

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE CITÓTIPOS DE
Mazama americana (ARTIODACTYLA: CERVIDAE)**

Elias Alberto Gutierrez Carnelossi
Zootecnista

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE CITÓTIPOS DE
Mazama americana (ARTIODACTYLA: CERVIDAE)**

Elias Alberto Gutierrez Carnelossi

**Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
Co-orientadora: Profa. Dra. Susana Gonzalez**

Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias do Câmpus de Jaboticabal – UNESP, como parte das exigências para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoramento Animal.

Jaboticabal – São Paulo – Brasil
Maio 2008

C289d Carnellosi, Elias Alberto Gutierrez Carnellosi
Diferenças moleculares entre citótipos de *Mazama americana* /
Elias Alberto Gutierrez Carnellosi. -- Jaboticabal, 2008
ii, 67 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Banca examinadora: Reinaldo Otávio Alvarenga Alves de Brito,
Cláudia Márcia Aparecida Carareto

Bibliografia

1. Citótipos. 2. Filogenia. 3. *Mazama americana*. I. Título. II.
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.111.1:636.082

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

unesp



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

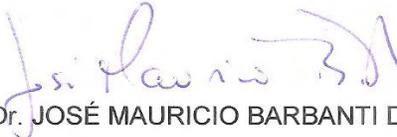
TÍTULO: DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE CITÓTIPOS DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE)

AUTOR: ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI

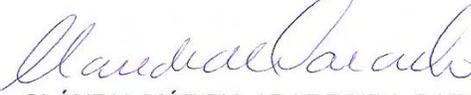
ORIENTADOR: Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Co-Orientador(a): Dra. SUSANA GONZÁLEZ

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL pela Comissão Examinadora:


Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE


Dr. REINALDO OTÁVIO ALVARENGA ALVES DE BRITO


Dra. CLÁUDIA MÁRCIA APARECIDA CARARETO

Data da realização: 27 de maio de 2008.



Presidente da Comissão Examinadora
Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI – Nascido em 13 de Abril de 1982, na cidade de Ariranha, SP, Brasil, graduou-se em Zootecnia em dezembro de 2005, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista – FCAV/UNESP, campus de Jaboticabal, SP. Durante a graduação foi representante discente, durante um ano, do Conselho de Curso e do Departamento de Zootecnia da FCAV. Executou o projeto de iniciação científica no laboratório de genética molecular do departamento de Zootecnia II da FCAV e estágio curricular supervisionado no Instituto de Biociências – Laboratório de Genética e Evolução de Aves da Universidade de São Paulo, 2005. Durante a execução deste trabalho recebeu bolsa Mestrado financiada pela Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo – FAPESP.

À minha família que se dedica, participa
e investe em minha educação.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela orientação, pelas oportunidades, pelos conselhos profissionais e científicos, pela confiança, puxões de orelha e todo aprendizado ao longo destes anos – muito obrigado!

À minha co-orientadora, Prof^a. Dr^a. Susana González, pelos conselhos, correções e elogios.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESP), por acreditar e investir para que este trabalho fosse realizado.

Aos técnicos laboratoriais Paulo Antonio Tosta e João Airton Boer, pelo auxílio no laboratório, pelos ensinamentos e conselhos, companheirismo, lanches da tarde e boas conversas.

Ao Prof. Dr. Manuel Vitor F. Lemos, pela confiança em disponibilizar o seqüenciador e a todos do departamento de Biologia da FCAV pelo carinho e respeito, especialmente ao amigo Irlan Leite de Abreu que acompanhou e ajudou nos seqüenciamentos.

À Prof^a. Dr^a. Maria Inês T. Ferro, pelo carinho, pela atenção ao me receber e todo trabalho realizado no Departamento de Tecnologia da FCAV. Um muito obrigado especial a Vanessa Cristiane Morgan e a Daniele Fernanda Revoredo Jovino, que fizeram a maior parte dos seqüenciamentos com muita atenção e responsabilidade.

À todo o pessoal do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) que vem lutando dia após dia com ações e pesquisas a favor do meio ambiente. Abraço e um muito obrigado especial à velha-guarda: Vanessa Veltrini Abril, Eveline dos Santos Zanetti, Alexandre Vogliotti, Bruna F. Polegato, Christina R. Capalbo, Marina S. Munerato, Ricardo José Garcia Pereira, Allyson Diaz Koester, José Eduardo Garcia, Fernando P. Rodrigues e Guilherme Trovati. Aos mais novos integrantes: André, Marcio, Maurício (Janota), Maurício (Piauí), Vinícius, Kena, Luciana, Samantha, Natália (Onça), Cíntia, Victor, Natália (Sexy), Jaqueline, Alex, Marina. Às meninas da iniciação, Aline Meira Bonfim Mantellatto e Paula Ribas Soares pela ajuda e confiança.

Aos amigos: André F. Gualberto, Leonardo de Oliveira Seno, Henry Cardona Cadavid, Javier Sarria-Perea, Carlos Eduardo Brighenti e um abraço para as amigas Simone Crestoni e Maria Eliane Vechetini.

À família Valério, pelo incentivo e carinho, especialmente à Andréa Valério que acompanhou e me motivou a terminar da melhor maneira possível.

DIFERENÇAS MOLECULARES ENTRE CITÓTIPOS DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE)

RESUMO - O veado-mateiro (*Mazama americana*) possui uma ampla distribuição geográfica na região neotropical. Estudos citogenéticos com a espécie revelam variações cromossômicas (citótipos) que apontam sua divisão em outras espécies. Neste trabalho, foram examinadas as relações filogenéticas desta espécie, analisando parte dos genes mitocondriais (citocromo-b e região controladora D-loop), dos genes nucleares (Beta e Kapa caseínas e do exon I do gene IRBP) e um fragmento do gene, presente no cromossomo Y, chamado SRY, para amostras de 19 indivíduos provenientes de diferentes regiões do Brasil. Os genes nucleares da kapa e beta caseína e do SRY, mostraram-se monomórficos, não sendo possível a obtenção de sequências para o gene IRBP. As inferências filogenéticas pelos genes mitocondriais revelam duas linhagens evolutivas, a dos indivíduos das populações da Bacia do Rio Paraná e a dos indivíduos do oeste da Bacia do Rio Amazonas. Também houve uma correlação entre os diferentes cariótipos e as distintas linhagens moleculares encontradas. Além disso, pode-se sugerir a ocorrência de convergência evolutiva entre estes grupos, bem como um possível caso de simpatria ou de retenção de polimorfismo ancestral nos indivíduos do leste da Amazônia.

Palavras-chave: citótipos, convergência evolutiva, filogenia, genes mitocondriais, genes nucleares, *Mazama americana*

MOLECULAR DIFFERENCES BETWEEN *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) CYTOTYPES.

ABSTRACT – The red brocket deer (*Mazama americana*) has a wide distribution in Neotropics. In this regard, cytogenetic studies in this species revealed chromosomic variations (cytotypes) which strongly suggest that red brockets can be divided into other species. In the present study, we examined phylogenetic relationships of 19 samples of individuals from different areas of Brazil through mitochondrial (cytochrome b and control region D-loop), nuclear (β -casein, k-casein, and first exon of the IBRP) and SRY gene analysis. The sequence analysis showed that β - and k-caseins as well as SRY nuclear genes were monomorphic, whereas IBRP gene sequencing was not possible. Phylogenetic inferences concerning mitochondrial gene analysis demonstrated two evolutionary lineages, one from Parana River Basin (southeast Brazil) and other from west of Amazon River Basin (northwest Brazil). Moreover, we found correlation between different karyotypes and distinct molecular lineages.

KEYWORDS - ancestral polymorphism, cytotypes, convergent evolution, mitochondrial genes, nuclear genes, phylogeny, red brocket deer

SUMÁRIO

	Páginas
I. INTRODUÇÃO.....	01
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1 Evolução.....	03
2.2 Morfologia e taxonomia.....	04
2.3 Citogenética.....	06
2.2 Filogenia Molecular.....	08
III. MATERIAL E MÉTODOS.....	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Extração de DNA.....	13
3.3 Quantificação de DNA.....	13
3.4 Amplificação de DNA.....	16
3.5 Eletroforese.....	21
3.6 Purificação.....	21
3.7 Sequenciamento.....	21
3.8 Análises Filogenéticas.....	22
IV. RESULTADOS.....	26
4.1 Amplificações, seqüenciamentos e alinhamentos.....	26
4.2 Haplótipos.....	28
4.3 Árvores Filogenéticas.....	29
4.4 Distâncias Genéticas.....	34
4.4.1 Distâncias entre as seqüências do citocromo-b de 480 pb.....	34
4.4.2 Distâncias entre as seqüências do citocromo-b concatenados	36
4.4.3 Distâncias entre as seqüências da região controladora.....	38
4.4.4 Distância genética entre clados.....	39
4.5 Análises da Variância Molecular.....	40
V. DISCUSSÃO.....	41
VI. CONCLUSÃO.....	48
VII. IMPLICAÇÕES.....	49
VIII. REFERÊNCIAS.....	50

I. INTRODUÇÃO

O veado-mateiro (*Mazama americana*) distribui-se amplamente na região neotropical e a variabilidade de aspectos morfológicos, ecológicos e citogenéticos desta espécie geram controvérsias entre os pesquisadores para uma correta definição taxonômica no Gênero *Mazama*. Por ser um animal solitário na natureza e utilizar preferencialmente habitats florestais, há poucos estudos em vida livre. Além disso, muitos problemas ambientais para conservação das espécies estão relacionados à vulnerabilidade de pequenas populações e ao fato das florestas tropicais das Américas Central e do Sul estarem sendo fortemente transformadas pela agricultura e pecuária, causando a fragmentação e perda dos habitats ocupados pelo *Mazama americana*.

Em nível internacional, a espécie está categorizada como DD (dado deficiente) na “IUCN Red List of Threatened Species 2006” (DEER SPECIALIST GROUP, 2008), refletindo a falta de conhecimento sobre a espécie. Em especial, inúmeras dúvidas ainda permanecem a respeito do grau de diferenciação entre as diferentes variantes cariotípicas (citótipos) da espécie *M. americana* e se estas poderiam gerar eficientes barreiras reprodutivas, caracterizando espécies distintas. DUARTE (1998) alerta que os distintos citótipos possuem potencial de serem espécies distintas e estarem em risco de extinção.

A genética molecular pode fornecer ferramentas para caracterizar espécies, uma vez que a análise dos nucleotídeos de certas regiões permitiria reconstruir parte da história evolutiva e conhecer melhor o grau de diferenciação entre os citótipos. Ela vem contribuir consideravelmente, com novas ferramentas para análises sistemáticas e para avaliação, monitoramento e manejo para conservação de populações ameaçadas.

Por estes motivos, o presente estudo busca analisar as relações filogenéticas entre alguns indivíduos da espécie *M. americana* provenientes de diferentes localidades do Brasil, estudando as sequências de fragmentos dos genes mitocondriais do citocromo-b e da região controladora (D-loop), dos genes nucleares kapa-caseína, beta-caseína e do gene IRBP (“Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein”) e do gene “Sex-determining Region Y” ou SRY, presente no cromossomo Y.

Apesar da existência de variações cromossômicas entre diferentes populações de *M. americana*, o que sugeriria serem estas unidades evolutivas independentes, uma hipótese deste trabalho é de que não existam diferenças moleculares entre os citótipos, a ponto de não ser identificada uma separação filogenética entre eles.

II. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Evolução

A classificação taxonômica do veado-mateiro *M. americana* ERXLEBEN 1777, tem sido discutida devido a diversas características evolutivas, ecológicas, morfológicas, genéticas e citogenéticas, particulares que a espécie apresenta.

A história evolutiva da família Cervidae e da espécie *M. americana*, têm inúmeras lacunas, pela inexistência de registros fósseis conhecidos de cervídeos na América Central, durante o Plioceno, quando os táxons neotropicais incluindo os pertencentes ao gênero *Mazama* possivelmente migraram para o Sul (WEBB, 2000).

Os escassos registros fósseis encontrados na América do Norte, demonstram que os dois principais ramos de cervídeos do Novo Mundo (tribos Odocoileini e Rangiferini), inicialmente se diversificaram em paralelo na Ásia, e no final do Plioceno (três milhões de anos atrás) se estabeleceram na América do Norte. Logo em seguida, há 2,4 milhões de anos, no final do Plioceno, ocorreu à grande migração dos mamíferos terrestres (“Great American Interchange”) da América do Norte para América do Sul (WEBB, 1991). Esta grande migração, em um curto espaço de tempo, proporcionou a colisão e troca de fauna entre os continentes, favorecendo um evento “explosivo” para diversificação genética dos mamíferos na América do Sul mais do que os da América do Norte (WEBB, 2000).

A partir daí, basicamente duas formas morfológicas são encontradas nos cervídeos da América Central e do Sul. A primeira forma é composta das pequenas espécies de cervídeos, menores que 60 cm quando adultos, morfológicamente semelhantes e machos com chifres pontiagudos, representada pelos gêneros *Pudu* e *Mazama*. A segunda, pelas espécies de grande estatura em

que os machos desenvolvem chifres ramificados, pertencentes aos gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus* (EISENBERG, 2000).

Algumas espécies de *Mazama* de pequena estatura e o gênero *Pudu*, assemelham-se em muitos aspectos aos Cephalophinae (duikers) da África e do gênero *Muntiacus* da Ásia. Porém, eles devem ter se separado na história evolutiva e, assim, a pequena estrutura corpórea destes cervídeos foi selecionada mais de uma vez e independentemente (EISENBERG, 2000).

Explicações para história evolutiva do gênero *Mazama* ainda é pouco conhecida, pois também não é claro quem migrou primeiro após a formação do istmo panamenho, podendo ter havido diferenciação na América Central antes da grande migração (WEBB, 2000).

GILBERT et al. (2006) sugerem que a América do Sul foi colonizada em duas etapas, a primeira vez por um ancestral do ramo dos cervídeos da América do Sul, no início do Plioceno e uma segunda vez pelo *M. americana* e *Odocoileus virginianus* no final do Plioceno e início do Pleistoceno. Este mesmo autor sugere que, provavelmente devido à enorme semelhança morfológica entre os cervídeos da América Latina, possam ter ocorrido adaptações similares e independentes ao longo do tempo para as espécies do gênero *Mazama*.

2.2 Morfologia e Taxonomia

Atualmente o gênero *Mazama* RAFINESQUE 1917, é composto por 9 espécies, *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. rufina*, *M. bricenii*, *M. chunyi*, *M. pandora*, *M. bororo* e *M. nemorivaga*. Dentre as espécies reconhecidas no Brasil estão *M. gouazoubira* (veado-catingueiro), *M. americana* (veado-mateiro), *M. bororo* (veado-mateiro pequeno), *M. nemorivaga* (veado-roxo) e *M. nana* (veado mão-curta) (DUARTE, 1996, ROSSI, 2000), Figura 1.

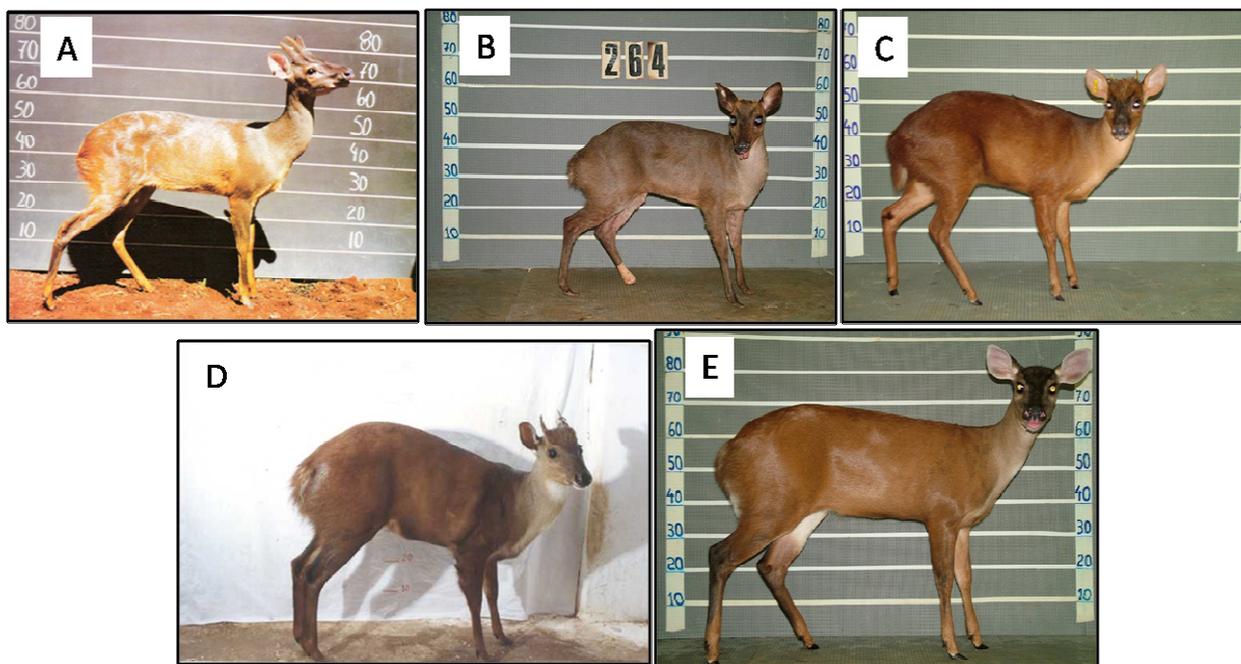


Figura 1. Espécies de cervídeos do gênero *Mazama* encontradas no território brasileiro. A – *M. gouazoubira*, B – *M. nemorivaga*, C – *M. nana*, D – *M. bororo*, E – *M. americana*.

Análises de genes mitocondriais e nucleares dos cervídeos identificaram que o gênero *Mazama* é merofilético e que a semelhança morfológica entre *M. americana* e *M. gouazoubira* deve ter ocorrido por evolução convergente. Entretanto, eles sugerem que esta hipótese deve ser corroborada por uma análise envolvendo todas as espécies do gênero *Mazama* e que novos marcadores nucleares devem ser estudados entre as espécies americanas (GILBERT et al. 2006).

Dentre todas as espécies de *Mazama* no Brasil, a espécie *M. bororo* é a mais recente espécie descrita do gênero, revelada por estudos citogenéticos e morfológicos de animais de cativeiro (DUARTE & JORGE, 2003). Posteriormente trabalhos ecológicos constataram uma população endêmica de *M. bororo* no Parque Estadual Intervales na Serra de Paranapiacaba, sul de São Paulo (VOGLIOTTI, 2004).

Já a espécie *M. americana* ocorre nas Américas Central e do Sul, desde o Sul do México até o Norte da Argentina e Sul do Brasil (EMMONS & FEER, 1997).

O Veado-mateiro é a maior espécie do gênero, apresentando um aspecto robusto com 30 a 40 Kg de peso, dorso arqueado com altura entre 58 a 80 cm e comprimento de 90 a 145 cm (DUARTE, 1996). Pertencente ao gênero mais numeroso entre os cervídeos é o primeiro em abundância e amplitude de distribuição dos cervídeos de florestas neotropicais (EISENBERG & REDFORD, 1999).

Além da ampla distribuição, esta espécie ao longo do tempo passou por diferentes divisões e classificações taxonômicas devido a estudos de comparações morfológicas. Em 1913, THOMAS reconheceu uma subespécie de *M. americana* no sul do Brasil (Paraná) e descreveu duas novas espécies: *M. zetta* e *M. sheila*, confirmado por ALLEN (1915) que, além destas, citou mais seis espécies e três subespécies, enquanto CABRERA em 1960, realizou uma reclassificação citando 9 subespécies. Entretanto, ROSSI (2000) sugere a existência somente da espécie *M. americana* no Brasil, também a partir de informações morfológicas.

2.3 Citogenética

A taxa de evolução cariotípica dos cervídeos, segundo SCHERTHAN (1991), é uma das mais altas dentro da ordem Mammalia. NEITZEL (1987) por análises comparativas de bandamentos cromossômicos, sugeriu que o ancestral da família Cervidae possuía um número diplóide igual a 70 cromossomos, dos quais 68 eram autossomos acrocêntricos.

DUARTE & JORGE (1996) analisando citogeneticamente o gênero *Mazama*, descreveram polimorfismo cromossômico entre algumas espécies. Por exemplo, em *M. gouazoubira*, o número diplóide ($2n$) variou de 68 a 70, número fundamental de braços (NF) igual a 70 e em *M. nemorivaga*, $2n= 68$ a 70 e NF=72.

ABRIL & DUARTE (2008) reportaram diferença cariotípica entre indivíduos de *M. nana* ($2n$ de 36 a 39 e NF igual a 58), devido a fusões cêntricas, além de variações no número de cromossomos supranumerários (B) dentro e entre indivíduos.

Para a espécie *M. americana*, os estudos citogenéticos têm procurado responder a questão ainda incerta da taxonomia da espécie. Citótipos encontrados de *M. americana* revelam um processo intenso de evolução cromossômica (DUARTE, 1998).

TAYLOR et al. (1969) descreveu um indivíduo com número diplóide de cromossomos $2n=68$ e número fundamental de braços $NF=74$ (origem desconhecida), enquanto JORGE & BENIRSCHKE (1977) analisaram 3 animais oriundos do México que apresentaram $2n=49/50/50$ e $NF=71/72/72$. NEITZEL (1987) cita um indivíduo do Paraguai com $2n=52$ e $NF=56$, coincidente com quatro outros indivíduos brasileiros estudados por DUARTE & MERINO (1997), que encontraram $2n=48, 50, 52$ e 54 e $NF=54, 54, 56$ e 56 , respectivamente.

Posteriormente, DUARTE (1998) analisou 33 indivíduos de diferentes localidades do Brasil, encontrando expressiva variação tanto no número diplóide de cromossomos (42 a 53), quanto no número fundamental de braços (48 a 57). A partir daí, notou-se que alguns cariótipos eram característicos de algumas regiões, permitindo distinguir sete diferentes citótipos: Rio Negro, Manaus, Jarí, Acre, Rondônia, Carajás e Rio Paraná (Tabela 1).

Tabela 1. Citótipos de *Mazama americana*, segundo DUARTE (1998).

Citótipos	2n	A	B	D	E	Origem
Acre	46-47	0	2-4	10-14	31-33	Rio Branco (AC)
Alto Rio Negro	44	1	4	5	30	Rio Branco (AC), Alto Rio Negro (AM)
Manaus	43-44	4	3-5	4	31-34	Manaus (AM), Manacapuru (AM)
Carajás	48-51	2-4	3-6	6 a 8	36-38	Carajás, Oriximiná, Parauapebas (PA)
Rondônia	42-45	2-4	3-5	7 a 10	26-28	Ariquemes (RO), Vilhena (RO)
Norte do Pará	48-50	3	3	5 a 7	38	Projeto Jarí (PA)
Paraná	52-53	2	2-5	6	42-43	Paraná, Paraguai

2n = número cromossômico, A=grandes cromossomos de dois braços, B=Cromossomos B ou supranumerários; D=grandes cromossomos acrocêntricos, E= pequenos cromossomos acrocêntricos.

De maneira semelhante, SARRIA-PEREA (2004), comparando citogeneticamente alguns citótipos da espécie *M. americana*, retratou uma diferença entre os citótipos Paraná e Carajás devido a uma fusão em tandem. Além disso, relatou que o citótipo Rondônia está consideravelmente mais distante evolutivamente dos citótipos do Paraná e Carajás, por diferir em quatro fusões em

tandem e uma translocação Robertsoniana, além de vários caracteres polimórficos.

Estudos recentes confirmam, mais uma vez, a variação cromossômica encontrada em *M. americana* de várias regiões do Brasil, devido a diferenças entre indivíduos/citótipos causadas por rearranjos cromossômicos. ABRIL & DUARTE (2006) analisaram mais 18 indivíduos de diferentes regiões e assim sugeriram a hipótese de que alguns dos citótipos possam vir a ser outra espécie (Tabela 2).

Tabela 2. Citótipos estudados por ABRIL & DUARTE (2006) de *M. americana*, número de indivíduos e seus respectivos número diplóide de cromossomos (2n) e seu número fundamental de braços (NF).

Citótipos	Nº Ind.	2n/NF	A	B	C	D	E
Rondônia	3	2n=42/NF=49 ou 2n=43/NF=46	2 ou 5	3 a 7	5 ou 10	5 ou 10	28 ou 30
Juína	5	2n=43/NF=48, 2n=44/NF=46 ou 2n=45/NF=48	2 ou 3	3 a 5	8	8	28,30 ou 32
Jari	1	2n= 49 / NF=56	6	5	4	4	40 ou 42
Carajás	1	2n=50 / NF=54	2	3 a 6	8	8	28,30 ou 32
Santarém	2	2n= 51 / NF=56	4	2 a 4	4	4	40
Paraná	6	2n = 51 a 53 / NF=56	2	2 a 5	6	6	40 ou 42

Nº ind.-número de indivíduos estudados; 2n = número cromossômico, A=grandes cromossomos de dois braços, B=Cromossomos B ou supranumerários, C=pequenos cromossomos de dois braços; D=grandes cromossomos acrocêntricos, E= pequenos cromossomos acrocêntricos.

2.2 Filogenia Molecular

As técnicas moleculares estão se tornando ferramentas fundamentais na geração de informações biológicas em todas as áreas. Elas são utilizadas para resolver problemas taxonômicos, filogenéticos de grandes grupos, relações filogenéticas de populações ou em estudos sobre evolução de características morfológicas, fisiológicas e comportamentais (RUSSO, 2001).

Os inúmeros genes e regiões são cada vez mais estudados para responder às diversas questões na biologia da conservação. MURPHY et al. (2001), examinaram 15 genes nucleares e três mitocondriais (no total de 9.779 pb) de 64

mamíferos placentários e dois marsupiais, com isso, determinaram as relações evolutivas entre estes grupos.

Investigações moleculares têm ajudado muito a delimitar a origem da família Cervidae e entender a evolução de alguns caracteres. Entretanto, devido ao número insuficiente de animais amostrados, de marcadores moleculares analisados e dos táxons utilizados, vários dos aspectos da história biogeográfica da família dos cervídeos das Américas ainda não estão definidos.

Há inúmeros estudos moleculares sobre a família Cervidae envolvendo comparações de seqüências de aminoácidos (MROSS & DOOLITTLE, 1967), ribonucleases (BEINTEMA et al. 1988), RNAs ribossomais (MIYAMOTO et al. 1990; KRAUS & MIYAMOTO, 1991), k-caseína (CRONIN et al. 1996), k-caseína combinada com DNA mitocondrial (RANDI et al. 1998) e mitocondriais (IRWIN et al. 1991, DOUZERY & RANDI, 1997, FEULNER et al. 2004; GILBERT et al. 2006; XIAO et al. 2007; GUHA et al. 2007).

Os marcadores mais utilizados ultimamente para determinar as relações filogenéticas, são os marcadores mitocondriais seguido dos nucleares. Dentre os mitocondriais, está o gene citocromo-b (cyt b), um gene codificante mitocondrial. Em cervídeos e outras espécies de mamíferos está sendo muito utilizada devida sua alta taxa de mutação de nucleotídeos (maior que os genes nucleares) e como todos os outros genes mitocondriais é de herança maternal, replica sem recombinação e é fácil de ser isolado. Por estes motivos, a variabilidade presentes em genes mitocondriais é útil na investigação de espécies que divergiram em tempos geológicos mais recentes, portanto, ideais para estudos das variações intra e interespecíficas (AVISE et al. 1987). RANDI et al. (1998), por exemplo, publicaram uma nova perspectiva filogenética da família Cervidae, comparando o citocromo b completo de 11 espécies da família.

Outra seqüência muito utilizada é a da região controladora mitocondrial (D-loop). Estudos e análises comparativas em Cervídeos indicam que esta seqüência é altamente estruturada, com uma região central conservada e flanqueada por dois domínios periféricos altamente divergentes. Portanto, podem ser seguramente utilizadas em filogenia para vários Artiodactyla, Cetacea e

Perissodactyla com mais de 60 milhões de anos de divergência evolutiva (DOUZERY & RANDI, 1997).

Genes nucleares também são usados como fonte de informações em diferentes espécies. MURPHY et al. (2001) relatam, por exemplo, a importância de segmentos de regiões não-codificadoras nucleares em estudos filogenéticos da ordem Mammalia e de outros grupos taxonômicos. Apesar de possuírem uma taxa de substituição de nucleotídeos menor do que no genoma mitocondrial, estudos revelam certo grau de associação filogenética entre seqüências de genes mitocondriais com nucleares (NOVACEK, 1992; MOUCHAITY, 2000; CALCAGNOTTO, 2001; MURPHY et al. 2001).

NABHOLZ et al. (2008) descrevem a importância do gene do citocromo-b e as taxas de mutações deste gene comparadas com a taxa do exon I do gene nuclear "Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein" (IRBP), para 1.696 espécies de mamíferos. O gene IRBP é uma região de cópia simples, codificante de uma grande glicoproteína encontrada primariamente na matriz interfotoreceptora da retina de todas as classes de vertebrados, mostra-se potencial marcador em estudos filogenéticos (BRIDGES et al. 1986).

Parte do exon I do IRBP tem sido utilizado em inferências filogenéticas entre ordens (SPRINGER et al. 2001) entre famílias (WEKSLER, 2003), gêneros (JANSA & VOSS, 2000) e tribos (D'ELÍA et al. 2006). Principalmente devido a características como a existência de uma simples cópia, por fornecer pouca incongruência entre os resultados do mtDNA e o IRBP, ausência de alinhamentos ambíguos entre as seqüências e ausência de efeitos de saturação de códons (JANSA & VOSS, 2000; WEKSLER, 2003; KOEPFLI et al. 2007).

As taxas de substituição por milhões de anos entre citocromo-b e IRBP são significativamente correlacionadas entre as espécies, mas a relação não é linear. Em mamíferos de evolução rápida, a taxa de substituição pode ser 100 vezes maior que a nuclear (ex., 136 em Muridae, Rodentia), enquanto que esta taxa é menor que 20 em mamíferos de evolução lenta (ex., 15 em Hominidae, Primatas) (NABHOLZ et al. 2008).

Outros genes nucleares também são utilizados para inferências filogenéticas em mamíferos, como o gene da Kapa-caseína exon IV por exemplo, CRONIN et al. (1996) avaliaram a filogenia dos grandes ruminantes da família Bovidae, Cervidae, Giraffidae e Antilocapridae utilizando este gene, entretanto contestaram a aplicação de seqüências deste gene para comparações interespecíficas nos estudos filogenéticos em Cervídeos.

A combinação das informações dos genes mitocondriais e nucleares também é realizada para elevar a confiabilidade dos resultados. Estudo comparando genes do DNA mitocondrial, de *Cervus elaphus* e *Cervus canadensis*, sugeriu que o status taxonômico desta última espécie deveria ser restabelecido (POLZIEHN & STROBECK, 2002).

Da mesma maneira, buscando associação entre seqüências mitocondriais e nucleares, TCHAICKA et al. (2007) investigaram a história populacional e filogeográfica da espécie *Cerdocyon thous*. As análises dos genes mitocondriais (citocromo b, 615 pb e da região controladora, 512 pb) revelaram uma forte divisão filogeográfica entre o norte e o sul do Brasil da distribuição desta espécie. Entretanto os resultados dos genes mitocondriais divergiram dos resultados nucleares, mesmo assim, apresentaram um cenário evolutivo da dispersão desta espécie baseados em outros vertebrados e da descontinuidade entre norte e sul da distribuição da floresta Atlântica.

Importantes aferições filogenéticas foram realizadas para família Procyonidae, utilizando dados de fragmentos de genes de nove marcadores nucleares e dois mitocondriais, e a partir destes identificaram três novas linhagens (KOEPLI et al. 2007).

Analisando as seqüências de DNA mitocondrial e nuclear, a filogenia da família Cervidae foi reconstruída, em 25 espécies e 15 gêneros, com base em informações sistemáticas, morfológicas e biogeográficas. Os autores citam que a taxonomia do gênero *Mazama* é muito confusa e que análises utilizando novos marcadores nucleares devem ser desenvolvidas para conhecermos as relações entre as espécies do Gênero (GILBERT et al. 2006).

Para o conhecimento da introgressão entre espécies, raças, subespécies, variedade ou populações distintas, vários autores passaram a adotar análises filogenéticas com marcadores presentes no cromossomo Y, por ser de herança paterna, comparados com os dados gerados pelos genes mitocondriais (KIKKAWA et al. 2003; MEADOWS, et al. 2006). Estudos considerando a herança paterna seriam interessantes devido a observações da filopatria de fêmeas em algumas espécies de cervídeos, por exemplo, em *Odocoileus virginianus*, *Blastocerus dichotomus* e *Capreolus capreolus* (PURDUE, 2000; NIES, 2005; OLIVEIRA, et al. 2005).

Os estudos realizados com genética molecular para elucidar as classificações taxonômicas tradicionais, com base na morfologia são muitas vezes discutidos entre os pesquisadores e conservacionistas. MORITZ (1994) e outros pesquisadores discutem que, com auxílio de estudos moleculares principalmente de informações da distribuição e filogenia do DNA mitocondrial e das frequências alélicas em um loco nuclear, pode-se caracterizar um termo chamado “Unidade Evolutiva Significante”, do Inglês “Evolutionarily Significant Units” (ESU). Basicamente a ESU é um grupo de populações isoladas historicamente que se diferenciam em um critério qualitativo, baseado na distribuição de alelos em relação a sua filogenia. Na prática uma ESU complementaria os critérios tradicionais de classificação taxonômica de uma espécie e definiria ações prioritárias e estratégia para conservação de uma unidade evolutiva com mais rapidez.

Diante do exposto, o presente projeto tem como objetivo definir parte das relações filogenéticas entre alguns citótipos da espécie *M. americana*, utilizando para isso informações moleculares provenientes do seqüenciamento dos genes mitocondriais: citocromo-b e região controladora D-loop e dos genes nucleares: kapa-caseína, beta-caseína, IRBP e SRY e assim contribuir para classificação taxonômica e sua conservação.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Foram amostrados 19 animais da espécie *M. americana* oriundos de diferentes localidades do Brasil e mantidos pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPPECE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da UNESP, campus de Jaboticabal-SP.

Amostras sanguíneas utilizadas para o estudo destes animais foram oriundas do banco de amostra do NUPECCE e os procedimentos laboratoriais foram realizados no laboratório de Genética Molecular do Departamento de Zootecnia.

A Tabela 3 e a Figura 2 reúnem informações sobre os espécimes amostrados, local de origem do cativo e da natureza, sexo, citótipo e a bacia hidrográfica em que o local de origem está posicionado.

3.2 Extração de DNA

Os procedimentos para extração de DNA foram realizados segundo o protocolo descrito por ZADWORNY & KUHLEIN (1990), com adaptações (ANEXO I).

3.3 Quantificação de DNA

Para o controle da pureza do DNA, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho Eppendorf BioPhotometer®, 1 µl da amostra de DNA genômico foi diluído em 99 µl de Água MilliQ e em seguida quantificado.

Os valores da relação de absorvância do DNA extraído deveriam estar entre 1,8 e 2,0 para relação 260/280 e da relação 260/230 maior que 2,0. Quando a leitura não obedecia a um valor aproximado destas relações um novo processo de extração era realizado.

As amostras, eventualmente, eram visualizadas e quantificadas em gel de agarose 1%. Após ambos os métodos de quantificação uma porção das amostras era diluída em água, buscando-se obter uma solução de trabalho de aproximadamente 50 ng/µl para amplificação e, em seguida, eram armazenadas em geladeira a 4°C.

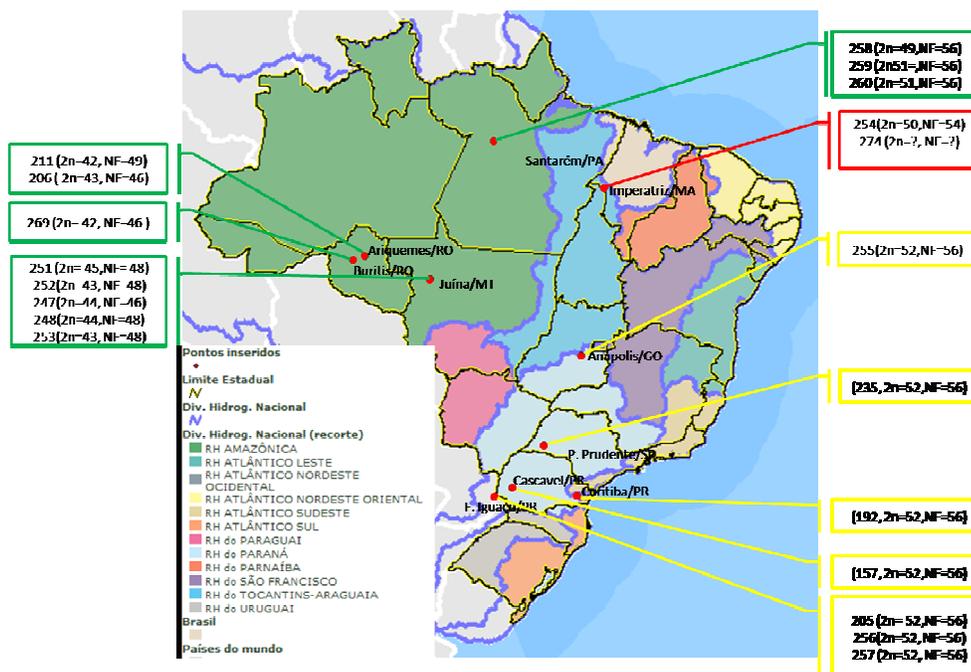


Figura 2. Distribuição da origem de cativeiro dos espécimes de *Mazama americana* dentro do território nacional (círculos vermelhos no mapa), numeração dos animais (ver tabela 3), 2n-número diplóide de cromossomos, NF- número fundamental de braços cromossômicos; quadrados verdes fora do Mapa - indivíduos da Bacia Hidrográfica Amazônica, quadrado vermelho-Bacia Hidrográfica do Tocantins, quadrados amarelo - Bacia do Rio Paraná, cores do mapa – verificar legenda do lado esquerdo do mesmo.

Tabela 3. Relação dos animais *Mazama americana* analisados, origem de cativeiro e suas abreviações (Abrev.), origem de natureza, citótipo e b hidrográfica em que a cidade de origem dos animais de cativeiro está localizada.

Identificação	Sexo	Origem de cativeiro	Abrev.	Origem de natureza	Citótipo	Bacia Hidrográfica
T206	Macho	Zôo de Ariqueemes – RO	Ar/RO	Desconhecida	Rondônia - RO	Rio Amazonas
T192	Fêmea	Zoo de Curitiba – PR	Cu/PR	Desconhecida	Paraná - PR	Rio Paraná
T205	Macho	Criadouro Itaipu – PR	It/PR	Nascido em cativeiro	Paraná - PA	Rio Paraná
T211	Fêmea	Zôo de Ariqueemes – RO	Ar/RO	Desconhecida	Rondônia - RO	Rio Amazonas
T235	Fêmea	Criadouro Pres. Prudente – SP	PP/SP	Desconhecida	Paraná- PR	Rio Paraná
T247	Macho	IBAMA Juína – MT	Ju/MT	Juína – MT	Mato-Grosso - MT	Rio Amazonas
T248	Fêmea	IBAMA Juína – MT	Ju/MT	Juína – MT	Mato-Grosso - MT	Rio Amazonas
T251	Macho	IBAMA Juína – MT	Ju/MT	Juína – MT	Mato-Grosso - MT	Rio Amazonas
T252	Fêmea	IBAMA Juína – MT	Ju/MT	Juína – MT	Mato-Grosso - MT	Rio Amazonas
T253	Fêmea	IBAMA Juína – MT	Ju/MT	Juína - MT	Mato-Grosso - MT	Rio Amazonas
T254	Fêmea	IBAMA Imperatriz – MA	Im/MA	Nascida em cativeiro	Carajás - PA	Rio Tocantins
T255	Fêmea	Criadouro Teuto/Anápolis – GO	An/GO	Desconhecida	Paraná - PR	Rio Paraná
T256	Fêmea	Criadouro Itaipu – PR	It/PR	Nascida em cativeiro	Paraná - PR	Rio Paraná
T257	Fêmea	Zôo de Cascavel – PR	Ca/PR	Pq. Nac. do Iguçu – PR	Paraná - PR	Rio Paraná
T258	Macho	Criadouro Santarém – PA	Sa/PA	Desconhecida	Jari-PA	Rio Amazonas
T259	Macho	Criadouro Santarém – PA	Sa/PA	Desconhecida	Santarém - PA	Rio Amazonas
T260	Macho	IBAMA Santarém – PA	Sa/PA	Desconhecida	Santarém - PA	Rio Amazonas
T269	Macho	Buritis - RO	Bu/RO	Itaituba – PA	Rondônia-RO	Rio Amazonas
T274	Fêmea	IBAMA Imperatriz - MA	Im/MA	Desconhecida	Paraná - PR	Rio Tocantins

3.4 Amplificação de DNA

As amostras extraídas foram submetidas à técnica de PCR (“Polimerase Chain Reaction” – SAIKI et al. 1985) utilizando um protocolo adequado para cada iniciador (“primer”) para isolar e amplificar diferentes genes de diferentes regiões do genoma. As seqüências de todos os iniciadores utilizados estão na Tabela 4.

Para todas as reações foram incluídos controles negativos para verificar a existência ou ausência de contaminação.

Neste trabalho, seis fragmentos de genes foram estudados: a) dois pertencentes ao DNA mitocondrial, o citocromo-b (divididos em dois fragmentos, um de 480 pb e um de 660 pb) e um fragmento da região controladora (D-loop) de 690 pb. B) Três fragmentos do DNA nuclear, um fragmento do exon da Kappa-caseína de 361 pb, um da beta-caseína de 481 pb e o terceiro do exon I do gene “Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein” (IRBP) de 730 pb e c) um fragmento do gene do cromossomo Y chamado SRY, do inglês “Sex-determining Region Y”, de 547 pb.

Tabela 4. Relação dos genes, iniciadores e suas sequências e o tamanho dos fragmentos em pares de bases (pb) amplificados de cada gene utilizados neste trabalho.

Genes	Iniciadores	Seqüência	Tamanho
Cit-b	L14724	5' CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3'	480pb
	H15149	5' AAAGTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3'	
Cit-b	FARH	5' TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTTCA 3'	660pb
	FARL	5' CCATGAGGACAAATATCATTCTGAT 3'	
D-loop	Thr- L15926	5' GAATTCCCCGGTCTTGTAACC 3'	690pb
	DL-H16340	5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3'	
Kapa-caseína	K1	5' CACGTCACCCACACCCACATTTATC 3'	361pb
	K2	5' TAATTAGCCATTTGCGCTTCTCTGT 3'	
Beta-caseína	BETA F	5' GATGAACTCCAGGATAAAATC 3'	481pb
	BETA R	5' AATAATAGGGAAGGGTCCCCG 3'	
IRBP	B2	5' ATGAGGTGTTCCGTGTCCTG 3'	730pb
	E2	5' AGCAGATGCGCAGAGCCATAGTGGT 3'	
SRY	RG4	5' CGTCAAGCGACCCATGAACGCCTTCATT 3'	547pb
	RY1	5' GCCTTTGTTAGCGAGAGTAAGGAAG 3'	

- Amplificação do Fragmento do Citocromo-b de 480pb

A amplificação do fragmento de 480 pb do gene do citocromo-b foi realizada com a utilização dos iniciadores L14724 (28 bases) e H15149 (34 bases), descritos por KOCHER et al. (1989) seguindo o protocolo descrito por MALDONADO et al. (1995). Os ciclos de temperatura utilizados nas reações de PCR estão descritos na Tabela 5.

A reação de PCR continha aproximadamente 45 ng da amostra de DNA, 1mM de dNTP, tampão de reação de 50 mM KCl acompanhado de 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl (pH 8.8), iniciadores a 12,5 pmoles, e 1U/μl de DNA Taq polimerase, em um volume total de 10 μl.

Tabela 5. Condições de amplificação do fragmento do gene mitocondrial do citocromo-b de 480pb.

Passos	Temperatura C°	Tempo
1. Desnaturação inicial	94°	3 min.
2. Desnaturação	94°	45 seg.
3. Ligação dos Iniciadores	58°	56 seg.
4. Extensão * Repetir o passo de 2 a 4, 35 vezes	72°	50 seg.
5. Extensão final	72°	7 min.

- Amplificação do Fragmento do Citocromo-b de 660pb

Um segundo fragmento do citocromo-b de 660pb foi amplificado com a utilização dos iniciadores *FARH* (34 bases) e *FARL* (25 bases), descrito por DUARTE et al. (no prelo). Os ciclos de temperatura utilizados para amplificação do fragmento de 660 pb estão descritos na Tabela 6.

A reação para amplificação continha aproximadamente 60 ng da amostra de DNA, 1 mM de dNTP, tampão de reação de 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.8) acompanhado de 2 mM MgCl₂, iniciadores a 12,5 pmoles, e 1U/μl de DNA Taq polimerase, em um volume total de 10μl.

Tabela 6. Condições de amplificação do fragmento do gene mitocondrial do citocromo-b de 660 pb.

Passos	Temperatura C°	Tempo
1. Desnaturação inicial	94°	3 min.
2. Desnaturação	94°	60 seg.
3. Ligação dos Iniciadores	58°	120 seg.
4. Extensão	72°	110 seg.
* Repetir o passo de 2 a 4, 35 vezes		
5. Extensão final	72°	8 min.

- Amplificação do Fragmento da Região Controladora (D-loop)

Para a região do D-loop foram utilizados os iniciadores mitocondriais DL-H16340 e Thr-L15926 (27 bases), VILÀ et al. (1999) seguindo o protocolo descrito por GONZÁLEZ (1997). Os ciclos de temperatura utilizados nas reações estão descritos na Tabela 7.

A reação de amplificação continha aproximadamente 45 ng da amostra de DNA, 1mM de dNTP, tampão de reação de 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, iniciadores a 12,5 pmoles, e 1 U/ul de DNA Taq polimerase, em um volume total de 10 µl.

Tabela 7. Condições de amplificação do fragmento do gene mitocondrial da região controladora (D-loop) de 660pb.

Passos	Temperatura C°	Tempo
1. Desnaturação inicial	94°	3 min.
2. Desnaturação	94°	15 seg.
3. Ligação dos Iniciadores	58°	20 seg.
4. Extensão	72°	1 min30s.
* Repetir o passo de 2 a 4, 35 vezes		
5. Extensão final	72°	7 min.

- Amplificação dos Fragmentos da Beta e Kapa Caseínas

Para otimização e padronização das amplificações para as regiões nucleares do exon VII de 481 pb da beta-caseína (CSN2) (acesso: EF133480) e do exon IV de 361 pb da kappa-caseína (CSN3) (acesso: EF133463), foram

utilizados os iniciadores desenhados por OTAVIANO (2006), Os ciclos de temperatura de amplificação estão descritos na Tabela 8.

A reação de amplificação continha aproximadamente 45 ng da amostra de DNA, 1 mM de dNTP, tampão de reação de 50 mM KCl acompanhado de 2 mM MgCl₂, 10 mM Tris HCl (pH 8.8), iniciadores a 10 pmoles, e 1U/μl de DNA Taq polimerase, em um volume total de 10μl.

Tabela 8. Condições de amplificação dos fragmentos nucleares da Kapa e Beta caseína.

Passos	Caseínas		
	Kapa (T°C)	Beta (T°C)	Tempo
1. Desnaturação inicial	95	95	5 min.
2. Desnaturação	95	95	60 seg.
3. Ligação dos Iniciadores	56	59	60 seg.
4. Extensão	72	72	60 seg.
* Repetir o passo de 2 a 4, 35 vezes			
5. Extensão final	72	72	5 min.

- Amplificação dos Fragmentos do Gene IRBP

O terceiro fragmento de gene nuclear estudado foi uma parte do exon I do gene codificador da “Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein” (IRBP) de 730 pb. Os iniciadores utilizados foram B2 e E2, descritos por WEKSLER et al. (2003), os ciclos de temperatura utilizados nas reações de amplificação “touchdown” estão descritos na Tabela 9.

A reação continha aproximadamente 45 ng da amostra de DNA, 1 mM de dNTP, tampão de reação de 50 mM KCl, 10 mM Tris HCl (pH 8.8), 1,5 mM MgCl₂, iniciadores a 10 pmoles, e 2 U/μl de DNA Taq polimerase, em um volume total de 15 μl.

Tabela 9. Condições de amplificação do fragmento do exon I do gene nuclear IRBP.

Passos	Temperatura C°	Tempo
1. Desnaturação inicial	95°	10 min.
2. Desnaturação	95°	20 seg.
3. Ligação dos Iniciadores	59°	20 seg.
4. Extensão	72°	15 seg.
5. Desnaturação	95°	20 seg.
6. Ligação dos Iniciadores	57°	20 seg.
7. Extensão	72°	15 seg.
8. Desnaturação	95°	20 seg.
9. Ligação dos Iniciadores	55°	20 seg.
10. Extensão	72°	15 seg.
11. Desnaturação	95°	20 seg.
12. Ligação dos Iniciadores	52°	20 seg.
13. Extensão	72°	60 seg.
* repetir os passos de 11 a 13, 23 vezes		
14. Desnaturação Final	95°	10min.

- Amplificação dos Fragmentos do Gene SRY

Para o estudo da região do cromossomo Y, incluiu-se parte do gene SRY, uma região de 547 pb. Para esse estudo foram utilizados todos machos de *M. americana* e como controle negativo uma fêmea e uma amostra sem DNA. Os iniciadores utilizados foram RG4 (“forward”), descrito por GRIFFITHS (1993) e o RY1 (“reverse”) de KIKKAWA et al. (2003). Os ciclos de temperatura utilizados nas reações de PCR estão descritos na Tabela 10.

Tabela 10. Condições de reação de PCR utilizadas na amplificação do fragmento do gene nuclear SRY.

Passos	Temperatura C°	Tempo
1. Desnaturação inicial	94°	3 min.
2. Desnaturação	94°	15 seg.
3. Ligação dos Iniciadores	56°	20 seg.
4. Extensão	72°	1m 30 seg.
* Repetir o passo de 2 a 4, 35 vezes		
5. Extensão final	72°	7 min.

3.5 Eletroforese

Após amplificação, o produto foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídeo (5 mg/ml) para verificação da qualidade e quantidade do produto amplificado. O gel, após um tempo de aproximadamente 1 hora, era fotografado e identificado por um aparelho “GelLogi 100 - imaging system”.

As amostras que apresentavam boa qualidade, ou seja, sem aparecimento de bandas inespecíficas e de quantidade de DNA satisfatória, eram armazenadas a -20° C e posteriormente purificadas.

3.6 Purificação

A purificação das amostras após PCR foram realizadas por duas enzimas, a Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) e a Exonuclease I (EXO). O mix de utilização consistia em misturar 5 µl de PCR + 0,5 de Exonuclease I (10 U/µl) + 1 µl da enzima SAP (1 U/µl) + 0,5 µl do Tampão de diluição da SAP + 3,0 µl de Água MilliQ, para um total de 10 µl de reação. As amostras, após purificação, foram obrigatoriamente armazenadas em geladeira (4°C).

3.7 Seqüenciamento

Antes do seqüenciamento, todos os produtos de PCR eram quantificados em espectrofotômetro e diluídos em uma concentração aproximada de 25 ng/µl. Em seguida os fragmentos dos genes estudados foram seqüenciados utilizando-se do seqüenciador automático ABI 3100 da Applied Biosystems de 16 capilares. A reação e material utilizado para o seqüenciamento seguem no anexo II.

Todas as sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos (BLAST) com sequências depositadas no GenBank, www.ncbi.nlm.nih.gov do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para confirmação da amplificação do fragmento esperado.

3.8 Análises Filogenéticas

- Confeção das Matrizes

Foram seqüenciados ambos os lados das fitas de DNA (3'-5' e 5'-3') para todas as amostras. As duplas fitas de cada amostra foram exportadas para o programa MEGA 4 (TAMURA et al. 2007) onde eram alinhadas automaticamente pelo CLUSTAL W (utilizando dados padrão do CLUSTAL – “default”). As seqüências de nucleotídeos eram revisadas visualmente com seus respectivos eletroferogramas, em seguida, uma seqüência consenso era utilizada para a montagem da matriz de dados com todas as amostras.

As lacunas de alinhamento, as regiões com alinhamento ambíguo e as regiões de sobreposição entre os genes, quando existiam, eram excluídas da matriz de dados. As seqüências codificadoras de proteínas, como o citocromo-b, foram analisadas no programa MEGA 4, que lê a seqüência de nucleotídeos na forma de proteínas, confirmando a ausência de códons de parada ou mutações que altere o código de leitura dos aminoácidos.

No anexo III, podem ser observados os eletroferogramas de uma partição dos genes estudados e no anexo IV os sítios variáveis para as partições dos genes mitocondriais.

Os fragmentos dos genes do citocromo-b de 480pb e 660pb foram concatenados, pois a sobreposição que havia entre as duplas fitas de DNA de cada amostra, que permitiria a obtenção de uma seqüência contínua, era muito pequena e também na maioria das vezes as extremidades das seqüências eram descartadas devido à qualidade do seqüenciamento. Estes fatores dificultavam a realização do alinhamento, sendo assim, as seqüências foram analisadas separadamente e confeccionada uma matriz para as seqüências consensos dos fragmentos de 480pb e outra para os de 660 pb e depois concatenada. Este procedimento resultou em uma perda de 100 pb na matriz de dados do citocromo-b e somado com a retirada de nucleotídeos das extremidades, obteve-se uma matriz de dados dos fragmentos concatenados de 911pb.

Por fim, as matrizes de dados utilizando os primers de amplificação de 480pb dos fragmentos do citocromo-b ficaram com 367 pb, a matriz concatenada com 903 pb e a matriz da região-controladora com 462 pb.

As matrizes foram produzidas inicialmente no programa MEGA 4 para cada gene em separado. Para as partições mitocondriais de 480 pb e 660 pb, os arquivos *.FASTA eram exportados para o programa Mesquite 1.06 (MADDISON & MADDISON, 2005). Em seguida, concatenados e exportados novamente no formato do MEGA 4 para serem analisadas. As matrizes dos fragmentos da região-controladora, da kappa-caseína, beta-caseína e SRY foram analisadas diretamente pelo MEGA 4.

As sequências utilizadas nas análises dos genes do citocromo-b, de *M. bororo* e *M. nana*, foram adquiridas do banco de dados do NUPECCE.

Para as análises dos genes nucleares da kappa e beta caseínas, foi preciso extrair, amplificar e seqüenciar os fragmentos destes genes para um indivíduo da espécie *M. nana* para comparação, no caso de ocorrência de monomorfismo, entre as seqüências destes genes nas amostras de *M. americana*. A amostra de sangue foi colhida de um animal alojado pelo NUPECCE e os procedimentos foram os mesmos descritos anteriormente.

As seqüência de *Odocoileus virginianus*, *Rangifer tarandus* e *Capreolus capreolus* nas análises do gene mitocondrial do citocromo-b e da região controladora, foram adquiridas no GenBank, <www.ncbi.nlm.nih.gov> do NCBI (National Center for Biotechnology Information) e os números de acesso para consulta são, respectivamente: DQ379370; AJ000029, AJ000024, EF061657, AF09449 e Z70318.

- Haplótipos

Primeiramente os táxons foram organizados em grupos de acordo com a bacia hidrográfica (para verificar se havia alguma relação filogeográfica e para facilitar a leitura das árvores filogenéticas) e, em seguida, comparados a distância genética entre eles e entre diferentes espécies de cervídeos, como o *M. bororo* e

M. nana, e com a seqüência de *O. virginianus*, um dos ancestrais de todo gênero *Mazama*.

A relação dos haplótipos foi gerada pelo programa MEGA 4 através da análise de “Pairwise distance calculation”, complete deletion, modelo Kimura-2-parâmetros (KIMURA, 1980).

- Árvores filogenéticas

Para todas as matrizes de dados, as árvores filogenéticas foram geradas utilizando os métodos de “Agrupamento de vizinhos” ou “Neighbor-Joining” de análise (SAITOU & NEI, 1987) (modelo: “Kimura-2-parameter” (KIMURA, 1980), 10000 réplicas, 24054 passos, Gaps/missing – Parwise deletion) e pelo método de “Máxima Parcimônia”, método: “Close-neighbor-interchange (CNI) with search level 1, random addition tree 10 replications”. Ambos os métodos com estimação do suporte estatístico dos agrupamentos filogenéticos através da aferição por “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985), utilizando 10.000 réplicas, com auxílio do programa MEGA 4.

Também foram geradas árvores utilizando os métodos de Máxima Parcimônia e “Neighbor-Joining” utilizando o programa PAUP (SWOFFORD, 2002) com o modelo de substituição selecionado pelo programa MODELTEST (POUSADA & CRANDAL, 1998) para as matrizes de dados em estudo.

- Distâncias genéticas

As matrizes de nucleotídeos do citocromo-b e D-Loop foram organizadas (no MEGA 4) em grupos de amostras pela sua localização nas bacias hidrográficas correspondentes, que tiveram suas distâncias genéticas comparadas entre si e com as espécies *M. bororo* e *M. nana*, além do grupo externo. Os parâmetros utilizados foram: análise de distancia média entre grupo, “gaps/missing”=“parwise deletion”; modelo: “Kimura-2-parâmetros, Substituição = transição+transversão e taxas entre sítios uniforme.

- Redes de Distância “Network distance”

As redes de distâncias “Median Joining Network” (BANDELT et al. 1999) foram criadas para representar a mais provável relação entre os haplótipos, tanto para as seqüências dos genes mitocondriais (de 480 pb e concatenados), como para a região controladora. Estas análises foram geradas utilizando o programa Network 4.5.0.0 (Fluxus Technology Ltd, <http://www.fluxus-engineering.com/netwinfo.htm>).

Uma segunda análise para estimação genealógica procedeu-se para os fragmentos do citocromo-b, utilizando o programa TCS 1.21 (CLEMENT et al. 2000). Para confecção das relações genealógicas neste programa foi utilizado o programa DNASP (ROZAS et al. 2003) para calcular os haplótipos e exportar os resultados como arquivos com extensão *.NEXUS.

No programa TCS, para a matriz de dados do citocromo-b utilizou-se os parâmetros de 95% de limite de conexão e “gaps” igual a “missing”, para a região controladora fixou-se um limite de 50 passos e considerou-se “gaps” e “missing” como um quinto estado de caractere.

- Análise da Variância Molecular (AMOVA)

A análise da variância molecular (AMOVA - loco por loco) foi calculada após a identificação dos clados nas árvores filogenéticas, utilizando o programa ARLEQUIM 3.1, para verificar se as diferenças entre agrupamentos seriam significativas. Esta análise foi realizada para todos os genes estudados.

IV. RESULTADOS

4.1 Amplificações, Seqüenciamentos e Alinhamentos

- Fragmento do gene citocromo-b de 480 pb

As amplificações dos fragmentos de 480 pb do citocromo-b não apresentaram problemas seguindo os procedimentos descritos pelos autores.

- Fragmento do gene Citocromo-b 660 pb

As amplificações do fragmento de 660 pb do citocromo-b foram possíveis apenas em 14 amostras, gerando uma matriz dos fragmentos concatenados com menor número de amostras.

- Fragmento do gene D-loop

Para a região controladora não foi possível obter amplificação adequada apenas para a amostra 192, que amplificou fragmentos de DNA inespecíficos de 550 pb, 620 pb e 690 pb (Figura 2). A amplificação de uma região não específica de aproximadamente 550 pb também foi observada para a maioria das amostras (Figura 2).

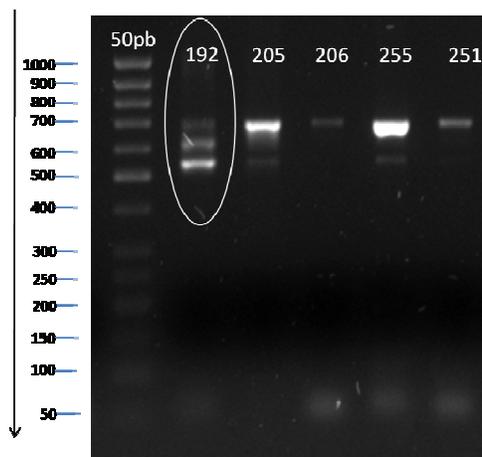


Figura 3. Imagem de um gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídeo, representando as amplificações de algumas amostras do fragmento do gene da região controladora (D-loop) de 690pb e amplificações de regiões inespecíficas como nas amostras 192, 205 e 255.

- Fragmento do gene SRY

A amplificação do gene SRY do cromossomo Y, inicialmente proposta, seria com os iniciadores para o SRY descritos por KIKKAWA et al. (2003). Entretanto, amplificações de regiões inespecíficas sempre ocorriam. Foi preciso utilizar o iniciador direto “forward”, descrito por GRIFFITHS (1993) e o RY1 para direção “reverse” de KIKKAWA et al. (2003). Este resultado foi obtido a partir de uma seqüência de um fragmento do gene SRY de bovino depositada no GenBank e exportada em formato *.Fasta para o “software” Microsoft Word. Feito isso, verificou-se que as seqüências dos iniciadores descritos por GRIFFITHS (1993) estavam no interior da seqüência amplificada pelos iniciadores de KIKKAWA et al. (2003), utilizando um de cada obteve-se uma seqüência de 547 pb sem amplificações inespecíficas.

Para o fragmento do gene SRY, todas as amostras de machos foram sequenciadas, porém, apresentaram-se monomórficas.

- IRBP

Os protocolos de amplificação resultaram em material de qualidade, entretanto, alguns ajustes de temperatura de ligação foram precisos para algumas amostras. E embora as amplificações tenham ocorrido com sucesso não foi possível obter seqüências confiáveis para as análises filogenéticas.

- Beta e Kapa Caseínas

Foram seqüenciados amostras de 10 indivíduos de *M. americana* e um da espécie *M. nana* tanto para os genes da beta-caseína quanto da kapa-caseína. No entanto as seqüências apresentaram-se monomórficas, ou seja, não apresentaram polimorfismo na região estudada.

4.2 Haplótipos

Na Tabela 11 pode-se observar a relação do número de haplótipos identificados para os fragmentos dos genes do citocromo-b (480 pb, concatenados) e para região controladora.

Nas 19 amostras seqüenciadas para o fragmento do citocromo-b de 480 pb, foram identificados 14 haplótipos. Para a matriz de dados do citocromo-b concatenado foram identificados 13 haplótipos de 14 amostras e para a região controladora 17 haplótipos de 18 amostras.

Tabela 11. Relação dos espécimes de *M. americana* analisados e a relação de haplótipos identificados para os fragmentos de genes do citocromo-b de 480pb (C4), das sequências concatenadas do citocromo-b (CC), da região controladora D-loop (DL) e origem de cativoiro.

Identificação	Haplótipos C4	Haplótipos CC	Haplótipos DL	Origem de Cativoiro*
192	01	01	-	Cu/PR
205	02	02	01	It/PR
235	03	04	02	PP/SP
256	03	10	03	It/PR
257	03	10	03	Ca/PR
255	03	09	05	An/GO
274	03	-	06	Im/MA
254	04	-	04	Im/MA
258	05	11	07	Sa/PA
259	06	12	08	Sa/PA
260	07	13	09	Sa/PA
206	08	-	10	Ar/RO
269	09	-	11	Bu/RO
211	10	03	12	Ar/RO
247	11	05	13	Ju/MT
251	11	-	14	Ju/MT
248	12	06	15	Ju/MT
252	13	07	16	Ju/MT
253	14	08	17	Ju/MT

(*) abreviações consultar Tabela 3; (“-“) ausência da sequência.

4.3 Árvores Filogenéticas

O modelo de substituição “Hierarchical Likelihood Ratio Test” (hLTRs) selecionado pelo programa MODELTEST, tanto para a matriz de dados do citocromo-b quanto para a região controladora foi o modelo HKY+1. Entretanto quando comparado os agrupamentos das árvores confeccionadas pelo PAUP utilizando o modelo selecionado pelo MODELTEST, com as árvores confeccionadas pelo MEGA utilizando o método Kimura-2-parâmetros, os agrupamentos não se alteravam. Sendo assim, optou-se por realizar as análises utilizando somente o programa MEGA com Kimura-2-parâmetros, pois este se assemelha como o modelo HKY nas considerações de taxas de substituição de

nucleotídeos, pela facilidade de trabalho com as matrizes de dados e para construção das árvores filogenéticas.

Em todas as análises filogenéticas dos genes mitocondriais apresentaram dois clados monofiléticos (A e B), um composto pelos táxons da Bacia do Rio Amazonas (BRA) e outro da Bacia do Rio Paraná (BRP). Ambos os clados, separados por um forte suporte de “bootstrap”. Também em todas as árvores filogenéticas pode-se observar que o Clado B aparece como um grupo monofilético formado pelos táxons da Bacia do Rio Paraná e uma politomia da amostra 259 do citótipo Santarém.

Também em todas as análises dos genes mitocondriais, os indivíduos dos citótipos Paraná agruparam-se em clados diferentes dos citótipos Rondônia e Juína, além de uma polifilia dos indivíduos do citótipo Santarém (Figuras 2, 3, 4 e 5).

A amostra 258, por ser de um indivíduo em que sua constituição cariotípica é diferente de todos os outros, classificada como citótipo Jari, apareceu em todas as análises agrupado com indivíduos do citótipo Juína.

As árvores filogenéticas dos fragmentos do citocromo-b (Figuras 4, 5, 6 e 7) exibem a estreita relação dos indivíduos da Bacia do Rio Amazonas com as espécies *M. bororo* e *M. nana* como grupos irmãos.

Quanto aos métodos utilizados (Máxima Parcimônia e “Neighbor-Joining”), ambos exibiram certa congruência nos agrupamentos.

- Árvores filogenéticas citocromo-b 480pb

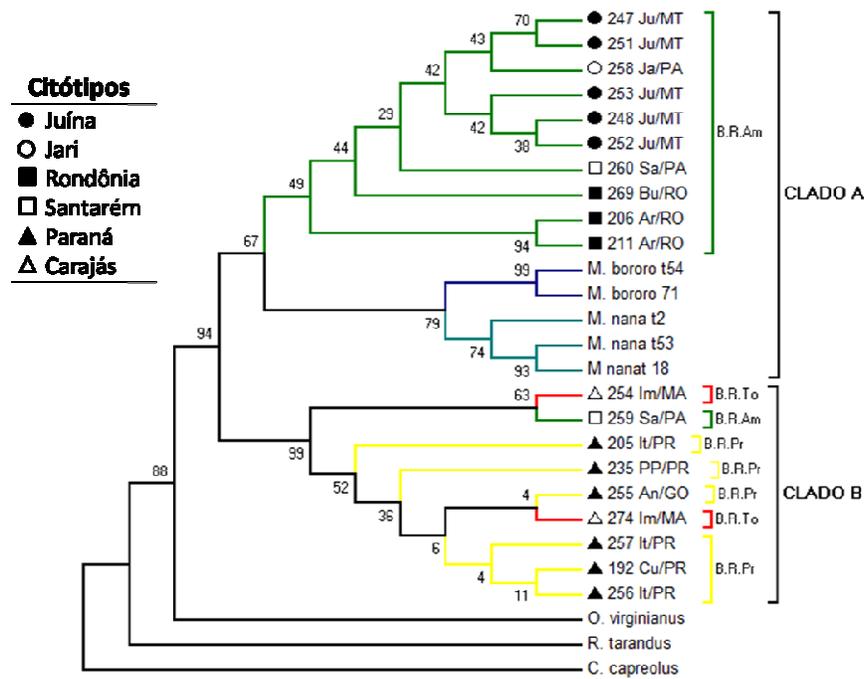


Figura 4. Representação da árvore filogenética da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b de 400pb, método "Neighbor-Joining" de análise. Numeração e abreviações, consultar Tabela 3; Out-Groups: espécie *O. virginianus*, *R. tarandus*, *C. capreolus*.

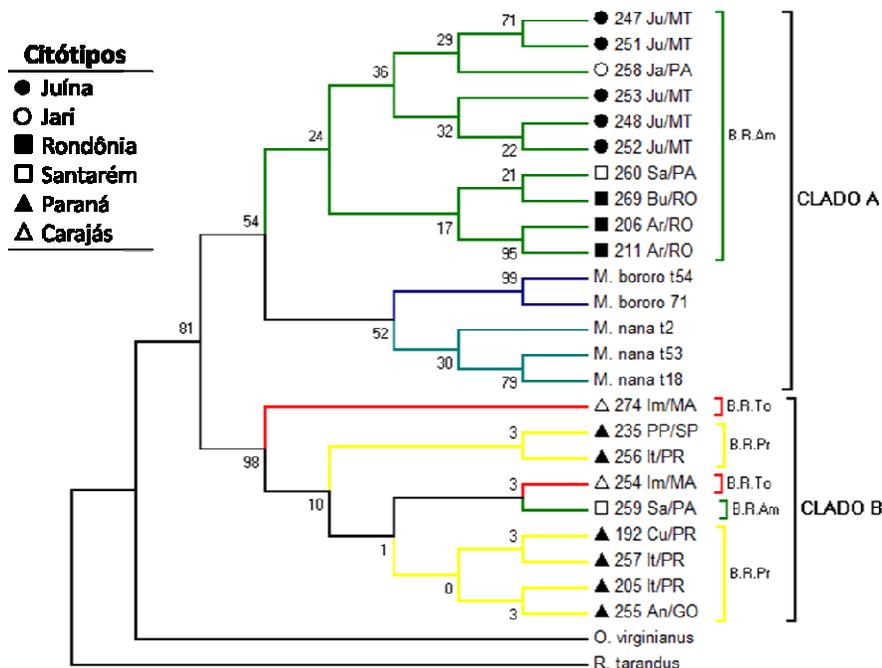


Figura 5. Representação da árvore filogenética consenso, Método Máxima Parcimônia da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b de 400pb. Out-group: *O. virginianus*, *R. tarandus*.

- Árvores filogenéticas citocromo-b seqüências concatenadas

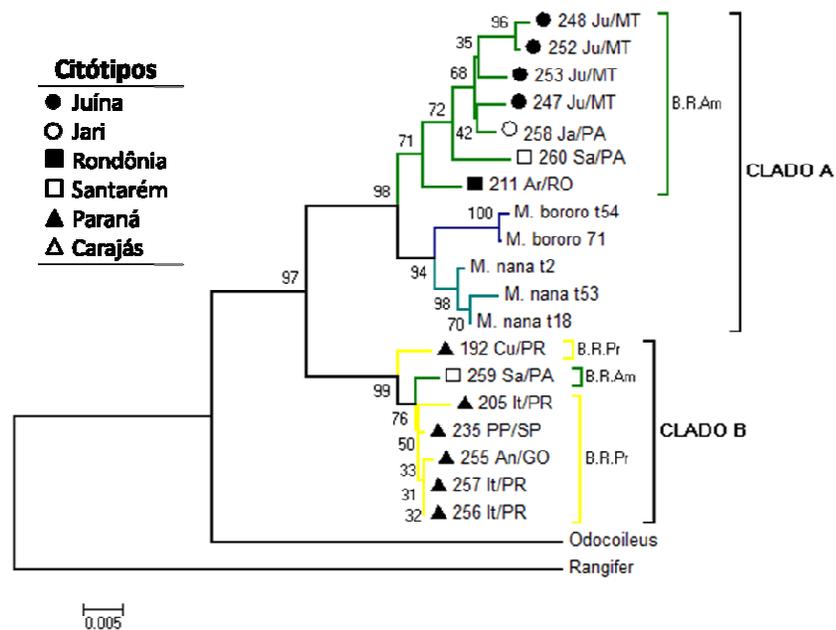


Figura 6. Representação da árvore filogenética consenso da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b concatenados, utilizando o método Neighbor-Joining de análise. Out-group: *O. virginianus*, *R. tarandus*.

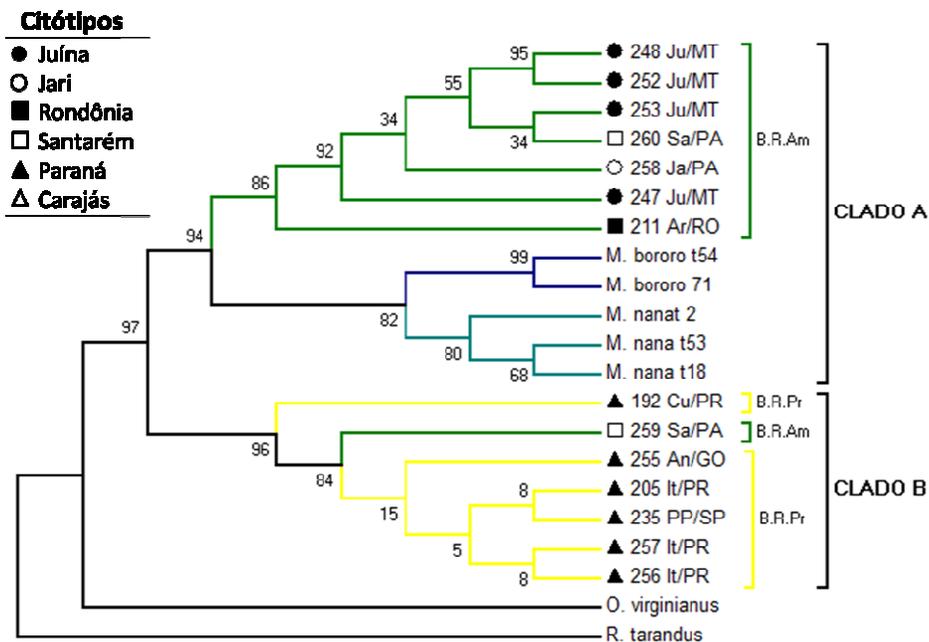


Figura 7. Representação da árvore filogenética, consenso, da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b concatenados, utilizando o método de Máxima Parcimônia. Out-group: *O. virginianus*, *R. tarandus*.

- Árvores filogenéticas da região controladora (D-loop)

Os resultados das árvores filogenéticas do D-loop exibiram algumas particularidades. Na Figura 8 e 9 o grupo monofilético formado pelas amostras 206/211 e 248/252 estão fortemente suportadas por um alto valor de bootstrap.

Também pôde ser observado nas análises do D-loop a monofilia das amostras 274 e 254, tanto no método de máxima parcimônia quanto no “Neighbor-Joining” e também a proximidade genética destas no diagrama do “Median-Joining Network” (Figuras 14).

As árvores filogenéticas do D-loop também revelam uma congruência com os resultados obtidos com o citocromo-b, considerando os agrupamentos pelo citótipo.

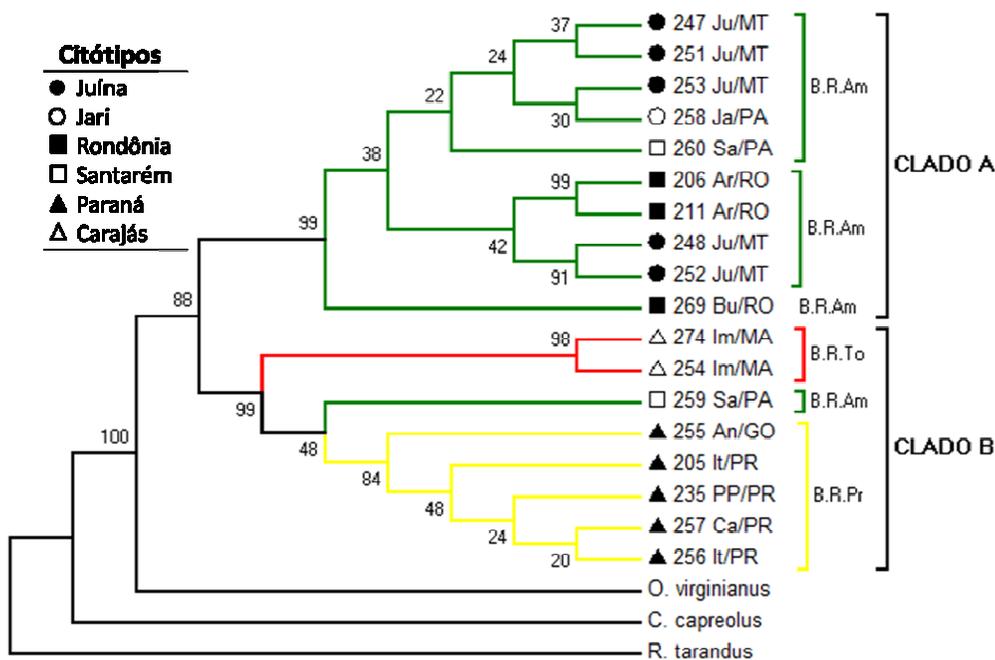


Figura 8. Representação da árvore filogenética, consenso, da matriz de dados dos fragmentos da região controladora (D-loop), utilizando o método de Máxima Parcimônia. Out-Groups: espécie *O. virginianus*, *R. tarandus*, *C. capreolus*.

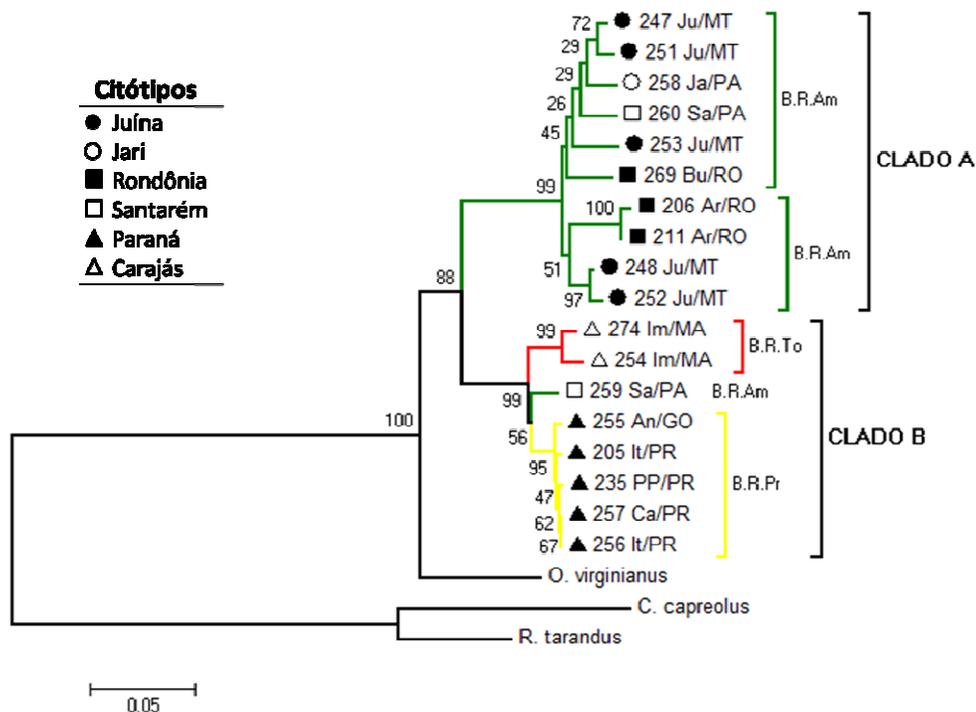


Figura 9. Representação da árvore filogenética consenso da matriz de dados dos fragmentos da região controladora (D-Loop), utilizando o método Neighbor-Joining de análise. Out-Groups: espécie *O. virginianus*, *R. tarandus*, *C. capreolus*.

4.4 Distâncias genéticas

4.4.1 Distâncias entre as seqüências do citocromo-b de 480 pb

As análises de distâncias para as amostras do citocromo-b de 480 pb mostraram que as distâncias entre as espécies, tanto de *M. bororo* quanto de *M. nana*, são mais próximas dos indivíduos da Bacia Amazônica do que dos indivíduos da Bacia do Rio Paraná. Por exemplo, o valor de distância exibidos na Tabela 12, entre o grupo dos indivíduos da Bacia Amazônica versus *M. bororo* foi de 0,0324 (linha 4 versus coluna 3), enquanto os indivíduos de *M. americana* da Bacia do Rio Paraná versus a espécie *M. bororo* foi de 0,0453 (linha 4, coluna 1).

Nas Tabelas 12 e 13, pode-se observar que a distância que separa o grupo da Bacia Amazônica do grupo da Bacia do Rio Paraná (p.ex.: 0,0302, na tabela 12) é muito próximo do valor que separa os *M. americana* da Bacia do Rio

Amazonas de *M. bororo* (0,0324), o que é muito diferente do valor que separa o indivíduo de *M americana* da Bacia do Rio Tocantins dos indivíduos da Bacia do Rio Paraná, que é de somente 0,0021. Além disso, a distância entre *M. bororo* e *M. nana* é menor que as diferenças deste para com *M. americana*. Por exemplo, na tabela 12 a diferença entre *M. bororo* e *M. nana* é de 0,0192 e de *M. bororo* ou *M. nana* para os *M. americana* da Bacia do Rio Amazonas é de 0,0324 e 0,0229.

Tabela 12. Distâncias genéticas para a matriz dos fragmentos do citocromo-b de 480pb, entre os grupos, de acordo com as Bacias Hidrográficas.

	1. BRP	2. BRT	3. BRA	4. Mb	5. Mn
2. BRT	0,0021				
3. BRA	0,0302	0,0303			
4. Mb	0,0453	0,0466	0,0324		
5. Mn	0,0402	0,0406	0,0229	0,0192	
6. Out-Group	0,0675	0,0679	0,0720	0,0872	0,0697

BRP-Bacia do Rio Paraná; BRT – Bacia do Rio Tocantins; BRA – Bacia do Rio Amazonas; Mb – espécimes de *Mazama bororo*; Mn – espécimes de *Mazama nana*; Out-Group- Espécie de *Odocoileus virginianus* (Genbank acesso: AJ000029).

As estimações haplotípicas realizadas no programa TCS, para os fragmentos do citocromo-b, expressaram uma relação entre os haplótipos semelhante às árvores filogenéticas e também às do programa Network (Figuras 10, 11, 12, 13, 14 e 15). Pode-se notar que indivíduos do Pará também apareceram em ambos os clados. Entretanto, as relações entre os clados A e B, foram colapsadas pelo programa TCS (Figuras 11 e 13).

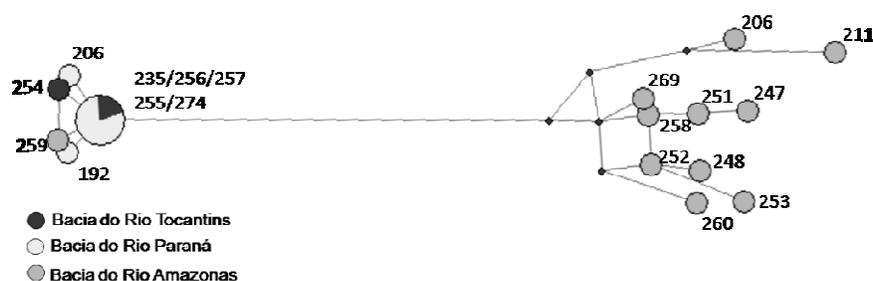


Figura 10. Diagrama do “Median Joining Network” da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b de 480 pb. O diagrama ilustra ambas as relações entre haplótipos e frequência observada dos indivíduos das diferentes bacias hidrográficas. O tamanho do círculo é proporcional a frequência dos dados em seu respectivo haplótipo. O comprimento do ramo corresponde à distância genética entre os haplótipos.

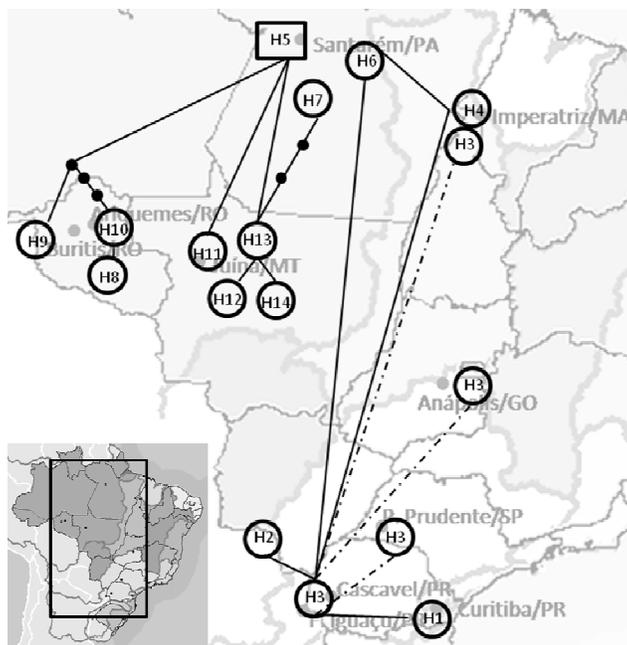


Figura 11. Diagrama da estimacão genealógica entre os haplótipos (Tabela 11), por parcimônia estatística, das seqncias do fragmento de gene do citocromo-b de 480 pb e suas relações de distribuico no território brasileiro. Programa TCS 1.21. Linha tracejada: mesmo haplótipo.

4.4.2 Distâncias entre as seqncias do citocromo-b concatenados

As relações entre as amostras e haplótipos para o fragmento do citocromo-b concatenado foram semelhantes às encontradas entre as seqncias de 480 pb.

Na Figura 11, o haplótipo 6 (amostra 248) e o haplótipo 3 da Figura 15, aparecem dentro de um quadrado, criado pelo programa TCS, isto significa que esta amostra foi classificada como o ancestral mais provável do Clado A.

Tabela 13. Distâncias genéticas para a matriz dos fragmentos do citocromo-b concatenados, entre os grupos de acordo com as Bacias Hidrográficas.

	1.BRP	2.BRA	3.Mb	4.Mn
1. BRA	0,0351			
2. Mb	0,0388	0,0272		
3. Mn	0,0363	0,0251	0,0139	
4. Out-group	0,1176	0,1217	0,1238	0,1166

BRP-Bacia do Rio Paraná; BRT – Bacia do Rio Tocantins; BRA – Bacia do Rio Amazonas; Mb – espécimes de *Mazama bororo*; Mn – espécimes de *Mazama nana*; Out-Group- Espécie de *Rangifer tarandus* (GenBank: acesso: DQ379370)

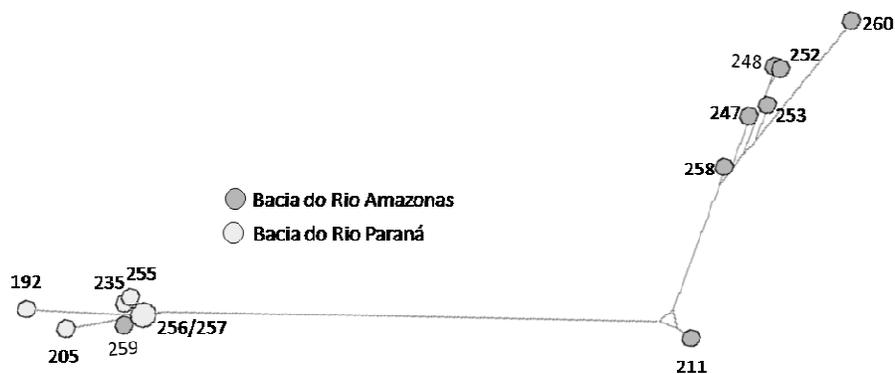


Figura 12. Diagrama do “Median Joining Network” da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b concatenados. O diagrama ilustra ambas as relações entre haplótipos e freqüência observada dos indivíduos das diferentes bacias hidrográficas. Em amarelo - Bacia do Rio Paraná, verde - Bacia do Rio Amazonas. O comprimento do ramo, corresponde à distância genética entre os haplótipos.

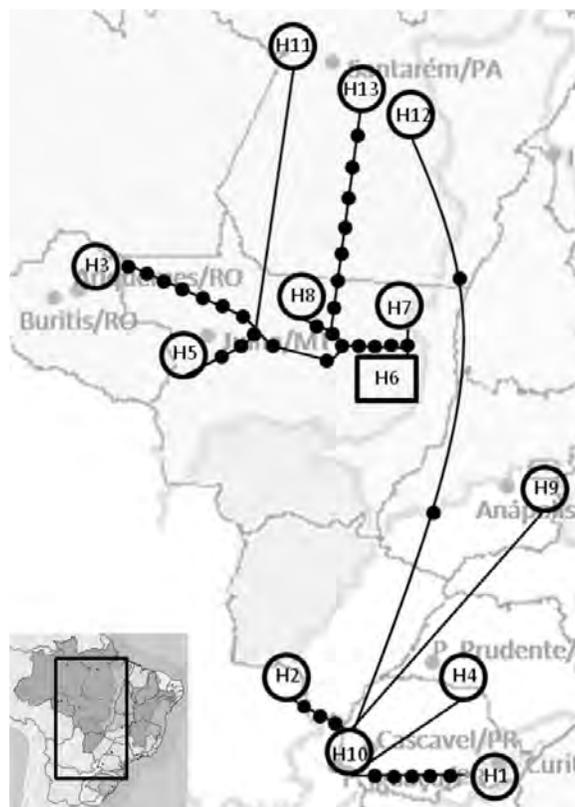


Figura 13. Diagrama da estimacão genealógica entre os haplótipos (Tabela 11), por parcimônia estatística, das seqüências do fragmento de gene do citocromo-b concatenados. Programa TCS 1.21.

4.4.3 Distâncias entre as sequências da região controladora

Os resultados das análises de distância da região controladora exibiram os mesmos padrões que as análises do citocromo-b.

A rede de haplótipos analisada no programa TCS (Figura 15), para a matriz da região controladora não foi colapsada como nas redes do citocromo-b porque foi estabelecido um limite de cinquenta passos de agrupamentos. Isso foi realizado, pois, a matriz de dados da região controladora exibiu um número elevado de mutações e ausência de nucleotídeos (Anexo IV).

Sendo assim, pode-se observar uma relação dos indivíduos da Bacia do Rio Tocantins e Paraná com os indivíduos da Bacia do Rio Amazonas (representada em linha pontilhada na Figura 15).

Tabela 14. Distâncias genéticas para a matriz dos fragmentos da região controladora (D-loop), entre os grupos, de acordo com as Bacias Hidrográficas.

		1.BRP	2.BRT	3.BRA
2.	BRT	0,0392		
3.	BRA	0,1033	0,1004	
4.	Out-group	0,1199	0,1334	0,1453

BRP-Bacia do Rio Paraná; BRT – Bacia do Rio Tocantins; BRA – Bacia do Rio Amazonas; Out-Group- Espécie *Odocoileus virginianus* (GenBank: acesso: AJ000029)

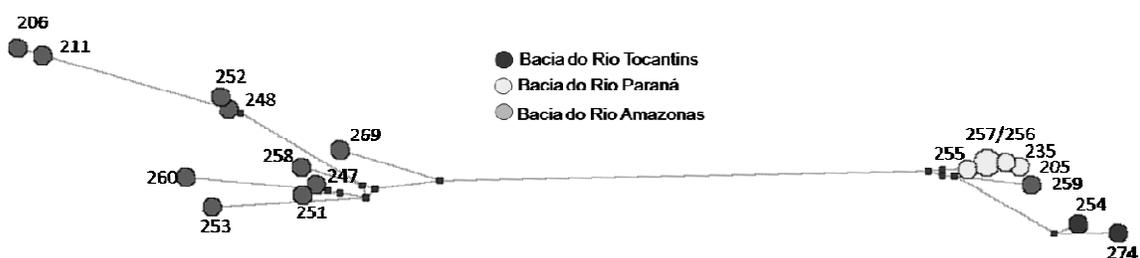


Figura 14. Diagrama do “Median Joining Network” da matriz de dados dos fragmentos da região controladora (D-loop). O diagrama ilustra ambas as relações entre haplótipos e frequência observada dos indivíduos das diferentes bacias hidrográficas.

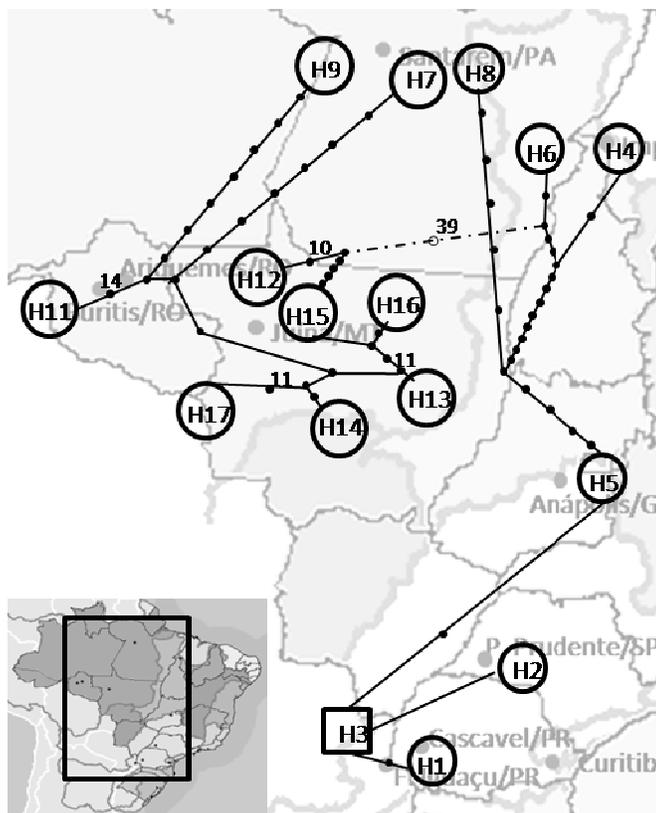


Figura 15. Diagrama da estimacão genealógica entre os haplótipos por parcimônia estatística, das seqncias do fragmento da região-controladora. Programa TCS 1.21. Números nas linhas = número de mutaces, linha tracejada – explicaes no texto.

4.4.4 Distância Genética entre Clados

As comparaes das distâncias genéticas entre os clados A e B, para as parties do citocromomo-b de 480 pb e citocromo-b concatenados e entre as espécies *M. bororo* e *M. nana* podem ser observados na Tabela 15. Nesta tabela, pode-se observar que a distância entre os clados A e B são maiores que a distancia entre as espécies *M. bororo* e *M. nana*.

Tabela 15. Distâncias genéticas, em porcentagem (%), entre os clados A e B e entre as espécies *Mazama bororo* e *Mazama nana* para os fragmentos de 480 pb e para partição concatenada do citocromo-b respectivamente (/).

	Clado A	Clado B	<i>M. Bororo</i>
Clado B	3,30/3,94		
<i>M. bororo</i>	3,08/2,50	4,59/3,93	
<i>M. nana</i>	3,10/2,30	4,05/3,68	1,92/1,39

4.5 Análises da Variação Molecular

As análises de variância molecular (AMOVA - loco por loco) realizadas pelo programa ARLEQUIM, entre os clados A e B demonstraram, para todos os genes estudados, que estes são significativamente diferentes (Pvalue de Fst menores que 0,00001).

Tabela 16. Resultados da análise da variância molecular (AMOVA) entre clados A e B, do fragmento do citocromo-b de 460pb (AMOVA - locus por locus).

	Clado A		Clado B	
	Kimura 2P*	Fst – valor P	Kimura 2P	Fst – valor P
Clado A	0,00000	-	-	-
Clado B	0,80124	0,00000+-0,00000	0,00000	-

Nível de significância = 0,05

*valor de distancia pelo método Kimura 2 parâmetros

V. DISCUSSÃO

- Genes Nucleares

Não foi possível a reconstrução filogenética a partir das seqüências dos genes nucleares da kapa-caseína, beta-caseína e SRY, pois as seqüências exibiram monomorfia (ausência de mutação ou polimorfismo).

CRONIN et al. (1996), utilizaram o gene da Kapa-caseína exon IV para avaliar a filogenia dos grandes ruminantes da família Bovidae, Cervidae, Giraffidae e Antilocapridae e encontraram ausência de polimorfismo nos fragmentos. Além disso, contestaram a aplicação de dados moleculares deste gene para comparações interespecíficas nos estudos filogenéticos em Cervídeos. A explicação para isto está na divergência entre as seqüências dentro das subfamílias Odocoileinae e Cervinae, que estão entre 0,5 a 4,7% no gene da Kapa-caseína e muito maior para os genes do DNA mitocondrial que estão entre 4 a 12%.

RIJNKELS (2002) conseguiu avaliar a distância evolutiva utilizando fragmentos de gene da família das caseínas, comparando sequências de humanos, bovinos, gatos e ratos. Entretanto, estas espécies divergiram entre 79 e 88 milhões de anos. Sendo assim, podemos afirmar que a monomorfia encontrada entre espécimes de *M. americana* tanto nos genes da kapa quanto da beta-caseína, tem como explicação a alta taxa de conservação e organização dos genes das caseínas (MERCIER & VILOITE, 1993; PROVOT et al. 1995; CRONIN et al. 1996 e RIJNKELS, 2002) aliado ao pequeno tempo de divergência das espécies estudadas. Era esperada a ausência de polimorfismos nesses genes,

mas como nosso laboratório já possuía os oligonucleotídeos para amplificação (oriundos de outros trabalhos), a prospecção foi realizada.

Já a monomorfia encontrada nas seqüências dos fragmentos do gene SRY, pode ter explicações diferentes dos genes da kapa e beta caseína. Embora o SRY seja um importante regulador na determinação sexual, esta seqüência é pouco conservada em primatas, roedores, crocodilos, lagartixas, *Drosophilas* e galinhas, exceto em um fragmento do gene, chamado HMG-box (TUCKER & LUNDRIAN, 1993; WHITFIELD et al. 1993; CORIATI et al. 1993). Por outro lado, os alinhamentos do gene SRY, em algumas espécies de bovinos e cangurus, demonstraram alta similaridade ao longo de toda a seqüência do gene e não somente na região HMG-box (O'NEILL et al. 1997 e CHENG et al. 2001).

Por estes motivos, sugerimos que estudos mais detalhados, utilizando um fragmento maior do gene SRY, sejam realizados na espécie *M. americana*, para confirmar a presença ou ausência de polimorfismo e assim possibilitar a reconstrução filogenética. Como fez NISHIDA et al. (2007), que estabeleceu as relações filogenéticas entre Cetáceos, afirmando que o sucesso à baixa homoplasia encontrada, ocorreu por ter utilizado um grande fragmento deste gene (1,7 kbp).

Quanto ao gene IRBP, apenas uma amostra (259) com alta confiabilidade das seqüências de nucleotídeos foi obtida. Os trabalhos que utilizam o gene IRBP em inferências filogenéticas descrevem que as amplificações deste gene sem a presença de amplificações inespecíficas são muito difíceis, sendo necessárias sucessivas eluições do fragmento desejado e PCR com gradiente de temperatura de ligação dos iniciadores (JANSA & VOSS, 2000; WEKSLER, 2003; D'ELÍA et al. 2006). Isto auxilia na obtenção de seqüências de nucleotídeos duvidosa, o que pode ter ocorrido nas análises realizadas. Além disso, os iniciadores utilizados neste trabalho foram desenhados para roedores e diferenças nos oligonucleotídeos em relação à espécie *M. americana* poderia ter prejudicado o seqüenciamento de DNA.

Um exemplo da dificuldade de se obter seqüenciais de genes nucleares foi relatado por Murphy et al. (2003), que precisaram excluir 5 (1.672 pb) de 20 genes

nucleares inicialmente testados (total de 12.000 pb) por conta de ampliações inconsistentes, em mais de 20% das espécies estudadas. O conjunto de dados de genes compreendeu em 10.704 pb dos quais 925 foram deletados por causa de alinhamentos ambíguos, resultado em um conjunto de dados de 9.779 pb.

- Genes Mitocondriais

A única amostra excluída das análises foi da amostra 192, para região controladora, pois, em todas as tentativas de amplificação, regiões inespecíficas eram amplificadas. Para as partições do citocromo-b de 660 pb, algumas amostras não participaram das análises pois não foi possível amplificá-las.

Em todas as análises dos genes mitocondriais, a presença dos clados A e B ficam evidentes, sugerindo a separação da espécie *M. americana* em duas linhagens evolutivas, uma dos indivíduos do citótipo Paraná e Carajás e outra dos citótipos Rondônia, Juína e do citótipo Jari. Isso foi confirmado pela diferença entre os clados nas análises de variância molecular (AMOVA) e pelos elevados valores de “Bootstrap”.

Além disso, as espécies *M. bororo* e *M. nana* aparecem como irmãs do Clado “A” nas árvores filogenéticas e a distância genética encontrada entre estas espécies é menor que a distância entre os clados de *M. americana*. Ou seja, existe uma diferença genética dentro de *M. americana* maior que entre duas espécies muito bem definidas taxonomicamente (*M. bororo* e *M. nana*).

As variações na constituição e na morfologia cromossômicas dentro e entre citótipos da espécie *M. americana*, encontrados por DUARTE (1998), SARRIA-PEREA (2004) e ABRIL & DUARTE (2006), parecem ocorrer mais rápido do que as variações moleculares, pois os resultados não indicaram qualquer monofilia dos citótipos de Juína, Rondônia e Santarém. Em todas as árvores filogenéticas eles estão separados ou unidos por um baixo suporte estatístico (Bootstrap).

Além disso, indivíduos do citótipo Santarém (amostras 260 e 259) não formam grupos monofileticos, apesar de sua constituição cariotípica semelhante,

com número diplóide ($2n$) igual a 51 e número fundamental de braços (NF) igual a 56. Eles estão dispostos em clados diferentes em todas as análises filogenéticas.

Observa-se também, que a amostra 258, classificada como citótipo Jari e proveniente de um criadouro de Santarém, possui constituição cromossômica diferente de todas as amostras. Porém, em todas as análises moleculares foi agrupada com indivíduos do citótipo Juína-MT.

O indivíduo 259, proveniente de Santarém no Pará do citótipo Carajás ($2n=50$; $NF=54$), e os indivíduos 254 e 274 de Imperatriz do Maranhão (de constituição cromossômica semelhante aos indivíduos do citótipo Paraná, apenas diferente pela ausência de um par de cromossomos acrocêntricos), estão sempre agrupados aos indivíduos da Bacia do Rio Paraná. Além disso, observou-se um agrupamento monofilético das amostras 254 e 274 nas análises da região controladora, podendo ser um grupo-irmão do citótipo Paraná.

As interpretações dos resultados encontrados nos citótipos Santarém e Carajás devem ser consideradas com cuidado. Talvez exista uma zona simpátrica no leste da Amazônia, onde indivíduos dos citótipos Paraná e Carajás encontram-se com indivíduos dos citótipos Rondônia e Juína. Ou que, devido a populações ou espécies separadas recentemente, tenha havido retenção de uma fração substancial das diferenças do DNA mitocondrial do ancestral mais recente (AVISE et al. 1987). Sugere-se que na população de citótipo Santarém, alguns indivíduos preservaram fragmentos de DNA mitocondrial das populações do oeste da Amazônia e outros da população do Sul do Brasil, caracterizando um possível caso de retenção de polimorfismo ancestral ou introgressão (DOWLING & SECOR, 1997; DONNELLY et al. 2003).

Outra questão a considerar é que a história da origem destes animais são distintas e incertas. Levar em consideração os resultados encontrados para os citótipo Santarém pode ser precipitado, uma vez que não conhecemos a localização do local exato de retirada destes animais na natureza, além de que o número de amostras e genes estudados é reduzido.

Todos os indivíduos estudados são semelhantes morfologicamente. Isto sugere que as duas linhagens evolutivas encontradas possam ter passado por um

processo de convergência evolutiva morfológica, ou seja, adaptações similares e independentes ocorreram entre elas, fazendo com que as tornassem morfolologicamente semelhantes.

Os resultados encontrados neste trabalho de genética molecular condizem com as comparações citogenéticas de outros indivíduos dos citótipos Rondônia, Carajás e Paraná realizadas por SARRIA-PEREA (2004), que também sugeriu a existência das duas linhagens. Este mesmo autor descreveu que os citótipos Paraná e Carajás diferem em apenas uma fusão em tandem, enquanto os indivíduos do citótipo Rondônia estão consideravelmente mais distantes destes, diferindo em quatro fusões em tandem e uma translocação Robertsoniana.

As linhagens de *M. americana* descritas parecem coincidir com o padrão de distribuição geográfica de outros mamíferos terrestres da América do Sul (marsupiais, roedores e primatas), estudados por COSTA & LEITE (2000). Eles investigaram os centros de endemismo e diversidade, revelando que há uma disjunção na distribuição de espécies entre noroeste e sudeste do continente e que há um grupo de espécies endêmicas do leste do Brasil, limitado à floresta atlântica. Sendo assim, seus resultados são similares aos encontrados aqui, dos quais exibem esta separação entre sudoeste (citótipo Paraná) e noroeste do Brasil (citótipos Rondônia e Juína).

A mais provável interpretação para principal causa de descontinuidade genética que exhibe orientação geográfica ocorre em longo prazo, não essencialmente por barreira de fluxo gênico. Dessa maneira, as populações da mesma espécie ocupam ramos monofiléticos de uma árvore filogenética intra-específica. Outra possibilidade, não mutuamente exclusiva, é a extinção de genótipos intermediários de espécies com ampla distribuição, porém, com limitada dispersão e capacidade de fluxo genético (AVISE et al. 1987). Entretanto, não podemos considerar estas hipóteses, pois não foi realizada uma amostragem ao longo de toda distribuição da espécie *M. americana*. Além disso, não há estudos da capacidade de dispersão e estudos da capacidade de fluxo genético entre as linhagens.

A descontinuidade da amostragem ao longo de todo território brasileiro também prejudica saber se há uma mudança gradual de caráter genético ao longo de um corte transversal geográfico, chamado de “Clima”. Isto seria interessante de ser estudado, uma vez que, os resultados exibem duas linhagens evolutivas e estas estão geograficamente distantes. As Climas podem se estender por toda a distribuição geográfica de uma espécie; por exemplo; o tamanho corporal do veado-da-cauda-branca, *Odocoileus virginianus*, aumenta gradualmente com a latitude na maior parte da América do Norte (FUTUYMA, 1992).

Análises filogenéticas entre *Muntiacus crinifrons* e *Muntiacus gongshanensis* revelam que estes talvez sejam partes de um grande grupo variável ou que ocorrem em Clima ao longo da China, Myanmar, e sudeste tibetano. As diferenças de cor da pelagem entre eles também podem representar uma diferenciação em nível subespecífico (AMATO et al. 2000). A clima pode se estabelecer por diversas razões e é muito comum em mamíferos e aves (FUTUYMA, 1992).

Aparentemente, a semelhança morfológica das duas linhagens encontradas são conseqüências da recente radiação dos cervídeos da América do Norte para a América do Sul. Um exemplo semelhante às questões que sucedem *M. americana* ocorrem para correta taxonomia das espécies do *Muntiacus*, refletida em partes de uma deficiência na diferenciação morfológica deste grupo (AMATO et al. 2000).

Análises de seqüências de DNA sugerem que todas as espécies de *Muntiacus*, que é uma das linhagens ancestrais dos cervídeos, podem ser originárias de uma recente radiação. Além disso, no gênero *Muntiacus* ocorre alta divergência no número de cromossomos que diferem entre as espécies e entre os sexos da mesma espécie, nos *Muntiacus muntjak* com $2n=6$ ou 8 em fêmeas e de 7 a 9 em machos, e em *M. reevesi* com $2n=46$ em ambos os sexos (AMATO et al. 2000; GROVES & SCHALLER, 2000).

Entretanto, estudos cariotípicos inter e intra-específicos deste gênero, que poderiam auxiliar na história evolutiva deste grupo, parecem não ser tão simples, uma vez que não é comum que os padrões das relações baseadas nas

informações cromossômicas sejam diferentes das informações de seqüências de DNA (AMATO et al. 2000).

Deve ficar claro que todas as afirmações e hipóteses das inferências filogenéticas neste trabalho são baseadas em comparações do DNA mitocondrial, que revela uma suposta história das sequências de eventos mutacionais e da diferenciação apenas da linhagem materna. Portanto, está longe de ser uma caracterização filogenética intraespecífica completa, na qual a descrição pode ser distorcida se machos e fêmeas diferirem em características filogeográficas relevantes, como na variação de dispersão entre machos e fêmeas, já observada em outras espécies de cervídeos (CATHEY et al. 1998; PURDUE et al. 2000; OLIVEIRA et al. 2005; RANDI et al. 1998). Portanto, são necessários estudos confrontando inferências filogenéticas de genes mitocondriais e genes nucleares, para avaliar, com maior segurança, a história evolutiva da espécie *M. americana*.

Populações separadas possuem alta probabilidade de que seus alelos tornem-se monofiléticos. Além disso, populações com tamanho efetivo reduzido e alta taxa de substituição, tendem a alcançar esta condição mais rapidamente no DNA mitocondrial do que nos alelos nucleares (MORITZ, 1994). Isto seria uma hipótese para o que ocorreu para caracterização da linhagem dos indivíduos do Paraná, no entanto, devemos ser cautelosos, pois o número amostral e poucos nucleotídeos estudados podem levar a interpretações errôneas (AVISE, 1987).

Contudo, as linhagens evolutivas são significativamente diferentes, mas seriam estas espécies distintas? Para responder a esta questão, seriam necessários outros estudos em morfologia, citogenética e reprodução para caracterizar outra espécie.

O nível de separação entre as linhagens são suficientes para sugerir que estas sejam unidades evolutivas diferenciadas (MORITZ, 1994). Entretanto, as distâncias genéticas (Tabela 15) entre os citótipos Rondônia/Juína e Paraná/Carajás é maior que a observada entre os citótipos Rondônia/Juína e as espécies *M. bororo* e *M. nana*. Estes resultados sugerem a existência de uma nova espécie, a qual atualmente recebe o mesmo nome, *M. americana*.

VI. CONCLUSÃO

As técnicas moleculares utilizadas foram adequadas para reconstituir parte das relações filogenéticas da espécie *M. americana* pelas partições dos genes mitocondriais e compará-la com as descrições das variantes citogenéticas descritas na literatura. Também permitiu identificarmos variações genéticas dentro e entre citótipos. No entanto, a escolha e o tamanho dos fragmentos dos genes nucleares utilizados não permitiram tal reconstrução.

O número de amostras, o incerto local de origem na natureza e a ausência de homogeneidade de distribuição destas ao longo de todo território nacional, prejudicam na elucidação de existência de uma divisão populacional molecular (monofilia) dos citótipos Juína, Rondônia e Santarém e se realmente existe uma relação molecular destes com o citótipo Paraná e Carajás.

No entanto, as inferências filogenéticas baseadas nos fragmentos dos genes mitocondriais revelaram duas linhagens evolutivas, da espécie *M. americana*; uma composta pelos citótipos Rondônia e Juína e outra pelos citótipos Paraná e Carajás. Além disso, há um grau de diferenciação genética dentro da espécie *M. americana* maior do que entre diferentes espécies do gênero *Mazama*.

VII. IMPLICAÇÕES

Ainda não é possível afirmar se as diferenças encontradas neste trabalho são variações intra-populacionais históricas e comuns, ou se existe uma espécie distinta. Entretanto, apesar de não estar classificada em nível internacional pela IUCN como uma espécie ameaçada, se estudos forem aprofundados confirmando a diferenciação destas unidades, algumas delas podem estar em risco de extinção, uma vez que esta espécie ocupa uma ampla distribuição geográfica e habitats ameaçados.

Portanto, estas diferenças moleculares merecem atenção da comunidade científica e governamental. Além disto, os métodos e resultados encontrados podem servir como ferramentas para futuros estudos moleculares e justificativas à conservação de habitats ameaçados onde a espécie *M. americana* ocupa, como também, para outras espécies de mamíferos.

VIII. REFERÊNCIAS

ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Variação cariotípica em veado-mateiro, *Mazama americana* (Cervidae, Artiodactyla). In: **Congresso Sul-americano de Mastozoologia**, 1., 2006, Gramado. *Anais...* Gramado: Mamíferos RS, 2006. P. 21

ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p.53-57, 2008.

ALLEN, J. A. Notes on american deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v. 34, n. 18, p. 521-553, 1915.

AMATO, G.; EGAN, M. G.; SHALLER, B. G. Mitochondrial DNA variation in Muntjac: Evidence for discovery, and phylogenetic relationships. In: VRBA, E. S.; SCHALLER, G. B. **Antelopes, deer, and relatives: fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000. p. 285-295.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematic. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 18, p. 489-522, 1987.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**., Orlando, v. 16, p. 37-48, 1999.

BEINTEMA, J. J.; SCHÜLLER, C.; IRIE, M.; CARSANA, A. Molecular evolution of the ribonuclease superfamily. **Progress in biophysics and molecular biology**, Elmsford, v. 51, n. 3, p. 165-192, 1988.

BRIDGES, C. D.; LIOU, G. I.; ALVAREZ, R. A.; LANDERS, R. A.; LANDRY, JR. A. M.; FONG, S. L. Distribution of interstitial retinol-binding protein (IRBP) in the vertebrates. **The Journal of experimental zoology**, New York, v. 239, n. 3, p. 335-346, 1986.

CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. II (Sirenia, Perissodactyla, Artiodactyla, Lagomorpha, Rodentia, Cetacea). **Museo Argentino de Ciencias Naturales Bernardino Rivadavia (MACN)**, Buenos Aires, v. 4, n. 2, p. 309-732, 1960.

CALCAGNOTTO, D. Taxa de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 51-63.

CATHEY, J. C.; BICKHAM, J. W.; PATTON, J. C. Introgressive Hybridization and Nonconcordant Evolutionary History of Maternal and Paternal Lineages in North American Deer. **Evolution**, Lancaster, v. 52, n. 4, p. 1224-1229, 1998.

CHENG, H.; SHI, H.; ZHOU, R.; GUO, Y.; LIU, L.; LIU, J.; JIANG, Y.; KUDO, T.; SUTOU, S. Characterization of *Bovidae* sex-determining gene *SRY*. **Genetics Selection Evolution**, Paris, v. 33, p. 687-694, 2001.

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.

CORIAT, A-M.; MIJLLER, U.; HARRY, J. L.; UWANOGHO, D.; SHARPE, P. T. PCR amplification of *SRY-related* gene sequences reveals evolutionary conservation of the *SRY-box* motif. **PCR Methods Appl**, New York, v. 2, p. 218-222, 1993.

COSTA, L. P.; LEITE, Y. L. R. Biogeography of south american forest mammals: Endemism and diversity in the Atlantic Forest. **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 4b, p. 872-881, 2000.

CRONIN, M. A.; STUART, R.; PIERSON, B. J.; PATTON, J. C. K-casein gene phylogeny of higher ruminants (Pecora, Artiodactyla). **Molecular Phylogenetics and Evolution**., Orlando, v. 6, n. 2, p. 295-311, 1996.

DEER SPECIALIST GROUP 2000. **Mazama americana**. Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 05 maio 2008.

D'ELÍA, G.; LUNA, L.; GONZÁLEZ, E. M.; PATTERSON, B. D. On the Sigmodontinae radiation (Rodentia, Cricetidae): An appraisal of the phylogenetic position of *Rhagomys*. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 38, n. 2, p. 558-564, 2006.

DONNELLY, M. J.; PINTO, J.; GIROD, R.; BESANSKY, N. J.; LEHMANN, T. Revisiting the role of introgression vs shared ancestral polymorphisms as key processes shaping genetic diversity in the recently separated sibling species of the *Anopheles gambiae* complex. **Heredity**, London, v. 92, p. 61–68, 2004.

DOUZERY, E.; RANDI, E. The mitochondrial control region of Cervidae: evolutionary patterns and phylogenetic content. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 14, n. 11, p. 1154-1166, 1997.

DOWLING, T. E.; SECOR, C. L. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v. 28, p. 593–619, 1997.

DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. 1. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 16 p.

DUARTE, J. M. B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. Não paginado. Tese (Doutorado em

Ciências Biológicas - Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S.; MALDONADO J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. No prelo.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de zootecnia**, Córdoba, v. 45, n. 170, p. 281-287, 1996.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, Paris, v. 67, n. 3, p. 403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. Taxonomia e evolução. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 21.

EISENBERG, J. F. The Contemporary Cervidae of Central and South America. In: VRBA, E. S.; SCHALLER, G. B. **Antelopes, deer, and relatives: fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000. p. 189-202.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. M. Mammals of the neotropics: The central Neotropics. Chicago: **University of Chicago**, 1999, v. 3, p. 609, 1999.

EMMONS, L. H.; FEER, F. **Neotropical rainforest mammal: a field guide**. 2. Chicago: The University of Chicago Press, 1997. 281 p.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, n. 4, p. 783-791, 1985.

FEULNER, P. G. D.; BIELFELDT, W.; ZACHOS, F. E.; BRADVAROVIC, J.; ECKERT, I.; HARTL, G. B. Mitochondrial DNA and microsatellite analyses of the

genetic status of the presumed subspecies *Cervus elaphus montanus* (Carpathian red deer). **Heredity**, London, v. 93, p. 299–306, 2004.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva**. 2. Ed. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 1992. 646 p.

GILBERT, C.; ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**., Orlando, v. 40, n.1, p. 101-117, 2006.

GONZÁLEZ, S. **El manejo del ciervo Axis (*Cervus axis*) en la residencia presidencial de Colonia-Uruguay**. IUCN/SSC Conservation Breeding Specialist Group, Apple Valley, 1997, p. 60

GRIFFITHS, R.; TIWARI, B. Primers for the differential amplification of the sex-determining region Y gene in a range of mammal species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 405-406, 1993.

GROVES, C. P.; SCHALLER, G. B. The phylogeny and biogeography of the newly discovered Annamite Artiodactyls. In: VRBA, E. S.; SCHALLER, G. B. **Antelopes, Deer, and Relatives: Fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000. p. 261-285.

GUHA, S.; GOYAL, S. P.; KASHYAP, V. K. Molecular phylogeny of musk deer: A genomic view with mitochondrial 16S rRNA and cytochrome *b* gene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 42, n. 3, p. 585–597, 2007.

IRWIN, D. M.; KOCHER, T. D.; WILSON, A. C. Evolution of the cytochrome *b* gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 32, n. 2, p.128-144, 1991.

JANSA, S. A.; VOSS, R. S. Phylogenetic studies on didelphid marsupials I. Introduction and preliminary results from nuclear IRBP gene sequences. **Journal of Mammalian Evolution**, New York, v. 7, n.1, p. 43-77, 2000.

JORGE, W.; BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the Red Brocket Deer, *Mazama americana* temama (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-robertsonian translocation. **Cytologia**, Tokyo, v. 42, n. 3-4, p. 711-721, 1977.

KIKKAWA, Y.; TAKADA, T.; SUTOPO.; NOMURA, K.; NAMIKAWA, T.; YONEKAWA, H.; AMANO, T. Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 96-101, 2003.

KIMURA, M. A simple method for estimating evolutionary rate of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. **Journal of Molecular Evolution**, New York, v. 16, n. 2, p. 111-120, 1980.

KOCHER, D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved iniciadores. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 86, p. 6196-6200, 1989.

KOEPFLI, K-P.; GOMPPER, M. E.; EIZIRIK, E.; HO, C-C.; LINDEN, L.; MALDONADO, J. E.; WAYNE, R. K.; Phylogeny of the procyonidae (Mammalia: Carnivora): Molecules, morphology and the Great American Interchange. **Molecular Phylogenetics and Evolution**., Orlando, v. 43, n. 3, p. 1076-1095, 2007.

KRAUS, F.; MIYAMOTO, M. M. Rapid cladogenesis among the pecoran ruminants: evidence from mitochondrial DNA sequences. **Systematic Zoology**, Washington, v. 40, n. 2, p. 117-130, 1991.

MADDISON, W. P.; MADDISON, D. R. **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis Version 1.05.** Disponível em: <<http://www.mesquiteproject.org>>, Acesso em: 9 ago. 2007.

MALDONADO, J. E.; DAVILA, F. O.; STEWART, B. S.; GEFFEN, E.; WAYNE, R. K. Intraspecific genetic differentiation in California Sea Lions (*Zalophus californianus*) from Southern California and the Gulf of California. **Marine Mammal Science**, Lawrence, v. 11, p. 46-58, 1995.

MEADOWS, J. R. S.; HANOTTE, O.; DRÖGEMÜLLER, C.; CALVO, J.; GODFREY, R.; COLTMAN, D.; MADDOX, J. F.; MARZANOV, N.; KANTANEN, J.; KIJAS, J. W. Globally dispersed Y chromosomal haplotypes in wild and domestic sheep. **Animal Genetics**, Oxford, v. 37, n. 5, p. 444-453, 2006.

MERCIER, J-C; VILOITE, J-C. Structure and function of milk protein genes. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 10, p. 3079-3078, 1993.

MIYAMOTO, M. M.; KRAUS, F.; RYDER, O. A. Phylogeny and evolution of antlered deer determined from mitochondrial DNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 87, p. 6127-6131, 1990.

MORITZ, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, Amsterdam, v. 9, n. 10, 1994.

MOUCHATY, S. K.; GULLBERG, A.; JANKE, A.; ARNASON, U. The phylogenetic position of the Talpidae within Eutheria based on analysis of complete mitochondrial sequence. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 17, n. 1, p. 60-67, 2000.

MROSS, G. A.; DOOLITTLE, R. F. Amino acid sequence studies on artiodactyl fibrinopeptides. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 122, p. 674-684, 1967.

MURPHY, J. W.; EIZIRIK, E.; JOHNSON, W. E. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. **Nature**, London, v. 409, n. 2820, p. 614-618, 2001.

NABHOLZ, B.; GLE´MIN, S.; GALTIER, N. Strong variations of mitochondrial mutation rate across mammals—the longevity hypothesis. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 25, n. 1, p. 120–130, 2008.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G.; ASLER, A. (Ed.) Cytogenetics, basic and applied aspects. Berlin: **Springer Verlag**, 1987. p. 90-102.

NIES G.; ZACHOS F. E.; HARTI G. B. The impact of female phylopatry on population differentiation in the European roe deer (*Capreolus capreolus*) as revealed by mitochondrial DNA and allozymes". **Mammalian Biology**, v. 70, p. 130-134, 2005.

NISHIDA, S.; GOTO, M.; PASTENE, L. A.; KANDA, N.; KOIKE, H. Phylogenetic relationships among cetaceans revealed by Y-chromosome sequences. **Ecological Science**, Tokyo, v. 24, n. 7, p. 723-732, 2007.

NOVACEK, M. J. Mammalian phylogeny: shaking the tree. **Nature**, London, v. 356. N. 6365, p.121-125, 1992.

OLIVEIRA, E. J. F.; GARCIA, J. E.; CONTEL, E. P. B.; DUARTE, J. M. B. Genetic structure of *Blastocerus dichotomus* populations in the Paran´a River Basin (Brazil) Based on Protein Variability. **Biochemical Genetics**, New York, v. 43, n. 5/6, 2005.

O'NEILL, R. J.; ELDRIDGE, M. D; CROZIER, R. H.; GRAVES, J. A.; Low levels of sequence divergence in rock wallabies (*Petrogale*) suggest a lack of positive directional selection in *SRY*. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 14, n. 3, p. 350-353, 1997.

OTAVIANO, A. R. **Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino bubalina**. 2006. 82 p. Tese (Doutorado em Produção Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2006.

POLZIEHN, R. O.; STROBECK, C. A phylogenetic comparison of red deer and wapiti using mitochondrial DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v. 22, n. 3, p. 342-356, 2002.

POUSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Oxford Journals: Bioinformatics**. London, v. 14, p. 817–818, 1998.

PROVOT, C.; PERSUY, M-A.; MERCIER, J-C. Complete sequence of the ovine β -casein-encoding gene and interspecies comparison. **Gene**, Amsterdam, v. 154, n. 2, p. 259-263, 1995.

PURDUE, J. R.; SMITH, M. H.; PATTON, J. C.; Female philopatry and extreme spatial genetic heterogeneity in white-tailed deer. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v. 81, n. 1, p. 179–185, 2000.

RANDI, E.; MUCCI, N.; PIERPAOLI, M.; DOUZERY, E. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Edinburgh, v. 265, n. 1398, p. 793-801, 1998.

RIJNKELS, M. Multispecies comparison of the casein gene loci and evolution of casein gene family. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 7, n. 3, p. 327-345, 2002.

ROSSI, R. V. 2000. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**, 2000. f. 174. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

RUSSO, C. A. M. Como escolher genes para problemas filogenéticos específicos. In: MATIOLI, S, R. (Ed.) **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, 2000. p. 130-136.

ROZAS, J.; SÁNCHEZ-DELBARRIO, J. C.; MESSEGUER, X.; ROZAS, R. DnaSP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. **Bioinformatics**, Oxford, v. 19, n. 18, p. 2496-2497, 2003.

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v. 230, n. 4732, p. 1350-1354, 1985.

SAITOU, N.; NEI, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 4, n. 4, p. 406-425, 1987.

SARRIA-PEREA, J. A. **Comparações entre alguns citótipos de *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE): Quão grande é a diferença entre eles?** 2004. 51 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia – Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2004.

SCHERTHAN, H. Characterization of a tandem repetitive sequence cloned from the deer *Capreolus capreolus* and its chromosomal localisation in two muntjac species. **Hereditas**, Lund, v. 115, n. 1, p. 43-49, 1991.

SPRINGER, M. S.; DeBRY, R. W.; DOUADY, C.; AMRINE, H. M.; MADSEN, O.; de JONG, W. W.; STANHOPE, M. J.; Mitochondrial versus nuclear gene sequences in deep-level mammalian phylogeny reconstruction. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 18, n. 2, p. 132-143, 2001.

SWOFFORD, D.L. PAUP*: Phylogenetic analysis parcimony (*and related methods). Version 4. **Sinauer Associates**, Sunderland, Massachusetts, 1998.

TAMURA, K.; DUDLEY, J.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 24, n. 8, p. 1596-1599, 2007.

TAYLOR, K. M.; HUNGERFORD, D. A.; SNYDER, R. L. Artiodactyla mammals: their chromosome cytology in relation to patterns of evolution. In: BENIRSCHKE, K. Comparative mammalian cytogenetics. Berlin: **Springer Verlag**, 1969. p. 346-356.

TCHAICKA, L.; EIZIRIK, E.; OLIVEIRA, T. G.; CÂNDIDO, J. F.; FREITAS, T. R. O. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). **Molecular Ecology**, Oxford, v. 16, n. 4, p. 819–838, 2007.

THOMAS, O. On certain of the smaller south american cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, London, v. 11, p. 585-589, 1913.

TUCKER, K. P.; LUNDRIGAN, B. L. Rapid evolution of the sex determining locus in Old World mice and rats. **Nature**, London, v. 364, n. 6439, p. 715-717, 1993.

VILÀ, C.; AMORIM I. R.; LEONARD, J. A.; POSADA, D.; CASTROVIEJO, J.; PETRUCCI-FONSECA, F.; CRANDALL, K. A.; ELLEGREN, H.; WAYNE, R. K. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2089-2103, 1999.

VOGLIOTTI, A. **História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

WEBB, D, S. Ecogeography and the Great American Interchange. **Paleobiology**, New York, v. 17, n. 3, p. 266-280, 1991.

WEBB, D, S. Evolutionary History of new world cervidae. In: VRBA, E. S; SCHALLER, G. B. **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000. p. 38-64.

WEKSLER, M. Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 331-349, 2003.

WHITFIELD, L. S.; LOVELL-BADGE, R.; GOODFELLOW, P. N. Rapid sequence evolution of the mammalian sex-determining gene SRY. **Nature**, London, v. 364, n. 6439, p. 713-715, 1993.

XIAO, C-T.; ZHANG, M-H.; FU, Y.; KOH, H-S. Mitochondrial DNA distinction of northeastern China Roe Deer, Siberian Roe Deer, and European Roe Deer, to clarify the taxonomic status of northeastern China Roe Deer. **Biochemical Genetics**, New York, v. 45, n. 1/2, 2007.

ZADWORNÝ, D.; KUHLEIN, U. The identification of the kappa-caseína genotype in Holstein dairy cattle using the polymerase chain reaction. **Theoretical and applied genetics**, Berlin, v. 80, p. 631-634, 1990.

ANEXO 1**PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE SANGUE:**

Os procedimentos para extração de DNA foram realizados segundo o protocolo de ZADWORNY & KUHLEIN (1990), com adaptações.

1. Descongelar as amostras, alíquotar 500 µL de sangue e transferir para um microtubo de 2 mL.
2. Adicionar 120 µL de SDS (0,5%) ou NONIDET P-40 (12,5%) as amostras, completar o volume (2 mL) com Tampão TKM 1, e homogeneizar no vórtex;
3. Centrifugar por 15 minutos- 10.000 RPM – Temperatura ambiente (22- 25°C), descartar o sobrenadante;
4. Adicionar 900 µL de tampão TKM 1 para dissolução do *pellet* em vórtex, e completar volume com TKM 1 (2 mL);
5. Centrifugar por 10 minutos – 10.000 RPM - Temperatura ambiente (22- 25°C), descartar o sobrenadante. Repetir este passo até obter precipitado de coloração clara.
6. Adicionar 1.000 µL de TKM 2 e 100 µL de SDS (20%), e agitar em vórtex para dissolução do “*pellet*”.
7. Incubar em banho-maria a 55-62 °C por 1 hora;
8. Adicionar 400 µL de NaCl (6M) e agitar no vórtex;
9. Centrifugar por 20 minutos – 14 000 RPM - Temperatura ambiente (22- 25°C), e transferir o sobrenadante para novo microtubo de 1,5 mL.
10. Adicionar 700 µL de Etanol absoluto gelado e misturar vagorosamente para precipitação do DNA.
11. Centrifugar por 15 minutos – 14 000 RPM – 4 °C, e descartar sobrenadante.
12. Adicionar 700 µL de Etanol 70% gelado e misturar vagorosamente para precipitação do DNA.
13. Centrifugar por 5 minutos – 14 000 RPM – 4 °C, e descartar sobrenadante.
14. Secar o *pellet* por inversão (2 a 3 horas);

15. Adicionar 50 μ L de tampão TE (1:10) e agitar por 12 horas em temperatura ambiente.

16. Armazenar as amostras em refrigerador (4 °C) ou em freezer.

SOLUÇÕES DE TRABALHO

Tampões:

REAGENTES	TKM 1	TKM 2
Tris – HCl (1M) pH 7,6	5,0 mL	0,5 mL
KCl (1M)	5,0 mL	0,5 mL
MgCl ² (1M)	5,0 mL	0,5 mL
EDTA (0,1M)	10,0 mL	1,0 mL
NaCl (1M)	---	20 mL
Água milli-Q q.s.p.	500 mL	50 mL

- Filtrar em filtro 0,2M ou autoclavar a solução.
- Estocar a 4 °C

TE:

REAGENTES	10 : 1	10 : 0,1
Tris – HCl (1M) pH 8,0	0,5 mL	1,0 mL
EDTA (0,1M)	0,5 mL	25,0 mL
Água milli-Q q.s.p	50,0 mL	10,0

- Filtrar em filtro 0,2M ou autoclavar a solução.
- Estocar a 4 °C

SDS:

REAGENTES	10%	0,05 %
SDS (dodecil sulfato de sódio)	5,0 g	0,025 g
Água milli-Q q.s.p	50,0 mL	50,0 mL

- Filtrar em filtro 0,2M ou autoclavar a solução.
- Estocar a 4 °C

NaCl:

REAGENTES	6 M	1 M
NaCl (p.m.=58,45)	35,06 g	5,84 g
Água milli-Q q.s.p	100,0 mL	100,0 mL

- Filtrar em filtro 0,2M ou autoclavar a solução.
- Estocar a 4 °C.

ANEXO 2**REAÇÕES DE SEQÜENCIAMENTO****Passo 1. Mix de Reação do produto do PCR com os didesoxinucleotídeos**

DNA (produto de PCR) - 1 µl (25 ng/µl)

Tampão – 3 µl (2,5x - “Save Money”)

Didesoxinucleotídeos - 1 µl (BigDye Terminator v.3)

Primer - 1 µl (10pmol)

Água - 4 µl

Passo 2. Reação de Incorporação dos didesoxinucleotídeos em termociclador

Desnaturação a 96 °C por 10 segundos, ligação dos iniciadores a 52°C por 5 segundos, extensão a 60° por 4 minutos, repetir estes ciclos 35 vezes e por fim armazenar a 4°C.

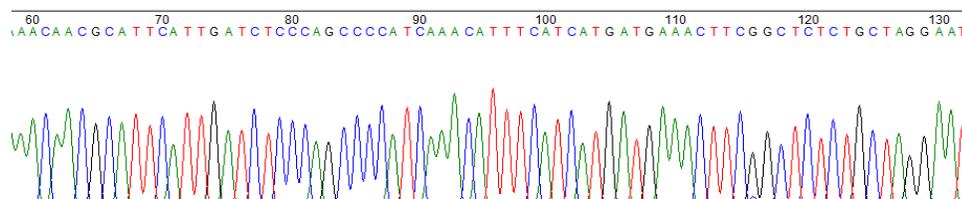
Passo 3. Procedimentos de Lavagem

- Adicionar 60 µl Isopropanol para precipitar o DNA.
- Passar em vortex bem rápido.
- Reação de escuro 15 minutos.
- Centrifugar 30 minutos a 4000 RPM; 20 °C.
- Adicionar 160 µl de etanol 70% e agitar vagarosamente.
- Centrifugar 10 minutos a 4000 RPM e repetir lavagem com etanol.
- Enxugar as placas com papel higiênico e não desvirar as placas.
- Centrifugar invertidas com papel no fundo – Spin 22 segundos; z1 (nunca ultrapassar!).
- Secar em bomba a vácuo por 5 minutos ou em temperatura ambiente por 45 minutos. Após este procedimento a placa pode ser armazenada a 4 °C até sua aplicação no seqüenciador.
- Adicionar 10 µl de Formamida Hi-Di.
- Selar as placas com plástico
- Desnaturar 95 °C; 5 minutos antes de aplicar no seqüenciador.

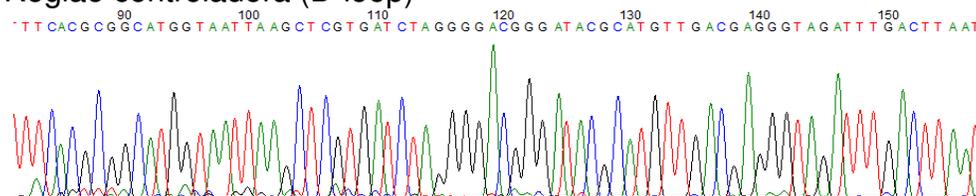
ANEXO 3

Eletroferogramas dos fragmentos das regiões estudadas

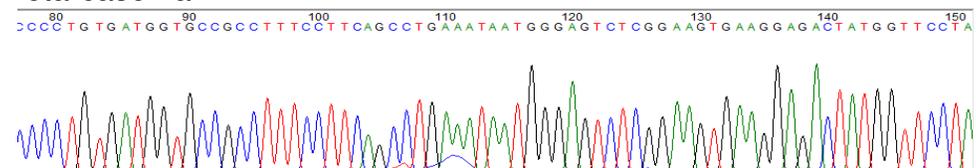
- Citocromo-b



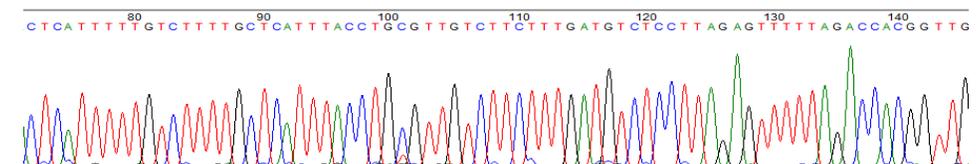
- Região controladora (D-loop)



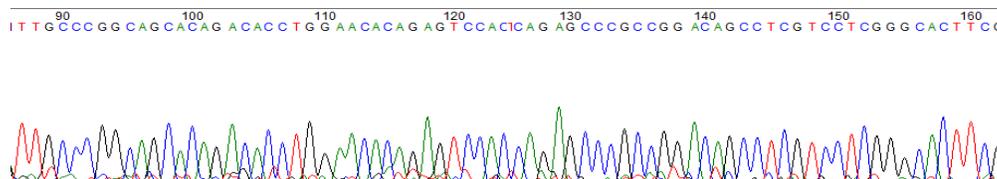
- Beta-caseína



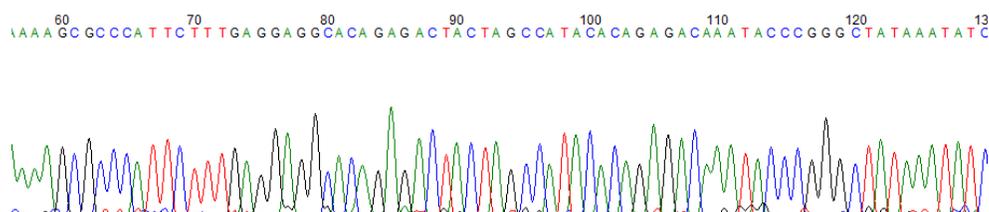
- Kappa-caseína



- IRBP



- SRY



ANEXO 4

192Cu/PR	TCTACTGTTT	CTCTCCTTCA	TGGC
205It/PRC...	..A.	
235PP/PRC...		
256It/PRC...		
257PR_itC...		
255Ca/PRC...		
274Im/MAC...		
254Im/MAC.A.		
259Sa/PAC.T.		
258Sa/PA	CTCG.C.C..	.C.CT.C..G	C...
260Sa/PA	CTCG.C.CCC	T..CT.C..G	C...
206Ar/RO	CTCT.C.C..	..CTCCTG	C...
269Bu/RO	CTCG.C.C..	..TCT.C..G	C...
211Ar/RO	CTCT.C.C..	..CTTC.TG	C...
247Ju/MT	CTCG.CAC..	.C.CT.C..G	C..T
248Ju/MT	CTCG.C.C.C	.C.CT.C..G	C.A.
252Ju/MT	CTCG.C.C.C	.C.CT.C..G	C...
253Ju/MT	CTCGTC.C.C	.C.CT.C..G	CA..
251Ju/MT	?TCG.CAC..	.C.CT.C..G	C...

- I. Sítios variáveis na matriz de dados do fragmento do citocromo-b de 367 pb. Número de sítios variáveis = 24; Idênticos à amostra 192=.; "Missing"=?; "Gaps"=-.

192Cu/PR	TCTACTGTTT	CTTCCTCATG	GCCACCTTAA	CATCTTTGCT	TACAGCTACA	TCCTGTTA
205It/PRC....	A..GGTC...C...C...C...	...GA...
235PP/SPC....TC...C...C...CG...	...A???
255An/GOC....TC...CA..C...C...	...A...
257Ca/PRC....TC...C...C...C...	...A...
256It/PRC....TC...C...C...C...	...A...
211Ar/RO	CTCT.C.C..	..CTTCTGC.CG.A...C	.GT..TC..G	CTTCACA.
247Ju/MT	CTCG.CAC..	.CCT.C.GC.	.T....CG.	T.C.CA...C	.GT.ATC..G	CTTCACAG
248Ju/MT	CTCG.C.C.C	.CCT.C.GC.	A.T....CGG	T.C.CAC..C	CGT.ATC.AG	CTTCACAG
252Ju/MT	CTCG.C.C.C	.CCT.C.GC.	..T....CGG	T.C.CAC..C	CGT.ATC.AG	CTTCACA.
253Ju/MT	CTCGTC.C.C	.CCT.C.GCACGG	T.C.CA...C	.GT.ATC..G	C.TCACAG
259Sa/PAC....CT...TC..GC...	C.....C...	...A...
258Sa/PA	CTCG.C.C..	.CCT.C.GC.CGG	TTC.CA...C	.GT..TC..G	CTTCACAG
260Sa/PA	CTCG.C.CCC	T.CT.C.GC.C.G	T.CTCA.AAC	.GTTA?????	?????????

- II. Sítios variáveis na matriz de dados do fragmento de citocromo-b de 903 pb. Número de sítios variáveis = 58; Idênticos à amostra 192=.; "Missing"=?; "Gaps"=-.

205It/PR	GCCTCTCCCT	CTTTCCTACT	TCATGTTTTC	CTGCGTAGGT	CTCACTAATG	ATTTACTTAC	ACCTAAGTCG	ATCAATATCCATGTC
257Ca/PRCCCCCCCC
256It/PRCCCCCCCC
235PP/SPCCCCCGCC
274Im/MACGA.C	..T.T.G.C.G.C...	G.....A...C.C.T.CA..	
255An/GOCATCCCGAC.C.C.T.CA..
254Im/MACGA.A.CTC..C.G.C...	G.....A...C.G.C.C.T.CA..	
259Sa/PACGATCC...	ta.....GGTG.A..
206Ar/RO	ATTCTCTTTC	TCC.TT.GT.	CAC.A.-CCT	TCA....TC	TCTGT..T..	..CCGA.AT.	GA..TTA..AGCG..T..A.T
260Sa/PA	ATTCTCTTTC	..C.TT..T.	CAC.A.-CCT	TCA....AT.	T..GT..T.A	..C..A.AT.	GATCTTA.T.	G.....C...T..AcT
211Ar/RO	ATTCTCTTTC	TCC.TT.GT.	CAC.A.-CCT	TCA....TC	TCTGT..T..	..C.GA.AT.	GA..TTA..ACG..T..A.T
269Bu/RO	ATTCTCTTTC	T.C.TTC.TC	CACAA.-CCT	TCA....T.T..T..	..C...A.ATT	GAT...AC..CT...A.T
247Ju/MT	AT.C.CTTTC	T.CCTT..T.	CAC.A.-CCT	TCA....AT.	T.TGT..T..	..C...A.AT.	GATCTCA.TAC...A.T
248Ju/MT	AT.C.CTTTC	T.CCTT..T.	.AC.A.-CCT	TCA....T.	..TGT..T..A.AT.	GA..TTA..AC.C.T.CA.T
251Ju/MT	AT.C.CTTTC	T.CCTT..T.	CAC.A.-CCT	TCA....GAT.	T.....T..	..C...A.AT.	GATCTCA.TAC.T..A.T
252Ju/MT	AT.C.CTTTC	T.CCTT..T.	.AC.A.-CCT	TCA....C.T.	..TGT..T..	..C.A.AT.	GAT.TTA..AC.C.T.CA..
253Ju/MT	AT.C.CTTTC	T.CCTT..T.	CAC.ACC.C	TCCGA..AT.T..	..C...A.AT.	GA..TCA..AT...ACT
258Sa/PA	AT.C.CTTTC	..CCTT..T.	CAC.A.-CCT	TCA....AT.T..T..	GC...A.AT.	GAT.TTA.TA	..T....C...A.T

- III. Sítios variáveis na matriz de dados do fragmento da região controladora 462 pb. Número de sítios variáveis = 85; Idênticos à amostra 192=.; "Missing"=?; "Gaps"=-.