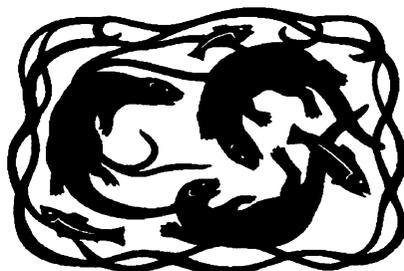


UNIVERSIDADE DE ÉVORA  
MESTRADO EM BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO



Parentesco e padrões sócio espaciais da lontra euro-asiática (*Lutra lutra*)  
num ambiente mediterrânico

Vania Carolina Fonseca da Silva

Dissertação apresentada à  
Universidade de Évora como  
parte dos requisitos para a  
obtenção do grau de mestre  
em Biologia da Conservação

Orientador: Prof. Dr. António Mira  
Co-Orientador: Lorenzo Quaglietta

ÉVORA  
2010

UNIVERSIDADE DE ÉVORA  
MESTRADO EM BIOLOGIA DA CONSERVAÇÃO

Parentesco e padrões socioespaciais da lontra euro-asiática (*Lutra lutra*)  
num ambiente mediterrânico

Vania Carolina Fonseca da Silva

Dissertação apresentada à  
Universidade de Évora como  
parte dos requisitos para a  
obtenção do grau de mestre  
em Biologia da Conservação

Orientador: Prof. Dr. António Mira  
Co-Orientador: Lorenzo Quaglietta



ÉVORA  
2010

Esta dissertação foi redigida conforme o Novo Acordo Ortográfico da Língua Portuguesa que entrou em vigor em Janeiro de 2009.

*“Conservar a natureza é uma luta muito difícil e que está fadada a não dar certo enquanto depender apenas de razões utilitárias (...). Mas a natureza é importante para nós também por outras razões, muito mais sutis, dentro da nossa mente e do nosso inconsciente. Essas coisas são universais, parte essencial de nossa própria natureza. A esperança de um mundo melhor está justamente em que tantas pessoas tão diferentes percebem isso, espontaneamente, sem que seja preciso aprender: pois está dentro delas.”*

Fernando Fernandez

## AGRADECIMENTOS

Realizar este trabalho não foi uma conquista só minha. Direta ou indiretamente, eu precisei de muita gente para alcançar este objetivo, e portanto eu expresso aqui a minha gratidão:

À todos os professores e colegas que foram indispensáveis na minha formação acadêmica e científica, desde a graduação na UFRJ até hoje.

Ao Professor Antônio Mira, por ter aceitado a orientação deste trabalho, por ter recolhido nas estradas grande parte dos cadáveres de lontras utilizados neste estudo e pela prontidão e disponibilidade em me ajudar durante a apressada fase final desta dissertação.

À Maria João Vila-Viçosa, do Laboratório de Parasitologia Victor Caeiro, por ter sido sempre tão simpática e disponível para realizar as necrópsias das lontras e me ajudar a recolher as amostras e dados necessários.

À Dra. Petra Hájková, pela supervisão nas análises laboratoriais deste trabalho, como também pela amigável hospitalidade na gelada República Tcheca e pela constante disponibilidade em esclarecer dúvidas à distância. Este trabalho só foi possível graças à sua valiosa colaboração.

À todos aqueles que já me socorreram ou apoiaram durante o trabalho de campo devido a algum problema mecânico ou atolamento na lama, especialmente ao Pedro “Canicalho” que tirou tanta gente do sufoco neste projeto, sempre de boa vontade, fosse às quatro da tarde ou às quatro da manhã.

À todos os estudantes e voluntários que colaboraram na obtenção de dados em campo, frequentemente transpondo os limites do conforto humano! Obrigada especialmente à Nadia e Margherita, que proporcionaram muita companhia e momentos alegres durante o trabalho. O trio Otter's Angels foi a melhor versão *field-work* das Panteras que podia existir!

À minha mãe, muito obrigada pelo carinho, apoio e por sempre me incentivar a fazer aquilo que gosto e correr atrás dos meus sonhos. Por ter investido em mim e na minha educação e por sempre enxergar meu potencial quando eu mesma me desmereço.

Aos meus familiares mais próximos, que eu sei que sentem a minha falta, mas que também sei que compreendem o quanto o caminho que estou trilhando é importante para mim.

Aos meus amigos: de perto, de longe, da vida, da escola, da graduação, da especialização, do mestrado, de todo lado... Amigos são essenciais na vida, e todos vocês contribuíram para fazer de mim uma pessoa melhor e mais feliz. Sem vocês com certeza eu não teria chegado até aqui.

À Juliana e à Raquel, minhas amigas silly-cones, um obrigada adicional, por terem me enviado vários artigos em pdf que eu não conseguia acessar.

Ao Lorenzo, agradeço primeiro por ter possibilitado a minha participação neste projeto e pela confiança depositada em mim para estudar um aspecto tão lindo da vida das lontras; e pelos conselhos, pela paciência, pelo constante incentivo, pelo carinho, companheirismo, compreensão e até pelas grosserias (em teoria, elas às vezes são úteis).

Ao Paicanito e seus bichinhos, Magali, Cascão, Fra, Cor de Rosa, Buja Buja, Arrepiada, e ao Tio Canhoto e à Lourdes, um grandíssimo obrigada, pois eu não poderia ter tido um lugar melhor para redigir esta dissertação do que aquele querido pedaço de montado cercado de encantos, me possibilitando toda a tranquilidade do mundo nos momentos mais difíceis...

E por fim, à todas as lontras capturadas (e batizadas) durante este trabalho: Sofia Loren, Joana, Ilona, Zelda, Filó, Asha, Lola, Beringela, Melloa, Natália, Mavablu, Gollum, Uzo, Giovanni, Lucky Luke, Henry Otter, Jack Sparrow, Djogo, Diego, Ciro, Atreyu, Lugh, Merlino. Desculpem pela constante intromissão nas suas vidas e por todos os incômodos que causamos à vocês. Muito obrigada pelas tantas informações que eu pude extrair dos seus genes e dos seus comportamentos e, acima de tudo, obrigada simplesmente por existirem e serem tão lindas e especiais...

## ÍNDICE

<b>Agradecimentos</b> .....	iv
<b>Resumo</b> .....	1
<b>Abstract</b> .....	2
<b>1. Introdução</b> .....	3
1.1 Padrões Espaciais e Organização Social.....	5
1.2 Parentesco.....	6
1.3 Sistemas Sociais em Lutrinae.....	9
1.4 A espécie em estudo ( <i>Lutra lutra</i> ).....	11
<b>2. Materiais e Métodos</b> .....	15
2.1 Área de Estudo.....	15
2.2 Captura e seguimento de indivíduos.....	17
2.3 Colheita de amostras.....	19
2.4 Análises de laboratório.....	20
2.5 Análise de dados.....	22
2.5.1 Análises genéticas e estimativa do parentesco.....	22
2.5.2 Distâncias geográficas.....	23
2.5.3 Relação entre distâncias geográficas e parentesco.....	24
2.5.4 Dispersão.....	26
2.5.5 Análises de Interações.....	27
<b>3. Resultados</b> .....	29
3.1 Estimativas de parentesco e relação com a distância geográfica.....	29
3.2 Dispersão.....	33
3.3 Interações.....	34
<b>4. Discussão</b> .....	38
4.1 Integração de dados genéticos com dados de campo.....	45
<b>5. Conclusão</b> .....	48
<b>6. Referências Bibliográficas</b> .....	49
<b>7. Anexos</b> .....	62

**Parentesco e padrões sócio espaciais da lontra euro-asiática (*Lutra lutra*)  
em um ambiente mediterrânico**

**RESUMO**

Apesar de *Lutra lutra* ser uma das lontras mais estudadas, o conhecimento acerca do sistema social da espécie ao longo da sua área de distribuição é repleto de lacunas. Na presente dissertação, foram investigados os padrões sócio espaciais da espécie a nível local num ambiente mediterrânico. Utilizaram-se dados genéticos e de seguimento por rádio telemetria para estudar a relação entre parentesco e distância geográfica, a dispersão e as interações entre indivíduos. As fêmeas que se encontravam espacialmente mais próximas eram mais aparentadas entre si comparativamente com os machos mais próximos, sugerindo que a dispersão ocorre predominantemente nos machos. Os resultados de dispersão em indivíduos sub adultos seguidos por telemetria são consistentes com os resultados genéticos, e mostraram uma distância média de dispersão de 17km para machos, enquanto a única fêmea seguida não se dispersou. As distâncias de dispersão parecem ser suficientes para evitar o endocruzamento, pois não foram observados casais adultos com parentesco próximo. A organização social parece integrar-se no padrão de territorialidade intra sexual típico dos mustelídeos, com sistema de acasalamento poligínico. Contudo, contrariamente ao padrão de comportamento das espécies solitárias, as lontras estiveram mais associadas do que seria esperado ao acaso. Estes resultados revelaram aspectos até agora desconhecidos na espécie, enriquecendo o conhecimento acerca de seu sistema social, que é um pré-requisito para uma correta gestão e conservação de populações.

**Relatedness and socio-spatial patterns of the Eurasian otter (*Lutra lutra*)  
in a Mediterranean environment**

**ABSTRACT**

In spite of being one of the most studied otter species, knowledge on *Lutra lutra* social system along its geographic range is scarce. In the present work, socio-spatial patterns of the species were investigated on a local scale in a Mediterranean environment. Molecular and field data obtained by radio-telemetry were used to study: (i) the relationship between relatedness and geographic distance, (ii) dispersal and (iii) inter-individual interactions. Females at closer distances were more related than males. A significant negative relationship between relatedness and distance was observed for females, but not for males, suggesting male-biased dispersal. Dispersal results obtained in young individuals followed by telemetry, in agreement with genetic results, showed a mean dispersal distance of 17km for males and the absence of dispersal on the only female monitored. Dispersal distances are probably enough to avoid inbreeding, since the potential mating pairs observed were not related. Social organization seems to correspond to the classical mustelid pattern of intra-sexual territoriality within a polygynous mating system. But, contrary to the behavioral pattern of solitary species, positive association between individuals were more frequent than expected by chance. These results revealed aspects still unknown in this species and contribute to a better knowledge on its social system, which is a prerequisite for a correct management and conservation of populations.

## 1. INTRODUÇÃO

O conhecimento acerca do sistema social de uma espécie pode fornecer as bases para diversos aspectos essenciais à sua conservação e à gestão de populações. São bem conhecidas, por exemplo, as suas implicações no fluxo e diversidade genética e na dinâmica de populações (Singleton & Hay, 1983; Morin et al., 1994).

Ter em conta o sistema social de uma população é um importante pré-requisito para a estimativa de tamanhos populacionais efetivos (Kruuk, 2006; Creel, 1998). Carecendo de informações base sobre este aspecto, é evidente o risco de subestimar ou sobre-estimar a população que efetivamente se reproduz (Komdeur & Deerenberg, 1997). Estas informações são, portanto, capazes de fornecer substanciais contributos para previsões de persistência populacional a longo prazo (Chapman & Bourke, 2001).

Além da relevância no contexto conservacionista, pode-se ressaltar ainda a importância da incorporação de dados sociais e comportamentais em estudos filogenéticos e evolutivos (Cahan et al., 2002; Veron et al., 2004) e no campo da epidemiologia e dispersão de doenças por vetores animais (Böhm et al., 2008 ; Cullingham et al., 2008).

Kappeler & van Schaik (2002) definiram três componentes principais de sistemas sociais em primatas que, segundo Dalerum (2007), se aplicam também a outros grupos de mamíferos, incluindo os carnívoros. Estas três componentes são: (1) a organização social, que descreve os padrões de distribuição espaço temporal de indivíduos (p.ex. através das áreas vitais); (2) a estrutura social, que descreve os padrões de interações sociais e relações

entre indivíduos; e (3) o sistema de acasalamento, que descreve os padrões sociais e genéticos da reprodução entre indivíduos.

Na ordem Carnivora são reconhecidas tanto espécies sociais, que vivem em grupos estáveis, como espécies solitárias. A maior parte dos estudos e teorias desenvolvidas sobre os sistemas sociais neste táxon referem-se às primeiras (Dalerum, 2005; Dammhahn & Kappeler, 2009), apesar da maioria das espécies (85-90%) serem solitárias (Sandell, 1989). Isto ocorre normalmente devido aos hábitos mais crípticos das espécies solitárias (Dammhahn & Kappeler, 2009) e às conseqüentes dificuldades em estudá-las.

É importante salientar que a denominação “solitária” pode ser erroneamente interpretada. Segundo Sandell (1989) este termo indica que normalmente os indivíduos não apresentam comportamentos cooperativos, e que encontram-se isolados espacialmente na maior parte do tempo, exceto para o acasalamento. Mas estes aspectos não esclarecem como são os padrões de interações, ou seja, quanto e como interagem os indivíduos em termos espaciais e temporais.

Kays et al. (2000) atentam para a existência de um *continuum* de socialidade, entre os extremos de comportamentos solitários e sociais. Um comportamento solitário pode implicar a existência de interações reduzidas, mas ainda assim os conspecíficos podem reconhecer-se uns aos outros e viver num complexo sistema social (Waser & Jones, 1983). Reconhece-se ainda a existência de variabilidade intraespecífica nos sistemas sociais (Sandell, 1989; Lott, 1991; Johnson et al., 2000), reforçando o facto de que pode não ser

correto recorrer a uma classificação de atributos de tal maneira fixa e dicotômica.

A socialidade nos carnívoros pode refletir-se nos padrões espaciais de organização das populações (e.g., Erlinge, 1995; Azevedo & Murray, 2007; Pitt et al., 2008), e do parentesco entre indivíduos (Fredsted et al., 2005). Estas duas abordagens podem ser utilizadas com a perspectiva de investigar a organização e estrutura social duma espécie. A seguir far-se-á uma breve síntese dos principais aspectos de ambas e de porque são úteis neste contexto.

### **1.1 Padrões espaciais e organização social**

Frequentemente, recorrem-se às análises de áreas vitais e movimentos individuais como forma de inferir sobre o aspecto social do comportamento animal (McDonough, 2000; Powell, 2000). Estes padrões permitem identificar, grosso modo, como os membros de uma população compartilham o espaço disponível: se exibem algum tipo de territorialidade, se vivem em grupos, o quanto interagem, quanto tempo passam numa mesma área.

A área vital (AV, daqui em diante) é considerada como o espaço restrito utilizado por um indivíduo nas suas atividades normais de reprodução, alimentação e cuidado com as crias (Burt, 1943). A extensão da sobreposição entre AVs, segundo Sandell (1989), é uma das principais características dos padrões espaciais de uma população, permitindo avaliar se os indivíduos são territoriais e o quanto compartilham suas áreas com os demais.

Doncaster (1990) definiu as sobreposições como interações, caracterizando-as em dois tipos: estáticas e dinâmicas. As interações estáticas são estimadas pela sobreposição espacial das AVs ao longo de um período, sem considerar se os animais usam este espaço simultaneamente (Kernohan et al., 2001). O estudo destas interações pode ser considerado como um primeiro passo na compreensão da organização sócio espacial de uma população (Reppucci et al., 2009). Já as interações dinâmicas têm em conta a sobreposição temporal de indivíduos dentro de suas AVs compartilhadas com conspecíficos, e são indicadas para uma compreensão mais detalhada das interações sociais (Kernohan et al., 2001).

Não é simples estudar as interações interindividuais em populações selvagens de carnívoros, uma vez que muitos animais são esquivos e/ou possuem hábitos noturnos, dificultando a sua observação direta. Assim, o emprego de técnicas de telemetria para este fim é bastante comum (Erlinge, 1983; Kenward, 2001). Através da telemetria, obtêm-se um conjunto de localizações geográficas para cada indivíduo e, a partir destas, estimam-se suas AVs e descrevem-se os seus movimentos, que serão o alicerce das análises de interações mencionadas.

## **1.2 Parentesco**

Conforme mencionado, o outro fator que frequentemente reflete a estrutura social de populações é o parentesco genético (Hughes, 1998; Gompper et al., 1998; Storz, 1999; Cutrera et al., 2005; Fredsted et al., 2005; Maher, 2009a,b).

A associação espacial entre indivíduos relacionados já foi documentada em diversas espécies de mamíferos (e.g. Wimmer et al., 2002; Ratnayeke et al., 2002; Hazlitt et al., 2004; Støen et al., 2005; Biek et al., 2006; McEachern et al., 2007; Frantz et al., 2008; Croteau et al., 2010). Nestes estudos observou-se que ocorrem padrões não aleatórios de parentesco entre indivíduos, estando o mesmo correlacionado com a distância geográfica.

O padrão de dispersão das espécies pode ter uma marcada influência na existência destas estruturas espaciais do parentesco (Biek et al., 2006; Støen et al., 2005; Croteau et al., 2010), especialmente em espécies solitárias. A dispersão pode ser definida como o movimento de um animal jovem a partir do ponto de origem (local de nascimento) até uma outra área onde se estabeleça e eventualmente se reproduza (Howard, 1960). Em quase todos os mamíferos, um dos sexos apresenta eventos de dispersão enquanto o outro sexo é filopátrico, estabelecendo-se próximo ao local de nascimento (Greenwood, 1980; Lawson Handley & Perrin, 2007). O padrão mais comum é a dispersão de indivíduos do sexo masculino (Greenwood, 1980) e a filopatria pelas fêmeas (Waser & Jones, 1983).

As causas que levam os animais a se dispersarem do local de nascimento não são sempre claras. Uma das hipóteses mais tradicionais é que este comportamento evoluiu como uma forma de evitar o endocruzamento (Greenwood, 1980). Outras importantes hipóteses propostas são relacionadas à competição por recursos (Greenwood, 1980) ou por pares reprodutivos (Dobson, 1982). Contudo, nenhuma destas hipóteses é mutuamente exclusiva,

e considera-se mais razoável enxergar a dispersão como um comportamento dependente da interação de diversos fatores (Dobson & Jones, 1985).

Nos casos em que a dispersão é enviesada em relação ao sexo, espera-se que os indivíduos do sexo filopátrico sejam mais aparentados entre si do que os indivíduos do sexo dispersor (Di Fiore, 2003), facto já documentado em alguns estudos (e.g., Gompper et al., 1998; Peakall et al., 2003; Støen et al., 2005 ; Hazlitt et al., 2004; Croteau et al., 2010).

Além da dispersão, outro fator que pode influenciar no parentesco é o comportamento reprodutivo ou sistema de acasalamento (Fredsted et al., 2007). Muitas vezes, o acasalamento não ocorre entre pares ao acaso. A dominância reprodutiva de um número limitado de indivíduos pode resultar em um reduzido grau de diferenciação genética entre os membros das coortes descendentes dos mesmos (Di Fiore, 2003).

O parentesco pode ser estimado a partir de linhagens conhecidas dos indivíduos de uma população (Csilléry et al., 2006). Contudo, em populações selvagens isto é pouco viável em grande parte dos casos (Queller & Goodnight, 1989; Janečka et al., 2006), pois exige um acompanhamento refinado e a longo prazo, com observações diretas e reconhecimento individual dos animais.

Uma alternativa para a obtenção de estimativas de parentesco em populações selvagens, nas quais a linhagem é desconhecida e difícil de ser determinada por outros meios, é a utilização de métodos em genética molecular (Hughes, 1998; Di Fiore, 2003; DeYoung & Honeycutt, 2005). O uso de marcadores moleculares tem sido cada vez mais difundido em estudos ecológicos com este objetivo (Selkoe & Toonen, 2006).

Dentre os marcadores mais utilizados estão os microsatélites, que são unidades curtas, repetidas em tandem, de 1 a 6 nucleotídeos. Sendo segmentos curtos, amplificam-se facilmente por PCR, mantendo-se estáveis mesmo em DNA já fragmentado (Taberlet et al., 1999; Hung et al., 2004), o que os torna ideais para a identificação de indivíduos em genética forense e amostragens não invasivas. Por serem seletivamente neutros e obedecerem aos padrões de herança mendeliana, tornam-se uma escolha bastante favorável em estudos de parentesco.

### **1.3 Sistemas sociais em Lutrinae**

Lutrinae é uma subfamília de mustelídeos (Ordem: Carnivora) que agrega 13 espécies de lontras distribuídas por todo o mundo, com exceção da Antártida e Oceania.

No seu modelo clássico de socialidade nos mustelídeos, Powell (1979) caracteriza a territorialidade intra sexual, típica de uma organização solitária, como o padrão da família. Contudo, na subfamília Lutrinae nota-se uma grande variedade de comportamentos sociais, mesmo entre espécies próximas e com necessidades ecológicas similares (Johnson et al., 2000; Kruuk, 2006).

Esta variação nos sistemas sociais traduz-se em diferenças inter e também intraespecíficas no grau de cooperação entre indivíduos, formação de grupos e presença ou ausência de grupos de um único sexo (Kruuk, 2006).

O comportamento gregário e cooperativo é bem conhecido nas ariranhas ou lontras gigantes (*Pteronura brasiliensis*) (Leuchtenberger & Mourão, 2008). Estes animais organizam-se em grupos familiares, que cooperam na defesa de

seu território e no cuidado com a prole. *Lutrogale perspicillata* apresenta um comportamento semelhante, vivendo em grupos mistos que forrageiam cooperativamente (Hussain, 1996 *apud* Kruuk, 2006).

A gregriedade não cooperativa também ocorre, nomeadamente na espécie *Enhydra lutris* (lontra-marinha), podendo assim ser considerada como solitária, apesar de viver em grupos (Sandell, 1989). Esta lontra apresenta um sistema social bastante peculiar, mais semelhante ao de outros mamíferos marinhos, como focas, do que ao de outras lontras (Kruuk, 2006). Os animais podem viver em grupos de centenas até milhares de indivíduos (Estes, 1980), contudo estes grupos são formados somente por indivíduos do mesmo sexo. A defesa de territórios é observada apenas nos machos, e ainda assim apenas durante a época de reprodução (Kruuk, 2006).

A formação de grupos é ainda conhecida noutras espécies (*Aonyx cinerea*, *Lutra maculicollis*), contudo, não se sabe como é a sua composição, nem se há cooperação entre os membros.

A flexibilidade social intra-específica ocorre na lontra norte-americana (*Lontra canadensis*). Em alguns locais, esta espécie parece ser solitária; em outros, como no Alasca, pode ocorrer a formação de grupos, que estaria associada à uma estratégia de cooperação na caça (Blundell et al., 2002a).

O comportamento solitário é relatado em *Lutra lutra* (Macdonald & Mason, 1990), *Lutra sumatrana* (Kruuk, 2006), *Lontra longicaudis* (Larivière, 1999; Kruuk, 2006) e *Lontra provocax* (Sepúlveda et al., 2007).

#### **1.4 A espécie em estudo (*Lutra lutra*)**

A lontra euro-asiática (*Lutra lutra* Linnaeus, 1758) encontra-se atualmente distribuída por todo o continente europeu, norte da África e grande parte da Ásia (Kruuk, 2006). Como as outras lontras, possui hábitos semiaquáticos, estando sua presença associada a habitats com disponibilidade de água doce (Beja, 1996; Kruuk, 2006) como lagoas, rios, albufeiras e estuários. Utilizam os corpos d'água especialmente para o forrageio, mantendo-se dependentes do ambiente terrestre para a reprodução e o estabelecimento de tocas e abrigos (Kruuk, 2006).

Globalmente, esta espécie é classificada como “Quase Ameaçada” (Ruiz-Olmo et al., 2008), além de constar no Apêndice I do CITES e nos anexos II e IV da Diretiva Habitats (n.º 92/43/CEE). Em Portugal, a espécie foi enquadrada como “Pouco Preocupante” (Cabral et al., 2005), podendo ser encontrada em praticamente toda a extensão continental do país (Trindade et al., 1998), com menor probabilidade de ocorrência em regiões próximas aos grandes centros urbanos (Barbosa et al., 2003).

Apesar de ser uma das espécies de lontra mais estudadas até hoje, com uma vasta literatura disponível acerca de sua biologia e ecologia, o conhecimento acerca do sistema social da espécie é ainda repleto de lacunas.

No estudo realizado por Kruuk & Moorhouse (1991) num ambiente costeiro da Escócia por meio de observações diretas, foram identificados grupos de fêmeas que compartilhavam um mesmo território. Contudo, o autor relata que estas passavam a maior parte do tempo isoladas ou com sua prole,

evitando interações com outras integrantes do grupo. Com animais externos ao grupo, foram relatados comportamentos agressivos.

Resultados semelhantes já haviam sido relatados por Jenkins (1980), também na Escócia, mas em sistemas de água doce. O autor concluiu que, em condições de alta densidade populacional, poderia haver coexistência de animais adultos num mesmo território, porém com rara sobreposição temporal de indivíduos que evitariam contato com os demais.

Através de amostragens genéticas não invasivas, Hung et al. (2004) também sugeriram a existência de territórios comuns para fêmeas em dois rios na China. Todavia, devido à técnica não invasiva e à duração do estudo (8 meses), não se pode ter a certeza que todos os indivíduos amostrados eram adultos e com territórios estabelecidos. Os grupos identificados poderiam ser de fêmeas juvenis, ainda associadas às mães, já que se sabe que nesta espécie a prole pode ficar até cerca de um ano ou mais com a mãe (Watt, 1993 *apud* Kruuk, 2006). Além disso não é possível saber se há ou não sobreposição temporal dos indivíduos de cada grupo.

Não obstante, a existência de territórios de grupo não parece ser uma constante ao longo da área de distribuição da espécie. Isto poderá indicar uma tendência à flexibilidade social em diferentes populações.

Erlinge (1968), através da técnica de *snowtracking*, observou uma forte territorialidade intra sexual para a espécie em ambientes de água doce na Suécia, com ambos os sexos defendendo territórios exclusivos. Mais recentemente, Ó'Neill et al. (2009) também observaram padrões de territorialidade intra sexual em rios na Irlanda, por meio de rádio telemetria.

Como já referido, *Lutra lutra* é considerada uma espécie de hábitos solitários, e os resultados destes estudos suportam esta condição. Porém aqui faz sentido lembrar a questão abordada anteriormente: classificar uma espécie como solitária significa afirmar uma reduzida ocorrência de interações dinâmicas entre indivíduos e ausência de cooperação entre os mesmos (Sandell, 1989). Contudo, não há estudos com a lontra euro-asiática que abordem este tipo de interações para de facto avaliar o quanto e como interagem estes animais.

Ao mesmo tempo, sabe-se que pode haver variação geográfica nos sistemas sociais. As informações disponíveis até o presente reforçam os argumentos acerca da variação intraespecífica da socialidade e do seu aspecto *continuum*. Ainda assim, há uma forte carência de dados que permitam caracterizar com clareza o sistema social da espécie. Até o presente, nenhum trabalho quantificou e caracterizou os padrões de interações dinâmicas e estáticas na espécie, juntamente com a relação entre os indivíduos.

Kruuk (2006) enfatiza que a escassez de conhecimento sobre o sistema social da lontra euro-asiática é uma consequência de problemas metodológicos. A sua observação direta torna-se complicada, por ser um animal inconspícuo e de hábitos noturnos em grande parte da sua área de distribuição. Além disso, as lontras em geral não possuem particularidades morfológicas que permitam o reconhecimento individual dos animais em campo.

No presente estudo, recorreu-se à técnicas de rádio telemetria e genética molecular para investigar os padrões sócio espaciais da lontra euro-

asiática num ambiente mediterrânico de água doce. Com isso visa-se ampliar o conhecimento acerca do sistema social da espécie, através do estudo das interações entre indivíduos e de suas relações genéticas.

Assim, os objetivos específicos foram:

- Estimar o parentesco entre indivíduos por meio de marcadores microssatélites.
- Verificar se o parentesco obedece a uma distribuição aleatória na área de estudo, ou se existe um padrão de estrutura espacial. A hipótese nula é que não haveria uma relação entre a distância geográfica e o coeficiente de parentesco entre pares de indivíduos.
- Verificar se existem diferenças na estrutura genética de machos e fêmeas, consistentes com a hipótese de dispersão do sexo masculino. Espera-se que o parentesco entre fêmeas seja inversamente correlacionado à distância geográfica e que o parentesco entre machos não apresente relações com a distância.
- Estudar a dispersão através de rádio telemetria, monitorizando indivíduos sub-adultos para documentar a ocorrência ou ausência deste processo, e medir as eventuais distâncias dispersadas.
- Estudar as interações interindividuais através de rádio telemetria, estimando o quanto os indivíduos interagem espacial e temporalmente em suas áreas vitais. Partiu-se da hipótese que as lontras permanecem mais isoladas, evitando a proximidade umas com as outras, e que as

sobreposições entre áreas vitais ocorram apenas intersexualmente conforme o modelo da territorialidade intra sexual (Powell, 1979).

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1 Área de Estudo**

O estudo foi realizado numa região do Alentejo Central, nos concelhos de Évora, Arraiolos e Montemor-o-Novo (Fig. 1), abrangendo uma área de aproximadamente 765 km<sup>2</sup> (definida pelo mínimo polígono convexo das localizações de amostras utilizadas). Os cursos de água da região pertencem às bacias hidrográficas dos rios Guadiana, Sado e Tejo e em alguns locais estão presentes albufeiras. Existem ainda diversos charcos, usados sobretudo como reservatórios de água para o gado.

O clima é tipicamente Mediterrânico e o regime hidrológico dos cursos d'água é fortemente influenciado por este facto (Pardo & Álvarez, 2006); de Outubro a Março, a ocorrência de chuvas determina o rápido enchimento dos leitos, enquanto no verão, com a ausência de chuvas e as altas temperaturas, estes acabam por secar quase completamente, restando essencialmente pegos intermitentes (Gasith & Resh, 1999).

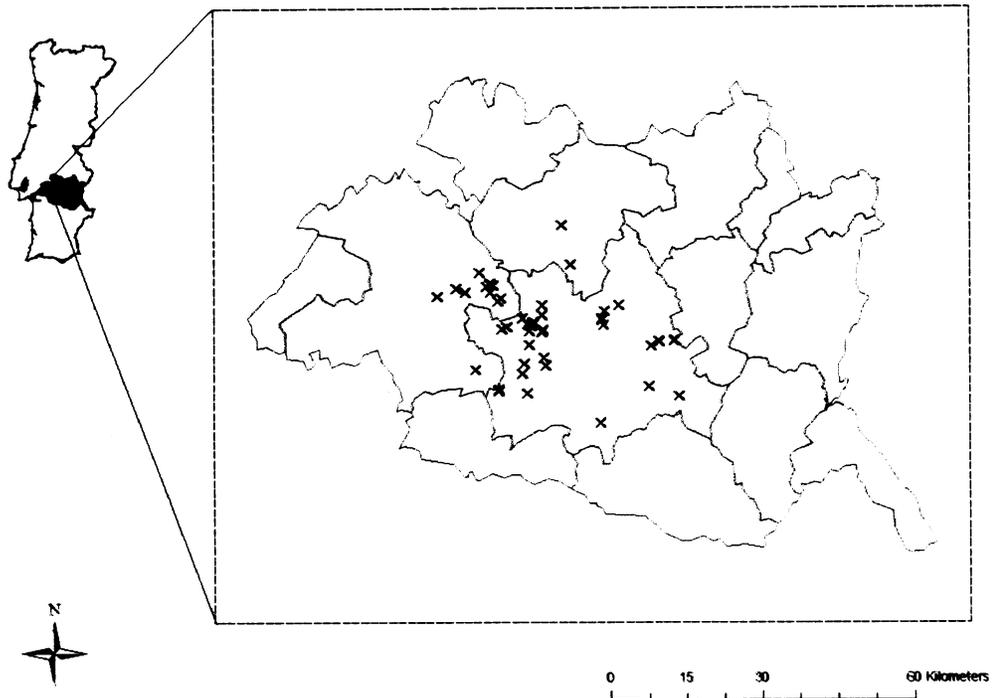
A temperatura média anual é de 14,1°C, com mínimas de até -6°C no inverno e máximas de 41°C no verão (Fonte: CGE, dados referentes ao período entre 2007-2009). A precipitação anual é de 627 mm, sendo que as chuvas são mais concentradas nos meses de Outubro a Março.

A área de estudo situa-se numa zona de peneplanície alentejana, com um relevo suave e ondulado. A cota média é de aproximadamente 200m, podendo atingir 420m em pontos mais altos como a Serra de Monfurado. Com respeito à litologia, as formações sedimentares e metamórficas são dominantes, em conjunto com rochas ácidas eruptivas (Portas, 1967; Atlas do Ambiente Digital - Instituto do Ambiente).

A pecuária e agricultura são as atividades humanas de maior expressão. A criação de gado bovino, ovino e suíno é realizada em grande parte nas pastagens naturais ou semeadas em regime extensivo. O uso do solo é predominantemente caracterizado por sistemas agro silvo pastoris, em particular os montados de sobro (*Quercus suber*) e azinho (*Q. rotundifolia*). Os cultivos mais comuns na região são os de cereais como trigo e centeio, olivais e vinhas, além de plantações de eucaliptos e pinheiros. Encontra-se dentro da área de estudo uma área protegida de aproximadamente 24000 ha, o Sítio de Monfurado, integrado na rede Natura 2000.

A vegetação ripícola, quando presente, destaca-se do restante da paisagem por ser mais densa, formando “corredores” ao longo das linhas d'água (Aguiar & Ferreira, 2005) e abrigando uma maior biodiversidade (Corbacho et al., 2003). As espécies rípicolas mais frequentes são *Salix* sp., *Fraxinus angustifolia*, *Populus* sp, *Rubus ulmifolius* e *Smilax* sp.

As atividades agrícolas praticadas com progressiva intensidade estão a tornar-se uma ameaça aos sistemas ainda preservados da região, em particular através da florestação com espécies exóticas, degradação de ribeiras e da vegetação associada e represamento dos cursos d'água.



**Figura 1:** Localização da área de estudo. As cruzes representam a localização das amostras de indivíduos utilizadas (ver 2.3).

## **2.2 Captura e seguimento de indivíduos**

As capturas de lontras foram efetuadas entre Junho de 2007 e Março de 2010 durante a execução do projeto “OPA” (Otter Project Alentejo) (maiores detalhes na tese de doutoramento de Quaglietta, em prep.)

Os animais capturados foram contidos e sedados com o uso de uma mistura de anestésicos injetáveis (Midazolam e Ketamina). Para cada animal foram tomadas medidas corporais (comprimento do corpo e cauda, circunferência torácica), peso e estimativa da idade (jovem, subadulto ou adulto) baseada no tamanho e no desgaste dos dentes. No hospital veterinário da Universidade de Évora foram realizadas cirurgias, nas quais se implantaram rádio transmissores intra peritoneais, dotados de sensores de atividade (IMP/300/L e IMP400/L - Telonics, Inc., Mesa, Arizona). A libertação foi sempre feita no mesmo ponto da captura e imediatamente após a recuperação dos efeitos dos sedativos, seguindo um protocolo utilizado num recente estudo (O'Neill et al., 2008). A libertação imediata, além de minimizar o stress, evita riscos de substituição dos territórios dos animais capturados por parte de outros indivíduos, assim como a eventual separação de membros duma família (crias da mãe e vice-versa) por demasiado tempo.

O seguimento dos animais por rádio telemetria consiste na detecção do sinal emitido pelos transmissores de cada indivíduo, que possuem frequências específicas, com o uso de um receptor e uma antena (Kenward, 1987). No presente estudo foi utilizada uma antena modelo Yagi de três elementos (Biotrack Ltd., Dorset, UK) e um receptor manual modelo Sika (Biotrack Ltd., Dorset, UK). Foram obtidas localizações de cada animal por triangulação (White & Garrot, 1990) a intervalos de aproximadamente 36 horas, de forma a cobrir homogeneamente todas as horas noturnas e diurnas.

## 2.3 Colheita de amostras

A recolha de amostras deu-se entre os anos de 2007 e 2010. Três das amostras (F9, LL28 e LL18) foram provenientes de indivíduos situados fora da área de estudo descrita, respectivamente nos distritos de Beja, Santarém e Setúbal. Contudo, pór pertencerem às mesmas bacias hidrográficas das demais, foram incluídas nas análises.

Amostras de sangue e/ou pelos foram obtidas de todas as lontras capturadas durante o projeto OPA (op.cit.). Quando ocorriam fugas das armadilhas antes da chegada dos investigadores, controlava-se sempre se havia pelos de lontra retidos, e em caso positivo os mesmos eram recolhidos. Também foram recolhidos cadáveres de lontras encontrados na área de estudo, dos quais se retiraram amostras de pelos ou músculo, sendo este último condicionado pelo estado de degradação do animal.

Em Dezembro de 2009, recolheram-se amostras de dejetos frescos, com o intuito de incrementar a amostragem através de procedimento não-invasivo. Em cursos d'água Mediterrânicos, devido à cobertura vegetal pouco densa, às altas temperaturas e à forte insolação durante grande parte do ano, o DNA nos dejetos é rapidamente degradado (Prigioni et al., 2006).

O mês de Dezembro foi escolhido para esta amostragem devido às baixas temperaturas, que inibem a ação das enzimas hidrolíticas presentes nos dejetos e, conseqüentemente, a degradação do DNA (Hájková et al., 2006). Os pontos de colheita foram escolhidos com base na facilidade de acesso, em ribeiras e barragens dentro da área de estudo, especialmente em locais onde havia poucas amostras obtidas até o momento. Decidiu-se amostrar os dejetos

durante o período noturno e alvorecida, de forma a recolhê-los apenas quando ainda fosse possível identificá-los como frescos, i.e., com poucas horas de deposição (ver Sales-Luís et al., 2009).

As coordenadas geográficas em UTM dos cadáveres, pelos retirados das armadilhas e dejetos foram registradas com um GPS Garmin Etrex.

Os pelos foram guardados em envelopes de papel branco, mantidos em sacos com fecho zip-lock contendo sílica gel à temperatura ambiente. As amostras de sangue foram mantidas em tubos com EDTA no frigorífico. Pequenos pedaços do tecido muscular (cerca de 6 a 8 cm<sup>3</sup>) foram conservados em Eppendorfs com etanol absoluto. Os dejetos foram recolhidos diretamente em frascos de plástico preenchidos com etanol absoluto, transportados em caixas térmicas e guardados numa arca congeladora à temperatura de -20°C.

## **2.4 Análises de laboratório**

Foram utilizados dois protocolos diferentes para isolar o DNA. Para as amostras de pelos, sangue e músculo utilizou-se o kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen) e para as amostras de dejetos, o QIAamp DNA Stool Mini kit (mesmo fabricante), com ligeiras modificações do protocolo original. O isolamento de DNA e preparação para PCR das amostras de pelos e dejetos foram realizados num laboratório distinto, destinado à manipulação de amostras de genética não invasiva, de forma a evitar contaminação com outras fontes de material genético.

Para a identificação dos genótipos, utilizaram-se 19 loci de microssatélites tetra nucleotídeos: Lut701, Lut715, Lut717, Lut733, Lut782, Lut818, Lut832, Lut833 (Dallas & Piertney, 1998), Lut902 (Dallas et al. 1999), Lut914 (Dallas et al. 2000), 04OT04, 04OT05, 04OT07, 04OT14, 04OT17, 04OT19, 04OT22 (Huang et al. 2005), Elu2 e Elu10 (Kretschmer et al. 2009). Para identificação do sexo, utilizou-se o marcador específico Lut-Sry (Dallas et al. 2000).

Os primers foram dispostos em quatro *sets* para uma PCR multiplex, cada um contendo primers de 4 a 6 *loci*, além de um controle negativo (sem DNA) para cada *set*. Foi utilizado o kit de reação Qiagen Multiplex PCR. Cada reação continha 5 µL de Master Mix Multiplex, 1 µL de Solução-Q, primers em diversas concentrações, 1 ou 2 µL do DNA isolado (1 µL para tecidos e sangue, 2 µL no caso de pêlos e dejetos) e ddH<sub>2</sub>O para completar um volume de 10 µL.

As condições da PCR foram as mesmas para todos os *sets*, programando-se da seguinte forma: ativação inicial a 95°C por 15 minutos, seguida por 20 ciclos (Touchdown) de 30 segundos a 94°C, 60°C - 0,5°C por ciclo por 90 segundos e 72°C por 60 segundos, com uma extensão final de 30 minutos a 60°C. A PCR Touchdown é uma modificação da PCR convencional, que evita a amplificação de sequências não-específicas.

Os produtos amplificados foram separados por eletroforese no sequenciador automático ABI 3130 usando GeneScan 500 LIZ como padrão de peso molecular. As análises para identificação dos alelos foram realizadas com GENEMAPPER v.3.7 (Applied Biosystems).

Todas as análises laboratoriais foram conduzidas nas dependências do Departamento de Biologia de Populações, Instituto de Biologia de Vertebrados, Academia de Ciências da República Checa (Studenec, República Checa).

## **2.5 Análise de Dados**

### **2.5.1 Análises genéticas e estimativa do parentesco**

A probabilidade de que dois indivíduos retirados ao acaso da população possuam o mesmo genótipo (Probabilidade de Identidade) foi calculada para indivíduos aparentados ( $Pi_{sib}$ ) e não aparentados ( $Pi$ ). O cálculo das  $Pi$ 's é importante para avaliar se o número de marcadores usados é suficiente para distinguir os indivíduos e, conseqüentemente, estimar o parentesco entre os mesmos. Contabilizaram-se também as frequências alélicas, número médio de alelos, heterozigosidades esperadas ( $He$ ) e observadas ( $Ho$ ) por locus. Desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg foram testados em cada locus. Para todos estes cálculos, utilizou-se o software GenAlEx v.6.3 (Peakall & Smouse, 2006).

O parentesco entre todos os pares de indivíduos foi estimado utilizando o coeficiente  $R$  de Queller & Goodnight (1989), calculado com o software livre SPAGeDi v.1.3 (Hardy & Vekemans, 2002). Este estimador baseia-se nas frequências alélicas da população (Queller & Goodnight, 1989) e é o mais frequentemente utilizado em estudos semelhantes. A função "Specific Hypothesis Test" do software ML-Relate (Kalinowski et al., 2006) foi utilizada para confirmar o tipo de relações de parentesco (pais, irmãos, meio-irmãos/outros parentescos, e não aparentados) em casos individuais quando

necessário (p. ex., entre os pares de lontras para os quais foram calculadas interações estáticas e dinâmicas).

### 2.5.2 Distâncias geográficas

No caso dos animais que foram monitorizados por telemetria, e para os quais portanto havia a estimativa das áreas vitais (Quaglietta, em prep.), utilizaram-se as coordenadas geográficas dos centróides das mesmas como pontos de localização. Para os demais indivíduos, utilizou-se a coordenada geográfica da captura ou de obtenção da amostra.

Todos os pontos correspondentes às localizações dos indivíduos foram projetados num sistema de informação geográfica (ArcGis v.9.3, ESRI, California). A partir destes pontos, calcularam-se dois tipos de distância geográfica: a distância euclidiana (ED) e a distância de menor custo (*least cost distance*; LCD).

A ED é calculada com base na menor distância em linha reta entre dois pontos, não levando em conta elementos da paisagem que possam influenciar o movimento dos animais.

O uso da LCD justifica-se pelo facto de as lontras utilizarem o habitat de forma não homogênea, por se deslocarem predominantemente nas linhas e corpos d'água. A LCD incorpora a conectividade e heterogeneidade presente no habitat (Coulon et al., 2004) e ilustra de forma mais realista os movimentos e o fluxo genético entre as localidades de cada indivíduo. Para calcular a LCD, é necessário primeiramente criar um mapa raster de fricção, onde a cada célula

é atribuído um valor de resistência ao movimento dos animais. Os valores mais altos indicam uma maior resistência e vice-versa.

Para construir o mapa de fricção, utilizaram-se layers da rede hidrográfica (escala 1:25.000) e do uso do solo (1:100.000; Corine Land Cover 2006). A rede viária não foi utilizada, por não ser considerada um elemento com papel significativo na movimentação das lontras (ver Discussão).

A partir da rede hidrográfica, obteve-se um layer raster de distância às linhas e corpos d'água, reclassificado com os seguintes valores: 1(0-25m); 2(25-50m); 5(>50m). Os critérios de reclassificação foram baseados no conhecimento subjetivo acerca dos padrões de uso do espaço pelas lontras. Foram retirados da layer de uso do solo todos os polígonos de ambientes aquáticos, pois sem este procedimento o seu valor seria sobreposto e somado ao da rede hidrográfica, sobre-estimando a resistência das células. As categorias do uso do solo foram reclassificadas em: 1(pauis e sapais); 2(florestas); 3(áreas agrícolas); 5(áreas de ocupação humana, indústrias). Em seguida, os dois rasters foram somados, obtendo-se o mapa de fricção final com uma resolução de 30m.

O conjunto de ferramentas Landscape Genetics para ArcGis (Etherington, 2010) foi utilizado para calcular ambas as distâncias entre todos os indivíduos.

### **2.5.3 Relação entre distâncias geográficas e parentesco**

Para verificar se havia uma relação entre o parentesco e a distância dos indivíduos, modelou-se como variável de resposta o coeficiente de parentesco

R em regressão linear com os dois tipos de distâncias separadamente. Foram realizadas 2000 permutações para testar se o coeficiente  $b$  da regressão (slope) era significativamente distinto do que seria esperado ao acaso, i.e., na ausência de relação entre R e as distâncias. Este teste é similar ao teste de Mantel e foi conduzido com o software SPAGeDi v.1.3 (Hardy & Vekemans, 2002). Em primeira instância, utilizou-se todo o conjunto de indivíduos para a análise. Depois foi feito o mesmo procedimento para machos e fêmeas separadamente, de forma a verificar a hipótese da dispersão no sexo masculino.

Este tipo de análise deveria incluir apenas os indivíduos em idade reprodutiva (i.e., aqueles que potencialmente contribuem com o fluxo genético), uma vez que a inclusão de juvenis poderia sobre-estimar a correlação entre parentesco e distância (Frantz et al., 2008). Por esta razão foi realizada uma prova, retirando-se da amostra os indivíduos conhecidamente juvenis, e comparando os resultados das análises com aqueles que incluíram todos os indivíduos. Como não foram observadas diferenças, os resultados apresentados referem-se às análises feitas com todos os indivíduos.

Para ter uma estimativa da extensão da estrutura espacial na população estudada, utilizou-se uma análise de regressão polinomial local (cf. Coulon, 2004; Broquet, 2006; Gonçalves da Silva, 2007), através do software livre R v.2.10.1 (R Development Core Team, 2010). Este tipo de regressão não-paramétrica é capaz de ajustar localmente a relação entre as duas variáveis, dando mais peso aos pontos vizinhos, sendo por isso bastante útil na análise de dados espaciais (Ruppert, 1996).

#### 2.5.4 Dispersão

Animais sub adultos em fase de pré dispersão foram seguidos por rádio telemetria de forma a identificar a eventual ocorrência de dispersão. Considerou-se uma dispersão quando um animal tenha realizado um deslocamento maior de 2 km para fora de sua área vital de origem estabelecendo-se sem retornar (ou tendo retornado apenas em eventos isolados).

Para a detecção da dispersão através da genética, foi verificada a relação de parentesco entre animais para os quais se tinha uma estimativa da provável data de nascimento. Isto porque, no caso da identificação de uma relação mãe/cria entre dois animais, o teste (ver tópico 2.5.1) não é capaz de indicar quem é quem. Contudo, conhecendo-se a idade estimada de cada um, é possível fazer essa distinção. Desta forma, a dispersão foi definida através da distância entre a mãe e o descendente adulto, conforme Zeyl et al. (2009). Justifica-se utilizar somente a relação com a mãe pois a localidade de origem, i.e., onde o animal provavelmente nasceu, corresponde à localização da sua mãe, mas não necessariamente à localização do pai.

As distâncias de dispersão foram medidas através da modelação de menor custo (LCD) descrita anteriormente, por meio da ferramenta programada por Etherington (2010), em ArcGis v.9.3 (ESRI Inc., California). Caso fossem identificados pontos intermediários onde o animal se manteve estável durante um período curto, na rota entre o início e o fim de sua dispersão, a distância máxima foi considerada como a soma entre as distâncias consecutivas de todos estes eventos.

### 2.5.5 Análises de Interações

Para a análise das interações estáticas, primeiramente foram estimadas as áreas vitais (AVs) e as áreas nucleares (AN) de cada animal. A AN é a porção dentro da AV mais utilizada pelo animal. Esta diferenciação é muito útil na análise das interações, uma vez que os animais poderiam, por exemplo, apresentar uma grande sobreposição na AV total e pouca ou nenhuma sobreposição na AN.

As localizações de cada animal foram analisadas utilizando-se um estimador de densidade kernel fixo. Sabe-se que o kernel não é um método ideal para animais como a lontra, que utilizam ambientes predominantemente lineares como rios e ribeiras, pois acaba por incluir nas estimativas muitas porções de habitat não utilizadas. Contudo, considerou-se justificável utilizá-lo, tal como fizeram Gorman et al. (2006) com a lontra norte americana, pois (1) o objetivo deste estudo não era a análise das áreas vitais *per se*, mas sim das percentagens de sobreposição entre as áreas de dois animais, que é um valor relativo e (2) as áreas vitais não incluíam apenas ribeiras, mas também muitas pequenas charcas e algumas albufeiras.

As estimativas do kernel com contornos de 95% (correspondentes às áreas vitais) e 50% (áreas nucleares) foram feitas com a extensão Home Range Tools para ArcGis, v.1.1 (Rodgers et al., 2007). Teve-se a precaução de separar por 1m os pontos sobrepostos, uma vez que nesta extensão a existência da sobreposição influencia as estimativas do kernel (Rodgers et al., 2007).

As interações estáticas foram estimadas quantificando-se a porcentagem de sobreposição nas AVs e ANs de cada animal em relação ao seu respectivo par.

As interações dinâmicas são quantificadas através de localizações simultâneas dos animais marcados (Doncaster, 1990; Böhm et al., 2008). No presente estudo as localizações foram definidas como simultâneas quando duas lontras eram encontradas inativas durante o dia (ver Gehrt & Fritzell, 1998) e num intervalo de uma hora durante a noite, independentemente da atividade (Gorman et al., 2006), visto que são predominantemente noturnas na área de estudo (OPA, dados não publicados).

Foi assumida uma distância crítica  $\leq 200$  m para classificar a interação como positiva, ou seja, com os animais juntos numa área restrita. Esta escolha foi feita com base nos erros estimados de telemetria, na escala de resolução dos mapas (Quaglietta, em prep.), e tendo em conta os sentidos aguçados dos carnívoros, em especial o olfato. Esta distância julgou-se adequada, considerando que com dados de campo é bastante difícil avaliar a distância na qual duas lontras notam a presença uma da outra (ver Gehrt & Fox, 2004).

Utilizou-se um método não paramétrico conforme sugerido por Doncaster (1990) para avaliar se as interações dinâmicas entre pares de indivíduos foram positivas ou negativas (i.e., se havia um grau de atração ou repulsão recíproco). Para tal, comparou-se a porcentagem de interações positivas nos eventos simultâneos observados com a porcentagem de interações positivas em eventos simultâneos simulados (correspondentes ao que seria esperado ao acaso).

A simulação foi feita permutando-se todos os pontos obtidos nos eventos simultâneos reais de um dado par de animais. As distâncias entre pontos foram medidas através da ferramenta *Point Distance* em ArcGis v.9.3 (ESRI Inc., California). Neste caso, não foram utilizadas as distâncias LCD devido à grande demanda de tempo que seria necessária à computação das mesmas, uma vez que havia uma grande quantidade de pontos em todos os pares de animais analisados. Um teste de  $\chi^2$  foi utilizado para verificar se a percentagem real de localizações abaixo da distância crítica era maior (interação positiva) ou menor (interação negativa) do que a percentagem esperada na simulação.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Estimativas de parentesco e relação com a distância geográfica

Foram recolhidas e analisadas 65 amostras. Destas, 55 ( $\approx 84\%$ ) tiveram sucesso na extração do DNA e amplificação dos loci (Tabela 1), possibilitando a identificação de 51 genótipos individuais. Uma amostra de dejetos e uma de pelos pertenciam a animais já capturados (F13 e F10 respectivamente), dois dejetos recolhidos pertenciam ao mesmo animal (DM1 e DM5), e por fim, descobriu-se que uma carcaça de animal atropelado era de um macho previamente monitorizado por telemetria (M4), cujo sinal havia sido perdido um ano e dois meses antes.

As probabilidades de identidade foram iguais a  $9,2e^{-14}$  ( $P_I$ ) e  $1,9e^{-6}$  ( $P_{i_{sib}}$ ), o que permitiu obter uma estimativa confiável do parentesco com os 19 loci utilizados. Todos os loci eram polimórficos, com um número de alelos variando entre dois e sete (Média=4,63) (Anexo I). A heterozigosidade média observada foi  $0,56 (\pm 0,15)$  e a heterozigosidade média esperada foi  $0,6 (\pm 0,11)$ . Nenhum

dos loci testados apresentou desvios significativos do equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exceção do locus 04OT19 ( $P < 0,0001$ , com correção de Bonferroni).

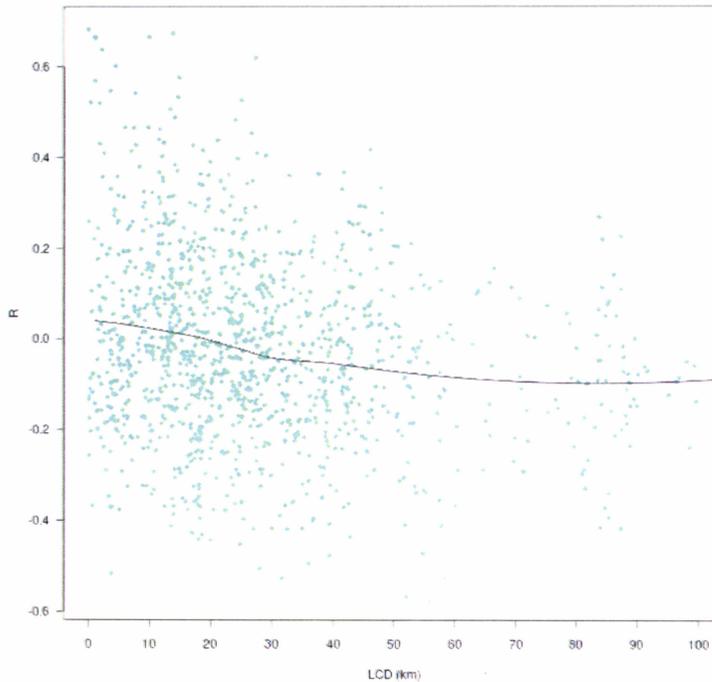
**Tabela 1:** Quantidade de amostras utilizadas e respectivos sucessos na extração e

Tipo de Amostra	amplificação do DNA.	
	N	N e % de amostras amplificadas com sucesso
<b>Animais capturados</b>		
Sangue	9	9 (100%)
Pelos	16	16 (100%)
<b>Cadáveres</b>		
Pelos	13	13 (100%)
Músculo	6	6 (100%)
<b>Fugas</b>		
Pelos	13	7 (53,8%)
<b>Dejetos Frescos</b>	8	4 (50%)
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>55 (84,6%)</b>

Considerando todas as combinações pareadas entre indivíduos ( $N=1275$ ), observou-se um declínio do parentesco com o aumento da distância geográfica ( $P < 0,001$ ). A relação foi significativa tanto para a distância ED como para LCD. Nas análises subsequentes, também não se notou diferença entre os resultados com os dois tipos de distâncias, de forma que apenas os resultados com a LCD serão apresentados.

Através da regressão polinomial local, foi possível observar com maior detalhe as tendências na relação entre parentesco e distâncias. Nota-se que o coeficiente de parentesco torna-se progressivamente menor até uma distância de cerca de 30 km, seguido por uma relativa estabilização a maiores distâncias

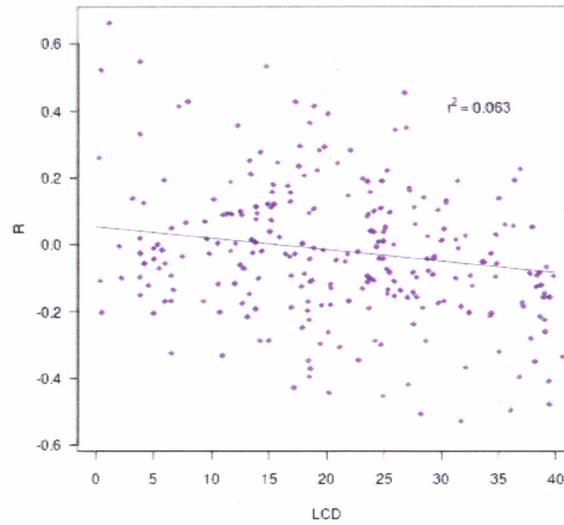
(Fig. 2). Esta pode ser inferida como a extensão espacial até onde o fluxo genético entre indivíduos determina a estrutura genética da população. Tendo isto em consideração, as análises seguintes foram restritas a pares de indivíduos distantes até 35km um do outro.



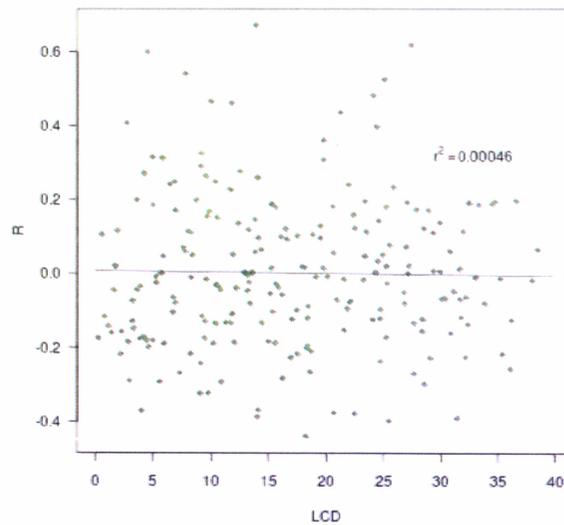
**Figura 2:** Gráfico da regressão polinomial local entre o coeficiente de parentesco ( R ) e a distância geográfica de menor custo (LCD).

Entre os pares de fêmeas (N=286) foi novamente observado o padrão de diminuição no coeficiente R com o aumento da distância ( $P < 0,001$ ) (Fig. 3a). Já nos machos (N=224), não se observou nenhuma relação significativa entre as duas variáveis (Fig. 3b). O baixo valor de  $r^2$  observado é devido à grande variância inerente ao coeficiente de parentesco calculado a nível individual (Blouin, 2003; Coulon et al., 2004).

a)



b)



**Figura 3:** Gráficos da regressão linear entre o coeficiente de parentesco R e a distância de menor custo (em km): (a) entre pares de fêmeas e (b) entre pares de machos. Obs.: Por propósitos ilustrativos, a variável dependente foi mostrada no eixo x.

O processo de validação recomendado por Zuur et al. (2009) foi aplicado aos dois modelos de regressão, confirmando que ambos são coerentes aos pressupostos de homogeneidade e normalidade (ver Anexo 2) e que a relação entre as variáveis pode ser de facto considerada como linear.

### 3.2 Dispersão

Foi possível estudar a dispersão através da telemetria em uma amostra de quatro lontras capturadas em idade sub adulta, no âmbito do projeto OPA. Esta amostra era constituída por três machos (M3, M5, M8) e uma fêmea (F6).

Além disso, foi possível detectar uma ocorrência de dispersão através da análise de parentesco, num indivíduo macho (M1). Este macho era descendente direto de F1 ( $P < 0,01$ ) e sua área vital encontrava-se numa localidade distinta à área desta fêmea.

O tempo de radio seguimento e os resultados da dispersão encontram-se resumidos na Tabela 2. Dos cinco animais, o único a não dispersar foi a fêmea.

A distância média de dispersão foi 17 km ( $\pm 9,8$ ) (tabela 2). Acredita-se que a distância de dispersão de M1 possa ter sido subestimada, uma vez que não se conhecia a rota utilizada por este animal e a estimativa foi feita portanto só com base na LCD.

Os animais M3 e M8 foram mortos por atropelamento na mesma estrada nacional (N114), num momento em que, aparentemente, se encontravam ainda

na exploração de novas áreas. Isto porque os seus cadáveres foram encontrados próximos a linhas d'água que haviam sido pontualmente utilizadas pelos mesmos pela primeira vez, pouco tempo antes de serem atropelados. O animal M1 morreu por causas aparentemente naturais, não esclarecidas.

A dispersão de M3 poderia ainda ser considerada como uma dispersão efetiva (cf. Greenwood, 1980), uma vez que houve evidências genéticas de que este indivíduo se reproduziu após a dispersão. Verificou-se que a fêmea F8, capturada na área onde M3 se estabeleceu após a dispersão, era sua descendente direta ( $P < 0,01$ ).

**Tabela 2:** Distâncias máximas dispersadas e tempo de monitorização de cada animal.

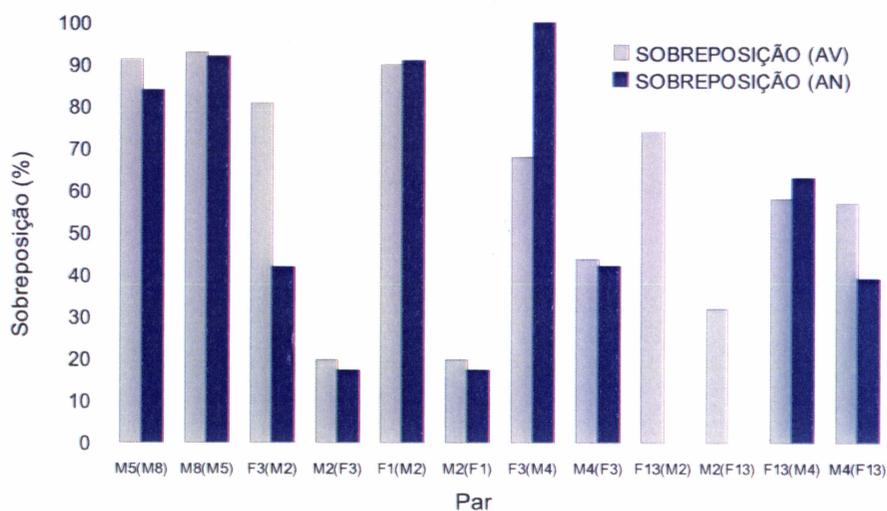
Animal	Tempo de monitorização	Distância máxima de dispersão (km)
M3	Set/07-Jun/09 (morte)	26,1
M5	Set/08 - Set/10	21,9
M8	Nov/08 – Out/09 (morte)	16,4
M1	Jul/07 - Mai/08 (morte)	3,6
F6	Dez/08 - Fev/10	Não dispersou

### 3.3 Interações

Para o estudo das interações estáticas, utilizaram-se seis pares de lontras que apresentaram sobreposição nas suas áreas vitais. Um par era composto por dois machos (M5-M8). Os outros pares eram compostos por machos e fêmeas (M2-F1; M2-F3; M2-F13; M4-F3; M4-F13). Documentaram-se as sobreposições de M2 e M4 com a área de F3 em períodos distintos, pois M4 foi capturado após a morte de M2.

Apesar de F13 não ter sido seguida no mesmo período que os dois machos, por ter sido capturada em Março de 2010, a sua inclusão nas análises de interação estática foi decidida com base em evidências genéticas e temporais da sua coexistência com ambos nos anos anteriores: (1) a fêmea F11, capturada em dezembro de 2009, era filha de F13 com M4 ( $p < 0,0001$ ); (2) um macho jovem (LL16) atropelado em dezembro de 2007 era filho de F13 ( $p < 0,00001$ ); (3) um macho jovem (F2 – na altura, acreditou-se ser uma fêmea) capturado em julho de 2007 também era filho de F13 ( $p < 0,01$ ).

O par que apresentou maior sobreposição foi M5-M8, tanto nas AVs como nas ANs, para as quais não se nota uma grande diferença. Em M2 e F1, também não é evidente uma diferença entre a sobreposição nas duas áreas. No caso de F3 e M4, a diferença nota-se apenas no caso da fêmea, cuja AN se encontra 100% dentro da AN de M4. No caso de F13 e M2, não houve nenhuma sobreposição nas ANs. Finalmente, entre F13 e M4, nota-se que a AN do macho teve menos sobreposição com a da fêmea (Figura 4).



**Figura 4:** Gráfico das porcentagens de sobreposição entre áreas vitais (AV) e áreas nucleares (AN) para cada indivíduo em relação ao seu par (entre parênteses).

**Tabela 3:** Relações de parentesco entre os pares estudados, analisadas com o teste específico no software ML-Relate.

Par	Relação de Parentesco
M5-M8	Irmãos (P<0,001)
M2-F1	Não aparentados
M2-F3	Não aparentados
M2-F13	Não aparentados
M4-F3	Não aparentados
M4-F13	Não aparentados

As interações dinâmicas foram analisadas para quatro pares (M5-M8, M2-F1, M2-F3, M4-F3). Todos os pares apresentaram interações dinâmicas positivas (tabela 4), sendo que no caso de M2-F3 o teste não foi significativo, devido ao pequeno número de localizações simultâneas observadas.

Apenas um dos pares (M5-M8) consistia em indivíduos aparentados (tabela 3). Como ambos ocupavam a área vital da fêmea F1 (cujo sinal foi perdido antes da documentação das interações entre estes dois animais), verificou-se a relação entre os dois e F1, possibilitando a confirmação da suspeita, baseada em impressões de campo, de que M5 e M8 eram seus descendentes diretos ( $P < 0,001$ ).

Diversos eventos de partilha de tocas foram observados (Quaglietta, com. pess.), tanto nos pares macho-fêmea como no par de machos.

O macho M8 dispersou-se da área natal em maio de 2009. Um mês depois, voltou numa ocasião, mas não foi encontrado junto com M5; contudo, neste dia foi visto interagindo com outra lontra, com a qual provavelmente havia partilhado a toca durante o dia, pois esta observação se deu no momento em que M8 iniciava sua atividade após ter saído da toca. Depois deste evento, M8 ficou cerca de dois meses sem voltar, até o início de Setembro. Desta vez, permaneceu durante um curto período (ca. 15 dias), durante o qual voltou a ser localizado pontualmente junto a M5, inclusive na mesma toca. A seguir voltou para a área da dispersão, tendo lá permanecido até morrer por atropelamento no início de Novembro.

**Tabela 4:** Resultados do teste de  $X^2$  para interações dinâmicas e relações de parentesco entre cada par de indivíduos

M5-M8	Nov08-Abr09	30	56	12	1806	<0,001
M2-F1	Ago07-Mar08	25	81	9	6479	<0,0001
M2-F3	Nov07-Mar08	33	22	24	462	n.s.
M4-F3	Mai08-Nov08	46	57	23	3192	<0,05

Legenda: Lo = proporção de localizações obtidas em interação positiva; No = número total de localizações simultâneas obtidas; Ls = proporção de localizações em interação positiva (simuladas); Ns= número total de localizações simuladas; P = nível de significância.

#### 4. DISCUSSÃO

Neste estudo averiguou-se pela primeira vez a existência de uma estrutura espacial do parentesco em *Lutra lutra* numa escala local, refutando a hipótese nula de que os indivíduos são distribuídos aleatoriamente com respeito ao parentesco.

Conforme esperado, observou-se uma correlação negativa entre o parentesco e a distância geográfica nos pares de lontras fêmeas, mas não nos pares de machos. Ou seja, as fêmeas que se encontram mais próximas na área de estudo são mais aparentadas entre si do que seria esperado ao acaso. Estes resultados sugerem que *L. lutra* apresenta padrões de dispersão enviesados em relação ao sexo, como grande parte dos mamíferos (Greenwood, 1980; Sandell, 1989). Neste caso, a ausência de relação entre parentesco e distância nos indivíduos do sexo masculino sugere que este é o sexo que geralmente dispersa.

Resultados semelhantes foram obtidos por meio de dados genéticos em estudos recentes com outros carnívoros, como o urso pardo (*Ursus arctos*;

Støen et al., 2005), o lince (*Lynx rufus*; Crouteau et al., 2010), o urso negro (*Ursus americanus*; Costello et al., 2008), a raposa cinzenta (*Urocyon cinereoargenteus*, Glenn et al., 2009), o urso polar (*Ursus maritimus*, Zeyl et al., 2009), o puma (*Puma concolor*, Biek et al., 2006), o guaxinim (*Procyon lotor*, Ratnayeke et al., 2002) e a lontra norte-americana num ambiente costeiro (*Lontra canadensis*, Blundell et al., 2002b).

Porém, a dispersão por machos em carnívoros não é sempre a regra. Outros estudos mostraram a dispersão apenas de fêmeas (e.g. jupará - *Potos flavus*, Kays et al., 2000; lobo da Etiópia - *Canis simensis*, Randall et al., 2007; no texugo - *Meles meles*, Huck et al., 2008) ou de ambos os sexos (e.g. lince - *Lynx pardinus*, Ferreras et al., 2004; carcaju - *Gulo gulo*, Dalerum et al., 2007).

A regressão polinomial local mostrou que a relação entre parentesco e distância geográfica ocorre principalmente numa extensão de até 30 km. A existência de uma extensão espacial nesta relação, já identificada em outras espécies (40km em ursos pardos - Støen et al., 2005; 10 km em martas - Broquet et al., 2006; 4 km em corços - Coulon et al., 2004), pode ser interpretada de acordo com o processo de isolamento por distância (Wright, 1943). À escala populacional, quando a dispersão é limitada a uma certa distância, o fluxo genético entre indivíduos próximos é maior do que entre os indivíduos mais distantes (Wright, 1943; Broquet et al., 2006).

O processo de isolamento por distância pode, portanto, gerar padrões como o que foi observado neste estudo, no qual a correlação negativa entre a distância geográfica e a similaridade genética entre indivíduos ocorreu numa escala geográfica limitada. A distância até a qual ocorre esta relação

corresponde ao ponto a partir do qual o fluxo genético entre indivíduos diminui, entrando em equilíbrio com a deriva genética, e geralmente evidencia a escala geográfica até a qual sucede, efetivamente, a dispersão (Hutchison & Templeton, 1999; Neville et al., 2006; Gonçalves da Silva, 2007).

A dispersão é um evento bastante difícil e raro de se documentar de forma direta (e.g., observações, telemetria) em mamíferos (Croteau et al., 2010). Em *L. lutra*, havia sido documentada apenas num estudo na Escócia, em ambiente de água doce (Jenkins, 1980). Através da marcação com Zn radioativo e posterior monitorização dos dejetos de um indivíduo macho, observou-se a ocorrência de dispersão a uma distância de 68 km da área original, quando o mesmo tinha cerca de um ano de idade (Jenkins, 1980).

Neste estudo, a dispersão de três indivíduos sub adultos foi documentada pela primeira vez por rádio telemetria na lontra euro-asiática. Isto não só permitiu identificar as rotas utilizadas e estimar as distâncias percorridas, como também verificar o estabelecimento nas novas áreas, excluindo a possibilidade que fossem movimentos erráticos. Houve também a detecção genética da dispersão para um animal (ver Resultados). Estas quatro dispersões observadas, juntamente com a ausência de dispersão na única fêmea sub adulta seguida por telemetria, mostram padrões consistentes com os obtidos pelas análises espaciais do parentesco. Foi possível, ainda, verificar pelo menos um caso de dispersão efetiva, com sucesso reprodutivo, por parte de M3.

As distâncias de dispersão aqui documentadas foram bem menores do que a observada na mesma espécie por Jenkins (1980), e essa diferença pode

ser explicada pelo facto de as áreas de estudo serem bastante distintas em termos de clima, tipo de habitat, e provavelmente da abundância de recursos. Contudo, no âmbito da população estudada estas distâncias podem ser consideradas como representativas, uma vez que estão dentro da escala de 30km onde parece ocorrer efetivamente o fluxo genético entre indivíduos.

A existência da limitação espacial no fluxo genético entre indivíduos pode ser explicada por diferentes fatores. Elementos da paisagem, por exemplo, podem constituir barreiras físicas, enquanto mecanismos biológicos intrínsecos à espécie seriam barreiras comportamentais.

Além da presença de uma auto estrada (A6), estrutura que já foi identificada como barreira para outros carnívoros (Riley et al., 2006), não se reconhecem outras potenciais barreiras físicas, sendo a área de estudo bastante homogênea em termos de paisagem. As análises genéticas revelaram indivíduos aparentados em lados opostos da A6, o que leva a crer que esta estrutura não seja uma barreira efetiva em termos de fluxo genético, apesar de terem sido documentados eventos de mortalidade por atropelamento numa estrada paralela adjacente (N114) (ver resultados; Projecto MOVE, dados não publicados). Isto pode ser explicado por uma alta taxa de recrutamento na população e/ou pelo facto que as lontras passam frequentemente sob as pontes ou nas passagens de fauna (Projecto MOVE, dados não publicados; Santos-Reis et al., 2008).

Sabe-se que o isolamento por distância entre indivíduos pode ocorrer mesmo na ausência de fragmentação e estruturação populacional (Aspi et al., 2006). Desta forma, o próprio potencial de dispersão dos animais poderá ser o

factor que mais está a influenciar o fluxo genético (Gonçalves da Silva, 2007). Sob esta perspectiva, as distâncias de dispersão poderiam estar relacionadas a fatores como a densidade ou distribuição dos indivíduos e à estratégias da espécie para evitar o endocruzamento.

As lontras estão presentes, virtualmente, em todos os cursos de água da área de estudo (Trindade et al., 1998). O uso de áreas vitais estáveis a longo prazo foi identificado nas 14 lontras seguidas por rádio telemetria na área de estudo (Quaglietta, em prep.), sem a ocorrência de indivíduos erráticos. Este facto poderia não deixar margem a grandes movimentos exploratórios por parte dos animais em dispersão. Os indivíduos em dispersão tem de se confrontar com esta grande ocupação territorial por outros da mesma espécie, e encontrar uma área (o primeiro local “vago”) onde o balanço entre a minimização da competição e disponibilidade de recursos seja otimizado. A interação entre estes fatores poderia explicar as distâncias de dispersão relativamente curtas observadas neste estudo. Neste contexto, Støen et al. (2006) mostraram que as distâncias de dispersão em *Ursus arctos* eram de facto menores em condições de alta densidade populacional, e o mesmo poderia ocorrer no caso das lontras. Segundo Perrin e Goudet (2001), a dispersão a curtas distâncias corresponde à distância suficiente para evitar a competição e o endocruzamento.

Lehmann e Perrin (2003) mostraram que nas espécies onde a dispersão é predominante nos machos, a escolha de parceiros pelas fêmeas também pode ter um papel fundamental no processo. Isto porque as fêmeas, numa estratégia para evitar o endocruzamento, podem rejeitar os machos

aparentados como parceiros reprodutivos. Isto levaria os machos a se dispersarem, até onde encontrassem fêmeas menos aparentadas e onde fosse possível estabelecer um território. Os dados aqui obtidos podem sugerir que isto acontece nas lontras, uma vez que todos os potenciais pares reprodutivos (machos e fêmeas com sobreposição nas áreas vitais) eram formados por animais adultos não aparentados. As distâncias de dispersão aqui observadas parecem, portanto, ser suficientes para evitar o endocruzamento.

A literatura referente à organização social em lontras euro asiáticas baseia-se nas observações diretas de indivíduos (Jenkins, 1980; Kruuk & Moorhouse, 1991), seguimento de indícios na neve (Erlinge, 1968) e por telemetria (Green et al., 1984; O'Neill et al., 2009). No entanto, os autores limitaram-se à análises mais descritivas, e não se conhecem estudos que tenham analisado e quantificado concomitantemente interações estáticas e dinâmicas na espécie.

As análises de interações revelaram, em parte, padrões já esperados de acordo com o modelo clássico de mustelídeos e sistema de acasalamento poligínico (Powell, 1979; Kruuk, 2006): territorialidade intra sexual e sobreposição da área vital de um macho com mais de uma fêmea. Este tipo de organização social já havia sido documentado na espécie anteriormente (Erlinge, 1968; Green et al., 1984; O'Neill et al., 2009), e é também consistente com os resultados observados sobre a dispersão, uma vez que em sistemas poligínicos ela ocorre mais frequentemente nos machos (Greenwood, 1980; Dobson, 1982).

Um resultado inesperado neste estudo foi a ocorrência não só de uma forte sobreposição espacial entre os pares de lontras analisados, mas também de uma sobreposição temporal, conforme resultou nas análises de interações dinâmicas. Os resultados apresentados sugerem que estas lontras não apresentam um comportamento solitário típico (Sandell, 1989), pois na verdade passaram mais tempo juntas do o esperado e não se evitaram mutuamente, ao contrário do que se relata na literatura (Green et al., 1984; Kruuk & Moorhouse, 1991; Kruuk, 2006).

Normalmente, acredita-se que machos e fêmeas encontram-se apenas para a reprodução (Sandell, 1989; Kruuk, 2006), mas as evidências deste estudo sugerem que estes encontros não são tão limitados. Kruuk (2006) também afirma que as fêmeas poderiam ser agressivas com machos quando estão com crias, e que evitariam o contato com estes devido ao potencial risco de infanticídio. Aqui, não só foram documentadas associações positivas entre machos e fêmeas adultos com dados de vários meses consecutivos, como também foram observados machos compartilhando tocas com fêmeas na altura em que as mesmas possuíam crias. Se as fêmeas estudadas apresentassem agressividade contra os machos, este comportamento não deveria ter sido observado.

Em virtude das medidas indiretas (i.e. distância entre os animais) utilizadas nas análises de interações, no momento em que dois animais eram encontrados juntos poderiam também estar numa briga ou interação agressiva, uma vez que a agressão intraespecífica já foi relatada na espécie através do exame de cadáveres (Simpson & Coxon, 2000) e de algumas observações

diretas (Kruuk, 2006). Porém, se as interações tivessem sido agressivas e potencialmente prejudiciais a ambos os animais, o evitamento temporal mútuo deveria ter sido evidente. Além disso e da referida partilha de tocas, outros dados (não apresentados neste estudo) adicionam evidências a favor da associação positiva, pois foi observado que durante períodos de monitorização contínua (6 ou 12hs) de alguns pares, os dois animais por vezes passaram uma grande quantidade de tempo juntos, mostrando que a proximidade entre eles não era apenas pontual.

A única sobreposição intra sexual observada foi relativa a um par de machos (M5 e M8), facto que poderia ser contraditório aos padrões esperados. Porém, conforme se confirmou posteriormente, os dois animais eram irmãos e nesse período encontravam-se ainda na fase de pré dispersão. Kruuk relata que é normal que a mãe tome a iniciativa de se separar das crias, e que após a separação estas podem permanecer juntas por algum tempo na área em que foram criadas (2006), podendo este ter sido o caso dos dois machos.

#### **4.1 Integração de dados genéticos com dados de campo**

Há uma série de vantagens em se utilizar dados obtidos por observações no campo em conjunto com dados de genética (DeYoung & Honeycutt, 2005), tal como foi realizado neste estudo. A utilização de métodos moleculares mostra-se capaz de enriquecer estudos de ecologia comportamental (Hughes, 1998) e a combinação entre as duas abordagens é recomendada sempre que possível (van Horn et al., 2008; Zeyl et al., 2009).

Os dados obtidos em campo permitem analisar e compreender diversos aspectos do comportamento social de uma espécie e dos seus padrões de

dispersão, e os dados genéticos complementam estas informações, possibilitando um entendimento de como estes aspectos se traduzem em termos do fluxo genético e parentesco entre indivíduos (Lawson Handley & Perrin, 2007).

A utilização de apenas um dos métodos de estudo pode, inclusive, levar à conclusões distintas. Por exemplo, Blundell et al. (2002b) observaram através de rádio telemetria que ambos os sexos em *Lontra canadensis* dispersavam e que as fêmeas pareciam ter uma mobilidade ainda maior do que os machos. Mas com os dados genéticos, foi possível perceber que o fluxo genético era determinado pela dispersão secundária dos machos, ocorrida apenas durante a época de reprodução. Isto levou à conclusão de que a dispersão era de facto enviesada em relação ao sexo, facto que não seria detectado apenas com os dados de campo. O trabalho de Zeyl et al. (2009) ilustra um exemplo bastante similar, pois seus dados de captura-marcação-recaptura de ursos polares apontavam para uma dispersão predominante das fêmeas, enquanto as evidências genéticas mostraram que os machos eram os dispersores efetivos.

Por outro lado, os estudos baseados apenas em genética, especialmente na genética não invasiva, também podem ter várias limitações na interpretação dos resultados. As relações de parentesco (i.e., irmãos, pais, etc.) entre indivíduos podem ser, por exemplo, classificadas erradamente quando baseadas apenas em dados moleculares (van Horn et al., 2008). No presente estudo classificaram-se as relações de parentesco apenas para animais conhecidos (em termos de idade e/ou área vital), sobre os quais já se tinha hipóteses baseadas nas observações de campo, confirmando-as através

de testes estatísticos (Kalinowski et al., 2006). Conforme van Horn et al. (2008), acredita-se que os dados genéticos são ideais para a identificação e confirmação das relações de parentesco e linhagens, mas não para substituir completamente os resultados destas técnicas.

A interpretação de dados genéticos isoladamente pode também encobrir processos de dispersão que embora não sejam efetivos, isto é, não se refletem no fluxo genético, podem ser muito importantes do ponto de vista comportamental da espécie e da ecologia da paisagem. Os dados genéticos *per se* podem também não conter informação suficiente para inferir sobre características mais detalhadas da dispersão (Guillot et al., 2009). A mobilidade de uma espécie não é importante apenas para a manutenção do fluxo genético mas também para a colonização de novos habitats, e informações relativas às distâncias que podem ser percorridas pelos animais e os percursos utilizados são de grande importância na elaboração de modelos ecológicos, planos de gestão e conservação.

## 5. CONCLUSÃO

O sistema social da lontra parece influenciar o fluxo e a estrutura genética da população, nomeadamente através da dispersão pelos machos e de prováveis estratégias para evitar o endocruzamento, visto que não foram observados casais adultos aparentados:

Ao contrário do que se esperaria para um animal estritamente solitário, as lontras apresentaram um alto grau de associações positivas com indivíduos da mesma espécie. Estes padrões foram diferentes dos observados (através de métodos diferentes) para a mesma espécie em outras áreas, reforçando as ideias acerca da flexibilidade e complexidade social em espécies solitárias.

Neste estudo, a combinação de dados genéticos com observações de campo possibilitou um enquadramento compreensivo da socialidade na lontra euro-asiática. Desta forma foi possível investigar diversos aspectos e revelar padrões até então desconhecidos na espécie, enriquecendo o conhecimento acerca de seu sistema social, um pré-requisito importante para uma correta gestão e conservação de populações.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aguiar, F.C.; Ferreira, M.T. 2005. Human-disturbed landscapes: effects on composition and integrity of riparian woody vegetation in the Tagus River basin, Portugal. *Environmental Conservation* 32: 30-41.

Arrendal, J.; Vjla, C.; Bjorklund, M. 2007. Reliability of noninvasive genetic census of otters compared to field censuses. *Conservation Genetics* 8: 1097-1107.

Aspi, J.; Roininen, E.; Ruokonen, M.; Kojola, I.; Vilà, C. 2006. Genetic diversity, population structure, effective population size and demographic history of the Finnish wolf population. *Molecular Ecology* 15: 1561-1576.

Azevedo, F.C.C.; Murray, D.L. 2007. Spatial organization and food habits of jaguars (*Panthera onca*) in a floodplain forest. *Biological Conservation* 137: 391-402.

Barbosa, A. M. ; Real, R.; Olivero, J.; Mario Vargas, J. 2003. Otter (*Lutra lutra*) distribution modeling at two resolution scales suited to conservation planning in the Iberian Peninsula. *Biological Conservation* 114: 377-387.

Beja, P. 1996. Temporal and spatial patterns of rest-site use by four female otters *Lutra lutra* along the south-west coast of Portugal. *Journal of Zoology* 239: 741-753.

Biek, R.; Akamine, N.; Schwartz, M.K.; Ruth, T.K.; Murphy, K. M.; Poss, M. 2006. Genetic consequences of sex-biased dispersal in a solitary carnivore: Yellowstone cougars. *Biology letters* 2: 312-315.

Blouin, M.S. 2003. DNA-based methods for pedigree reconstruction and kinship analysis in natural populations. *Trends in Ecology and Evolution* 18: 503-511.

Blundell, G.; Ben-David, M.; Bowyer, R. 2002a. Sociality in river otters: cooperative foraging or reproductive strategies? *Behavioral Ecology* 13: 134-141.

Blundell, G.M.; Ben-David, M.; Groves, P.; Bowyer, R. T. ; Geffen, E. 2002b. Characteristics of sex-biased dispersal and gene flow in coastal river otters: implications for natural recolonization of extirpated populations. *Molecular Ecology* 11: 289-303.

Böhm, M.; Palphramand, K. L.; Newton-Cross, G.; Hutchings, M. R.; White, P. C.L. 2008. Dynamic interactions among badgers: implications for sociality and disease transmission. *Journal of Animal Ecology* 77: 735-745.

Broquet, T.; Ray, N.; Petit, E. ; Fryxell, J. M. ; Burel, F. 2006. Genetic isolation by distance and landscape connectivity in the American marten (*Martes americana*). *Landscape Ecology* 21: 877-889.

Burt, W. H. 1943. Territoriality and Home Range Concepts as Applied to Mammals. *Journal of Mammalogy* 24 (3): 346-352.

Cabral, M.J., Almeida, J., Almeida, P.R., Dellinger, T., Ferrand d'Almeida, N., Oliveira, M.E., Palmeirim, J.M., Queiroz, AL., Rogado, L., Santos-Reis, M. (eds.) 2005. Livro Vermelho dos Vertebrados de Portugal. Instituto da Conservação da Natureza, Lisboa.

Cahan, S.; Blumstein, D.; Sundström, L.; Liebig, J.; Griffin, A. 2002. Social trajectories and the evolution of social behavior. *Oikos* 96: 206-216.

Chapman, R.E. & Bourke, A.F.G. 2001. The influence of sociality on the conservation biology of social insects. *Ecology Letters* 4: 650-662.

Corbacho, C.; Sanchez, J.M.; Costillo, E. 2003. Patterns of structural complexity and human disturbance of riparian vegetation in agricultural landscapes of a Mediterranean area. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 95: 495-507.

Costello, C.M.; Creel, S. R. ; Kalinowski, S.T.; Vu, N. V. ; Quigley, H. B. 2008. Sex-biased natal dispersal and inbreeding avoidance in American black bears as revealed by spatial genetic analyses. *Molecular Ecology* 17: 4713 – 4723.

- Coulon, A.; Cosson, J.F.; Angibault, J.M.; Cargnelutti, B.; Galan, M.; Morellet, N.; Petit, E.; Aulagnier, S.; Hewison, J.M. 2004. Landscape connectivity influences gene flow in a roe deer population inhabiting a fragmented landscape: an individual-based approach. *Molecular Ecology* 13: 2841-2850.
- Creel, S. 1998. Social Organization and effective population size in carnivores. In: Caro, T.M. (ed.) *Behavioral ecology and conservation biology*. New York: Oxford University Press, pp 246-266.
- Croteau, E.K.; Heist, E.J.; Nielsen, C.K. 2010. Fine-scale population structure and sex-biased dispersal in bobcats (*Lynx rufus*) from southern Illinois. *Canadian Journal of Zoology* 88: 536-545.
- Csillery, K.; Johnson, T.; Beraldi, D.; Clutton-Brock, T.; Coltman, D.; Hansson, B.; Spong, G.; Pemberton, J. M. 2006. Performance of Marker-Based Relatedness Estimators in Natural Populations of Outbred Vertebrates. *Genetics* 173: 2091-2101.
- Cullingham, C.I.; Pond, B.A.; Kyle, C.J.; Rees, E.E.; Rosatte, R.C.; White, B.N. 2008. Combining direct and indirect genetic methods to estimate dispersal for informing wildlife disease management decisions. *Molecular Ecology* 17:4874-4886.
- Cutrer, A.P.; Lacey, E.A.; Busch, C. 2005. Genetic structure in a solitary rodent (*Ctenomys talarum*): implications for kinship and dispersal. *Molecular Ecology* 14: 2511-2523.
- Dalerum, F. 2005. Sociality in a solitary carnivore, the wolverine. Tese de doutoramento. Department of Zoology, Stockholm University, Estocolmo, Suécia.
- Dalerum, F. 2007. Phylogenetic reconstruction of carnivore social organizations. *Journal of Zoology* 273: 90-97.
- Dallas, J. F. & Piertney, S. B. 1998. Microsatellite primers for the Eurasian Otter. *Molecular Ecology* 7:1247-1263.

Dallas, J.F.; Bacon, P.J.; Carss, D.N. et al. 1999. Genetic diversity in the Eurasian otter, *Lutra lutra*, in Scotland. Evidence from microsatellite polymorphism. *Biological Journal of the Linnean Society*, 68: 73–86.

Dallas, J.F.; Carss, D.N.; Marshall, F. et al. 2000. Sex identification of the Eurasian otter *Lutra lutra* by PCR typing of spraints. *Conservation Genetics* 1: 181–183.

Dammhahn, M.; Kappeler, P. M. 2009. Females go where the food is: does the socio-ecological model explain variation in social organisation of solitary foragers? *Behavioural Ecology and Sociobiology* 63: 939-952.

DeYoung, R.W.; Honeycutt, R.L. 2005. The Molecular Toolbox: Genetic Techniques in Wildlife Ecology and Management. *Journal of Wildlife Management* 69(4): 1362-1384.

Di Fiore, A. 2003. Molecular genetic approaches to the study of primate behavior, social organization, and reproduction. *Yearbook of Physical Anthropology* 46: 62-99.

Dobson, F. 1982. Competition for mates and predominant juvenile male dispersal in mammals. *Animal Behaviour* 30(4): 1183-1192.

Dobson, F. & Jones, W.T. 1985. Multiple causes of dispersal. *The American Naturalist* 126: 855-858.

Doncaster, C.P. 1990. Non-parametric estimates of interaction from radio-tracking data. *J. Theor. Biol.* 143: 431-443.

Erlinge, S. 1968. Territoriality of the otter *Lutra lutra* L. *Oikos* 19: 81-98.

Erlinge, S. 1983. Ecological research on mustelids. *Acta Zoologica Fennica* 174: 167-168.

Erlinge, S. 1995. Social organization in European small mustelids. *Hystrix* 7: 5-15.

Estes, J.A. 1980. *Enhydra lutris*. Mammalian Species 133: 1-8.

Etherington, T.R. 2010. Python based GIS tools for landscape genetics: visualising genetic relatedness and measuring landscape connectivity. *Methods in Ecology & Evolution*, no. doi:10.1111/j.2041-210X.2010.00048.x

Ferreras, P.; Delibes, M.; Palomares, F.; Fedriani, J.; Calzadā, J.; Revilla, E. 2004. Proximate and ultimate causes of dispersal in the Iberian lynx *Lynx pardinus*. *Behavioral Ecology* 15: 31-40.

Foster-Turley, P.; Macdonald, S. & Mason, C.F., 1990. Otters: An action plan for their conservation. IUCN/SSC Otter Specialist Group. 126pp.

Fredsted, T.; Pertoldi, C.; Schierup, M. H. & Kappeler, P. M. 2005. Microsatellite analyses reveal fine-scale genetic structure in grey mouse lemurs (*Microcebus murinus*). *Molecular Ecology* 14: 2363-72.

Frantz, A.C.; Hamman, J.; Klein, F. 2008. Fine-scale genetic structure of red deer (*Cervus elaphus*) in a French temperate forest. *European Journal of Wildlife Research*, 54: 44-52.

Gasith, A.; Resh, V. 1999. Streams in Mediterranean Climate Regions: Abiotic Influences and Biotic Responses to Predictable Seasonal Events. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 30: 51-81.

Gehrt, S.D.; Fox, L.B. 2004. Spatial Patterns and Dynamic Interactions among Raccoons in Eastern Kansas. *The Southwestern Naturalist* 49: 101-121.

Gehrt, S.D. & Fritzell, E.K. 1998. Resource distribution, female home range dispersion and male spatial interactions: group structure in a solitary carnivore. *Animal Behavior* 55: 1211-1227.

Glenn, J.L.W.; Civitello, D. J.; Lance, S.L. 2009. Multiple paternity and kinship in the gray fox (*Urocyon cinereoargenteus*). *Mammalian Biology* 74: 394-402.

Gompper, M.E. & Wayne, R.K. 1996. Genetic relationships among individuals within carnivore societies. In: Gittleman, J.L. (ed.) Carnivore behavior, ecology, and evolution, vol. 2. Ithaca: Cornell University Press, pp. 429-453.

Gompper, M.E.; Gittleman, J.L. & Wayne, R.K. 1998. Dispersal, philopatry and genetic relatedness in a social carnivore: comparing males and females. *Molecular Ecology* 7: 157-163

Gonçalves da Silva, A. 2007. Causes of spatial genetic structure in mammals. A case study in the Atlantic Forest, Brazil. PhD Thesis, Columbia University.

Gorman, T.A.; Erb, J.D.; McMillan, B.R. & Martin, D.J. 2006. Space use and sociality of river otters (*Lontra canadensis*) in Minnesota. *Journal of Mammalogy* 87 (4): 740-747.

Green, J.; Green, R.; Jefferies, D.J. 1984. A radio-tracking survey of otters *Lutra lutra* on a Perthshire river system. *Lutra* 27: 85–145.

Greenwood, P.J. 1980. Mating systems, philopatry and dispersal in birds and mammals. *Animal Behaviour* 28:1140–1162.

Guillot, G.; Leblois, R.; Coulon, A.; Frantz, A.C. 2009. Statistical methods in spatial genetics. *Molecular Ecology* 18: 4734–4756.

Hájková, P.; Zemanová, B.; Bryja, J.; Hájek, B. ; Roche, K.; Tkadlec, E.; Zima, J. 2006. Factors affecting success of PCR amplification of microsatellite loci from otter faeces. *Molecular Ecology Notes* 6: 559-562.

Hájková, P.; Zemanová, B.; Roche, K.; Hájek, B. 2009. An evaluation of field and noninvasive genetic methods for estimating Eurasian otter population size. *Conservation Genetics* 10: 1667-1681.

Hardy, O.J. & Vekemans, X. 2002. SPAGeDi: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes* 2: 218–620.

Hazlitt, S. L.; Eldrige, M. D. B.; Goldizen, A. W. 2004. Fine-scale spatial genetic correlation analyses reveal strong female philopatry within a brush-tailed rock-wallaby colony in southeast Queensland. *Molecular Ecology* 13: 3621-3632.

Howard, W.E. 1960. Innate and Environmental Dispersal of Individual Vertebrates. *American Midland Naturalist* 63: 152-161.

Huang, Chuan-Chin; Hsu, Yu-Cheng; Lee, Ling-Ling; Li, Shou-Hsien 2005. Isolation and characterization of tetramicrosatellite DNA markers in the Eurasian otter (*Lutra lutra*) *Molecular Ecology Notes* 5: 314–31.

Huck, M.; Frantz, A. C.; Dawson, D.A.;Burke, T.; Roper, T. J. 2008. Low genetic variability, female-biased dispersal and high movement rates in an urban population of Eurasian badgers *Meles meles*. *Journal of Animal Ecology* 77: 905-915.

Hung, C.; Li, S.; Lee, L. 2004. Faecal DNA typing to determine the abundance and spatial organisation of otters (*Lutra lutra*) along two stream systems in Kinmen. *Animal Conservation* 7: 301-311.

Hughes, C. 1998. Integrating Molecular Techniques with Field Methods in Studies of Social Behavior: A Revolution Results. *Ecology* 79 (2): 383-399.

Hutchison, D.W.; Templeton, A.R. 1999. Correlation of pairwise genetic and geographic distance measures: Inferring the relative influences of gene flow and drift on the distribution of genetic variability. *Evolution* 53, 1898-1914.

Janečka, J. E.; Blankenship, T. L.; Hirth, D. H. ; Tewes, M. E. ; Kilpatrick, C. W.; Grassman, L. I. 2006. Kinship and social structure of bobcats (*Lynx rufus*) inferred from microsatellite and radio-telemetry data. *Journal of Zoology* 269: 494-501.

Jenkins, D. 1980. Ecology of Otters in Northern Scotland I. Otter (*Lutra lutra*) Breeding and Dispersal in Mid-Deeside, Aberdeenshire in 1974-79. *The Journal of Animal Ecology* 49 (3): 713-735.

- Johnson, D.; Macdonald, D.; Dickman, A.J. 2000. An analysis and review of models of the sociobiology of the Mustelidae. *Mammal Review* 30: 171-196.
- Kalinowski, S.T.; Wagner, A.P.; Taper, M.L. 2006. ML-Relate: a computer program for maximum likelihood estimation of relatedness and relationship. *Molecular Ecology Notes* 6:576-579.
- Kappeler, P.M.; van Schaik, C.P. 2002. Evolution of Primate Social Systems. *International Journal of Primatology* 23(4): 707-740.
- Kays, R.W.; Gittleman, J.; Wayne, R. 2000. Microsatellite analysis of kinkajou social organization. *Molecular Ecology* 9: 743-751.
- Kenward, R. 1987. *Wildlife radio tagging: equipment, field techniques and data analysis*. London: Academic Press.
- Kenward, R. 2001. *A Manual for Wildlife Radio Tagging*. San Diego: Academic Press.
- Kernohan, B.J.; Gitzen, R.A.; Millspaugh, J.J. 2001. Analysis of Animal Space Use and Movements. In: Millspaugh, J.J. & Marzluff, J.M. (eds.) *Radio Tracking and Animal Populations*. San Diego: Academic Press.
- Komdeur, J. & Deerenberg, C. 1997. The importance of social behavior studies for conservation. In: Clemmons, J.R. et al. (Eds.) *Behavioral approaches to conservation in the wild*. Cambridge: Cambridge University Press, pp. 262-276.
- Kruuk, H. 2006. *Otters: ecology, behaviour and conservation*. New York: Oxford University Press. 265 pp.
- Kruuk, H.; Moorhouse, A. 1991. The spatial organization of otters (*Lutra lutra*) in Shetland. *Journal of Zoology* 224: 41-57.
- Larivière, S. 1999. *Lontra longicaudis*. *Mammalian Species* 609: 1-5.
- Lawson Handley, L. J.; Perrin, N. 2007. Advances in our understanding of mammalian sex-biased dispersal. *Molecular Ecology* 16: 1559-1578.

- Lehmann, L.; Perrin, N. 2003. Inbreeding Avoidance through Kin Recognition: Choosy Females Boost Male Dispersal. *The American Naturalist* 162: 638-652.
- Leuchtenberger, C.; Mourão, G. 2008. Social Organization and Territoriality of Giant Otters (Carnivora: Mustelidae) in a Seasonally Flooded Savanna in Brazil. *Sociobiology* 52: 257-270.
- Lott, D.F. 1991. Intraspecific variation in the social systems of wild vertebrates. Cambridge: University Press. 238 pp.
- MacDonald, S.; Mason, C. 1990. Action Plan for European Otters. In: Foster-Turley, P.; MacDonald, S.; Mason, C. (eds.). *Otters - An Action Plan for their Conservation* pp 29-40.
- Maher, C.R. 2009a. Genetic relatedness and space use in a behaviorally flexible species of marmot, the woodchuck (*Marmota monax*). *Behavioral Ecology and Sociobiology* 63: 857—868.
- Maher, C.R. 2009b. Effects of relatedness on social interaction rates in a solitary marmot. *Animal Behaviour* 78: 925—933.
- McDonough, C.M. 2000. Social Organization of Nine-Banded Armadillos (*Dasypus Novemcinctus*) in a Riparian Habitat. *American Midland Naturalist* 144: 139-151.
- McEachern, M.B.; Eadie, J.M.; Van Vuren, D.H. 2007. Local genetic structure and relatedness in a solitary mammal, *Neotoma fuscipes*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 61: 1459–1469.
- Morin, P.A.; Moore, J.J.; Chakraborty, R.; Jin, Li; Goodall, J & Woodruff, D.S. 1994. Kin Selection, Social Structure, Gene Flow, and the Evolution of Chimpanzees. *Science* 265: 1193-1201.
- Neville, H.; Dunham, J.; Peacock, M. 2006. Assessing connectivity in salmonid fishes with DNA microsatellite markers. In: Crooks, K.R.; Sanjayan, M. (eds.) *Connectivity conservation*. New York, Cambridge University Press, pp 318-342.

O'Neill, L.; Wilson, P.; de Jongh, A.; De Jong, T.; Rochford, J. 2008. Field techniques for handling, anaesthetising and fitting radio-transmitters to Eurasian otters (*Lutra lutra*). *European Journal of Wildlife Research* 54: 681--687.

O'Neill, L.; Veldhuizen, T.; de Jongh, A.; Rochford, J. 2009. Ranging behaviour and socio-biology of Eurasian otters (*Lutra lutra*) on lowland mesotrophic river systems. *European Journal of Wildlife Research* 55: 363-370.

Pardo, I.; Álvarez, M. 2006. Comparison of resource and consumer dynamics in Atlantic and Mediterranean streams. *Limnetica*, 25: 271-286.

Peakall, R.; Ruibal, M.; Lindenmayer, D.B. 2003. Spatial Autocorrelation Analysis offers new insights into gene flow in the Australian bush rat, *Rattus fuscipes*. *Evolution* 57: 1182-1195.

Peakall, R.; Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6: 288-295.

Perrin, N.; Goudet, J. 2001. Inbreeding, kinship and the evolution of natal dispersal. In: Clobert, J.; Danchin, E.; Dhondt, A.A.; Nichols, J.D. (eds.) *Dispersal*. New York: Oxford University Press.

Pitt, J. A.; Lariviere, S. & François, M. 2008. Social organization and group formation of raccoons at the edge of their distribution. *Journal of Mammalogy* 89: 646-653.

Portas, C.M. 1967. O Alentejo: situação e perspectivas sócio-económicas. In: *Análise social*. Lisboa: ISCUL, ISSN00003-2573 Vol.5, nº 18 p. 185-206.

Powell, R.A. 1979. Mustelid Spacing Patterns: Variations on a Theme by *Mustela*. *Zeitschrift für Tierpsychologie* 50(2): 153-165.

Powell, R.A. 2000. Animal home ranges and territories and home range estimators. In: Boitani L. and Fuller T.K. (eds). *Research techniques in animal*

ecology: controversies and consequences. New York, Columbia University Press.

Prigioni, C.; Remonti, L.; Balestrieri, A. 2006. Otter *Lutra lutra* movements assessed by genotyped spraints in southern Italy. *Hystrix* 17: 91-96.

Queller, D. C.; Goodnight, K. F. 1989. Estimating relatedness using genetic markers. *Evolution* 43 (2): 258-275.

Randall, D.A.; Pollinger, J.P.; Wayne, R.K.; Tallents, L.A.; Johnson, P.J.; MacDonald, D.W. 2007. Inbreeding is reduced by female-biased dispersal and mating behavior in Ethiopian wolves. *Behavioral Ecology* 18: 579-589.

Ratnayeke, S.; Tuskan, G.A. & Pelton, M.R. 2002. Genetic relatedness and female spatial organization in a solitary carnivore, the raccoon, *Procyon lotor*. *Molecular Ecology* 11: 1115-1124.

Reppucci, J.I.; Castillo, D.F.; Lucherini, M.; Vidal, L. E.M. & Casanave, E. B. 2009. Interindividual interactions of Molina's hog-nosed skunks. *Acta Theriologica* 54: 87-94.

Riley, S. P. D.; Pollinger, J.; Sauvajot, R. M.; York, E.; Bromley, C.; Fuller, T. K.; Wayne, R. 2006. A southern California freeway is a physical and social barrier to gene flow in carnivores. *Molecular Ecology* 15: 1733-1741.

Rodgers, A.R.; Carr, A.P.; Beyer, H.L.; Smith, L.; Kie, J.G. 2007. HRT: Home Range Tools for ArcGIS. Version 1.1. Ontario Ministry of Natural Resources, Centre for Northern Forest Ecosystem Research, .

Ruiz-Olmo, J.; Loy, A.; Cianfrani, C.; Yoxon, P.; Yoxon, G.; de Silva, P.K.; Roos, A.; Bisther, M.; Hájková, P.; Zemanová, B. 2008. *Lutra lutra*. In: IUCN 2010. IUCN Red List of Threatened Species. Versão 2010.3. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acessado a 19 de Junho de 2010.

Ruppert, D. 1996. Local Polynomial Regression and its applications in Environmental Statistics. *Statistics for the Environment*.

Sales-Luís, T.; Freitas, D.; Santos-Reis, M. 2009. Key landscape factors for Eurasian otter *Lutra lutra* visiting rates and fish loss in estuarine fish farms. *European Journal of Wildlife Research* 55: 345-355.

Sandell, M. 1989. The mating tactics and spacing patterns of solitary carnivores. In: Gittleman, J.L. (ed.) *Carnivore Behavior, Ecology, and Evolution*, vol. 1. Cornell University Press, Ithaca 164-182 pp.

Santos-Reis, M.; Grilo, C.; Ascensão, F.; Mateus, A.R.; Serronha, A.M. 2008. Road mortality and permeability for otters (*Lutra lutra*) in a Mediterranean region. In: *Abstracts from the European Otter Workshop, Moravske Toplice, Slovenia*.

Selkoe, K.A.; Toonen, R.J. 2006. Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. *Ecology Letters* 9: 615-629.

Sepulveda, M. A.; Bartheld, J.L.; Monsalve, R.; Gomez, V.; Medina-Vogel, G. 2007. Habitat use and spatial behaviour of the endangered Southern river otter (*Lontra provocax*) in riparian habitats of Chile: Conservation implications. *Biological Conservation* 140: 329-338.

Simpson, V.R.; Coxon, K.E. 2000. Intraspecific aggression, cannibalism and suspected infanticide in otter. *British Wildlife* 11: 423-426.

Singleton, G.R. & Hay, D.A. The effect of social organization on reproductive success and gene flow in colonies of wild house mice, *Mus musculus*. *Behavioral Ecology and Sociobiology* 12: 49-56.

Støen, O.; Bellemain, E.; Sæbø, S. & Swenson, J.E. 2005. Kin-related spatial structure in brown bears *Ursus arctos*. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 59: 191-197.

Støen, O.; Zedrosser, A.; Sæbo, S.; Swenson, J.E. 2006. Inversely density-dependent natal dispersal in brown bears *Ursus arctos*. *Oecologia* 148: 356-364.

Storz, J.F. 1999. Genetic Consequences of Mammalian Social Structure. *Journal of Mammalogy* 80 (2): 553-569.

Taberlet, P.; Waits, L.P.; Luikart, G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Trends in Ecology and Evolution* 14: 323-327.

Trindade, A.; Farinha, N.; Florêncio, E. 1998. A distribuição da lontra *Lutra lutra* em Portugal — Situação em 1995. ICN, Lisboa.

Veron, G.; Colyn, M.; Dunham, A.E.; Taylor, P.; & Gaubert P. 2004. Molecular systematics and origin of sociality in mongooses (Herpestidae, Carnivora). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 30(3): 582-598.

Waser, P.M. & Jones, W.T. 1983. Natal philopatry among solitary mammals. *The Quarterly Review of Biology* 58 (3): 355-390

Wimmer, B.; Tautz, D. & Kappeler, P.M. 2002. The genetic population structure of the gray mouse lemur (*Microcebus murinus*), a basal primate from Madagascar. *Behavioural Ecology and Sociobiology* 52: 166-175.

White, G. C., & Garrott, R.A. 1990. Analysis of wildlife radiotracking data. Academic Press, San Diego. 383 pp.

Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics* 28:114- 138.

van Horn, R.; Altmann, J.; Alberts, S. 2008. Can't get there from here: inferring kinship from pairwise genetic relatedness. *Animal Behaviour* 75: 1173-1180.

Zeyl, E.; Aars, J.; Ehrich, D.; Wiig, Ø. 2009. Families in space: relatedness in the Barents Sea population of polar bears (*Ursus maritimus*). *Molecular Ecology* 18: 735-749.

Zuur, A. F.; Ieno, E. N.; Walker, N. J.; Saveliev, A. A.; Smith, G.M. 2009. Mixed Effects Models and Extensions in Ecology with R. New York: Springer.

## ANEXOS

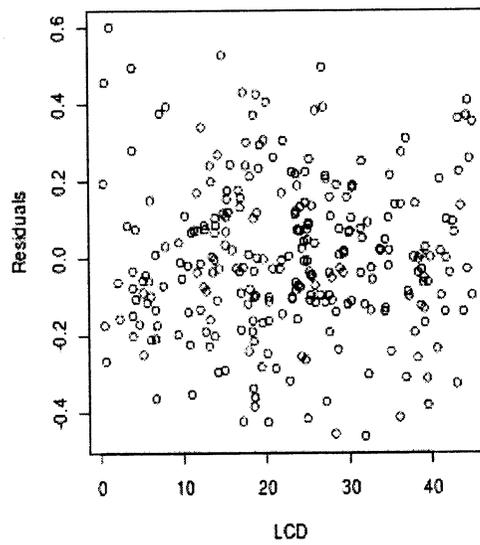
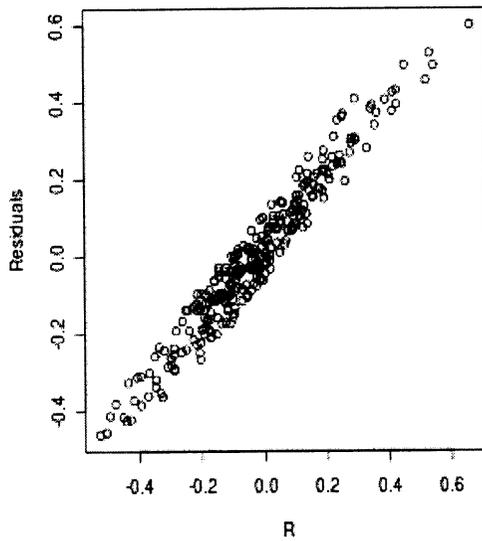
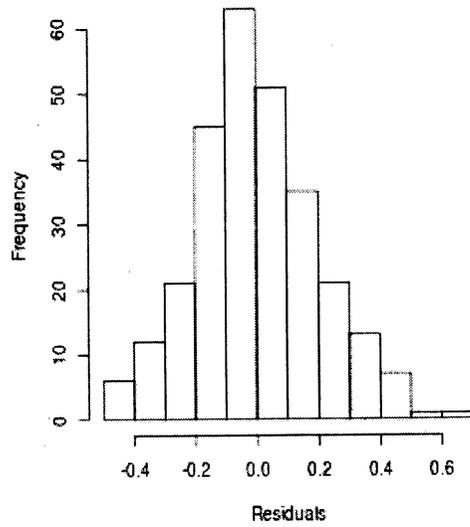
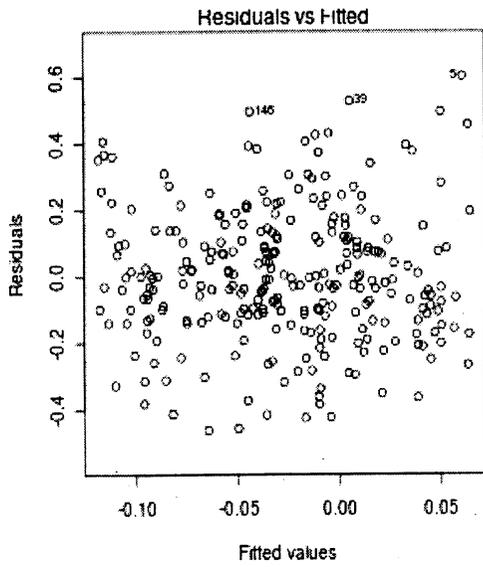
**ANEXO I: Propriedades dos 19 loci de microssatélites utilizados.**

Locus	Nº de alelos	Ho / He	Tamanho do alelo (pb) e frequência						
04OT14	5	0,431 / 0,521	118	122	126	138	142		
			0,62	0,23	0,05	0,02	0,07		
Lut902	7	0,706 / 0,708	140	144	148	152	162	166	170
			0,01	0,18	0,04	0,02	0,13	0,48	0,14
Lut832	4	0,647 / 0,624	180	184	188	192			
			0,5	0,15	0,28	0,05			
Lut701	4	0,569 / 0,583	201	205	209	217			
			0,5	0,4	0,08	0,01			
04OT04	5	0,667 / 0,708	180	204	208	212	216		
			0,16	0,39	0,33	0,1	0,01		
Lut914	4	0,569 / 0,630	138	142	146	150			
			0,05	0,51	0,3	0,13			
04OT17	3	0,569 / 0,606	148	152	156				
			0,5	0,36	0,12				
Lut733	4	0,471 / 0,603	166	170	174	178			
			0,54	0,19	0,21	0,05			
04OT05	6	0,765 / 0,749	174	178	182	186	190	194	
			0,11	0,05	0,39	0,21	0,1	0,13	
Lut715	2	0,235 / 0,239	203	207					
			0,85	0,15					
Elu10	3	0,627 / 0,586	138	142	146				

			0,27		0,57		0,16		
04OT22	7	0,608 / 0,688	146	150	154	158	162	166	170
			0,02	0,27	0,41	0,27	0,01	0,01	0,01
Lut782	5	0,588 / 0,612	176	180	184	188	192		
			0,02	0,03	0,21	0,55	0,19		
04OT07	6	0,784 / 0,785	192	200	208	212	216	220	
			0,1	0,17	0,19	0,06	0,36	0,1	
04OT19	5	0,191 / 0,582	210	214	218	222	226		
			0,08	0,21	0,6	0,1	0,01		
Lut833	4	0,420 / 0,468	150	154	158	166			
			0,04	0,67	0,27	0,01			
Lut818	5	0,647 / 0,623	161	173	177	181	185		
			0,18	0,2	0,53	0,07	0,01		
Lut717	5	0,686 / 0,640	174	186	190	194	198		
			0,07	0,06	0,4	0,44	0,02		
Elu2	4	0,569 / 0,574	205	213	217	221			
			0,2	0,62	0,09	0,08			
Média = 4,63 Média= 0,57 / 0,6									

ANEXO II: Gráficos do processo de validação do modelo linear: (a) fêmeas e (b) machos.

a)



b)

