilamida	6 ml	
H ₂ O destilada	11 ml	
Amberlite	1 espátula	
TBE 10X filtrada	4 ml	
APS	200 µl	
Temed	22,5 µl	Essa Solução é estocada a +4°C.

Preparação do tampão TBE 10X:

Tris	107,8 g	
Ácido Bórico	55 g	
EDTA	8,2 g	
H ₂ O destilada	qsp 1 l	Essa Solução é estocada a +4°C.

Preparação dos produtos da amplificação:

Cada ponto contém:

- 2 µl de produtos da PCR;
- 0,5 µl de marcador de tamanho;
- 3 µl de tampão de depósito (Formamida + Azul Dextran)

As amostras são desnaturadas a 94°C durante 5 min, e são imediatamente colocadas no gelo, aguardando a fase de depósito sobre o gel.

Pré-migração:

- voltagem de 1100 V;
- duração mínima de 15 min.

Condições de migração:

- voltagem de 1100 V;
- amperagem de 40 mA;
- potência de 30 W;
- duração da migração: aproximadamente 2h30min.