

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

**VARIANTES MOLECULARES DE *Mazama americana*  
(MAMMALIA, CERVIDAE) NO ESTADO DE RONDÔNIA**

André Ferrari Gualberto

**Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte**

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  
Outubro 2008

G899v Gualberto, André Ferrari  
Variantes moleculares de *Mazama americana* (MAMMALIA,  
CERVIDAE) no estado de Rondônia / André Ferrari Gualberto. --  
Jaboticabal, 2008  
x, 44 f. : il. ; 28 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008  
Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte  
Banca examinadora: Irlan Leite de Abreu, Fernando Pacheco  
Rodrigues  
Bibliografia

1. *Mazama americana*. 2. Rondônia. 3. citocromo-b. I. Título. II.  
Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:636.294

## **DADOS CURRÍCULARES DO AUTOR**

**ANDRÉ FERRARI GUALBERTO** – Nascido em 16 de Maio de 1981, na cidade de São Paulo, SP, Brasil, graduou-se em Zootecnia em maio de 2006, pela Universidade Federal de Viçosa – UFV, Viçosa, MG. Durante a graduação foi representante discente, durante um ano, do Conselho de Curso e do Departamento de Zootecnia da UFV. Fez parte do Centro Acadêmico de Zootecnia da UFV, como presidente, durante dois anos. Durante a execução deste trabalho recebeu bolsa Mestrado financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Capes.

unesp



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



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


**TÍTULO:** VARIANTES MOLECULARES DE Mazama americana (MAMMALIA,  
CERVIDAE) NO ESTADO DE RONDÔNIA

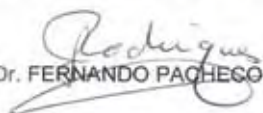
**AUTOR:** ANDRÉ FERRARI GUALBERTO

**ORIENTADOR:** Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

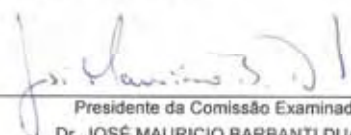
Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de MESTRE em GENÉTICA E  
MELHORAMENTO ANIMAL pela Comissão Examinadora:

  
Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

  
Dr. IRLAN LEITE DE ABREU

  
Dr. FERNANDO PACHECO RODRIGUES

Data da realização: 07 de outubro de 2008.

  
\_\_\_\_\_  
Presidente da Comissão Examinadora  
Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

”Cipó caboclo ta subindo na virola; Chegou à hora do pinheiro balançar; Sentir o cheiro do mato da imburana; Descansar morrer de sono na sombra da barriguda; De nada vale tanto esforço do meu canto; Pra nosso espanto tanta mata haja vão matar; Tal mata Atlântica e a próxima Amazônica; Arvoredos seculares impossível replantar

Que triste sina teve cedro nosso primo; Desde menino que eu nem gosto de falar; Depois de tanto sofrimento seu destino; Virou tamborete mesa cadeira balcão de bar; Quem por acaso ouviu falar da sucupira; Parece até mentira que o jacarandá; Antes de virar poltrona porta armário; Mora no dicionário vida eterna milenar;

Quem hoje é vivo corre perigo; E os inimigos do verde da sombra o ar; Que se respira e a clorofila; Das matas virgens destruídas vão lembrar; Que quando chegar a hora; É certo que não demora; Não chame Nossa Senhora; Só quem pode nos salvar é;

Caviúna, cerejeira, baraúna, imbuia, pau-d'arco, solva, juazeiro e jatobá, gonçalo-alves, paraíba, itaúba, louro, ipê, paracaúba, peroba, massaranduba, carvalho, mogno, canela, imbuzeiro, catuaba, janaúba, aroeira, araribá, pau-fero, anjico, amargoso gameleira, andiroba, copaíba, pau-brasil, jequitibá”

*(Jatobá)*

## **DEDICO**

### ***A minha mãe Ana Maria (in memoriam)***

*“Eu não posso entender essa vida tão injusta; Não vou fingir que já parou de doer, mas um dia isso vai se acabar... Eu não consigo me convencer que essa vida não foi injusta! Tanta falta me faz você, queria ver você em casa... Mãe, o amor que eu tenho por você é seu...”*

*(Nando Reis)*

### ***Ao meu pai Edmundo e minhas irmãs Ana Cristina e Fernanda***

*“São eles que me fizeram entender que nada é tão difícil e que a vida pode ser fácil quando se tem planos para sonhar. Fazem-me enxergar caminhos, pra eu buscar e me entender. É só olhar com outros olhos o que temos de melhor e viver um dia após o outro. Mostraram-me que não existe amor se existir medo. Eu vejo o mundo com mais esperanças. É que fui criado para ser livre, porém, sem esquecer daqueles que fazem parte da minha história! Que são minha essência!”*

*(Autor Desconhecido)*

## **Agradecimentos**

Ao meu orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, por toda a força, conselhos e principalmente por acreditar em mim. Pelo exemplo de profissionalismo e pela delicadeza que teve comigo em todos os momentos, muito obrigado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela concessão da bolsa de estudos concedida.

Ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) pela licença de coleta e transporte, auxílio na coleta dos materiais e estadia em Rondônia.

À Coordenação do Departamento de Genética e Melhoramento Animal da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV – UNESP) e seus funcionários Carlos e Íris, pela ajuda em diversos momentos.

Aos técnicos João Bôer e Paulo Tosta por todo o auxílio no laboratório, paciência e dedicação.

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.

A minha família, que me apoiou a todo instante e cuidou de mim em horas tão complicadas.

Aos companheiros de departamento com os quais dividi angústias e alegrias, agradeço também pelos almoços no RU em mesas homéricas regadas a sorrisos e companheirismo.

Aos membros e amigos do NUPECCE por me ensinar o real significado da palavra grupo.

Aos meus amigos de São Paulo e Viçosa, pela amizade a toda prova, “A tua saudade corta como aço de navaia, o coração fica aflito bate uma a outra faia, os olhos se enche d’água que até as vistas se atrapaia...” (Paulo Vanzolini).

A Roberto Rosa, Luciane Leone e Pietra, obrigado por fazer meus dias em Jaboticabal mais prazerosos e inesquecíveis. Agradeço as conversas, os conselhos, os “colos”, risos e acima de tudo por permitirem que eu faça parte desta família.

À Alexandre Vogliotti pelas longas conversas, ensinamentos e amizade.

À Eveline, Vanessa, Marina “K-stanha” e Bruna “Longa” pessoas de sorriso fácil, sempre disposta a ajudar. O que seria deste grupo sem essas meninas?



Ao casal Allyson e Carlos Renato pela companhia nas longas noites em Itapuã do Oeste e principalmente ajuda nos trabalhos de campo.

À Carla Santana Cassini a quem devo grande parte da pessoa que sou hoje e certo de que sempre poderei contar com sua amizade. Seu destino é voar cada vez mais alto, “Porque se chamava homem, também se chamava sonhos e sonhos não envelhecem...” (Clube da Esquina II)

À Ricardo, Jefferson, Alessandra, Sueli Ribeiro e Jessé que me acolheram em sua casa em Porto Velho como um membro de sua família.

Aos amigos e companheiros de república: Elias, Leonardo e Javier por me agüentar nos melhores e piores momentos desta jornada.

À Ny, Cy e família, que mesmo em tão pouco tempo ocuparam um espaço enorme no meu coração!

Rafael “Naval”, Williams “Ceará” e Lauro, irmãos que a vida me permitiu escolher e que mesmo a distância se mostraram presentes em todas as etapas deste processo, “Metade de mim agora é assim de um lado a poesia, o verso e a saudade, do outro a luta a força e a coragem pra chegar no fim...” (Teatro Mágico)

A todos os membros da banda Hakuna Matata por embalar minhas noites em Jaboticabal, “Quando a dor se aproxima fazendo eu perder a calma, passo uma espoja de rima nos ferimentos da alma” (Cordel do Fogo Encantado).

Enfim, a todos aqueles que de alguma forma ajudaram na execução e conclusão deste trabalho, agradeço!

**TÍTULO: Variantes moleculares de *Mazama americana* (MAMMALIA, CERVIDAE)  
no Estado de Rondônia.**

RESUMO - O veado-mateiro (*Mazama americana*) é a maior espécie do Gênero *Mazama*, e encontra distribuído geograficamente por quase toda a região neotropical. Animais originários do Estado de Rondônia têm apresentado importantes diferenças citogenéticas em relação ao padrão de outras populações, o que suscita necessidade de estudos mais aprofundados para definição da sua posição filogenética. O presente estudo objetivou identificar as diferentes populações de veado-mateiro desta região, verificando a existência de mais de uma espécie no local. Para tanto, foram obtidos 51 fragmentos de tecido de animais caçados por indígenas e pela população local em todas as regiões do Estado dos quais 33 tiveram seu DNA extraídos, amplificados (região de 480pb do citocromo b) e seqüenciados de forma satisfatória. Estas seqüências foram alinhadas e comparadas, gerando 21 haplótipos que se encontram distribuídos de forma aleatória pelas diversas regiões de coleta. Estes haplótipos serviram de base para a elaboração de redes de distância e árvores filogenéticas que quando analisadas sugeriram a existência de espécies crípticas dentro do que hoje se denomina *Mazama americana*.no Estado de Rondônia

**Palavras-chave:** citocromo b, convergência evolutiva, filogenia, genes mitocondriais, *Mazama americana*, PCR, Rondônia

**Molecular variants of *Mazama americana* (MAMMALIA, CERVIDAE) in Rondônia state, Brazil.**

ABSTRACT – The red brocket deer is the largest species of *Mazama* genus and it is distributed in almost all Neotropical regions. Individuals originated from Rondônia state in Brazil have been presented important cytogenetic differences when compared with populations of other regions of country; however more studies are necessary to define correct phylogenetic position of species. The objective of present study was performed the identification of different populations of red brocket deer from Rondônia state by verification of occurrence of more than one species on mentioned region. For this, 51 fragments of tissues from hunted animals were obtained with Indians and local people of all regions of Rondônia state. In 31 fragments of tissues the DNA was successful extract, amplified (480 bp region of cytochrome b) and sequenced. These sequences were aligned and compared creating 21 haplotypes, which are distributed in a randomly way thru the different regions of sampling. The haplotypes were used to elaborate distance nets and phylogenetic trees, which when analyzed suggested the existence of cryptic species on *Mazama americana* species that occurs in Rondônia state.

KEY WORDS - cytochrome b, convergent evolution, mitochondrial genes, PCR, phylogeny, red brocket deer, Rondônia

## SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	01
REVISÃO DE LITERATURA.....	02
OBJETIVOS.....	07
MATERIAL E MÉTODOS.....	08
4.1 Animais.....	08
4.2 Análises Laboratoriais.....	09
Extração de DNA.....	09
Quantificação de DNA.....	09
Amplificação do DNA por PCR.....	10
Quantificação do produto amplificado por PCR.....	11
Purificação do produto amplificado por PCR.....	12
Seqüenciamento.....	13
4.3 Análises de Dados.....	13
Visualização e Edição das Seqüências Obtidas.....	13
Verificação da Qualidade da Informação Genética e Seleção do	
Modelo Evolutivo.....	15
Identificação dos Haplótipos.....	15
Análises Filogenéticas.....	15
Redes de Distância.....	16
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5.1 Extração, Amplificação e Seqüenciamento.....	17
5.2 Verificação da Qualidade de Dados.....	17
5.3 Identificação de Haplótipos.....	18
5.4 Análises Filogenéticas.....	20
5.5 Rede de Haplótipos.....	24
CONCLUSÃO.....	27
REFERÊNCIAS.....	28

## 1. INTRODUÇÃO

A espécie *Mazama americana* está classificada na Lista Vermelha da União Internacional para a Conservação da Natureza e dos Recursos Naturais (IUCN Red List) como DD (dados deficientes) e como uma espécie de baixo risco de extinção (LR: lower risk), sem informações suficientes para ser alvo de esforços de conservação. Entretanto há fortes indícios de que existam várias espécies dentro da atualmente denominada *Mazama americana* (veado-mateiro). Essa hipótese deve ser urgentemente testada, pois pode gerar uma mudança substancial no status de conservação oficial do veado-mateiro em nosso país. Uma vez que no Brasil todos os ecossistemas vêm sofrendo grandes pressões antrópicas, causando a fragmentação e perda dos habitats ocupados pelo *Mazama americana*, sobretudo na região Amazônica, torna-se premente o conhecimento das distintas populações/espécies para que possam ser definidas políticas públicas de conservação em tempo de conservar várias delas.

Os constantes aprimoramentos das técnicas de genética molecular aliados a coevolução dos microcomputadores com programas de análise filogenética permitem a reconstrução das filogenias de organismos com representantes de diferentes áreas geográficas, detectar correlação com eventos vicariantes, buscar relações da ramificação com áreas de endemismo, investigar a evolução de espécies que interagem entre si, coevolução e uma série de outros acontecimentos que auxiliam na caracterização das espécies, contribuindo de forma significativa no que diz respeito ao conhecimento da evolução, ecologia e conservação das populações.

Desta forma, este projeto visa definir as variantes moleculares existentes na nesse grupo dentro do Estado de Rondônia, fornecendo desta forma ferramentas que auxiliem o conhecimento e a conservação das espécies existentes.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

Juntamente com os gêneros *Hippocamelus*, *Blastocerus*, *Ozotoceros*, *Odocoileus* e *Pudu*, os *Mazama* são pertencentes à ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, infra-ordem Pecora, superfamília Cervoidea, família Cervidae, subfamília Odocoileinae, compondo a tribo Odocoileini (ROSSI, 2000). Os cervídeos são os que têm maior grau de diversificação cromossômica embora sejam relativamente jovens na escala evolutiva com um pequeno número de espécies recentes.

Segundo Gilbert et al. (2006) a família Cervidae originou-se na Ásia e sua presença na América deve ser interpretada por um ou mais eventos de dispersão através da Beringia. O ancestral comum de todos os cervídeos da América é datado entre 4,2 e 5,7 milhões de anos. Os autores sugerem que a América do Sul tenha sido colonizada no mínimo duas vezes: a primeira vez por um ancestral do clado dos cervídeos da América do Sul no início do Plioceno e uma segunda vez, por *Mazama americana* e *Odocoileus virginianus* no limite entre o Plioceno e Pleistoceno. Em concordância com este cenário o ancestral comum das espécies endêmicas da América do Sul é datado entre 3,4 e 4,9 milhões de anos, o que é compatível com a conclusão da ligação das Américas no Plioceno através do Istmo do Panamá.

Contudo, em recente estudo Duarte et al. (2008) sugerem que pelo menos oito formas ancestrais de cervídeos invadiram a América do Sul durante o final do Plioceno e os membros dos *Mazama* vermelhos tiveram uma rápida diversificação independente logo que seus ancestrais chegaram aqui, proporcionando um número de espécies morfológicamente crípticas. A baixa plasticidade ecológica das espécies de *Mazama* vermelhos (DUARTE, 1996) dificultava sua mobilidade entre os refúgios do Pleistoceno resultando em isolamento e diversificação genética após sua invasão na América do Sul. Por sua vez, as espécies de *Mazama* cinzas possuíam alta plasticidade ecológica (PINDER & LEEUWENBERG, 1997) que permitia que estes se movessem através da paisagem durante os ciclos de chuva e seca do Pleistoceno resultando em níveis reduzidos de estruturação genética, morfológica e de especiação.

Durante a última Era Glacial, as florestas tropicais das Américas estavam restritas a refúgios de matas e brejos de encostas e serras úmidas. A América do Sul era tomada por eixos de expansão de semi-aridez e Cerrados (AB'SABER, 1977). Desde a Região Amazônica até o Brasil Central, bem como do Nordeste até a Região Sul, dominavam vegetações de natureza e fitofisionomias savânicas. Essa vegetação pretérita, arcaica, de clima mais frio e seco, antecessora da recente expansão, em clima mais quente e úmido, das coberturas florestais amazônicas, podem ser atualmente constatadas através da presença de enclaves de vegetações savanizadas nos domínios da Floresta Amazônica (AB'SABER, 1986). Absy & Van der Hammen (1976) relatam o encontro de perfis polínicos característicos de "savanas" (= cerrados) na mineração de Rio Preto (do Crespo), em 09°28'S, 63°07'W, corroborados por Vanzolini (1992) que relata a descoberta no meio de uma mata próxima a cidade de Santa Cruz da Serra, RO, uma mancha de vegetação de fisionomia peculiar que remete a formações abertas como cerrado ou caatinga, além da presença de paleopavimentos de caatinga "stone lines" sob a mata de tipo amazônico de Rondônia.

O Estado de Rondônia encontra-se em sua totalidade, localizado no Centro de Endemismo Rondônia para vertebrados terrestres sugerido por Haffer & Prance (2001) que coincide com as áreas de endemismo para borboletas florestais (Brown, 1979; Tyler et al., 1994; Hall & Harvey, 2002) e plantas vasculares (Prance, 1982). Segundo Silva et al. (2005) a maior diversidade e endemidade encontradas em seus estudos no centro de endemismo Rondônia devem-se ao fato da região apresentar grande instabilidade geológica, o que aumenta a probabilidade de eventos de especiação.

Atualmente, no Brasil, são reconhecidas cinco espécies de *Mazama* a partir de evidências morfológicas (ROSSI, 2000) e citogenéticas (DUARTE & MERINO, 1997; DUARTE & JORGE, 2003): *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*.

Popularmente conhecido como veado-mateiro, *Mazama americana* é a maior espécie do gênero *Mazama*. Segundo Duarte (1996), estes animais apresentam aspecto robusto com aproximadamente 65 cm de altura e pesando de 30 a 40kg, apresentando coloração geral avermelhada e manchas brancas abaixo da cauda, face



interna dos membros, região submandibular, ponta da maxila superior e face interna da orelha. É considerada uma das espécies de cervídeo de maior abundância e distribuição nas florestas da América Central e do Sul (EISENBERG & REDFORD, 1999). Junqueira (1940) cita que o veado-mateiro prefere habitar as grandes matas, a beira dos rios, quase sempre cobertas de vasta vegetação, evitando desse modo o sol. Na Argentina, Olrog & Lucero (1981) relatam *M. americana* em cerrados fechados, selvas e bosques, até 2.500 m de altura. Eisenberg (1989) acredita que a espécie ocupe desde florestas semidecíduas até cerrado fechado, pois como Emmons (1997) cita, eles são adaptados para a vida na floresta. Segundo Bodmer (1997), na Amazônia esta espécie, prefere as encostas das florestas úmidas de terra firme.

Devido à variabilidade de aspectos morfológicos, ecológicos e citogenéticos, a taxonomia na espécie *Mazama americana* ainda é incerta quanto ao número de subespécies ou até quanto ao desdobramento destas subespécies em espécies. Thomas (1913) havia elevado ao nível de espécie *Mazama zetta* e *Mazama sheila*, corroborado por Allen (1915) que além destas citou mais seis espécies e três subespécies. Cabrera (1960) realizou uma reclassificação, citando nove subespécies, inclusive *M. a. zetta* e *M. a. sheila*, que foi completada por Czernay (1987) com a descrição de mais seis subespécies de *Mazama americana*, perfazendo um total de quinze. Em recente revisão taxonômica de *Mazama*, a partir de informações morfológicas, Rossi (2000) sugere a existência de uma única espécie de *Mazama americana* no Brasil.

Usualmente os estudos taxonômicos levam em consideração os aspectos morfológicos dos animais (MEDELLIN et al., 1998; ROSSI, 2000), mas os aspectos genéticos têm sido cada vez mais introduzidos como peça fundamental na solução dos problemas relacionados a taxonomia (DUARTE & MERINO, 1997). A taxa de evolução cariotípica dos cervídeos é uma das mais altas dentro da ordem Mammalia, apesar do seu recente surgimento (NEITZEL, 1987). Dentro do gênero *Mazama*, aparentemente a espécie *M. americana* é a que envolve maior complexidade quanto às variações cariotípicas (DUARTE, 1998). A descrição citogenética de *Mazama americana* foi feita inicialmente por Taylor et al. (1969) que citam  $2n=68$  e  $NF=74$ , enquanto Jorge e

Benirschke (1977) analisaram 3 indivíduos no México com  $2n=50$  e  $NF=70$ . Neitzel (1987) descreveu para um animal da espécie, procedente do Paraguai  $2n=52$  e  $NF=56$ , assemelhando-se aos resultados obtidos por Duarte & Merino (1997) que encontraram  $2n=48, 50, 52$  e  $54$  e  $NF=54, 54, 56$  e  $56$  respectivamente de quatro animais oriundos do Brasil. Em posterior estudo onde foram analisados 33 espécimes de diferentes localidades do Brasil, Duarte e Jorge (1996) encontraram variação ainda maior no número diplóide de cromossomos (42 a 53), e no número fundamental de braços (48 a 57). Notou-se também que a variação cromossômica apresentava coerência geográfica, o que permitiu separá-los em sete diferentes citótipos: Rio Negro, Manaus, Jarí, Acre, Rondônia, Carajás e Rio Paraná.

Os estudos cromossômicos servem tanto para a análise das variações cariotípicas entre populações consideradas como subespécies pela taxonomia morfológica, quanto para a determinação das relações filogenéticas entre espécies diferentes (LIMA & SEUÁNEZ, 1991).

A inferência filogenética para grandes grupos de organismos é uma área historicamente importante. Essa área do conhecimento sofreu forte impulso com a incorporação de dados moleculares às tradicionais abordagens morfológicas e com o aprimoramento das metodologias de análise. A análise molecular pode confirmar ou refutar o que a análise anatômica sugere ou, fornecer pistas para os casos em que a filogenia de um determinado grupo não está bem definida para os pesquisadores.

A filogenia molecular contribuiu consideravelmente para resolver os relacionamentos evolucionários entre espécies no nível da família Cervidae. Pitra et al. (2004) determinaram o padrão filogenético e tempo de irradiação dos cervídeos do Velho Mundo por meio do citocromo b (1140 pb). Segundo os autores, o citocromo b tem sido utilizado como marcador molecular para analisar relações filogenéticas entre cervídeos porque seu tempo e modo de evolução são bem compreendidos, além de serem relativamente constantes e similares entre mamíferos terrestres de grande porte. O citocromo b foi usado em numerosos estudos de relações filogenéticas entre cervídeos (RANDI et al. 1998; COOK et al. 1999; LUDT et al. 2004) e é o gene mais estudado em mamíferos.

Outra seqüência muito utilizada ultimamente é a região mitocondrial controladora, também conhecida como D-loop (POLZIEHN & STROBECK, 2002; COOK et al., 1999). 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 alinhadas em vários Artiodactyla, Cetácea 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. RIJNKELS (2002) conseguiu avaliar a distância evolutiva utilizando fragmentos de gene da família das caseínas, comparando seqüências de humanos, bovinos, gatos e ratos, espécies que divergiram entre 79 e 88 milhões de anos. Entretanto a K-caseína não é adequada para estudo de espécies que apresentam um tempo pequeno de divergência, como mostrado por Carnelossi (2008) devido à 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 da espécie estudada.

Gilbert et al. (2006) analisaram a filogenia da família Cervidae através de seqüências de DNA mitocondrial e nuclear de 25 espécies de 15 gêneros, propondo através destas análises uma nova classificação desta família. Os autores citam que a taxonomia do gênero *Mazama* é confusa e que investigações moleculares têm ajudado muito a delimitar os clados dos Cervídeos e a entender a evolução de caracteres morfológicos. Entretanto devido a insuficiente amostragem tanto de regiões do DNA analisadas como dos táxons, em particular para cervídeos da América, muitas dúvidas permanecem não resolvidas impedindo a interpretação de muitos aspectos da história biogeográfica da família.

Duarte et al. (2008), estudando o citocromo b, relatam que *Mazama americana* é um grupo polifilético e que provavelmente não é uma espécie válida, entretanto as relações filogenéticas entre as inúmeras variantes não puderam ser definidas nesse estudo. Dessa maneira, é de suma importância o conhecimento de quantas e quais

espécies existem, para que desta forma, torne-se possível o desenvolvimento de políticas públicas eficientes de proteção às mesmas com embasamento científico.

A genética molecular está envolvida diretamente nestas questões, uma vez que o acesso a estes animais é muito difícil. Ferramentas como a PCR/RFLP (Reação em Cadeia da Polimerase / Polimorfismo de Comprimento dos Fragmentos de Restrição) têm sido eficientes na identificação das espécies mesmo quando aliadas a métodos não invasivos, cujo DNA pode encontrar-se degradado, como é o caso de DNA fecal (TABERLET & LUIKART, 1999; GONZALEZ et al., 2004).

Entretanto, para que tais ferramentas possam ser utilizadas para inventários e estimativas populacionais é necessário o conhecimento dos padrões de cada uma das espécies a serem avaliadas.

### **3. OBJETIVOS**

- Definição das variantes moleculares do gene citocromo b de veado-mateiro no Estado de Rondônia.
- Avaliação da distância genética existente entre as variantes moleculares encontradas.
- Determinação da relação evolutiva das variantes entre si e sua relação filogenética com variantes de outras espécies.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Animais

Utilizou-se para este estudo, amostras de 51 animais provenientes de vida livre no estado de Rondônia coletadas em duas expedições científicas com dois meses de duração cada, perfazendo um total de quatro meses de trabalho de campo, adquiridas através de doações de caçadores locais e indígenas. As amostras utilizadas foram fragmentos de tecido (carne, couro, etc.) colhidas e preservadas em etanol absoluto até o processamento no laboratório. O acesso às amostras é sempre um problema em trabalhos dessa natureza, mas entidades que já trabalham com as comunidades locais foram acionadas pelos integrantes do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), da UNESP – Jaboticabal para que fosse possível o contato com tais comunidades para auxílio no processo de obtenção das amostras. Além das entidades, o interesse demonstrado por moradores locais pelo estudo, foi de suma importância para a obtenção das amostras.

Também foram incluídas duas amostras de cada uma das outras espécies de *Mazama* brasileiros atualmente reconhecidas (*M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. bororo*, *M. nemorivaga* e *M. americana*) para efeito comparativo. Estas amostras foram obtidas no banco de células do NUPECCE.

## **4.2. Análises Laboratoriais**

### **Extração de DNA**

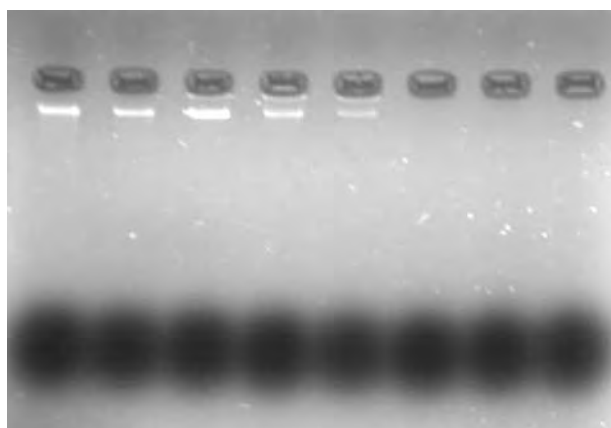
As extrações do DNA genômico a partir das amostras de tecido preservadas em álcool foram realizadas através de um protocolo já testado em laboratório (SAMBROOK et al., 1989), com adaptações (ANEXO I).

### **Quantificação de DNA**

Visando analisar a qualidade e a quantidade do DNA extraído, foi realizada eletroforese em gel de agarose (Figura 1) utilizando-se cerca de 2 µl de solução (DNA extraído), mais 3 µl de tampão de corrida (Tris-HCl 0,1mM, pH 6,8; azul de bromofenol 0,02%; glicerol 50%), em gel de agarose (1%) preparado com tampão TBE 1X (10mM Tris HCl pH 7,6, 1mM EDTA pH 8,0, e ácido bórico 89mM, pH 8,3) com brometo de etídeo (0,05 µg/mL).

Este material foi fotodocumentado em aparelho GEL-DOC, com transiluminador ultravioleta e analisados pelo software Image Analysis da Kodak.

Em seguida, as amostras foram quantificadas por espectrofotometria em aparelho Eppendorf BioPhotometer® , utilizando-se 2 µl de solução, mais 98 µl de Água MilliQ sendo em seguida diluídas 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 1.** Imagem de um gel de agarose 1,0%, corado com brometo de etídio, mostrando o DNA extraído.

### **Amplificação do DNA pela Reação em Cadeia da Polimerase (PCR – SAIKI et al. 1985)**

O gene utilizado foi escolhido com base na literatura, em função do seu modo de evolução e existência de iniciadores conservados que puderam ser empregados na reação de PCR. Entre as regiões gênicas para as quais já existem iniciadores disponíveis está a região mitocondrial do citocromo b (KOCHER et al., 1989) para a qual foi utilizado um jogo de Iniciadores (Tabela 1), de modo a obter o gene citocromo-b com um fragmento de aproximadamente 480pb, seguindo o protocolo descrito por Maldonado et al., (1995) (ANEXO II).

**Tabela 1.** Seqüências dos iniciadores utilizados de modo a se obter um fragmento de aproximadamente 480pb do citocromo-b da espécie *Mazama americana* através da técnica de PCR

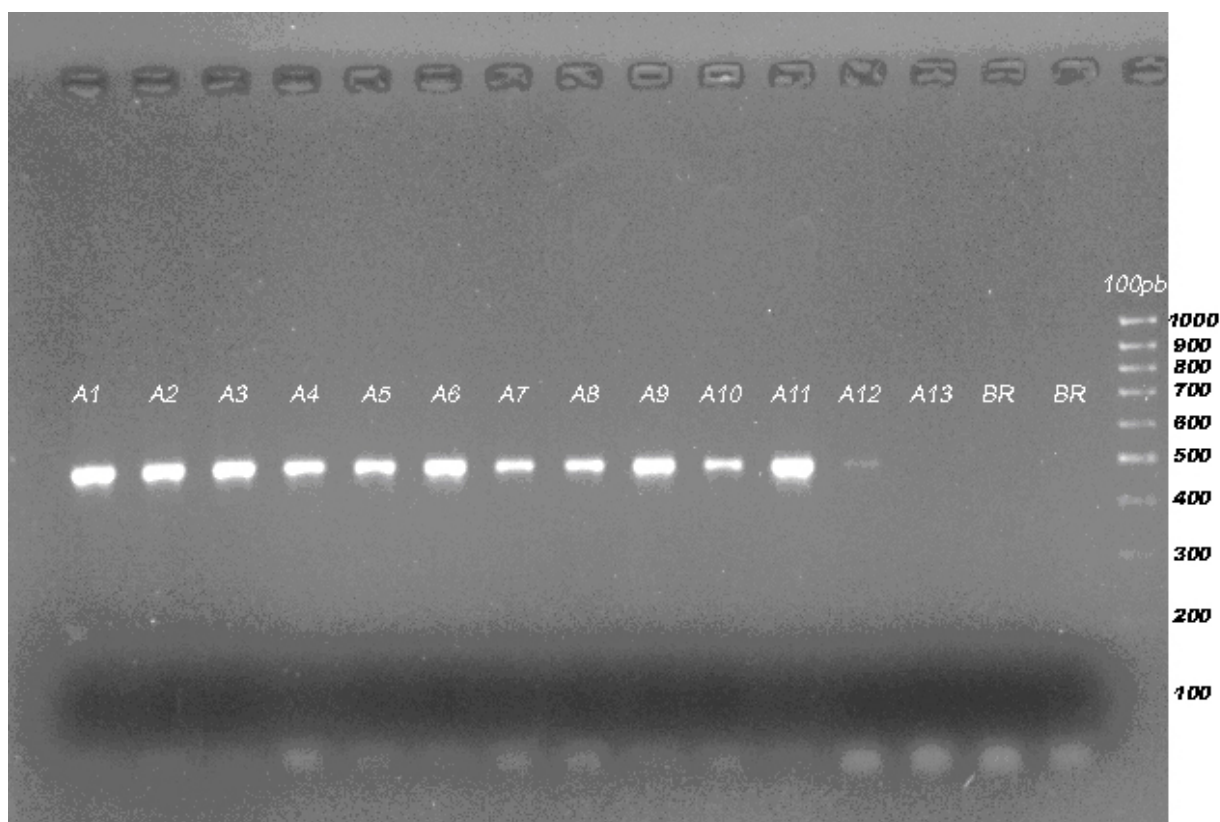
Gene	Iniciadores	Seqüências	Tamanho
Cyt-b	L14724 (Reverse)	5´ CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG 3´	480pb
	H15149 (Forward)	5´ AAAGTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA 3´	

### Quantificação do produto amplificado por PCR

Após a PCR, o produto de amplificação foi analisado por meio de eletroforese em gel de agarose 2% e corado com brometo de etídio (0,05 µg/mL) (Figura 2) para verificação da presença de bandas inespecíficas, existência de contaminação através de controle negativo e verificação da quantidade do produto amplificado.

As amostras que se apresentavam satisfatórias eram armazenadas a –20°C para posterior purificação.





**Figura 2.** Imagem de um gel de agarose 2,0%, corado com brometo de etídio (0,05 µg/mL), mostrando o resultado da amplificação através da técnica de PCR. Amostras amplificadas (A1 até A12), amostra não amplificada (A13) e controles negativos (BR).

### **Purificação do produto amplificado por PCR**

O produto amplificado por PCR foi purificado através das enzimas Fosfatase Alcalina de Camarão (SAP) 1 U/µl e Exonuclease I (EXO) 10 U/µl juntamente com o Tampão de diluição da SAP (10X RX Buffer) e Água Milli-Q, submetidos em termociclador (TPersonal Biometra) ao programa e concentrações indicados no ANEXO III, sendo posteriormente armazenadas em geladeira (4°C).

## **Seqüenciamento**

Após a purificação, os produtos foram quantificados em espectrofotômetro e diluídos em concentração de aproximadamente 25ng/μl. Com essa solução de trabalho eram efetuadas reações de PCR específicas para o seqüenciamento automático (ANEXO IVa), que é constituída basicamente pelos mesmos reagentes de uma PCR rotineira, com a incorporação em termociclador (ANEXO IVb), de dideoxynucleotídeos (ddNTP) marcados com corantes luminescentes identificáveis pela sonda laser do aparelho de seqüenciamento automático.

Após a amplificação os produtos de PCR foram lavados com isopropanol 75% e após a secagem absoluta, ressuspendidos em tampão de seqüenciamento (ANEXO IVc).

Uma vez amplificados, os fragmentos de DNA mitocondrial foram seqüenciados nos sentidos “forward” e “reverse” utilizando-se do seqüenciador automático ABI 3100 da Applied Biosystems de 16 capilares, 50cm, com polímero POP\_6 e tampão de corrida.

### **4.3. Análises de Dados**

#### **Visualização e Edição das Seqüências Obtidas**

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 (Figura 3), em seguida, uma seqüência consenso era utilizada para a montagem da matriz de dados com todas as amostras.

Cada seqüência consenso foi submetida à consulta de similaridade de nucleotídeos (BLAST) com seqüências depositadas no GenBank, [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov) do NCBI (National Center for Biotechnology Information) para confirmação da amplificação do fragmento e espécie esperados e em seguida alinhadas automaticamente pelo CLUSTAL W (utilizando dados padrão do CLUSTAL – “default”).

As seqüências utilizadas nas análises do citocromo-b, de *M. bororo*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira* e *M. nana*, foram adquiridas do banco de dados do NUPECCE e a seqüência de *Rangifer tarandus* foi adquirida no GenBank, (número de acesso: AJ000029).



**Figura 3.** Imagem de eletroferograma no programa MEGA do fragmento citocromo -b de 480 pb utilizadas para revisão visual

## **Verificação da Qualidade da Informação Genética e Seleção do Modelo Evolutivo**

Antes de se iniciar a análise dos dados, verificou-se a qualidade da informação filogenética disponível verificando a existência ou não de saturação das substituições, através do programa DAMBE (Xia & Xie, 2001). Normalmente a taxa de transição é maior que a de transversão. Entretanto, à medida que aumenta a divergência entre duas seqüências, o número de transições observadas em relação ao das transversões decresce em função da saturação.

O modelo evolutivo que descreve o padrão de substituição de nucleotídeos no DNA, mais adequado para cada partição dos dados, foi o modelo Tamura-Nei (Tamura & Nei, 1993) selecionado pelo teste de razão de verossimilhança (“hierarchical likelihood ratio test” – hLRTs) implementado no programa Modeltest 3.6, (POSADA e CRANDALL, 1998).

## **Identificação dos Haplótipos**

Foi utilizado o programa DNASP (ROZAS et al. 2003) para identificar os haplótipos e exportar os resultados como arquivos com extensão \*.NEXUS.

## **Análises Filogenéticas**

Procederam-se as análises filogenéticas no programa MEGA, utilizando os seguintes métodos: máxima verossimilhança (FELSENSTEIN, 1985), métodos de distância como o “Neighbor-joining” (SAITOU & NEI, 1987) e estimação do suporte estatístico dos agrupamentos filogenéticos através do método como o “bootstrap”

(FELSENSTEIN, 1985) e posteriormente pelo programa PAUP utilizando-se o modelo selecionado pelo MODELTEST a título de comparação.

As seqüências dos diferentes clados da árvore filogenética foram organizadas (no MEGA 4) e tiveram suas distancias genéticas comparadas entre si. Os parâmetros utilizados foram: análise de distancia media entre grupo, “gaps/missing”=“parwise deletion”; modelo: “Tamura-Nei, 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. Estas análises foram geradas utilizando o programa TCS 1.21 (CLEMENT et al., 2000) utilizando-se os parâmetros de 95% de limite de conexão e “gaps” igual a “missing”.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

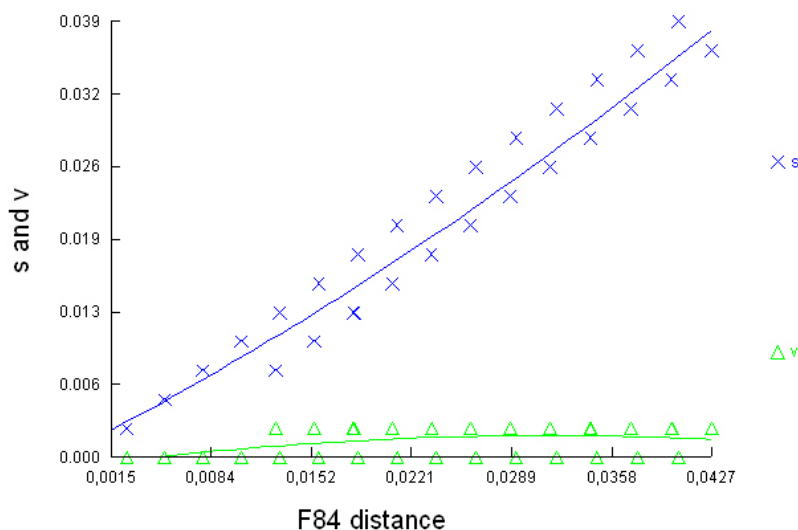
### 5.1 Extração, Amplificação e Seqüenciamento

Das 51 amostras obtidas apenas 6 apresentaram problemas no processo de extração. É provável que este problema seja decorrente do armazenamento das amostras no local de origem.

As amplificações do fragmento do citocromo-b e seus respectivos seqüenciamentos foram realizados com sucesso em 38 amostras das 45 cujo DNA foram extraídos. Após o processo de seqüenciamento, todas as amostras foram submetidas a análise de similaridade com sequencias do GenBank, constatando-se que 5 eram pertencentes à espécie *Mazama nemorivaga*, sendo estas descartadas deste estudo resultando um N total de amostras = 33 .

### 5.2 Verificação da qualidade dos dados

A plotagem do número de transições e transversões *versus* a divergência fornece uma imagem visual do nível de saturação das substituições (Figura 4). No caso de seqüências codificadoras, sabe-se que a taxa de substituição sinônima é maior na 3<sup>a</sup> base do códon que na 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup>, nessa ordem. Portanto espécies muito divergentes podem apresentar saturação na 3<sup>a</sup> base (SCHNEIDER, 2003).



**Figura 4.** Gráfico de transição (s) e transversão (v) versus distância do gene mitocondrial citocromo-b plotado pelo programa DAMBE para verificação da qualidade da informação filogenética disponível

Pode-se notar que a distribuição das transições e transversões seguem praticamente uma reta. Esse padrão sugere que não há sinal de saturação das substituições. Logo, esses dados puderam ser analisados usando-se ambas as substituições.

### 5.3 Identificação de Haplótipos

As 33 amostras seqüenciadas para o fragmento de 480pb do citocromo-b pertencentes à espécie *Mazama americana* foram analisadas pelo programa DNASP, identificando 21 haplótipos, (Tabela 2) que foram dispostos de acordo com suas localidades geográficas o mapa de desmatamento e áreas protegidas de Rondônia (Figura 5).

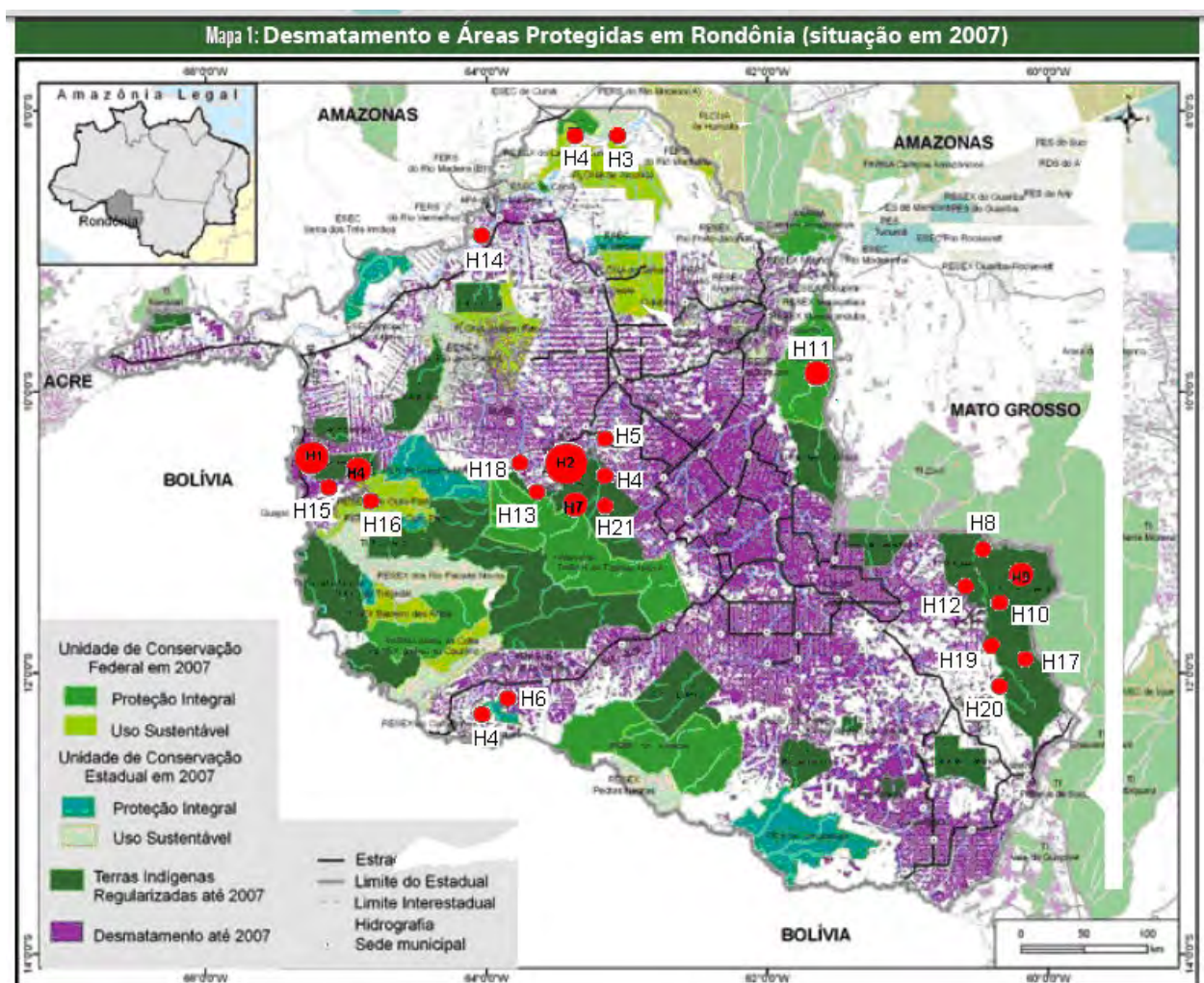
Evidencia-se portanto, que os locais de coleta coincidem com as áreas ainda conservadas no Estado e onde ainda existe pressão de caça. Dessa maneira, a

amostragem não foi uniforme no Estado de Rondônia, o que dificulta uma discussão mais completa sobre a distribuição dos haplótipos na área de estudo.

**Tabela 2.** Relação dos espécimes de *M. americana* analisados e a relação de haplótipos identificados para os fragmentos de genes do citocromo-b de 480pb analisados pelo programa DNASP

Haplótipos	Animais
H1	2,12,15
H2	3,10,14, 33
H3	4
H4	5,8,13,20,42
H5	9
H6	17
H7	27,46
H8	28
H9	29,34
H10	31
H11	32,49
H12	35
H13	37
H14	38
H15	39
H16	40
H17	43
H18	44
H19	48
H20	50
H21	51

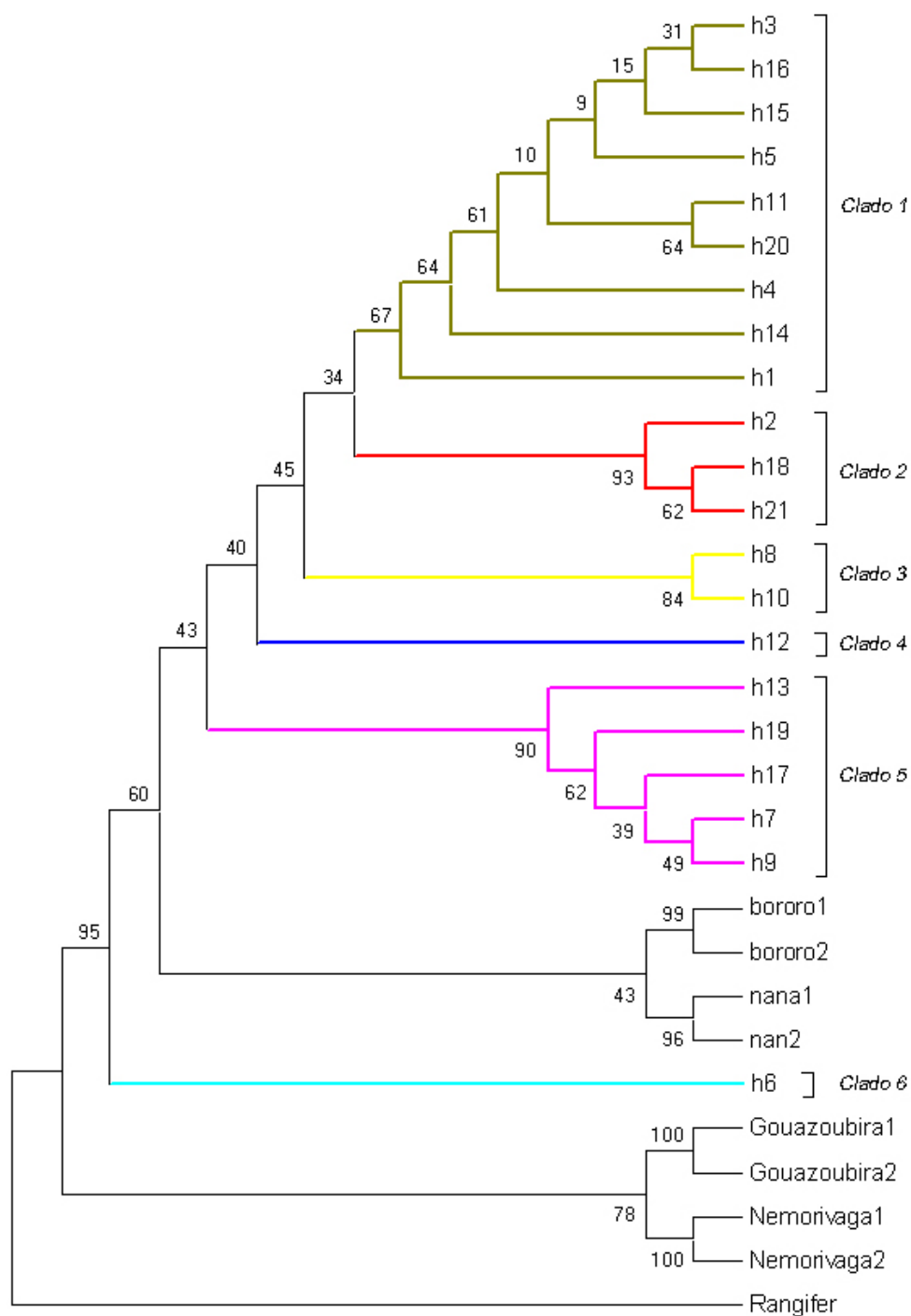




**Figura 5.** Mapa do Desmatamento e Áreas Protegidas do Estado de Rondônia até o ano de 2007. Fonte: GTA-RO

#### 5.4 Análises Filogenéticas

Como não foram detectadas diferenças importantes nos padrões de agrupamento das árvores confeccionadas pelos programas MEGA e PAUP, optou-se por realizar as análises utilizando somente o programa MEGA com o modelo Tamura-Nei, pela facilidade de trabalho com as matrizes de dados e para construção das árvores filogenéticas (Figura 6).



**Figura 6.** Representação da árvore filogenética da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b de 480pb, método "Neighbor-Joining" de análise; Out-Group: espécie *R. tarandus*, *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*.

Na Figura 6 observa-se a representação da árvore filogenética da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b de 480pb, método “Neighbor-Joining” de análise, que se assemelha a árvore filogenética da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b de 480pb, método “Máxima Parcimônia” de análise (ANEXO V).

A árvore filogenética (Figura 6) mostra que os animais classificados como *M. americana* e estudados aqui é relativamente antigo quando comparado a outros taxa mais recentes, como *M. bororo* ou *M. nana*, portanto ele reteve uma grande diversidade de haplótipos de DNA mitocondrial. A separação dos animais em 5 clados aparentemente distintos, embasados por alto valor de bootstrap sugere uma separação destes animais durante o processo evolutivo.

Sugere-se que no passado o grupo dos *Mazama* vermelhos teria sido uma população panmítica que ocupou uma grande extensão territorial (DUARTE et al. 2008). Nas épocas das inúmeras glaciações do Pleistoceno, onde o clima ficou mais seco e frio, algumas áreas com maior umidade seriam ideais para os redutos de matas (AB'SABER, 1986), ambiente característico dessa espécie para os quais teria se refugiado (refúgios). Assim, a mesma espécie teria ficado dividida em diversas populações separadas por barreiras ecológicas (áreas secas e sem matas). Cada uma das populações teria sofrido processos seletivos independentes, gerando considerável variação genética. Quando as condições climáticas voltaram a ser propícias à expansão das florestas, as barreiras ecológicas desapareceram e as matas originais retomaram o território perdido, então as espécies, separadas por longos períodos, voltaram a conviver. Em alguns casos, a diferenciação havia sido tanta que a mesma espécie original já não tinha mais compatibilidade suficiente para que ocorressem cruzamentos (VANZOLINI, 1970). Em outros casos, essa diferenciação pode não ter sido suficiente para afetar a compatibilidade entre os indivíduos.

Entretanto, pode ser que esta variação encontrada hoje tenha sido simplesmente uma retenção de polimorfismo ancestral ou introgressão (DOWLING & SECOR, 1997; DONNELLY et al. 2004). Essa hipótese é enfraquecida quando verificamos os dados citogenéticos obtidos para essa espécie (DUARTE et al. 2008), que demonstram que

existe também grande variação nessa característica, que nesse caso, afeta significativamente o isolamento reprodutivo.

Portanto, o grupo dos *Mazama* vermelhos deve ter sido afetado pelos sucessivos fenômenos de fragmentação e recuperação da floresta amazônica sofrendo uma rápida diversificação independente, proporcionando um número de espécies morfológicamente crípticas, frente à pequena diferença nas características ecológicas desses habitats. Apesar das diferenças morfológicas terem sido pequenas, as mudanças cromossômicas foram mais consistentes, auxiliadas pela grande fragilidade cromossômica do grupo (VARGAS-MUNAR, 2003), somada ao pequeno número de indivíduos que persistiram em alguns fragmentos. Algumas dessas mudanças cromossômicas foram suficientes para gerar isolamento reprodutivo, gerando espécies válidas.

Um exemplo claro disso é a espécie *Mazama bororo*, tida como pertencente à espécie *Mazama americana* até sua descrição, realizada por Duarte (1996) através de evidências citogenéticas (DUARTE & JORGE, 2003). Apesar do alto grau de semelhança morfológica entre os indivíduos da espécie *M. bororo* e indivíduos tidos como da espécie *M. americana*, observamos na Tabela 3 que as distâncias genéticas entre estes se apresentaram sempre superiores quando comparadas as distâncias genéticas de *M. americana* versus *M. nana*, que são espécies cujas morfologias permitem sua distinção. Este fato reforça a idéia de que a espécie *Mazama americana* possa ser na verdade um conjunto de espécies crípticas.

Quando analisamos a árvore filogenética e comparamos espécies distintas e bem definidas taxonomicamente (*M. bororo* e *M. nana*) observamos que em alguns casos a distância genética entre estas espécies (0,0226) é menor do que quando comparamos alguns clados de haplótipos tidos como da espécie *Mazama americana* entre si, como por exemplo Clado 1 versus Clado 4 (0,0289). Isso pode ser atribuído ao fato de que, segundo Duarte et al (2008), as espécies *M. bororo* e *M. nana* possuem uma especiação mais recente quando comparadas as variantes de *M. americana*.

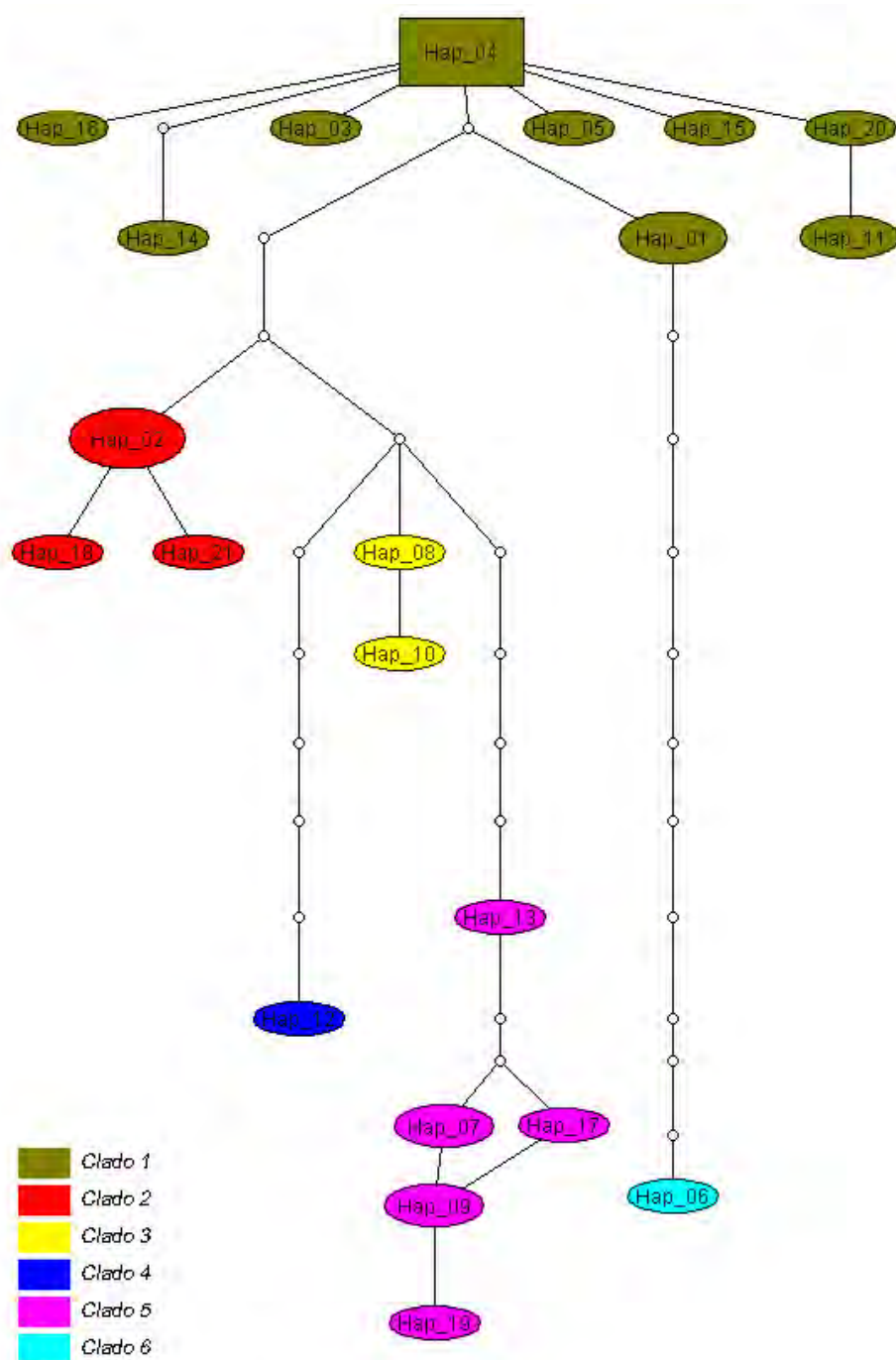
**Tabela 3.** Distancias genéticas para a matriz dos fragmentos do citocromo-b de 480 pb, calculadas para os diferentes clados da árvore filogenética entre si e com variantes da espécie *M. bororo* e *M. nana*.

	<i>M. bororo</i>	<i>M. nana</i>	Clado 1	Clado 2	Clado 3	Clado 4	Clado 5	Clado 6
<i>M. bororo</i>								
<i>M. nana</i>	0.0226							
Clado 1	0.0372	0.0269						
Clado 2	0.0314	0.0218	0.0150					
Clado 3	0.0336	0.0240	0.0166	0.0109				
Clado 4	0.0353	0.0314	0.0289	0.0232	0.0199			
Clado 5	0.0330	0.0245	0.0308	0.0244	0.0210	0.0306		
Clado 6	0.0380	0.0340	0.0373	0.0373	0.0395	0.0415	0.0390	

## 5.5 Rede de Haplótipos

Quando tomamos a rede de haplótipos criada pelo programa TCS (Figura 7) e verificamos a relação mais provável entre os haplótipos, observamos que haplótipos intimamente relacionados podem habitar diferentes regiões do estado (H4 e H20), enquanto haplótipos menos relacionados podem coabitar a mesma região (H4 e H6).

Frente a esses dados, surge uma pergunta de extrema relevância. Esses distintos haplótipos são espécies válidas? Pode ser que estas espécies possam estar bem estabelecidas com mecanismos consistentes de isolamento reprodutivo e que vivam hoje em simpatria no Estado de Rondônia. Seriam, portanto, 5 espécies distintas, referentes aos distintos clados? Apesar de pouco provável, isso é possível. Ou será que esta variação é um resíduo da diversificação ocorrida durante os eventos históricos de isolamento populacional? Após estes sucessivos eventos, as populações teriam se fundido, quando as barreiras ecológicas eram suprimidas. Isso faria que as populações atuais apresentassem uma variação resultante da retenção da variação ancestral.



**Figura 7.** Diagrama da estimação genealógica entre os haplótipos (Tabela 7) por parcimônia estatística, geradas pelo programa TCS 1.21, das seqüências do fragmento de gene do citocromo-b de 480 pb

Entretanto este trabalho não permite responder essas perguntas, uma vez que a região estudada é pertencente ao DNA mitocondrial, de herança exclusivamente materna. Assim, há ou não mistura de material genético dos distintos clados? Ou seja, estes animais sofreram especiação e encontram-se isolados reprodutivamente? Seriam necessários novos estudos para confirmar a presença ou ausência de polimorfismo em genes nucleares e assim possibilitar a reconstrução filogenética do taxon.

## 6. CONCLUSÃO

Definidas as variantes moleculares do gene citocromo-b de veado-mateiro no estado de Rondônia, o presente trabalho nos permitiu verificar que a separação das variantes de *M. americana* é antiga quando comparada com as demais espécies de *Mazama*-vermelhos do Brasil. Devido a esta diferença temporal, quando comparamos espécies distintas e bem definidas taxonomicamente (*M. bororo* e *M. nana*) observamos que na maioria dos casos a distância genética entre estas espécies é menor do que a de alguns clados de haplótipos tidos como da espécie *Mazama americana*.

O alto valor de bootstrap dos clados de algumas variantes permite supor que estes podem ter sofrido processo de especiação. Em contrapartida a presença nas análises de um grupo antigo com grande variação sugere que há muito tempo exista polimorfismo neste grupo, que se mantém até os dias atuais, caracterizando retenção de polimorfismo ancestral. Estas hipóteses só poderão ser testadas através da verificação do fluxo gênico utilizando-se de marcador nuclear.

O sistema de coleta de amostras mostrou-se ineficiente. Sugerimos que em trabalhos posteriores, a utilização de cães farejadores na busca de fezes seja empregada.

Novos estudos envolvendo um número maior de amostras, genes nucleares e fragmentos maiores de genes mitocondriais se fazem necessários para elucidar estas questões.



## 7. REFERÊNCIAS

AB'SABER, A. N. Províncias geológicas e domínios morfoclimáticos no Brasil. **Geomorfologia**, São Paulo, v. 20, p. 1-25, 1970.

AB'SABER, A. N. Espaços ocupados pela expansão dos climas secos na América do Sul, por ocasião dos períodos glaciais quaternários. **Paleoclimas**, Instituto de Geografia da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 3, p. 1-19, 1977.

AB'SABER A. N. Geomorfologia da Região, In: ALMEIDA JR, J. M. G. de (Ed.) **Carajás: desafio político, ecologia e desenvolvimento**, Editora Brasiliense, 1986. Capítulo 5, p. 88-124.

ABSY, M. L.; VAN DER HAMMEN, T. Some paleoecological data from Rondonia, southern part of the Amazon basin. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 6, n. 3, p. 293–299, 1976.

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.

BANDELT, H. J.; FORSTER, P.; RÖHL, A. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 16, n. 1, p. 37-48, 1999.

BODMER, R. Ecologia e conservação dos veados mateiro e catingueiro na Amazônia. In: DUARTE, J. M. B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, 1977. p. 69-77.

BROWN JR, K. S. Ecologia geográfica e evolução nas florestas neotropicais. Tese de Livre Docência — Instituto de Biologia UNICAMP. **Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, Brasil, 1979.

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.

CARNELOSSI, E. A. G. **Diferenças moleculares entre citótipos de Mazama americana**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2008

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.

COOK, C. E.; WANG, Y.; SENSABAUGH, G. A mitochondrial control region and cytochrome b phylogeny of sika deer (*Cervus nippon*) and report of tandem repeats in the control region, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, V. 12, n. 1, p. 47–56, 1999.

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.

CZERNAY. S. Spiesshirsche und Pudus. Die Neue Brehm Bucherei. 581, p. 1-84, 1987.

DEER SPECIALIST GROUP 2000. *Mazama americana*. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em: 05 maio 2008.

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, n. 2, 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. **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.; 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.

DUARTE, J. M. B.; VOGLIOTTI, A.; TALARICO, A. C.; RODRIGUES, F. P.; OLIVEIRA, E. J. F.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J. . Distribution and abundance of the small red bocket deer (*Mazama bororo* Duarte, 1996): Is it an endangered species?. In: **XIX Annual Meeting of the Society for Conservation Biology**, 2005, Brasília. XIX Annual Meeting of the Society for Conservation Biology, 2005.

DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S.; MALDONADO J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Chicago, 2008.

EISENBERG, J. F. **Mammals of the neotropics**. Chicago: University of Chicago Press, 1989. v. 1, p. 449.

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. p. 281.

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

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.

GONZALEZ, S.; MALDONADO, J.; BIDEGARAY, L.; GARCIA, J. E.; DUARTE, J. M. B. **Determinación de *Mazama bororo* utilizando métodos no-invasivos**. In: Congreso Internacional sobre Manejo de Fauna Silvestre en la Amazonia y Latinoamérica. 2004, Iquitos, p. 102-102.

HAFFER, J.; PRANCE, G.T. Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation, **Amazoniana**, Manaus, v. 16, p. 579-607, 2001

HALL, J. P. W.; HARVEY D. The phylogeography of Amazonia revisited: new evidence from riordinid butterflies. **Evolution**, Lancaster, v. 56, n. 7, p. 1489-1497, 2002.

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.

JUNQUEIRA, J. F. D. Veados do Brasil. Chácaras e Quintais, São Paulo, v.62, p. 330-331, 1940.

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 primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, Washington, v. 86, n. 16, p. 6196-6200, 1989.

LIMA, M. M. C.; SEUÁNEZ, H. N. Chromosome studies in the red howler monkey, *Alouatta seniculus stramineus* (Platyrrhini, Primates): description of an X1X2Y1Y2/X1X1X2X2 sex-chromosome system and karyological comparisons with other subspecies. **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v. 57, n. 2-3, p. 151-156, 1991.

LUDT, J. C., SCHROEDER, W., ROTTMANN, O., KUEHN, R. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 31, n. 3, p. 1064-1083, 2004.

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, n. 1, p. 46-58, 1995.

MEDELLIN, R. A.; GARDNER, A. L.; ARANDA, J. M. The taxonomic status of the yucatán brown brocket, *Mazama pandora* (Mammalia: Cervidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, Washington, v. 111, n. 1, p. 1-14, 1998.

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.

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.

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.

OLROG, C. C. & LUCERO, M. M. **Guía de los mamíferos argentinos**. Tucuman, Fundación Miguel Lillo, 1981. 151p.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado–catingueiro. In: DUARTE, J. M. B. (Ed.) **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: Funep, 1997, p. 59-68.

PITRA, C.; FICKEL, J.; MEIJAARD, E.; GROVES, P. C. Evolution and phylogeny of old world deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v. 33, n. 3, p. 880-895, 2004.

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

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, London, v. 14, n. 9, p. 817–818, 1998.

PRANCE, G. T. Forest refuges: evidence from woody angiosperms. In: \_\_\_\_\_ (Ed.). **Biological diversification in the tropics**, Nova Iorque: Columbia University Press, 1982, p. 137-158.

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

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. **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.

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.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning**: a laboratory manual, 2<sup>nd</sup> ed. Nova Iorque: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 1989

SCHNEIDER, H. Métodos de análise filogenética: um guia prático. **Holos**, Ribeirão Preto, v. 2, p. 20-23, 2003

SILVA, J. M. C.; RYLANDS, A.B.; FONSECA, G. A.B. O destino das áreas de endemismo da Amazônia, **Megadiversidade**, Minas Gerais, v. 1, n. 1, p. 124-131, 2005

TABERLET, P.; LUIKART G. Non-invasive genetic sampling and individual identification **Biological Journal of the Linnean Society**, Londres, v. 68, n. 1-2, p. 41-55, 1999.

TAMURA, K.; NEI, M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in control region of mitochondrial DNA in human and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v. 10, n. 3, p. 512-526, 1993.

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.

TYLER, H.; BROWN JR. K. S.; WILSON K. **Swallowtail butterflies of the Americas: A study in biological dynamics, ecological diversity, biosystematics and conservation**, Gainesville, Scientific Publishers, 1994, 976 p.

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.

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

VANZOLINI, P. E. Zoologia sistemática, geografia e a origem das espécies. Instituto de Geografia: **Universidade de São Paulo**, vol. 3, p. 1-56, 1970

VANZOLINI, P. E. A supplement to the ornithological gazetteer of Brazil. São Paulo, Museu de Zoologia, Universidade de São Paulo, 1992. p. 252.

VARGAS-MUNAR, D. S. F. **Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entre cromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de Cervídeos brasileiros.** Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, 2003

XIA, X.; XIE, Z. DAMBE: Software Package for Data Analysis in Molecular Biology and Evolution. **Journal of Heredity**, Washington, v. 92, n. 4, p. 371-373, 2001.

**ANEXO I****PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO DE TECIDO:**

Os procedimentos para extração de DNA foram realizados segundo o protocolo de SAMBROOK et al. (2006), com adaptações.

1. Eliminar o álcool existente no tecido deixando-o em um tubo de polipropileno de 1,5 mL aberto no interior de uma estufa ou no próprio ambiente pelo tempo necessário para que este fique totalmente seco;
2. Em seguida macerar o tecido em 300 µl de TNE 1 X (10 mM Tris-HCl pH 8,0, 150 mM NaCl e 10 mM EDTA pH 8,0);
3. Adicionar ao tubo uma solução de lise composta por 30 µl de Tris-HCl 1 M, 10 µl de SDS 20% e 20 µl de proteinase K (20 mg/mL);
4. Inverter o tubo várias vezes e incubar a 55°C cerca de 12 h ou até que o tecido esteja completamente digerido, agitando-o periodicamente;
5. Resfriar as amostras à temperatura ambiente e adicionar 350 µl de fenol:Cloroformo:Álcool isoamílico (25:24:1), homogeneizando-se a solução em vortex;
6. Centrifugar por 10 min a 12.000 rpm, remover o sobrenadante cuidadosamente e transferi-lo para tubos novos;
7. A camada aquosa obtida no passo anterior adicionar 300 µl de cloroformo:álcool isoamílico (24:1), agitando-se em vortex até formar uma solução uniforme;
8. Centrifugar por 10 min a 12.000 rpm e transferir o sobrenadante para tubos novos;
9. Adicionar 700 µl de etanol absoluto gelado e misturar a solução invertendo-se o tubo gentilmente. Armazenar a -20°C por 12 horas, para ajudar na precipitação do DNA;
10. Centrifugar por 10 min (12.000 rpm) e descartar o sobrenadante por decantação;

11. Adicionar 150  $\mu$ l de etanol 70% e inverter o tubo várias vezes para lavar o “pellet” de DNA;
12. Centrifugar por 10 min (12.000 rpm) e descartar o sobrenadante por decantação. Todo o álcool existente no tubo deve ser retirado com a ajuda de uma micropipeta, e completamente seco deixando-o à temperatura ambiente ou em estufa 37°C por alguns minutos;
13. Ao DNA adicionar 150  $\mu$ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, mM EDTA pH 8.0), misturar e incubar a amostra por 12 horas à temperatura ambiente, ou durante algumas horas em Banho-maria à 56°C;
14. Após a incubação agitar os tubos por alguns segundos e estocar as amostras em freezer ou geladeira.

**ANEXO II**

**Reagentes e quantidades utilizados para reação de PCR na amplificação do fragmento do gene do citocromo b.**

Componentes	Quantidades
DNA	3 $\mu$ l
Tampão	1 $\mu$ l
dNTP	0,7 $\mu$ l
Iniciador (Forward)	0,35 $\mu$ l
Iniciador (Reverse)	0,35 $\mu$ l
Taq DNA Polimerase	0,35 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O Milli-Q	4,25 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

**Ciclos de temperatura utilizados na amplificação do fragmento do gene do citocromo b.**

Passos	Temperatura °C	Tempo
1. Desnaturação inicial	94 <sup>o</sup>	3 min.
2. Desnaturação	94 <sup>o</sup>	45 seg.
3. Anelamento	59 <sup>o</sup>	56 seg.
4. Extensão	72 <sup>o</sup>	50 seg.
Repetir os passos 2 ao 4 – 35 vezes		
5. Extensão final	72 <sup>o</sup>	10 min.
6. Pause	4 <sup>o</sup>	Infinito

## ANEXO III

## REAGENTES E PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO

## Reagentes

Produto amplificado por PCR	7 $\mu$ l
SAP	0,5 $\mu$ l
EXO	1 $\mu$ l
10X RX Buf	0,5 $\mu$ l
Água MilliQ	1 $\mu$ l
Total	10 $\mu$ l

## Protocolo em termociclador

Passos	Temperatura °C	Tempo
1. Purificação	37°	60 min.
2. Inativação das enzimas	72°	15 min.
3. Pause	4°	Infinito

**ANEXO IV****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**

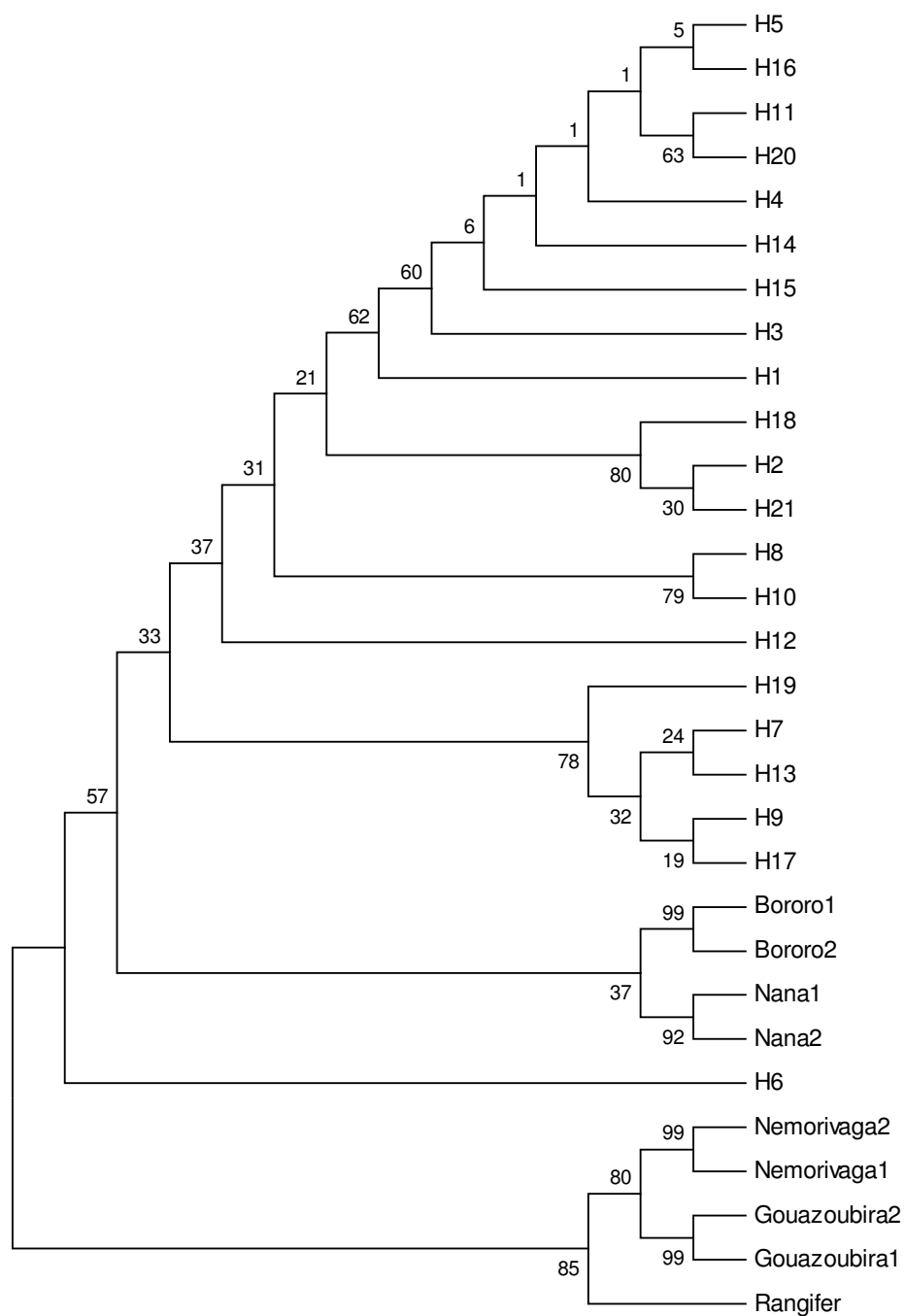
Desnaturação a 96 °C por 10 segundos, ligação dos iniciadores a 52°C por 5 segundos, extensão a 60º por 4 minutos, repetir estes ciclos 35 vezes e por fim armazenas a 4°C.

**Passo 3. Procedimentos de Lavagem**

- Adicionar 60 µl Isopropanol 75% 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 rápido (Máximo 500 rpm)
  - 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 V



Representação da árvore filogenética da matriz de dados dos fragmentos do citocromo-b de 480pb, método “Máxima Parcimônia” de análise; Out-Group: espécie *R. tarandus* M. *nemorivaga* e *M. gouzoubira*