

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

**Prospecção de regiões informativas do genoma
mitocondrial de Cervidae**

Marina Cabral Ricoldi
Bióloga

2021

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

**Prospecção de regiões informativas do genoma
mitocondrial de Cervidae**

Discente: Marina Cabral Ricoldi

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Campus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal

2021

R541p

Ricoldi, Marina Cabral

Prospecção de regiões informativas do genoma mitocondrial de Cervidae / Marina Cabral Ricoldi. -- Jaboticabal, 2021
64 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. DNA mitocondrial. 2. Filogenia. 3. Genética de populações. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

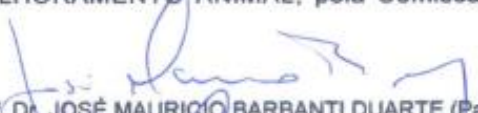
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: PROSPECÇÃO DE REGIÕES INFORMATIVAS DO GENOMA
MITOCONDRIAL DE CERVIDAE**

AUTORA: MARINA CABRAL RICOLDI

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

**Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E
MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:**


Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal


Prof. Dr. ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI (Participação Virtual)
Universidade Federal de Sergipe - Campus do Sertão / Nossa Senhora da Glória/SE


Pós-Doutoranda SAURA RODRIGUES DA SILVA (Participação Virtual)
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária-FCAV/UNESP / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 22 de outubro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

MARINA CABRAL RICOLDI – Nascida no dia 04 de abril de 1995 em Ribeirão Preto, SP. Filha de Adilson Ricoldi e Mariluci Cabral Ricoldi. Em fevereiro de 2013 ingressou no Curso de Graduação de Ciências Biológicas, modalidade Bacharel, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP –Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. No decorrer da graduação fez estágios na mesma instituição, nas áreas de genética, microbiologia e animais selvagens, o último no qual obteve bolsa de Iniciação Científica da Fapesp por um período de um ano. Após o término da graduação reingressou no ano de 2017 no Curso de Graduação de Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP –Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. Em março de 2019, ingressou no curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Departamento de Zootecnia, NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos), na linha de biologia molecular e conservação sob orientação da Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, sendo bolsista do programa CAPES.

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis”
(José de Alencar)

AGRADECIMENTOS

A Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus de Jaboticabal, que me concedeu o privilégio de estudar em uma das melhores Faculdades do país.

À CAPES e à UNESP, pelos recursos e bolsa investidos nesse trabalho e também na minha formação profissional.

A minha Família, pelo apoio, auxílio, incentivo e compreensão durante minha jornada, tornando-a mais fácil quando possível;

A Profº Drº José Maurício Barbanti Duarte, por ter me recebido e auxiliado nas áreas de biologia molecular e conservação, pela orientação, ensinamentos e colaboração no desenvolvimento desse trabalho;

Aos membros da banca de qualificação Profº Drº Alessandro de Mello Varani e Profº Drº Renato Caparroz e da banca de defesa Profº Drº Elias Alberto Gutierrez Carnelossi e Drª Saura Rodrigues da Silva, pela disponibilidade, críticas e grande colaboração, as quais me orientaram na melhora dessa dissertação;

A todos os amigos do Nupecce, pela ajuda, acolhimento e o bom convívio ao longo do tempo;

As amigas Ana Flávia (Végi) e Ana Paula (Coró), pelas festas e por todo apoio e conselhos durante esses anos;

A amada Batuka e agregados, por possibilitar o conhecimento de novas e loucas pessoas, com as quais tive momentos inesquecíveis, bizarros e únicos e também pelo contato musical ao longo desses anos;

A todos que contribuíram de alguma forma para realização desse trabalho e para minha formação acadêmica e pessoal;

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Obrigada!

SUMÁRIO

RESUMO.....	X
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
2.1. Objetivo geral	3
2.2. Objetivos específicos	3
3. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
3.1. Família Cervidae	3
3.2. Gênero <i>Mazama</i> e <i>Mazama gouazoubira</i>	8
3.3. Análises não invasivas e DNA fecal	13
4. REFERÊNCIAS	14
CAPÍTULO 2 - Perspectiva filogenética de marcadores mitocondriais da tribo Odocoileini	19
RESUMO	19
1. INTRODUÇÃO	20
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
2.1. Regiões de interesse do mitogenoma	21
2.2. Análises <i>in silico</i>	22
2.3. Análises das regiões filogeneticamente informativas	25
2.3.1. Sinal filogenético	25
2.3.2. Análise filogenética	25
3. RESULTADOS.....	28
3.1. Análises das regiões filogeneticamente informativas	28
4. DISCUSSÃO	33
5. CONCLUSÕES	34
6. REFERÊNCIAS.....	34
CAPÍTULO 3 - Perspectiva populacional de marcadores mitocondriais em <i>Mazama gouazoubira</i> (Fisher, 1814)	36
RESUMO	36
1. INTRODUÇÃO	37
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	38

2.1. Produção de sequências: Extração, Amplificação e Sequenciamento das amostras	38
2.2. Análises <i>in silico</i>	41
2.3. Análises populacionais.....	43
3. RESULTADOS.....	44
3.1. Análises populacionais.....	44
4. DISCUSSÃO	48
5. CONCLUSÕES	49
6. REFERÊNCIAS.....	49
CAPÍTULO 4 - Potencial de amplificação de marcadores mitocondriais de <i>Mazama gouazoubira</i> em DNA fecal	51
RESUMO	51
1. INTRODUÇÃO	52
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	53
2.1. Primers e Amostras fecais	53
2.2. Teste de eficiência de amplificação.....	56
3. RESULTADOS.....	57
3.1. Teste de eficiência de amplificação.....	57
4. DISCUSSÃO	59
5. CONCLUSÕES	60
6. REFERÊNCIAS.....	60
7. APÊNDICE	62

Resumo

A tribo Odocoileini é o grupo mais heterogêneo, com maiores problemas e controvérsias taxonômicas dos cervídeos. Ela é dividida em duas subtribos bem suportadas: Odocoileina e Blastocerina. Todos os cervídeos da região Neotropical são da tribo Odocoileini e suas espécies representantes destacam-se pela ampla variedade morfológica e de habitats. Dentre as espécies tem *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro) a qual possui uma grande amplitude em sua distribuição geográfica e na diversidade de habitats que ocupa. No Brasil pode ocupar quase todos os biomas, exceto a Amazônia. O veado-catingueiro apresenta ainda variações regionais, ecológicas e individuais de coloração, além de uma alta diversidade haplotípica. Por essa razão análises genéticas são importantes, já que, fornecem informações valiosas para taxonomia e para determinação da existência de estruturação populacional e, consequentemente, unidades evolutivamente significativas distintas. Para tanto, primers foram confeccionados a partir das sequências existentes (Genbank) e das produzidas no presente projeto em uma análise *in silico* das sequências das regiões Citocromo B, ND5, ND2 e D-loop (região controle) do DNA mitocondrial, visto que já se conhece o mitogenoma da espécie. As sequências foram alinhadas com as várias existentes para a mesma espécie e de espécies distintas, buscando-se áreas polimórficas flanqueadas por regiões conservadas. Prospectamos primers que permitam amplificação de pequenos fragmentos (150-250pb) informativos das diferentes regiões. Os primers foram utilizados para amplificação do mtDNA em amostras de fezes de veado-catingueiro, sendo testada a eficiência de amplificação para os diferentes marcadores. Também foram realizadas duas análises Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana para confirmação dos sinais filogenéticos e uma rede de haplotipos para análises intrapopulacionais das matrizes dos fragmentos separados e concatenadas. Nossos resultados mostraram que os marcadores testados possuem sinal filogenético relevante para estudos filogenéticos preliminares, identificação de gêneros e populações, principalmente quando a amostra contém pouco DNA de qualidade. Os fragmentos das regiões podem apresentar resultados de diversidade genética similares ao da região completa, a diversidade depende do local da região onde fragmento se encontra. Os amplicons menores tem maior facilidade de amplificação no material fecal e que sua concatenação pode gerar um marcador de importância para análises filogenéticas em cervídeos.

Palavras-chave: DNA fecal, DNA mitocondrial, Genética de populações, Citocromo B, ND5, D-loop.

Abstract

The Odocoileini tribe is the most heterogeneous group, with the greatest taxonomic problems and controversies among deer. It is divided into two well-supported subtribes: Odocoilein and Blastocerin. All deer in the Neotropical region are from the Odocoileini tribe and their representative species stand out for their wide morphological and habitat variety. Among the species there is *Mazama gouazoubira* (brocket deer) which has a wide range of geographic distribution and the diversity of habitats it occupies. In Brazil it can occupy almost all biomes, except for the Amazon. The brocket deer also presents regional, ecological and individual color variations, in addition to a high haplotype diversity. For this reason genetic analyzes are important, as they provide valuable information for taxonomy and for determining the existence of population structure and, consequently, distinct evolutionarily significant units. For this purpose, primers were made from existing sequences (Genbank) and those produced in this project in an in silico analysis of sequences from the Cytochrome B, ND5, ND2 and D-loop (control region) regions of the mitochondrial DNA, since the mitogenome of the species is known. The sequences were aligned with the several existing ones for the same species and from different species, looking for polymorphic areas flanked by conserved regions. We are looking for primers that allow the amplification of small fragments (150-250bp) that are informative from different regions. The primers were used for mtDNA amplification in brocket deer feces samples, and the amplification efficiency for the different markers was tested. Two Maximum Likelihood analyzes and Bayesian Inference were also performed to confirm the phylogenetic signals and a haplotype network for intrapopulation analyzes of the matrices of the separated and concatenated fragments. Our results showed that the tested markers have a relevant phylogenetic signal for preliminary phylogenetic studies, identification of genera and populations, especially when the sample contains little quality DNA. The fragments of the regions can show similar genetic diversity results to the complete region, the diversity depends on the location of the region where the fragment is found. Smaller amplicons are easier to amplify in fecal material and their concatenation can generate an important marker for phylogenetic analysis in deer.

Keywords: Fecal DNA, Mitochondrial DNA, Population genetics, Cytochrome B, ND5, D-loop

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1. INTRODUÇÃO

A família Cervidae possui uma série de caráter simplesiomórficos, como presença de chifres nos machos, sendo um grupo caracterizado pela ampla divergência genética e citogenética em tamanho, habitat e comportamento, além de haver inconsistências no conhecimento das relações evolutivas em diferentes níveis taxonômicos (GILBERT et al., 2006; HASSANIN et al., 2012; FIGUEIREDO, 2014). Esse taxón apresenta grande fragilidade cromossômica, a qual caracteriza os cervídeos com uma das maiores taxas de evolução cariotípica em mamíferos (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008).

A tribo Odocoileini é o grupo heterogêneo de Cervidae, com maiores controvérsias taxonômicas (GILBERT et al., 2006), possuindo atualmente nove gêneros, nos quais estão os seis representantes neotropicais: *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Odocoileus*, *Ozotoceros*, *Padu*. A tribo Odocoileini é dividida entre duas subtribos Odocoileina (*M. americana*, *M. nana*, *M. bororo*, *M. temama*, *M. rufina*, *M. bricenii*) e Blastocerina (*M. gouazoubira*, *M. pandora*, *M. chunyii*, *M. nemorivaga*) (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; DUARTE; GONZALES, 2010; HECKERBERG et al., 2016).

O gênero *Mazama* possui uma das histórias evolutivas mais surpreendentes, ocasionada pela convergência morfológica observada nos seus representantes, sendo atualmente reconhecido como um gênero polifilético. Em seu trabalho sobre a história evolutiva dos cervídeos neotropicais Duarte, González e Maldonado (2008) possivelmente devido a radiação adaptativa e altos níveis de radiação separada de duas linhagens não relacionadas e com altos níveis de divergência molecular e citogenética.

Mazama gouazoubira possui grande amplitude de distribuição geográfica e diversidade de habitats, no Brasil podendo ocupar quase todos os biomas (PINDER; LEEUWENBERG, 1997, BLACK-DÉCIMA et al., 2010) excetuando-se a região Amazônica (PINDER; LEEUWENBERG, 1997). Podem-se observar inúmeras variações ecológicas e individuais de coloração conforme a região de ocorrência (ROSSI, 2000; BLACK-DÉCIMA et al., 2010).

Uma alta diversidade haplotípica foi detectada *M. gouazoubira* utilizando regiões mitocondriais, como Cytb e D-loop (BIDEGARAY et al., 2003; DUARTE,

GONZÁLEZ, MALDONADO, 2008; ELIZONDO, 2010; ARISTIMUÑO, 2013 FIGUEIREDO, 2014), sendo constatada uma subdivisão em cinco clados com distribuição simpátrica a espécie no Brasil (FIGUEIREDO, 2014). Portanto, nota-se a grande diversidade haplotípica populacional da espécie em uma ampla distribuição geográfica, aumentando assim a necessidade de estudar outras regiões geográficas não analisadas.

Para cervídeos, devido à dificuldade de captura dos indivíduos para obtenção de amostras biológicas, o DNA fecal se apresenta como ferramenta importante para o estudo de suas populações. A utilização de amostras fecais presentes no solo em vida livre é facilitada pelo uso de cães farejadores treinados, como foi mostrado no estudo feito por Oliveira et al. (2012). Para os cervídeos brasileiros, a coleta de amostras fecais tem permitido amplas amostragens e fonte de DNA mitocondrial para estudos moleculares (OLIVEIRA; DUARTE 2013; DUARTE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). Outras características que o mtDNA apresenta é o alto polimorfismo, taxa de mutação mais alta que o DNA nuclear, herança uniparental materna e baixas taxas de recombinação (AVISE, 2000).

Entretanto é necessário ressaltar que o DNA fecal está geralmente degradado devido à exposição ambiental e da presença de inúmeros inibidores de PCR como: polissacarídeos complexos, produtos da degradação de alimentos e bactérias (BEJA-PEREIRA et al., 2009). Algumas das alternativas para driblar esses reveses são os protocolos para armazenamento, processos de extração de DNA e oligonucleotídeos iniciadores (primers) espécie específicos. Entretanto, quanto maior o fragmento de DNA, oriundos de amostras fecais, maior a dificuldade de obtenção de sequências completas.

Dentro do apresentado, há necessidade de avaliação genética das inúmeras populações de veado-catingueiro a partir de uma amostragem mais ampla, para isso, deve-se utilizar um conjunto de marcadores mais expressivos, para melhor caracterizar essa diversidade. Obtendo esses dados através de amostras fecais, encontradas por cães farejadores. As características do DNA obtido de fezes dificulta o uso de marcadores nucleares, permanecendo o DNA mitocondrial como a opção mais viável para este tipo de matriz biológica.

Dentro deste contexto, o presente projeto pretende analisar o sinal genético das regiões selecionadas do mtDNA que se adequem para estudos populacionais e

filogeográficos em veado-catingueiro. Para tanto, partiremos da hipótese de que as regiões selecionadas possuem informações genéticas muito similares as dos fragmentos gênicos já descritos na literatura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- Prospectar regiões de mtDNA para estudos populacionais e genéticos de *M. gouazoubira*.

2.2. Objetivos específicos

- Mensurar as informações genéticas dos fragmentos das regiões ND5, ND2, D-loop e CytB com as regiões inteiras.
- Comparar a eficiência dos fragmentos das regiões ND5, ND2, D-loop e CytB com as regiões inteiras em análises de diversidade intrapopulacional, sinal filogenético e filogenia.
- Testar a amplificabilidade de primers das regiões ND5, ND2, D-loop e CytB com amplicons entre 224 a 675 pb em amostras de DNA fecal.

3. Revisão de literatura

3.1. Família Cervidae

A ordem Artiodactyla engloba a família Cervidae, a qual possui 55 espécies e 18 gêneros, sendo a segunda família mais diversa, atrás somente de Bovidae (ZURANO et al., 2019). Essa grande diversidade e as inconsistências quanto a suas relações evolutivas em diferentes níveis taxonômicos caracterizam a família Cervidae (GILBERT et al., 2006; HASSANIN et al., 2012).

A história evolutiva e sistemática pouco compreendida dos cervídeos pode ter relação com a grande fragilidade cromossômica, a qual caracteriza-os com uma das maiores taxas evolutivas cariotípicas em mamíferos (DUARTE; JORGE, 1996; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; VARGAS-MUNAR et al., 2010). Essa relação é demonstrada pelas diversas mudanças taxonômicas do grupo ao longo dos anos (DUARTE; MERINO 1997; WEBB, 2000; GRUBB, 2005;).

Os cervídeos apresentam uma distribuição cosmopolita, possuindo representantes nos continentes Americano, Europeu, Asiático e ao norte da África, em uma variedade de ambientes e altitudes (MERINO; ROSSI, 2010; HECKBERG et al., 2016). Suas espécies formam um grupo diversificado com exemplares pequenos como o *Pudu mephistophiles* (DE WINTON, 1896), com peso corporal de aproximadamente 6 kg, e espécies de maior tamanho como *Alces alces* (LINNAEUS, 1758), com mais de 600 kg (EINSENBENRG, 2000; MERINO; ROSSI, 2010).

A característica mais comum entre os cervídeos é a presença de chifres decíduos nos machos, que são estruturas ósseas maciças desenvolvidas por processos no osso frontal, com exceção ao gênero *Moschus* e a espécie *Hydropotes inermis*, que não possuem chifres, no entanto apresentam um desenvolvimento marcado dos caninos superiores nos machos e a espécie *Rangifer tarandus* (LINNAEUS, 1758), que as fêmeas também possuem chifres (DUARTE; MERINO, 1997).

Em alguns gêneros, os chifres são simples, sem ramificação, como em *Mazama* (RAFINESQUE, 1817), *Pudu* (GRAY, 1852), *Muntiacus* (RAFINESQUE, 1815) e *Elaphodus* (MILNE-EDWARDS, 1871), ou se ramificam em duas pontas como em *Hippocamelus* (LEUCKART, 1816), três pontas prioritariamente em *Ozotoceros* (AMEGHINO, 1891), *Capreolus* (GRAY, 1821) e *Axis* (SMITH, 1828) ou se ramificam com múltiplas pontas como em *Blastocerus* (GRAY, 1850), *Cervus* (LINNAEUS, 1758), *Dama* (FRISCH, 1775), *Odocoileus* (RAFINESQUE, 1832) e *Alces* (GRAY, 1821) (DUARTE; MERINO, 1997; HECKBERG, 2020).

A região Neotropical abrange uma grande diversidade de cervídeos, que passaram por uma recente e intensa irradiação, tal como uma surpreendente convergência morfológica (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; GONZÁLEZ et al., 2010). A alta diversidade de Cervidae na região, deve-se, em parte, a ausência de outros ruminantes ocupando esse nicho ecológico, porém a família continua com sua história evolutiva e taxonomia obscuras nos Neotrópicos (WEBB 2000; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; GONZÁLEZ et al., 2010; HASSANIN et al., 2012; GONZÁLEZ et al. 2017; GONZÁLEZ; DUARTE, 2020).

Após a formação do istmo do Panamá há cerca de 2,5 milhões de anos (Mya), conexão que possibilitou do grande intercâmbio da fauna americana, os cervídeos expandiram sua distribuição para a América do Sul onde viveram uma intensa irradiação adaptativa (MERINO; ROSSI, 2010). Através de dados moleculares Duarte, González e Maldonado (2008) apontam que oito linhagens ancestrais das espécies neotropicais possam ter migrado para a América do Sul durante a expansão.

A filogenia da família Cervidae com base nos caracteres morfológicos conta com altos níveis de homoplasia, causando seu questionamento em diversos estudos (MERINO et al. 2005; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; MERINO; ROSSI 2010). Atualmente a subdivisão de Cervidae em duas subfamílias já é um consenso, Capreolinae e Cervinae estão sustentadas por dados morfológicos e genéticos (GILBERT et al., 2006; HASSANIN et al., 2012; HECKBERG et al., 2016; ZURANO et al., 2019; HECKBERG, 2020).

A subfamília Capreolinae inclui as tribos Alceini, Capreolini, Odocoileini e Rangiferini, já a subfamília Cervinae contém as tribos Cervini e Muntiacini (HECKBERG et al., 2016). Ainda que muitas pesquisas na última década tenham reconstruído e analisado a filogenética de Capreolinae, ficaram algumas lacunas e questionamento sobre a validade de certos gêneros e espécies (HECKBERG et al., 2016; GUTIÉRREZ et al., 2017; ZURANO et al., 2019; HECKBERG, 2020).

Há indícios que a tribo Odocoileini iniciou sua diversificação antes da migração para a América do Sul (2,5 Myr), uma vez que, já era detectadas ao menos duas linhagens na América do Norte há 5 Myr (WEBB 2000; GILBERT et al., 2006). Todos os cervídeos da região Neotropical são da tribo Odocoileini e são os únicos Cervidae presentes na América do Sul (HECKBERG et al., 2016). As espécies representantes da tribo destacam-se pela ampla variedade morfológica e de habitats, com os maiores problemas e controvérsias taxonômicas dos cervídeos (GILBERT et al., 2006). Os gêneros que apresentaram polifilia em análises anteriores foram: *Mazama* (SMITH et al., 1986; GILBERT et al., 2006; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; HASSANIN et al., 2012), *Hippocamelus* (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008) e *Odocoileus* (HASSANIN et al., 2012).

A tribo Odocoileini é dividida em duas subtribos bem suportadas: Odocoileina e Blastocerina (HECKBERG et al., 2016). Odocoileina é composto pelo gênero *Odocoileus*, e as espécies: *Mazama americana*, *Mazama bororo*, *Mazama nana*, *Mazama temama*, *Mazama pandora*, *Mazama rufina* e *Mazama bricenii*, enquanto Blastocerina agrupa os gêneros *Hippocamelus*, *Ozotoceros*, e *Blastocerus* e as espécies *Mazama gouazoubira*, *Mazama chunyi*, *Mazama nemorivaga* e *Pudu puda* (Figura 1).

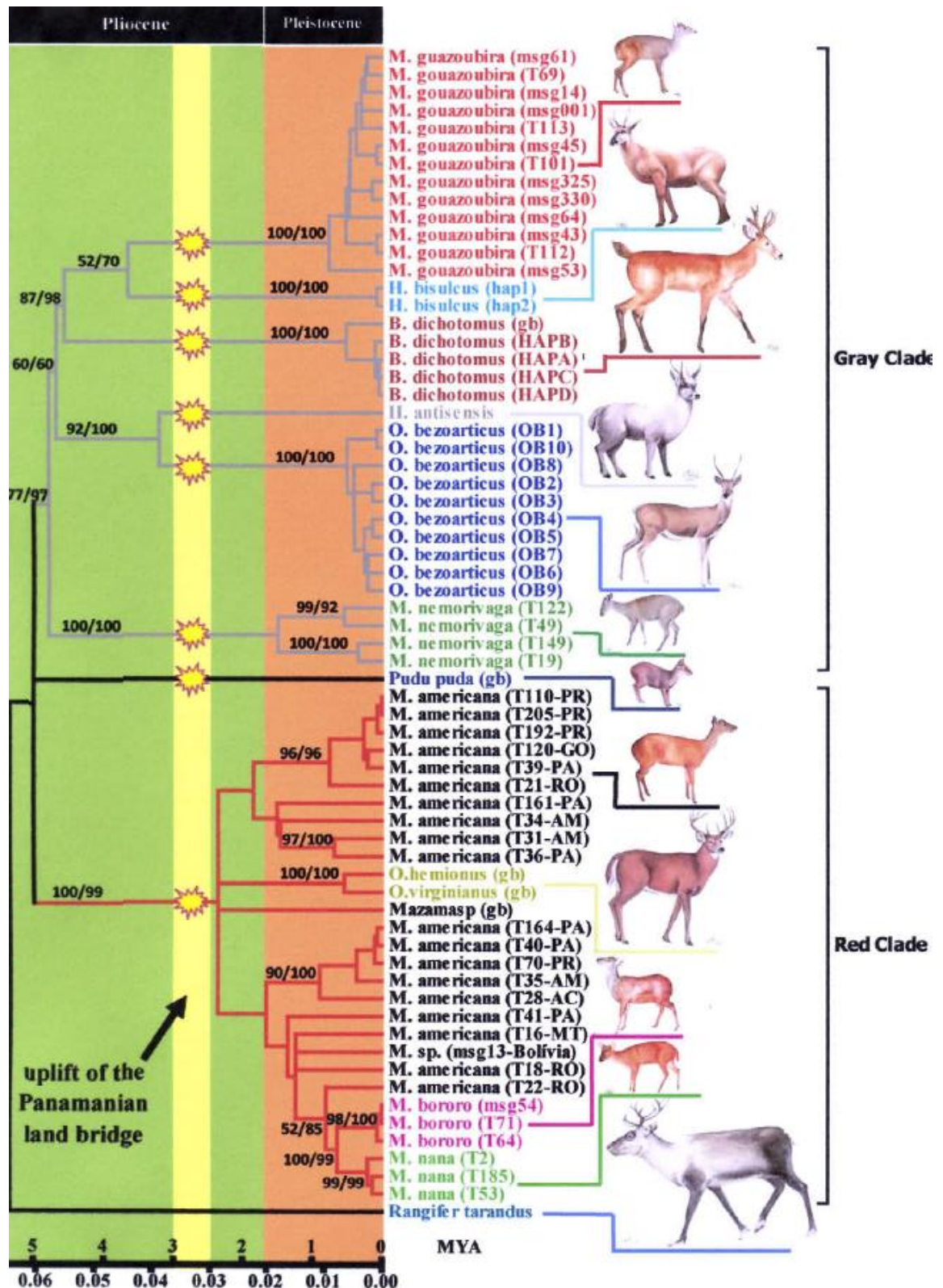


Figura 1. Relações filogenéticas de cervídeos neotropicais inferidas com uma matriz do gene mitocondrial Cytb. O suporte dos clados é apresentado através de valores de *bootstrap* e probabilidade posterior (>50%). Figura publicada por Duarte, González; Maldonado (2008).

3.2. Gênero *Mazama* e *Mazama gouazoubira*

O gênero *Mazama* tem a maior distribuição geográfica entre os cervídeos neotropicais, ocupando desde centro sul do México ao norte da Argentina (ROSSI, 2000). As espécies do gênero têm hábito solitário e juntamente com *Pudu* são cervídeos neotropicais de pequeno a médio porte, com chifres simples e adaptados para a movimentação em ambientes florestais e savanas arbóreas (EINSERBERG, 2000; DUARTE; GONZALES, 2010).

Esse grupo possui uma das histórias evolutivas mais surpreendentes e controversas ocasionada pela convergência morfológica observada nos seus representantes (Figura 2), sendo atualmente reconhecido como um gênero polifilético, possivelmente resultará em novas descrições de gêneros para Odocoileini (GILBERT et al., 2006; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; GUTIÉRREZ et al., 2017; ZURANO et al., 2019; HECKBERG, 2020).

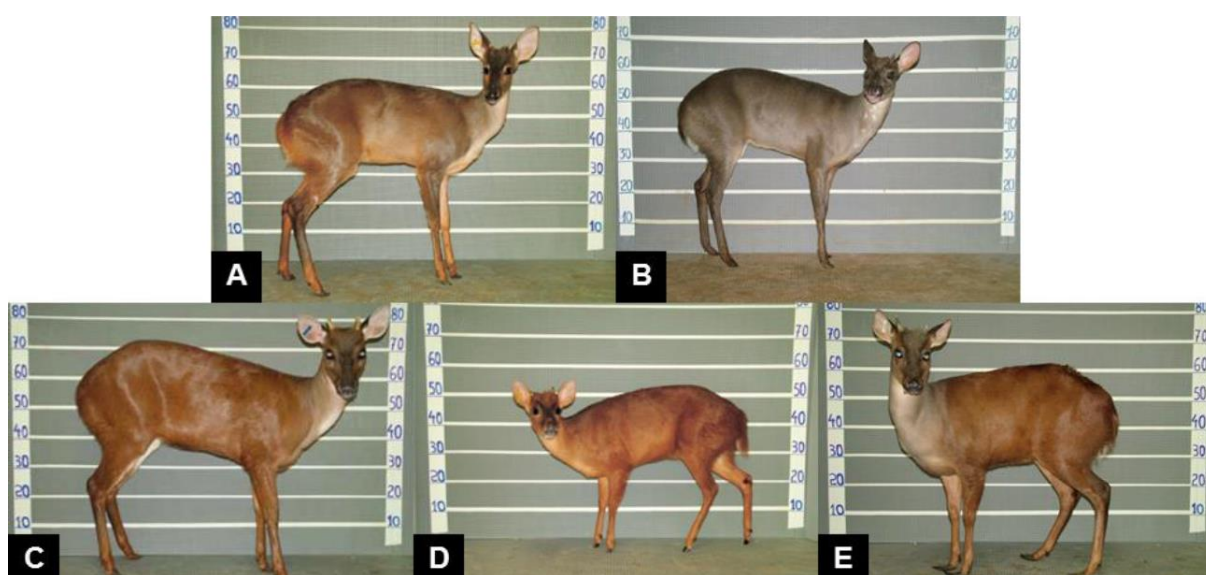


Figura 2. Espécimes adultos de cinco espécies do gênero *Mazama* (Rafinesque, 1817) que ocorrem no território brasileiro: (A) *M. gouazoubira* (Fischer, 1814), (B) *M. nemorivaga* (Cuvier, 1817), (C) *M. americana* (Erxleben, 1777), (D) *M. nana* (Hensel, 1872) e (E) *M. bororo* (Duarte, 1996). Fotos de J.M.B. Duarte.

Nas análises morfológicas e moleculares com isoenzimas das espécies *M. gouazoubira* e *M. americana* Smith et al. (1986) já relatavam uma polifilia no gênero. Nos anos 2000 outros estudos utilizando citogenética, marcadores moleculares

mitocondriais e nucleares reavaliaram a filogenia de *Mazama* e também constataram a polifilia do gênero em seus resultados (GILBERT et al., 2006; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; HASSANIN et al., 2012; GUTIÉRREZ et al., 2017; ZURANO et al., 2019; HECKBERG, 2020). Merino et al. (2005) relataram a monofilia de *Mazama* através de análises por morfometria craniométrica, dados que indicam as dificuldades ao utilizar morfometria para esse táxon, uma vez que, a maioria das espécies do gênero compartilham semelhanças morfológicas, todavia, podem apresentar diferenças no tamanho corporal, na cor da pelagem e cariótipo (GROVES; GRUBB, 1987; DUARTE; MERINO, 1997; GONZÁLEZ et al., 2009). Possuem também um alto índice de fragilidade cromossômica, produzindo rearranjos cromossômicos, que contribuem para ampla variedade cromossômica inter e intra-específica do gênero *Mazama* (VARGAS-MUNAR; SARRIA-PEREA; DUARTE, 2010).

A IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) reconhece dez espécies de *Mazama*: *M. americana*, *M. bororo*, *M. bricenii*, *M. chunyi*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. pandora*, *M. rufina* e *M. temama*. No Brasil temos dois representantes da subtribo Blastocerina: *M. gouazoubira* (FISHER, 1814), conhecido popularmente como veado-catingueiro, o qual trata-se de um veado de porte médio, com comprimento de cabeça e corpo de 882 - 1060 mm e altura dos ombros de 500 - 650 mm, com coloração variando do cinza escuro até o marrom avermelhado, a maioria dos indivíduos apresenta mancha superciliar, característica inexistente nas outras espécies (ROSSI, 2000). Uma característica morfológica marcante da espécie é a sua orelha, grande e arredondada que dentre outros fatores auxilia sua diferenciação do segundo representante da subtribo, o *M. nemorivaga* (CUVIER, 1817) espécie popularmente conhecida como veado-roxo, um cervídeo de pequeno porte, com uma estatura média de 480 mm de altura, coloração acinzentada, orelhas pequenas e mufla grande (DUARTE, 1996).

Mazama gouazoubira possui grande amplitude de distribuição geográfica e diversidade de habitats, no Brasil podendo ocupar quase todos os biomas (PINDER; LEEUWENBERG, 1997, BLACK-DÉCIMA et al., 2010). A distribuição abrange regiões da Argentina e da Bolívia, Uruguai, Paraguai e Brasil, não ocorrendo apenas na região Amazônica (Figura 3) (PINDER; LEEUWENBERG, 1997). Podem-se observar inúmeras variações ecológicas e individuais de coloração conforme a região de

ocorrência (ROSSI, 2000; BLACK-DÉCIMA et al., 2010). Os *M. gouazoubira* do norte do Cerrado brasileiro têm a mesma coloração louro pálido que *Ozotoceros bezoarticus* e ambos compartilham parte da distribuição geográfica. No Pantanal, onde ocorrem em simpatria com *M. americana* e *Ozotoceros bezoarticus*, eles apresentam uma maior amplitude de coloração marrom, acinzentado e avermelhado (BLACK-DÉCIMA et al. 2010; ORTEGA; MALDONADO, 2020). As variações de tamanho também podem ser observadas em escala latitudinal, sendo que os veados-catingueiro provenientes do sul do Brasil são maiores que os do nordeste (DUARTE; JORGE, 1998).



Figura 3. Distribuição geográfica de *M. gouazoubira* segundo a IUCN.

Por sua grande abrangência geográfica e contingente populacional, é classificado pela lista vermelha de espécies da IUCN como menos preocupante (LC) em termos de conservação, todavia sua tendência populacional encontra-se em declínio (BLACK-DECIMA; VOGLIOTTI, 2016), já estando presente em listas da

Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul como vulnerável (VU) (MARQUES, 2002; DUARTE et al., 2012) e na categoria “em perigo” (EN) na Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção do estado do Rio de Janeiro (SEMA, 1998; DUARTE et al., 2012). Dentre os fatores que contribuem para tal, estão a caça, doenças transmitidas por animais domésticos e perda e destruição de habitat (ARISTIMUÑO; GONZÁLEZ; DUARTE, 2015).

Pela sua ampla distribuição e variação morfologia esta espécie é um excelente modelo para examinar os padrões de variação genética e explorar se os padrões de diferenciação genética populacional estão correlacionados com a distribuição histórica e ecológica.

Uma alta diversidade haplotípica para *M. gouazoubira* foi detectada por Duarte, González e Maldonado (2008), na qual encontraram grupo de haplótipos divergentes para este táxon. Figueiredo (2014), em um estudo de relações filogenéticas de *M. gouazoubira* no Brasil, constatou uma subdivisão em cinco clados com distribuição simpátrica em sua maioria, corroborando com Duarte; González e Maldonado (2008) (Figura 4). Sugere-se, portanto, uma revisão mais acurada, além de análises complementares para confirmação da existência de um complexo de espécies crípticas (FIGUEIREDO, 2014).

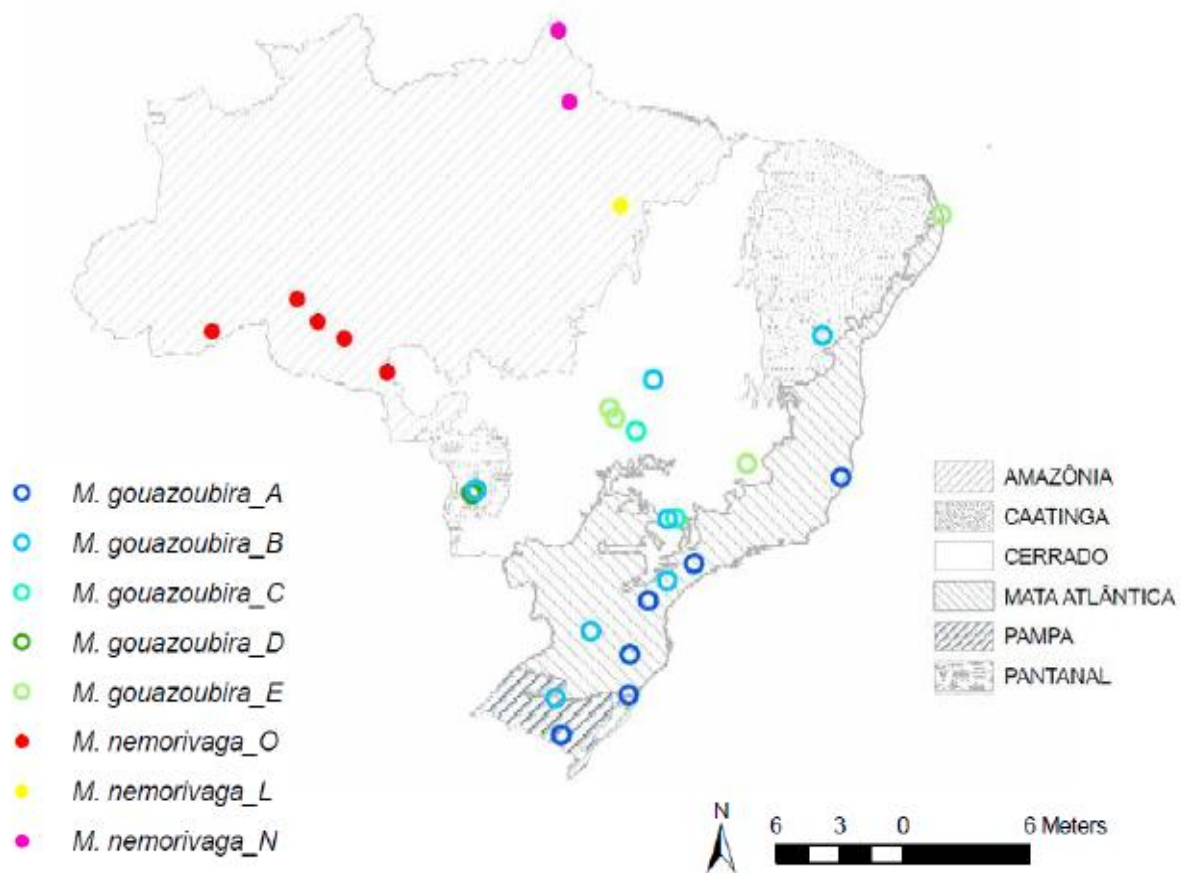


Figura 4. Distribuição dos clados de *M.gouazoubira* e *M. nemorivaga* no Brasil e os biomas em que ocorrem. (FIGUEIREDO, 2014).

Aristimuño (2013), ao analisar espécimes do Uruguai, Brasil, Paraguai, Argentina e Bolívia, em um estudo com enfoque populacional, através de análise filogenética de máxima parcimônia, rede de haplótipos e AMOVA (análise de variância molecular) da região controle do DNA mitocondrial (D-loop 159 pb), relatou altos níveis de variabilidade genética e baixos níveis de diferenciação geográfica. Bidegaray et al. (2003) e Elizondo (2010) encontraram resultados parecidos com um fragmento do gene do CytB (423 pb e 480 pb, respectivamente).

A conexão espacial entre haplótipos de amostras representativas de parte da distribuição geográfica (principalmente do Brasil e Uruguai) foram plotadas com uma Rede de haplótipos obtida com um fragmento curto (160 bp) da região hipervariável do D-loop. Este fragmento da região D-loop apresentou altos níveis de diversidade, mas uma estruturação genética moderada (ARISTIMUÑO, 2017).

Portanto, nota-se a grande diversidade haplotípica populacional da espécie e uma diversidade geográfica, aumentando assim a necessidade de estudar outras

regiões geográficas não analisadas, buscando assim toda a amplitude genética de *M. gouazoubira*, e um conjunto de marcadores que explore diferentes regiões mitocondriais para melhor caracterizar essa diversidade.

3.3. Análises não invasivas e DNA fecal

Dados genéticos em nível populacional fornecem informações primárias para a conservação da espécie, como características sobre a organização social, análises da divergência genética e distribuições geográficas das populações (FRANKHAM, 2010). Estas informações podem ser acessadas por análises filogenéticas com base no DNA mitocondrial, auxiliando assim, a identificação de Unidades Evolutivas Significativas (ESU), as quais são definidas por conjunto de populações que possuam separação filogenética, ou seja, apresentam monofília para haplótipos mitocondriais (FRASER; BERNATCHEZ, 2001). A definição de ESUs auxiliará na elaboração dos programas de conservação e manejo populacional de espécies com melhores fundamentos (TELLES et al., 2003).

Para a família Cervidae os avanços nas técnicas de citogenética e genética molecular possibilitaram a utilização de dados genéticos para elucidar problemas relacionados à história evolutiva e taxonômica (GILBERT et al., 2006; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; DUARTE e GONZÁLEZ, 2010). Devido à dificuldade de visualizar os animais e captura-los, usualmente utiliza-se de material depositado em museu e/ou coleta de material não invasivo, como fezes na natureza (GUTIÉRREZ et al., 2015; DUARTE et al., 2016). Sendo assim, o DNA fecal é uma ferramenta importante para o estudo de populações e identificação de espécies de cervídeos neotropicais (GONZÁLEZ et al. 2009; DUARTE et al. 2017).

O desenvolvimento de métodos para a obtenção de DNA a partir de amostras coletadas de forma não invasiva, principalmente de fezes, permitiu aos pesquisadores obtenção de informações em nível individual e populacional (KOHN et al. 1999). A utilização de amostras fecais é facilitada pelo uso de cães treinados que encontram grandes quantidades de fezes no campo, como foi mostrado no estudo feito por Oliveira et al. (2012).

As fezes são as amostras não invasivas mais utilizadas em cervídeos, detendo uma poderosa fonte de informações sobre os animais, as quais vão desde a genética até a endocrinologia (OLIVEIRA; DUARTE, 2013). Para os cervídeos brasileiros, a

coleta de amostras fecais tem permitido amplas amostragens e o DNA mitocondrial tem se mostrado viável de ser amplificado (OLIVEIRA; DUARTE 2013; DUARTE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). Além da fácil amplificação, o DNA mitocondrial apresenta como características o alto polimorfismo, taxa de mutação mais alta que o DNA nuclear, herança uniparental materna e baixas taxas de recombinação (AVISE, 2000).

Reddy et al. (2012) identificaram DNA de tigres em amostras fecais através da amplificação de uma região de 162 pb do gene do CytB, muitas dessas amostras identificadas positivamente continham quantidades indetectáveis de DNA nuclear, só tornando possível a identificação pelo mtDNA. Murphy et al. (2002) mostraram resultados semelhantes em extratos fecais de urso pardo, corroborando para simplicidade e viabilidade do mtDNA em identificar espécies, independentemente da qualidade / idade da amostra obtida ou do método de preservação usado, enquanto comparando-se com as taxas de sucesso na identificação individual o DNA nuclear são mais baixas, como os trabalhos supracitados mostram.

Todavia, é necessário ressaltar que o DNA fecal está geralmente degradado devido à exposição ambiental, danos oxidativos ou hidrolíticos, crescimento de mofo e deterioração ativa e contínua pelo grande número de bactérias presentes no corpo das fezes além da presença de inúmeros inibidores de PCR como: polissacarídeos complexos, produtos da degradação de alimentos e bactérias (BEJA-PEREIRA et al., 2009). Algumas das alternativas para driblar esses problemas são os protocolos para armazenamento / extração de DNA e os iniciadores (primers) específicos para cada espécie, os quais reduzem o risco de amplificação de fragmentos não específicos, de DNA externo de humanos, alimentos ou bactérias, além de levar em consideração o tamanho do locus amplificado, posto que, foi observado uma menor eficiência na amplificação de locus maiores do que 200-300 pb (BEJA-PEREIRA et al., 2009).

4. Referências

- AVISE, J.C. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, 203 p. 2000.
- ARISTIMUÑO, M. P. Variabilidad genética em poblaciones de *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae Fisher, 1814) de Uruguay y la región. Bachelor dissertation. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay. 2013.

ARISTIMUÑO, M. P.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B. Population structure and genetic variability of the gray-brocket deer (*Mazama gouazoubira*; Mammalia: Cervidae) in Uruguayan populations. Uruguay: **Deer Specialist Group News**, 58-66 p. 2015.

ARISTIMUÑO M. P. Análisis genético de poblaciones de guazú birá *Mazama gouazoubira* (Fischer.1814). Implicancias para su conservación, Master dissertation Programa de Desarrollo de Ciencias Básicas-Universidad de la República-Uruguay. 2017.

BEJA-PEREIRA, A. et al. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. Portugal: **Molecular Ecology Resources**, 01-23 p. 2009.

BIDEGARAY, L, et al. Variabilidad genética en *Mazama gouazoubira* (MAMMALIA: CERVIDAE). IV Taller de Cérvidos del Uruguay-VII Jornadas de Zoología del Uruguay. **Sociedad Zoológica del Uruguay**. P. 173, 2003.

BLACK-DÉCIMA, P. et al. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). Pp. 190-201. In: **Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer** (Duarte, J.M.B.; González, S., Eds.) FUNEP/IUCN, Jaboticabal, Brasil e Gland, Switzerland, 393 p. 2010.

BLACK-DÉCIMA P. A, VOGLIOTTI A. *Mazama gouazoubira*. The IUCN Red List of Threatened Species, 2016: e.T29620A22154584. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T29620A22154584.en>. Acesso em 20 de abril de 2021.

CAPARROZ, R. et al. Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. Brasil: **Genetics and Molecular Biology**, 338-345 p. 2015.

DUARTE, J. M. B. Guia de identificação de cervídeos brasileiros.1. ed. **FUNEP**. 14 p. 1996.

DUARTE J. M. B, JORGE W. Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**. 1996.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. Taxonomia e Evolução. In: Duarte, J.M.B. (Ed.), **Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 17–22 p. 2008.

DUARTE, J. M. B., GONZALEZ, S. Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal: **FUNEP e IUCN**, 394p, 2010.

DUARTE, J. M. B.; PIOVEZAN, U.; ZANETTI, E.S.; RAMOS, H. G. C. Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção. Brasília: **Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. 128 páginas, 2012.

DUARTE, J. M. B. et al. S. Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama Bororo*. **Oryx**, 1-9, 2016.

EISENBERG, J.F. The contemporary Cervidae of Central and South America. In: Vrba, E.S., Shaller, G.B. (Eds.). **Antelopes, Deer, and Relatives**. London: Yale University Press, 2000.

ELIZONDO, C. Estudio de la variabilidad genética del *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae) Fischer, 1814. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética, Laboratorio de Genética de la Conservación, IIBCE - Facultad de Ciencias, Udelar. Montevideo, Uruguay, 2010.

FIGUEIREDO, M. G. Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*). UNESP / Campus Jaboticabal: Molecular Ecology Resources, 2014.57 p. Tese (Doutora em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.

FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**. 2010.

FRASER, D. J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. **Mol. Ecol.** 2001

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

GONZÁLEZ S, et al. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, 2009.

GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B.; MALDONADO, J. E. Molecular Phylogenetics and Evolution. In: Duarte JMB e Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology**, Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, 2010.

GONZÁLEZ, S, et al. Population Structure of mtDNA Variation due to Pleistocene Fluctuations in the South American Maned Wolf (*Chrysocyonbrachyurus*, Illiger, 1815): Management Units for Conservation. **Journal of Heredity**, 2015.

GONZÁLEZ S; DUARTE J. M. B, COSSE M, REPETTO L. Conservation genetics taxonomy and management applications in neotropical deer. In: Aguirre A, Sukumar R (eds) **Tropical conservation. perspectives on local and global priorities**, Oxford University Press. 2017.

GONZÁLEZ S., DUARTE J. M. B. Speciation, evolutionary history and conservation trends of Neotropical deer. **Mastozoología Neotrop.** 2020.

GONZÁLEZ, S. et al. Integrative Genetic Tools to Assess Population Parameters Molecular Ecology of the Southern Gray Brocket Deer (*Mazama gouazoubira* Fischer, 1814). In: Ortega J e Maldonado JE (Eds.) **Conservation Genetics in Mammals**, Springer, 2020.

GROOVES, C. P., GRUBB, P. Relationships of living deer. in: Wemmer, C.M. **Biology and Management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, v. 1, p .21-59, 1987.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: **Mammal species of the World. A taxonomic and Geographic reference** (D.E. Wilson and D.M. Reeder, eds) The Jonhs Hopkins University Press, Baltimore, Maryland. USA, v. 1, p. 637-722, 2005.

GUTIÉRREZ, E. E. et al. A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys**. 2017.

HASSANI, A. et al. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes.C. R. **Biologies** 335, 2012.

HECKBERG N. S, ERPENBECK D, GERT WÖRHEIDE G, ROSSNER G. E. Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ**. 2016.

HECKBERG N. S. The systematics of the Cervidae: a total evidence approach. **PeerJ**. 2020.

_____. The IUCN red list of threatened species: version 2018.2. Gland; Cambridge, 2018. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 21 jan. 2019.

KOHN, M. H. et al. Estimating population size by genotyping faeces. Proceedings of the Royal Society of London. B. **Biological Science**, London, 1999.

MARQUES A. A. B. Lista de Referência da Fauna Ameaçada de Extinção no Rio Grande do Sul. Decreto no 41.672, de 10 junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT–PUCRS/PANGAEA, 2002.

MERINO M. L, MILNE N, VIZCAÍNO S. F. A cranial morphometric study of deer (Mammalia, Cervidae) from Argentina using threedimensional landmarks. **Acta Theriologica**. 2005.

MERINO, M. L.; ROSSI, R. V. Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: Duarte, J.M.B. & Gonzalez, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology**, Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, 2010.

MURPHY M. A., WAITS L. P., KENDALL K. C. et al. An evaluation of long-term preservation methods for brown bear (*Ursus arctos*) faecal DNA samples. **Cons Genetics** 3: 435–440, 2012.

OLIVEIRA, M. L. et al. Dogs can detect scat samples more efficiently than humans: an experiment in a continuous Atlantic Forest remnant. **Zoologia**, 183–186 p. 2012.

OLIVEIRA, M. L.; DUARTE, J. M. B. Amplifiability of mitochondrial, microsatellite and amelogenin DNA loci fecal samples of red brocket deer *Mazama americana* (Cetartiodactyla, Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, 2013.

OLIVEIRA, M. L.; COUTO, H. T. Z.; DUARTE J. M. B. Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. **European Journal of Wildlife Research**, 2019.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado Catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814).42-58 p. In: **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama** (Duarte, J. M. B., Ed.) FUNEP, Jaboticabal, Brasil. 1997.

REDDY P. A.; BHAVANISHANKAR M.; BHAGAVATULA J. et al. Improved Methods of Carnivore Faecal Sample Preservation, DNA Extraction and Quantification for Accurate Genotyping of Wild Tigers. **PloS ONE** 7(10): e46732, 2012.

ROSSI, R. V. Taxonomia de *Mazama* (Rafinesque, 1817) do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). Tesis de Maestría, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2000.

SAKAMOTO, T. Ferramentas para análise filogenética e de distribuição taxonômica de genes ortólogos. Tese (Doutora em Bioinformática) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2016.

SEMA - Secretaria do Meio Ambiente do Estado do Rio de Janeiro. **Lista das Espécies Ameaçadas de Extinção do estado do Rio de Janeiro**. Portaria-SEMA nº 001, de 4 de junho de 1998.

TELLES, M. P. C. et al. Avaliação do padrão de amplificação de marcadores rapd em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas. [S.l.]: **Ciência Animal Brasileira**, 7-14 p. 2003.

VARGAS-MUNAR D. S. F., SARRIA-PEREA J. A., DUARTE J. M. B. Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genet. Mol. Res.** 2010.

WEBB D. S. Evolutionary History of new world cervidae. In: Vrba ES; Schaller GB. **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation**. New Haven: Yale University Press, 2000.

ZURANO J. P, et al. Cetartiodactyla: updating a time-calibrated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2019.

CAPÍTULO 2 - Perspectiva filogenética de marcadores mitocondriais da tribo Odocoileini

Resumo

A tribo Odocoileini é o grupo mais heterogêneo e com maiores controvérsias taxonômicas dentre os cervídeos. Todos os cervídeos da região Neotropical são da tribo Odocoileini e as espécies destacam-se pela ampla variedade morfológica e pela ocupação de diversos habitats. Análises genéticas são importantes, já que, fornecem informações valiosas para taxonomia e para determinação da existência de estruturação populacional e, conseqüentemente, unidades evolutivamente significativas distintas dentro de toda sua área de ocorrência. Pela dificuldade de visualizar e capturar os cervídeos, utiliza-se material depositado em museu e/ou coleta de material não invasivo para estudos sobre a distribuição das espécies. Sendo assim, analisamos o sinal filogenético de regiões selecionadas do mtDNA potenciais para estudos filogeográficos da tribo Odocoileini. A partir dos 24 mitogenomas de espécimes da subfamília Capreolinae (Cervidae), foram montadas e alinhadas as 14 matrizes das regiões e seus fragmentos (CytB, Dloop, ND5, ND2 e a Concatenada dos quatro). Investigamos o sinal filogenético utilizando likelihood mapping e testamos as hipóteses filogenéticas com os métodos de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Os resultados mostraram que todos os marcadores mitocondriais possuem sinal filogenético e são potencialmente informativos para os estudos filogenéticos da tribo Odocoileini.

Palavras-chave: Filogenia; mtDNA; Odocoileini.

1. INTRODUÇÃO

A família Cervidae possui uma série de sinapomorfias, como presença de chifres nos machos, sendo um grupo caracterizado pela ampla divergência em tamanho, habitat e comportamento, além de haver inconsistências no conhecimento das relações evolutivas em diferentes níveis taxonômicos (GILBERT et al., 2006; HASSANIN et al., 2012; FIGUEIREDO, 2014). Dentro de Cervidae, a tribo Odocoileini é o grupo mais heterogêneo e com mais controvérsias taxonômicas (GILBERT et al., 2006), possuindo atualmente nove gêneros, nos quais estão os seis representantes neotropicais: *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Mazama*, *Odocoileus*, *Ozotoceros*, *Pudu*.

Todos os cervídeos da região Neotropical são da tribo Odocoileini e são os únicos Cervidae presentes na América do Sul (HECKBERG et al., 2016). As espécies representantes da tribo destacam-se pela ampla variedade morfológica e de habitats, com os maiores problemas e controvérsias taxonômicas dos cervídeos (GILBERT et al., 2006). Os gêneros que apresentaram polifilia em análises anteriores foram: *Mazama* (SMITH et al., 1986; GILBERT et al., 2006; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; HASSANIN et al., 2012), *Hippocamelus* (DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008) e *Odocoileus* (HASSANIN et al., 2012).

A tribo Odocoileini é dividida em duas subtribos bem suportadas: Odocoileina e Blastocerina (HECKBERG et al., 2016). Odocoileina é composto pelo gênero *Odocoileus*, e as espécies: *Mazama americana*, *Mazama bororo*, *Mazama nana*, *Mazama temama*, *Mazama pandora*, *Mazama rufina* e *Mazama bricenii*, enquanto Blastocerina agrupa os gêneros *Hippocamelus*, *Ozotoceros*, e *Blastocerus* e as espécies *Mazama gouazoubira*, *Mazama chunyi*, *Mazama nemorivaga* e *Pudu puda*.

Para a família Cervidae os avanços da citogenética e da genética molecular possibilitaram a utilização de dados genéticos para elucidar problemas relacionados à história evolutiva e taxonômica (GILBERT et al., 2006; DUARTE; GONZÁLEZ; MALDONADO, 2008; DUARTE e GONZÁLEZ, 2010).

Dados genéticos em nível populacional fornecem informações primárias para a conservação da espécie, como análises da divergência genética e distribuições geográficas das populações (FRANKHAM, 2010). Estas podem ser acessadas por análises filogenéticas com base no DNA mitocondrial, auxiliando assim, a identificação de Unidades Evolutivas Significativas (ESU), as quais são definidas por linhagens de certas espécies que possuam separação filogenética, ou seja, apresentam monofília.

para haplótipos mitocondriais (FRASER; BERNATCHEZ, 2001). A criação de ESUs auxilia na definição dos programas de conservação e manejo populacional de espécies com melhores fundamentos (TELLES et al., 2003).

O desenvolvimento de métodos para a obtenção de DNA a partir de amostras coletadas de forma não invasiva, principalmente de fezes, permitiu aos pesquisadores obtenção de informações em nível individual e populacional (KOHN et al. 1999). No entanto DNA fecal está geralmente degradado devido à exposição ambiental e possui inúmeros inibidores de PCR. Tendo como alternativas para driblar esses problemas protocolos para armazenamento / extração de DNA e os iniciadores (primers) específicos para cada espécie, os quais reduzem o risco de amplificação de fragmentos não específicos, de DNA externo de humanos, alimentos ou bactérias, além de levar em consideração o tamanho do locus amplificado, posto que, foi observado uma menor eficiência na amplificação de locus maiores do que 200-300 pb (BEJA-PEREIRA et al., 2009).

Dentro deste contexto, o presente projeto pretende analisar o sinal filogenético das regiões selecionadas do mtDNA que se adequem para estudos filogeográficos em cervídeos. Para tanto, partiremos da hipótese de que as regiões selecionadas possuem informações filogenéticas muito similares as dos fragmentos gênicos já descritos na literatura.

2. Material e Métodos

2.1. Regiões de interesse do mitogenoma

Para o presente estudo, decidiu-se optar por quatro regiões do genoma mitocondrial, são elas: D-loop (região controle), ND5 (NADH dehydrogenase subunit 5), ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2) (Figura 6).

Para ilustrar as regiões de interesse temos o genoma mitocondrial de *M. gouazoubira* (Figura 1), que possui 13 genes codificadores de proteína (ND1, ND2, COI, COII, ATP8, ATP6, COIII, ND3, ND4L, ND4, ND5, ND6 e CytB), duas subunidades ribossômicas de RNA (RNAm e RNAr), 22 RNA de transferência (trnX)

e a região de controle, tendo sua forma circular de aproximadamente 16.000 bp (CAPARROZ et al., 2015).

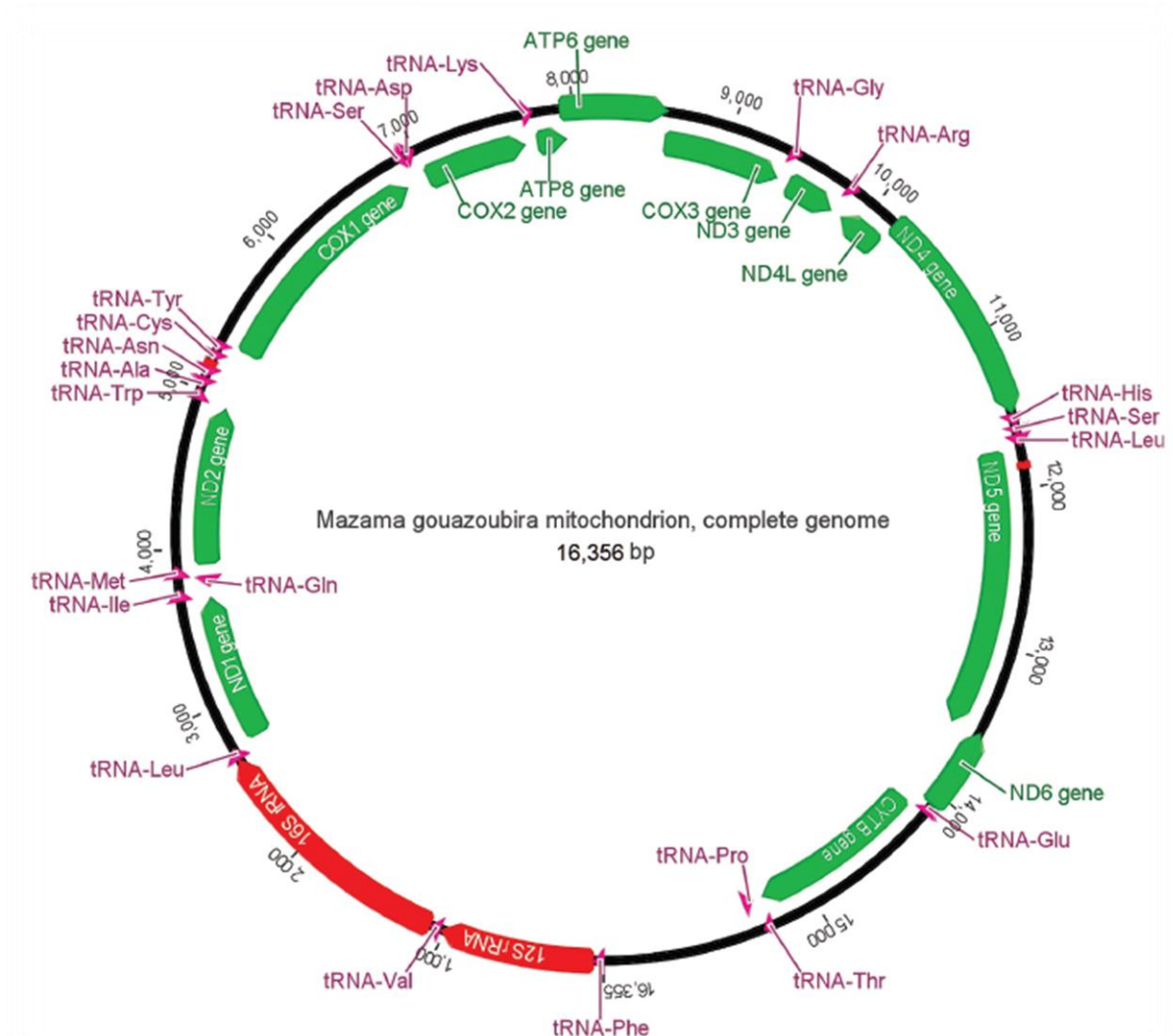


Figura 1. Mitogenoma da espécie *Mazama gouazoubira* representando as regiões de interesse. Em verde os genes mitocondriais (ND1, ND2, COX1, COX2, ATP8, ATP6, COX3, ND3, ND4, ND5, ND6, CytB). Em vermelho as subunidades ribossômicas de RNA (RNAm e RNAr). Em rosa as 22 RNA de transferência (trnX). A região controle (D-loop) está entre o tRNA-Pro e o tRNA-Phe. (CAPARROZ et al., 2015).

2.2. Análises *in silico*

A partir dos 24 mitogenomas de espécimes da subfamília Capreolinae (Cervidae) (Tabela 1) obteve-se as 24 sequências de cada região de interesse (ND5, ND2, D-loop e CytB).

Tabela 1. Mitogenomas de espécimes da subfamília Capreolinae (Cervidae) utilizadas nas análises filogenéticas.

Espécie	Identificação	Origem	Número de acesso	Referências
<i>Capreolus capreolus</i>	CYTO 2000.256	França	JN632610	HASSANIN et al., 2012
<i>Hydropotes inermis</i>	H6	Parc de Branféré, França	JN632649	HASSANIN et al., 2012
<i>Odocoileus hemionus</i>	T1766	Arizona, EUA	JN632670	HASSANIN et al., 2012
<i>Odocoileus virginianus</i>	T4887	Guiana Francesa	JN632671	HASSANIN et al., 2012
<i>Odocoileus virginianus</i>	MRGOv14	Colombia	JN632673	HASSANIN et al., 2012
<i>Odocoileus virginianus</i>	CYTO 02.133		JN632672	HASSANIN et al., 2012
<i>Blastocerus dichotomus</i>	PP224	Porto Primavera, Brasil	Não publicado	
<i>Blastocerus dichotomus</i>	CV21	Pantanal, Brasil	Não publicado	
<i>Blastocerus dichotomus</i>	MRGBd8	Bolivia	JN632646	HASSANIN et al., 2012
<i>Hippocamelus antisensis</i>	MRGHa9	Argentina	JN632603	HASSANIN et al., 2012
<i>Mazama americana</i>	MAZ9472	Guiana Francesa	JN632656	HASSANIN et al., 2012
<i>Mazama americana</i>	MRGMa40	Peru	JN632657	HASSANIN et al., 2012
<i>Mazama americana</i>	T329	Acre, Brasil	Não publicado	
<i>Mazama nemorivaga</i>	T1627	Guiana Francesa	JN632660	HASSANIN et al., 2012
<i>Mazama nemorivaga</i>	MRGMa36	Peru	JN632659	HASSANIN et al., 2012
<i>Mazama gouazoubira</i>	T314	Pantanal-Brasil	KJ772514	CAPARROZ et al., 2015
<i>Mazama gouazoubira</i>	T389	Topótipo - Paraguai	Não publicado	
<i>Mazama rufina</i>	MRGMr4	Colombia	JN632661	HASSANIN et al., 2012
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	RIC5	Pantanal, Brasil	Não publicado	
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	FNMA40	Emas, Brasil	Não publicado	
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	URU	Uruguai	Não publicado	
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	MRGOB2	Bolivia	JN632681	HASSANIN et al., 2012
<i>Pudu puda</i>	M92144		JN632692	HASSANIN et al., 2012
<i>Rangifer tarandus</i>			NC_007703	HASSANIN et al., 2012

As sequências de cada região foram alinhadas, separadamente, pelo software BioEdit (HALL, 1999) com o método de alinhamento progressivo (THOMPSON et al., 1994), e ajustadas manualmente.

Após o alinhamento das matrizes das regiões mitocondriais, iniciou-se a produção *in sílica* das matrizes concatenadas, através do aplicativo Mesquite 3.61 (MADDISON; MADDISON, 2019), e das matrizes dos fragmentos das regiões (Tabela 2), as quais tiveram seu tamanho definido pelos amplicons dos primers disponíveis para cada região. (Tabela 3)

Tabela 2. Matrizes para as análises das regiões filogeneticamente informativas. i = região inteira, c = concatenado dos fragmentos da região, F = fragmento da região.

Matrizes	Tamanho em pares de base (pb)
CytBi	1060
CytB _c	529
CytB _{F305}	305
CytB _{F224}	224
Dloop _i	693
Dloop _F	479
ND5 _i	1821
ND5 _c	476
ND5 _{F251}	251
ND5 _{F224}	224
ND2 _i	1160
ND2 _F	241
Concatenada _i	4726
Concatenada _F	1724

Tabela 3. Características dos primers utilizados para construção das matrizes dos fragmentos das regiões.

Região	Identificação	Iniciador (5'-3')	Amplicon (pb)	Temperatura pareamento	Fonte
ND5	ND5 F ND5 R	TGTCACATGGTCCATCATAG GCAGAGCTGCTGTGTTT	224	58°C	atual
ND5	ND5_252_F ND5_252_R	CTCTACATCCAGTCAATTAGGC CCAGTAAGAAAAGGCATTCTG	252	58°C	atual
Cytb	IDMAZ224L IDMAZH	CATCCGACACAATAACAGCA TCCTACGAATGCTGTGGCTA	224	52°C	GONZÁLEZ et al 2009
Cytb	Cit305 F Cit305 R	CCATCAGACGCAGACAAA GCGTTGTTTAGATGTGTGAAG	305	52°C	LEANDRO, 2019*
D-loop	D-loop F D-loop R	GCGGCATGGTAATTAAGCTC CATTACATTATATGCCCCATGC	479	56°C	Não publicado
ND2	ND2A_F ND2A_R	ACCCAATCAACAGCCTCAAT GTACGGATATGGGTGCCAGT	241	58°C	atual

*Relatório Científico Final FAPESP processo 2017/26529-9.

2.3. Análises das regiões filogeneticamente informativas

2.3.1. Sinal filogenético

O sinal filogenético de cada matriz foi analisado no programa Treepuzzle v. 5.2 (SCHMIDT et al., 2002), utilizando likelihood mapping, que analisa os grupos de quatro sequências aleatórias chamadas de quartetos. Essa análise demonstra se um conjunto de dados é adequado para a análise filogenética. A escala do sinal filogenético foi determinada empiricamente como: regular para valores < 70%; bom para valores entre 70 e 90%; e ótimo para valores >90% (ROCHA, 2013) Com número de quartetos de 10000 (random choice).

2.3.2. Análise filogenética

Realizamos dois métodos para inferir as hipóteses filogenéticas para cada matriz: a Máxima Verossimilhança (ML) e a Inferência Bayesiana (IB), os quais usam modelos estocásticos sobre a otimização dos caracteres avaliados, para então, calcular a probabilidade dos dados observados em uma dada árvore. Na Máxima Verossimilhança temos a avaliação probabilística das diferentes topologias das árvores, na qual, são realizados cálculos probabilísticos baseados em um modelo de substituição e no algoritmo para determinar a árvore que apresenta o maior valor da probabilidade (GAINETT; DIAS; MONTESINOS, 2017). Contudo o método não

incorpora dados a priori, a principal característica que diferencia a Máxima Verossimilhança da Inferência Bayesiana.

A Inferência Bayesiana também se baseia no cálculo da probabilidade, porém sua análise produz múltiplas árvores. Nesse método são definidos parâmetros a priori, como o modelo de substituição, tamanho dos ramos e a topologia das árvores, posteriormente foram coletados os dados do alinhamento e aplicamos os modelos evolutivos estocásticos e o teorema de Bayes para atualizar as probabilidades a priori, transformando-as em posteriori (SAKAMOTO, 2016).

Só geramos árvores filogenéticas nas matrizes que obtiveram valores de sinal filogenético maiores que 70%. Para a Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança utilizando-se o critério AIC (Akaike Information Criterion) (BURNHAM; ANDERSON, 2002) (Tabela 4). As análises tiveram como *ingroup* representantes da tribo Odocoilenini (Tabela 1) e o *outgroup* foi composto pelas sequências de *Hydropotes inermis*, *Capreolus capreolus* (ambos da tribo Capreolini).

Tabela 4. Melhor modelo evolutivo dos testes das matrizes utilizado o particionamento das matrizes. i = região inteira, c = concatenado dos fragmentos da região, F = fragmento da região.

Matriz	Modelo evolutivo
CytB _i	HKY+I+G / GTR+I+G
CytB _c	HKY+I+G / GTR+G
CytB _{F305}	HKY+I+G / GTR+G
CytB _{F224}	GTR+I
Dloop _i	GTR+G
Dloop _F	GTR+G
ND5 _i	GTR+G / GTR+I+G / HKY+I+G
ND5 _c	HKY+I+G / HKY+I
ND5 _{F251}	GTR+G / K80+I+G
ND5 _{F224}	HKY / HKY+I
ND2 _i	GTR+G / GTR+I+G
ND2 _F	HKY+I+G / HKY+I
Concatenada _i	HKY+G / GTR+I+G
Concatenada _F	GTR+I+G

A análise da Máxima Verossimilhança foi realizada no programa IQ-TREE (MINH et al., 2020) com 5000 réplicas de *bootstrap* (BTS). A análise da Inferência Bayesiana foi realizada no programa MR. BAYES 3 (HUELSENBECK; RONQUIST; 2001), na plataforma CIPRES (MILLER et al., 2010), com análise de MCMC (*Monte Carlo Markov Chains*) 1.000.000 gerações com 4 réplicas e uma temperatura de 0,05. A frequência de amostragem será de 1 árvore a cada 1.000 passos, com burnin de 25%. Foi calculada a probabilidade posterior (PP) como medida de suporte. As árvores finais foram visualizadas e editadas pelo aplicativo FigTree 1.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Para comparação foram selecionados dois parâmetros: A topologia, na qual será observado a posição das amostras em cada uma das doses matrizes, se ocorre ou não a alteração do posicionamento. O segundo parâmetro será os valores de suporte estatístico das filogenias.

3. Resultados

3.1. Análises das regiões filogeneticamente informativas

Todos as regiões e fragmentos apresentaram sinal filogenético com valores maiores que 80% (Tabela 5). Nas regiões inteiras, o que apresentou o menor sinal foi D-loop_i com 89,01%, mas ainda assim considerado como um bom sinal. Nos fragmentos das regiões o D-loop_F apresentou sinal filogenético 89,50%, já nas matrizes concatenadas as regiões que tiveram os menores sinais foram ND5_c e CytB_c, (97,86% e 97,10%, respectivamente).

Tabela 5. Sinal filogenético das matrizes. i = região inteira, c = concatenado dos fragmentos da região, F = fragmento da região.

Matrizes	Sinal filogenético (%)
CytB _i	98,78
CytB _c	97,86
CytB _{F305}	96,15
CytB _{F224}	90,33
Dloop _i	89,01
Dloop _F	89,50
ND5 _i	99,07
ND5 _c	97,10
ND5 _{F251}	94,25
ND5 _{F224}	93,78
ND2 _i	98,73
ND2 _F	94,58
Concatenada _i	99,72
Concatenada _F	98,90

Para observar a filogenia das regiões selecionadas do mtDNA geramos duas hipóteses filogenéticas (sendo uma para análise de Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana), as árvores com a melhor definição topológica entre as duas análises e de suporte estatístico (PP e BTS) estão representadas nas figuras 2 e 5.

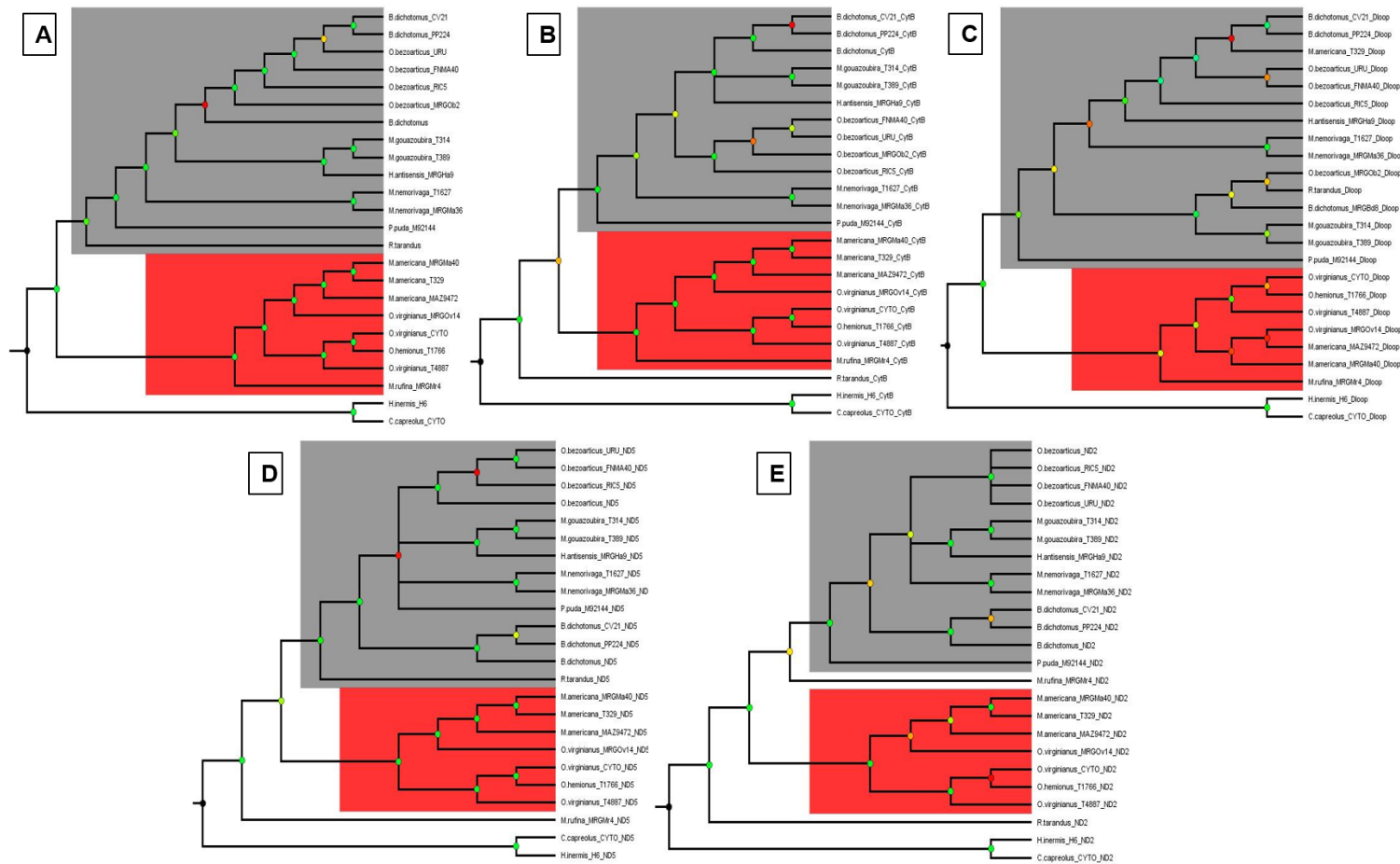


Figura 2. Comparação das hipóteses filogenéticas da tribo Odocoileini (Capreolinae: Cervidae) a partir das regiões da matriz Concatenada (A) das regiões CytbI (B), Dloopi (C), ND5i (D) e ND2i (E). As cores nas árvores destacam as subtribos Odocoileina (vermelho) e Blastocerina (cinza). A cor do nó indica os intervalos dos valores de probabilidade posterior (PP) e *bootstrap* (BTS), sendo verde para PP/BTS > 0.9/90, amarelo para PP/BTS > 0.8/80, laranja para PP/BTS > 0.7/70 e vermelho para PP/BTS < 0.7/70.

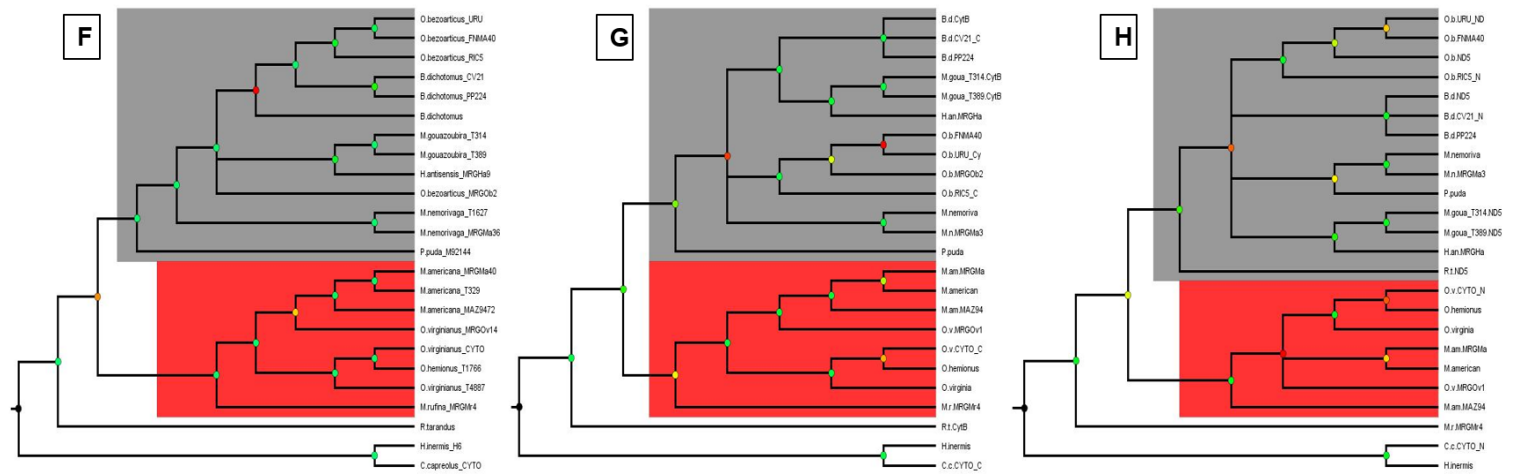


Figura 3. Comparação das hipóteses filogenéticas da tribo Odocoileini (Capreolinae: Cervidae) a partir dos fragmentos concatenados das regiões das matrizes Concatenada (F), CytBc (G) e ND5c (H). As cores nas árvores destacam as subtribos Odocoileina (vermelho) e Blastocerina (cinza). A cor do nó indica os intervalos dos valores de probabilidade posterior (PP) e *bootstrap* (BTS), sendo verde para PP/BTS > 0.9/90, amarelo para PP/BTS > 0.8/80, laranja para PP/BTS > 0.7/70 e vermelho para PP/BTS < 0.7/70.

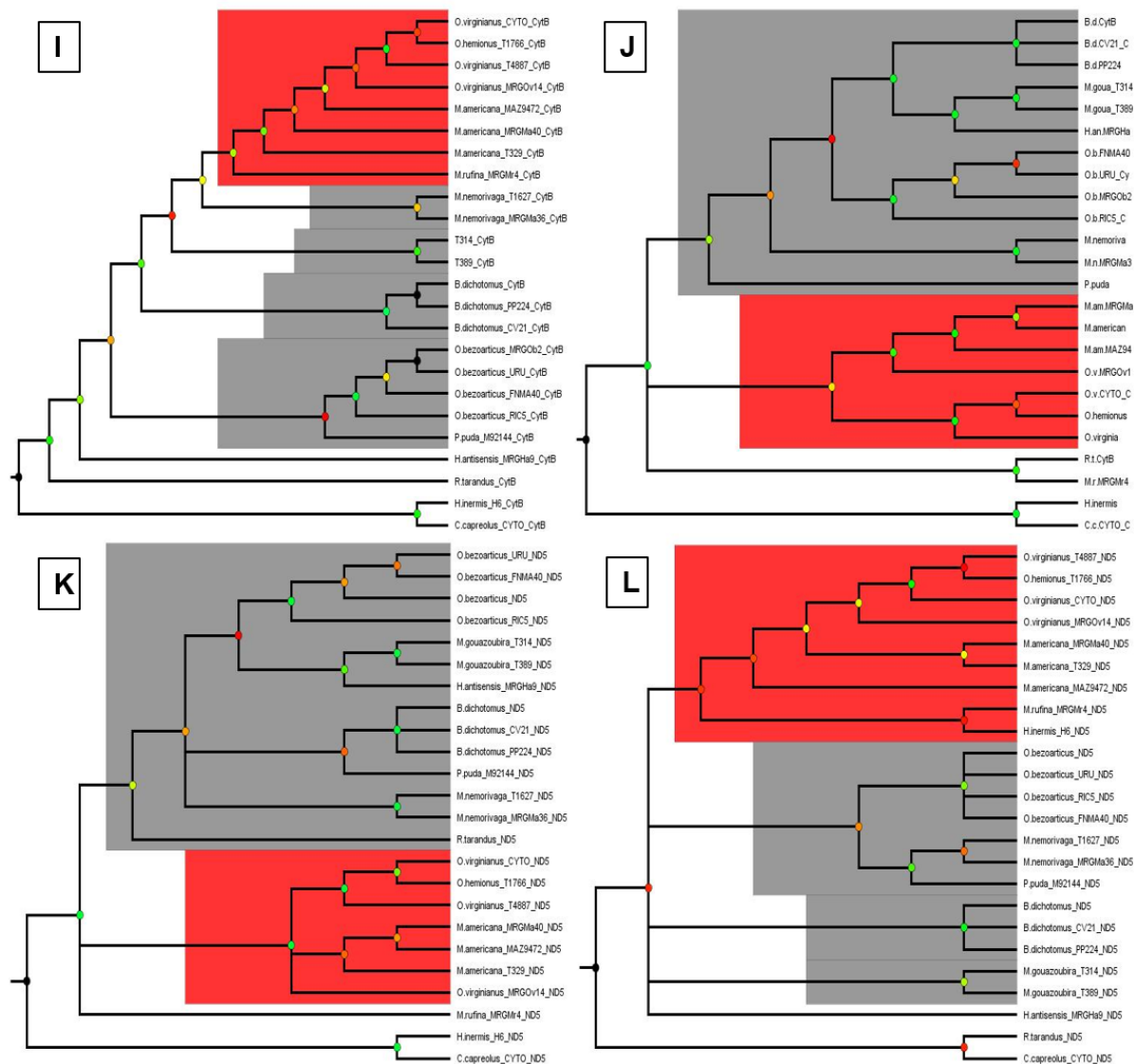


Figura 4. Comparação das hipóteses filogenéticas da tribo Odocoileini (Capreolinae: Cervidae) a partir dos fragmentos das regiões CytB224 (I), CytB305 (J), ND5224 (K) e ND5251 (L). As cores nas árvores destacam as subtribos Odocoileina (vermelho) e Blastocerina (cinza). A cor do nó indica os intervalos dos valores de probabilidade posterior (PP) e *bootstrap* (BTS), sendo verde para PP/BTS > 0.9/90, amarelo para PP/BTS > 0.8/80, laranja para PP/BTS > 0.7/70 e vermelho para PP/BTS < 0.7/70.

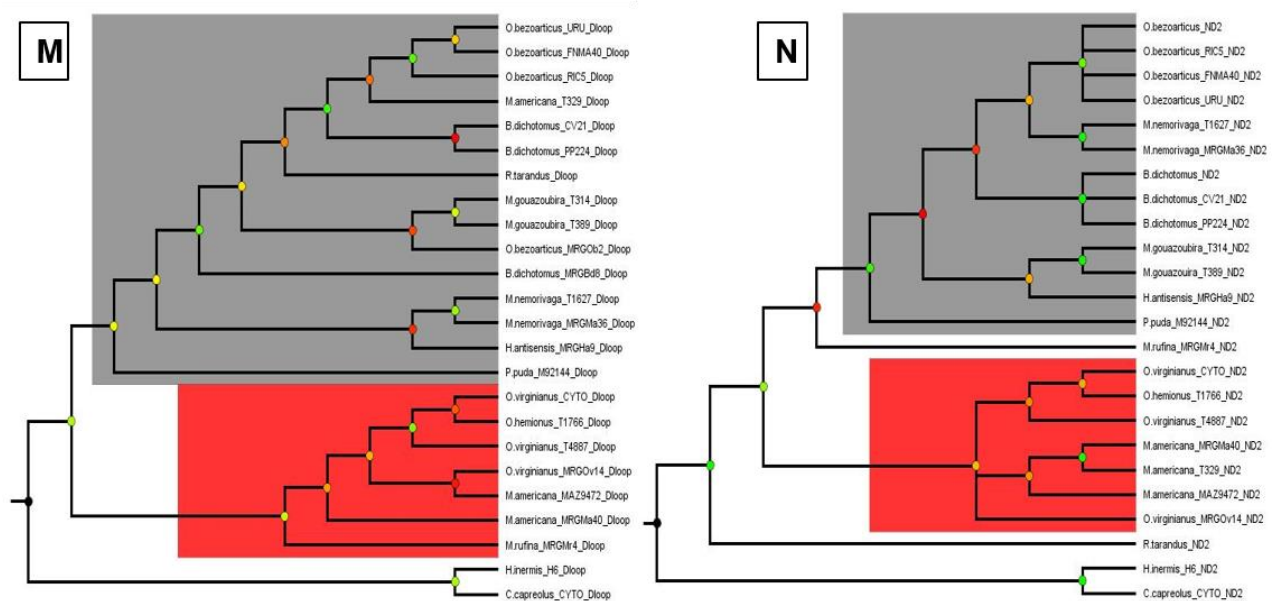


Figura 5. Comparação das hipóteses filogenéticas da tribo Odocoileini (Capreolinae: Cervidae) a partir dos fragmentos das regiões Dloop_F (M), ND2_F (N). As cores nas árvores destacam as subtribos Odocoileina (vermelho) e Blastocerina (cinza). A cor do nó indica os intervalos dos valores de probabilidade posterior (PP) e *bootstrap* (BTS), sendo verde para PP/BTS > 0.9/90, amarelo para PP/BTS > 0.8/80, laranja para PP/BTS > 0.7/70 e vermelho para PP/BTS < 0.7/70.

As hipóteses A, C, D, G, J, K, M e N dividem com alto suporte (PP/BTS > 0.9/90) as subtribos Odocoileina e Blastocerina. As hipóteses E e N também possuem alto suporte, mas não inclui *Mazama rufina* no clado Odocoileina. A hipótese H também divide as subtribos, porém com suporte PP/BTS < 0.9/90, assim como as hipóteses B e F com suporte PP/BTS < 0.8/80 para a divisão. As hipóteses I e L não dividem as subtribos, uma vez que a I não recupera os clados e a L recupera uma politomia da tribo Odocoileina.

Em relação ao clado Blastocerina as hipóteses B, D, E, G, I, J, K e N recuperam os gêneros da subtribo com alto suporte (PP/BTS > 0.9/90), no entanto a hipótese I recupera *M. nemorivaga* com suporte PP/BTS > 0.8/80. Já as hipóteses A, C e F não agrupam todos os indivíduos dos gêneros *Blastocerus* e *Ozotocerus* e na C e M, com baixo suporte (PP/BTS < 0.7/70), há um indivíduo de *M. americana* como irmão dos *Blastocerus* na C e irmão dos *Ozotocerus* na M. A hipótese L recupera os gêneros com suportes PP/BTS > 0.9/90 e *M. nemorivaga* com suporte PP/BTS > 0.7/70, porém em clados politômicos.

No clado *Odocoileina* as hipóteses A, B, D, F, G, e J recuperam os gêneros da subtribo com alto suporte (PP/BTS > 0.9/90). As hipóteses C, E, H, K e M só agrupam o gênero *Odocoileus* com alto suporte (PP/BTS > 0.9/90). A hipótese I não recupera os gêneros da subtribo em clados e as hipóteses L e N agrupam os gêneros com suportes abaixo de PP/BTS < 0.8/80.

Os resultados apontam que todos os marcadores analisados possuem sinal filogenético relevantes e potencialmente informativos. Quanto às hipóteses filogenéticas, D, G e J possuem alto suporte e topologia coesa para divisão das subtribos e agrupamento de seus gêneros.

4. Discussão

Avaliamos o sinal filogenético das regiões selecionadas do mtDNA promissoras para estudos filogeográficos em cervídeos. Nos resultados observamos que todos os marcadores possuem sinal filogenético relevantes e potencialmente informativos para os estudos, sendo o gene ND5 e CytB com os maiores valores de sinal filogenético.

Esse resultado pode ser explicado pelas regiões genicas escolhidas como marcadores, as quais possuem regiões polimórficas e conservadas que possibilitam boas amplificações das sequências alvo e recuperam informações filogeneticamente importantes, como mutação, inserção e deleção.

As topografias recuperadas na maioria das hipóteses filogenéticas são semelhantes às encontradas por Hassanin et al. (2012), Zurano et al. (2019) e Heckberg (2020), reforçando assim a capacidade dos marcadores testados nas reconstruções filogenéticas, principalmente os marcadores das matrizes ND5i, CytBc e CytB305, uma vez que, os trabalhos supra citados utilizam do genoma mitocondrial dos indivíduos nas filogenias.

A polifilia do gênero *Mazama* observada por Gilbert et al. (2006), Duarte, González e Maldonado (2008) e Hassanin et al. (2012) e do gênero *Odocoileus* por Hassanin et al. (2012) também foi retratada em nossas hipóteses filogenéticas, corroborando com os dados sobre sinal filogenético descritos acima.

Por fim, estudos com mais de um indivíduo por espécie e que contenham representantes de todos os gêneros da tribo *Odocoileini* podem analisar o potencial informativo dos marcadores mitocondriais ao nível de gêneros monofiléticos e seus grupos irmão. Auxiliando assim, novas pesquisas taxinômicas e moleculares em

cervídeos, como obtenção e identificação de DNA das amostras depositadas em museu, amostras não invasivas e em amostras coletadas nos estudos filogeográficos.

5. Conclusões

Todos os marcadores mitocondriais possuem sinal filogenético maiores que 80% e são potencialmente informativos para os estudos filogenéticos da tribo Odocoileini, principalmente para definição das subtribos e alguns marcadores para separação dos gêneros. Os marcadores das matrizes ND5i, CytBc e CytB₃₀₅, foram os que recuperaram as melhores hipóteses filogenéticas da tribo.

6. Referências

- CAPARROZ, R. et al. Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. Brasil: **Genetics and Molecular Biology**, 338-345 p. 2015.
- DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 17–22 p. 2008.
- DUARTE, J. M. B., GONZALEZ, S. Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal: **FUNEP e IUCN**, 394p, 2010.
- FIGUEIREDO, M. G. Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*). UNESP / Campus Jaboticabal: Molecular Ecology Resources, 2014. 57 p. Tese (Doutora em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.
- FRANKHAM, R. Challenges and opportunities of genetic approaches to biological conservation. **Biological Conservation**. 2010.
- FRASER, D. J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation: Towards a unified concept for defining conservation units. **Mol. Ecol.** 2001
- GAINETT, G.; DIAS, P.; MONTESINOS, R. Metodologia da Inferência Filogenética, 2017.
- GILBERT, C.; ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 40:101-117, 2006.
- GONZÁLEZ, S, et al. Population Structure of mtDNA Variation due to Pleistocene Fluctuations in the South American Maned Wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815): Management Units for Conservation. **Journal of Heredity**, 2015.

HASSANI, A. et al. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *C. R. Biologies* 335, 2012.

HECKBERG N. S, ERPENBECK D, GERT WÖRHEIDE G, ROSSNER G. E. Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ**. 2016.

HECKBERG N. S. The systematics of the Cervidae: a total evidence approach. **PeerJ**. 2020.

KOHN, M. H. et al. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Science*, London, 1999.

LANFEAR, R., FRANSEN, P. B., WRIGHT, A. M., SENFELD, T., CALCOTT, B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular biology and evolution**. 2016.

ROCHA, P. K. L. Qual região do DNA mitocondrial reflete a história evolutiva da ordem Lepidoptera?. 2013. Dissertação (Mestre em Genética) - Universidade Federal de Pernambuco, [S. I.], 2013.

SAKAMOTO, T. Ferramentas para análise filogenética e de distribuição taxonômica de genes ortólogos. Tese (Doutora em Bioinformática) - Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, Belo Horizonte, 2016.

TELLES, M. P. C. et al. Avaliação do padrão de amplificação de marcadores rapd em bandos de queixada (*Tayassu pecari*) do Parque Nacional das Emas. [S.I.]: **Ciência Animal Brasileira**, 7-14 p. 2003.

ZURANO J. P, et al. Cetartiodactyla: updating a time-calibrated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 2019.

CAPITULO 3 - Perspectiva populacional de marcadores mitocondriais em *Mazama gouazoubira* (Fisher, 1814)

Resumo

A espécie *Mazama gouazoubira* ocupa todos os biomas brasileiros, exceto a Amazônia. Ela apresenta uma alta diversidade haplotípica, variações ecológicas, regionais e individuais, como padrão de coloração e tamanhos corporais diversos. Pela sua ampla distribuição e variação morfológica, esta espécie é um excelente modelo para examinar os padrões de variação genética e explorar se os padrões de diferenciação genética populacional estão correlacionados com a distribuição histórica e ecológica. Sendo assim, analisamos um conjunto de marcadores mitocondriais expressivos, que caracterizarão melhor essa diversidade. A partir dos 17 representantes de *Mazama gouazoubira*, montamos e alinhamos as 14 matrizes das regiões e seus fragmentos (CytB, Dloop, ND5, ND2 e a Concatenada dos quatro). Investigamos índices de diversidade genética (número de haplotipos, diversidade haplotípica e diversidade nucleotídica) e as relações hierárquicas entre os haplótipos no software NETWORK. Os resultados mostraram que todos os marcadores mitocondriais com maior diversidade genética são ambos do Dloop, o fragmento do ND2 241 pb, gene ND2 e o fragmento ND5 224 pb.

Palavras-chave: População; mtDNA; haplótipos.

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mazama* tem a maior distribuição geográfica entre os cervídeos neotropicais, ocupando desde centro sul do México ao norte da Argentina (ROSSI, 2000). As espécies do gênero têm hábito solitário e juntamente com *Pudu* são cervídeos neotropicais de pequeno a médio porte, com chifres simples e adaptados para a movimentação em ambientes florestais e savanas arbóreas (EINSERBERG, 2000; DUARTE; GONZALES, 2010).

A espécie *Mazama gouazoubira* possui grande amplitude de distribuição geográfica e diversidade de habitats, sua distribuição abrange regiões da Argentina, Bolívia, Uruguai, Paraguai e Brasil, não ocorrendo apenas na região Amazônica (PINDER; LEEUWENBERG, 1997, BLACK-DÉCIMA et al., 2010). Inúmeras variações de coloração são observadas conforme a região de ocorrência (ROSSI, 2000; BLACK-DÉCIMA et al., 2010). Variações de tamanho também são observadas, sendo que, os veados-catingueiro provenientes do sul do Brasil são maiores que os do nordeste (DUARTE; JORGE, 1996).

Pela sua ampla distribuição e variação morfologia esta espécie é um excelente modelo para examinar os padrões de variação genética e explorar se os padrões de diferenciação genética populacional estão correlacionados com a distribuição histórica e ecológica. Devido à dificuldade de visualizar os animais e captura-los, usualmente utiliza-se de material depositado em museu e/ou coleta de material não invasivo, como fezes na natureza.

O desenvolvimento de métodos para a obtenção de DNA a partir de amostras coletadas de forma não invasiva, principalmente de fezes, permitiu aos pesquisadores obtenção de informações em nível individual e populacional (KOHN et al. 1999). No entanto o DNA fecal está geralmente degradado devido à exposição ambiental e possui inúmeros inibidores de PCR. Tendo como alternativas para driblar esses problemas protocolos para armazenamento / extração de DNA e os iniciadores (primers) específicos para cada espécie, os quais reduzem o risco de amplificação de fragmentos não específicos, de DNA externo de humanos, alimentos ou bactérias, além de levar em consideração o tamanho do locus amplificado, posto que, quanto mais pares de base maior é a dificuldade de amplificação na reação de PCR.

Um estudo de relações filogenéticas de *M. gouazoubira* no Brasil, constatou uma subdivisão em cinco clados com distribuição simpátrica em sua maioria

(FIGUEIREDO, 2014), corroborando com a alta diversidade haplotípica detectada por Duarte; González e Maldonado (2008).

Em um estudo com enfoque populacional Aristimuño (2013) analisou espécimes do Uruguai, Brasil, Paraguai, Argentina e Bolívia, através da análise da região controle do DNA mitocondrial (D-loop 159 pb), relatando altos níveis de variabilidade genética e baixos níveis de diferenciação geográfica. Bidegaray et al. (2003) e Elizondo (2010) encontraram resultados parecidos com um fragmento do gene do CytB (423 pb e 480 pb, respectivamente).

Com a expressiva diversidade haplotípica populacional da espécie e uma grande diversidade geográfica, tem-se a necessidade de investigar regiões geográficas não analisadas, para conhecer toda a amplitude genética de *M. gouazoubira*, por isso, necessita-se de um conjunto de marcadores expressivos que caracterizarão melhor essa diversidade. Para tanto, partiremos da hipótese de que os fragmentos gênicos selecionados possuem informações de diversidade genética muito similares as das regiões mitocondriais inteiras.

2. Material e Métodos

2.1. Produção de sequências: Extração, Amplificação e Sequenciamento das amostras

Elegemos quatro sequências de CytB depositadas no Genbank e os genomas mitocondriais completo de *M. gouazoubira* (KJ772514 e JN632658), que foram utilizados para as análises (Tabela 1). Não existem sequências isoladas dos genes ND5 e ND2 de *M. gouazoubira* depositadas no Genbank, sendo, portanto, necessária à amplificação de sequências destas regiões para o presente estudo. Para isso, produzimos 15 sequências para ND5, ND2 e D-loop e 11 para CytB.

Tabela 1. Lista de sequências do mtDNA de *M. gouazoubira* existentes no Genbank com número de acesso, tamanho das sequências, regiões, referências e localidades dos animais.

Região	Tamanho das sequências (pb)	Referências	Voucher Nupecce	Sexo	Origem	Número de acesso
CytB*	1139	CAPARROZ et al., 2015	T314	F	Pantanal-Brasil	KJ772514
ND5*	1820	CAPARROZ et al., 2015	T314	F	Pantanal-Brasil	KJ772514
ND2*	1041	CAPARROZ et al., 2015	T314	F	Pantanal-Brasil	KJ772514
D-loop*	708	CAPARROZ et al., 2015	T314	F	Pantanal-Brasil	KJ772514
CytB*	1139	HASSANIN et al., 2012	MRGMsp2		Colombia	JN632658
ND5*	1820	HASSANIN et al., 2012	MRGMsp2		Colombia	JN632658
ND2*	1041	HASSANIN et al., 2012	MRGMsp2		Colombia	JN632658
D-loop*	708	HASSANIN et al., 2012	MRGMsp2		Colombia	JN632658
CytB	985	DUARTE et al., 2016	T069	M	Rio Branco do Sul-PR/Cativeiro	DQ789229
CytB	985	DUARTE et al., 2016	T101	F	Palmas-PR/Cativeiro	DQ789200
CytB	985	DUARTE et al., 2016	T112	M	Bebedouro-SP/Cativeiro	DQ789202
CytB	985	DUARTE et al., 2016	T113	F	Pitangueiras-SP/Cativeiro	DQ789203

*Sequência retirada do genoma mitocondrial completo.

Perante o exposto, amostras de pelo de 15 exemplares de *M. gouazoubira* do banco de amostras do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (FCAV, UNESP) tiveram seu DNA extraído, segundo protocolo de fenol-clorofórmio (SAMBROOK et al., 1989) (Tabela 2).

Tabela 2. Identificação e localidade dos animais utilizados para obtenção das regiões mitocondriais selecionados. Foram selecionadas amostras de representantes dos cinco clados de *M. gouazoubira* citados por Figueiredo (2014).

Voucher Nupecce	Origem
T141	Paraíba - Brasil
T147	Bahia - Brasil
T48	Espirito Santo - Brasil
T386	São Paulo - Brasil
T112	Bebedouro-SP/Cativeiro
T113	Pitangueiras-SP/Cativeiro
T069	Rio Branco do Sul-PR/Cativeiro
T101	Palmas-PR/Cativeiro
T115	Goiás - Brasil
T126	Goiás - Brasil
T303	Pantanal - Brasil
T82	Rio Grande do Sul - Brasil
T91	Rio Grande do Sul - Brasil
T377	Neótipo - Paraguai
T389	Topótipo - Paraguai

Os iniciadores descritos na Tabela 3 foram utilizados para amplificação por meio da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR). As condições da reação foram padronizadas para um volume final de 30µl (28µl de mix e 2µl de DNA aproximadamente com 45ng/µl), seguindo as seguintes concentrações dos reagentes: 0,6 mM de dNTP; 0,5 pM de cada iniciador (forward/ reverse); 1x tampão de reação; 3 mM de MgCl₂, 1U de DNA Taq polimerase (tampão, MgCl₂ e Taq polimerase GoTaq® DNA Polymerase, Promega); 1,7 µg/µL de BSA; água ultrapura qsp 25,0 µl.

Tabela 3. Lista com os primers utilizados na amplificação das regiões do DNA mitocondrial de *M. gouazoubira* (Fisher, 1814).

Região	Identificação	Iniciador	Amplicon (pb)	Temperatura pareamento	Referências
ND5	Leu11775 ND512427	5'GGTGCAACTCCAAATAAAAG3' 5'TTTTCCRGTTGCAGCTARTG3'	690	58°C	CAPARROZ et al. (2015)
ND5	ND512326 ND512988	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3' 5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'	690	58°C	CAPARROZ et al. (2015)
CytB	L14724 H15149	5'CGAGATCTGAAAAACCATCGTTG 3' 5'AACTGCAGCCCCTCAGAATGATA TTTGTCTCA3'	480	50°C	IRWIN et al. (1991)
CytB	FAR-L FAR-H	5'CCATGAGGACAAATATCATTCTG AT3' 5'TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTT CA3'	660	55°C	DUARTE et al. (2008)
D-loop	Thr- L15926 DL-H16340	5'CAATTCCCCGGTCTTGTAACCC3' 5'CCTGAAGTAGGAACCAGATG3'	660	55°C	VILÀ et al. (1999)
ND2	ND2A_F ND2A_R	5' CATACCCCGAAAATGTTGGT3' 5' GTACGGATATGGGTGCCAGT3'	463	58°C	atual
ND2	ND2B_F ND2B_R	5' CTGGCACCCATATCCGTACT3' 5' GCTTTGAAGGCTCTTGGTCT3'	675	58°C	atual

A reação de PCR foi realizada pelo termociclador Bio-rad C-1000 Touch® ThermalCycler, sob as seguintes condições: um passo inicial de 94 ° C durante 2 min seguido de 36 ciclos de (1) 94 ° C durante 45 segundos, (2) temperatura de pareamento ° C durante 45 segundos, (3) 72 ° C durante 50 segundos e, ao final, uma extensão a 72 ° C durante 5 min.

A amplificação das regiões de interesse foi confirmada por meio da visualização do produto da PCR por eletroforese em gel de agarose 2%. Os produtos da PCR foram purificados pelo kit *Wizard SV Gel and PCR Clean Up System* (Promega) e submetidos a sequenciamento no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da FCAV/UNESP-Jaboticabal.

2.2. Análises *in silico*

A partir dos dois mitogenomas, houve uma comparação das sequências para eleição das regiões conservadas, usadas posteriormente como sítio de reconhecimento dos primers (anealling), utilizados para amplificação do gene inteiro para a construção das matrizes do gene ND2. No caso do CytB, ND5 e D-loop foram testados os primers para mtDNA já disponíveis na literatura (Tabela 3).

Após a obtenção das 17 sequências completas e alinhadas das regiões mitocondriais, iniciou-se a produção *in sílica* das matrizes com fragmentos menores dessas regiões (Tabela 4)

Tabela 4. Características dos primers utilizados para construção das matrizes dos fragmentos das regiões.

Região	Identificação	Iniciador (5'-3')	Amplicon (pb)	Temperatura pareamento	Fonte
ND5	ND5 F ND5 R	TGTCACATGGTCCATCATAG GCAGAGCTGCTGTGTTT	224	58°C	Não publicado
ND5	ND5_252_F ND5_252_R	CTCTACATCCAGTCAATTAGGC CCAGTAAGAAAAGGCATTCTG	252	58°C	atual
Cytb	IDMAZ224L IDMAZH	CATCCGACACAATAACAGCA TCCTACGAATGCTGTGGCTA	224	52°C	GONZÁLEZ et al 2009
Cytb	Cit305 F Cit305 R	CCATCAGACGCAGACAAA GCGTTGTTTAGATGTGTGAAG	305	52°C	LEANDRO, 2019*
D-loop	D-loop F D-loop R	GCGGCATGGTAATTAAGCTC CATTACATTATATGCCCCATGC	479	56°C	Não publicado
ND2	ND2A_F ND2A_R	ACCCAATCAACAGCCTCAAT GTACGGATATGGGTGCCAGT	241	58°C	atual

*Relatório Científico Final FAPESP processo 2017/26529-9.

As sequências de cada região foram alinhadas, separadamente, pelo software BioEdit (HALL, 1999) com o método de alinhamento múltiplo progressivo (*ClustalW*) (THOMPSON et al., 1994), e ajustadas manualmente.

Após o alinhamento das matrizes das regiões mitocondriais, iniciou-se a produção *in sílica* das matrizes concatenadas, através do aplicativo Mesquite 3.61 (MADDISON; MADDISON, 2019), e das matrizes dos fragmentos das regiões (Tabela 5), as quais tiveram seu tamanho definido pelos amplicons dos primers disponíveis para cada região. (Tabela 4)

Tabela 5. Matrizes para as análises das regiões filogeneticamente informativas. i = região inteira, c = concatenado dos fragmentos da região, F = fragmento da região.

Matrizes	Tamanho em pares de base (pb)
CytB _i	1060
CytB _c	529
CytB _{F305}	305
CytB _{F224}	224
Dloop _i	693
Dloop _F	479
ND5 _i	1821
ND5 _c	476
ND5 _{F251}	251
ND5 _{F224}	224
ND2 _i	1160
ND2 _F	241
Concatenada _i	4726
Concatenada _F	1724

2.3. Análises populacionais

Para cada matriz foram analisados alguns índices de diversidade genética através do software DNAsp versão 5.10.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009). Os índices analisados foram: número de haplotipos (h), diversidade haplotípica (Hd), que estima a probabilidade de amostrarmos dois haplótipos do total amostral e estes serem diferentes, variando entre 0 e 1, sendo que quanto mais próximo de 1, maior a diversidade entre os haplótipos analisados; diversidade nucleotídica (π), que representa o número médio de diferenças entre duas sequências (por sítio) retiradas ao acaso da amostra total.

As relações hierárquicas entre os haplótipos foram observadas a partir de redes de haplótipos geradas pelo software NETWORK v.10.2 (ROHL, 2000), o qual é baseado na implementação do algoritmo median-joining, gerando uma árvore (minimum spanning tree) e adiciona os intermediários ausentes usando o algoritmo de máxima parcimônia de Farris (BANDELT et al., 1999).

3. Resultados

3.1. Análises populacionais

Para investigar a diversidade genética populacional das regiões selecionadas do mtDNA analisamos os índices de diversidade: número de haplotipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π) (Tabela 6).

Tabela 6. Diversidade genética das matrizes de *M. gouazoubira*. número de haplotipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica (π). i = região inteira, c = concatenado dos fragmentos da região, F = fragmento da região.

Matrizes	h	Hd	π
CytB _i	15	0,9850	0,00887
CytB _c	15	0,9853	0,00887
CytB _{F305}	14	0,9779	0,00721
CytB _{F224}	12	0,9559	0,00700
Dloop _i	17	1	0,02895
Dloop _F	17	1	0,03802
ND5 _i	17	1	0,01053
ND5 _c	15	0,9779	0,00976
ND5 _{F251}	7	0,5956	0,00748
ND5 _{F224}	11	0,9412	0,01267
ND2 _i	16	0,9926	0,01376
ND2 _F	10	0,9044	0,01604
Concatenada _i	17	1	0,01281
<u>Concatenada_F</u>	17	1	0,01438

Todas as regiões inteiras e fragmentos concatenados apresentaram diversidade haplotípica (maior que 0,9) e também os maiores números de haplotipos de 15 a 17. As duas matrizes do D-loop, as Concatenadas e ND5_i possuem a maior Hd = 1. Já os fragmentos de CytB e ND5 tiveram os menores números de haplotipos, porém só ND5_{F251} possui um Hd abaixo de 0,9.

Em relação a diversidade nucleotídica as matrizes do gene ND2 e ND5_{F224} se mostraram tão diversas (acima de 0,01000) como a observada nas matrizes com Hd = 1. As matrizes que apresentam as menores π são ND5_{F251}, CytB_{F305} e CytB_{F224} (respectivamente π = 0,00748, 0,00721 e 0,00700).

Os resultados apontam que tamanho da região (pb), diversidade haplotípica e nucleotídica não são dependentes entre si. A matriz com maior tamanho e Hd pode não possuir a maior π .

Para observar as relações hierárquicas entre os haplótipos foram construídas redes de haplótipos das diferentes regiões geográficas amostradas da América do Sul onde ocorre a espécie *M. gouazoubira* (Figuras 1 a 4)

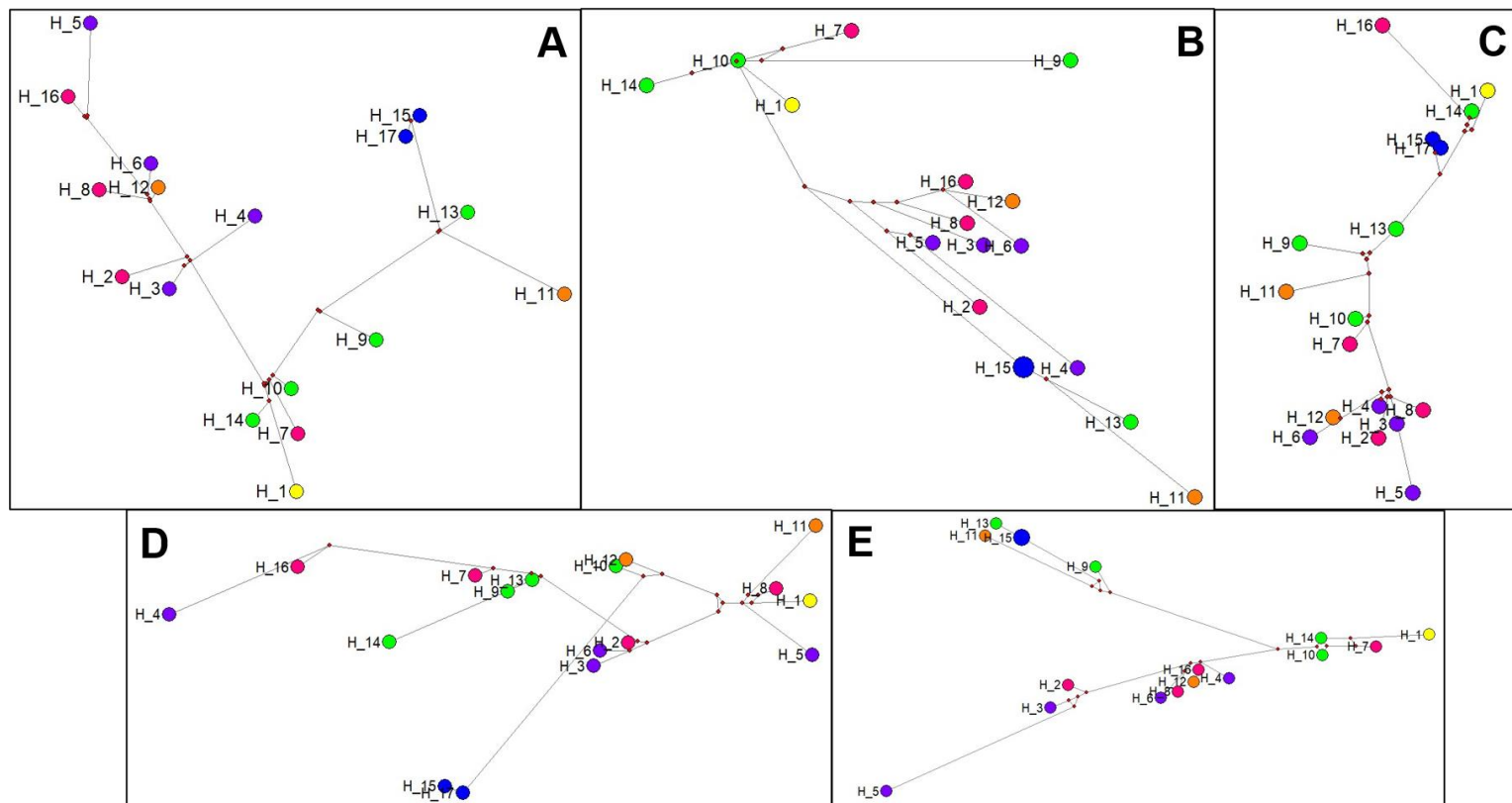


Figura 1. Diagrama do “Median Joining Network” da espécie *M. gouazoubira*, a partir das matrizes Concatenada (A), CytBi (B), Dloopi (C) e ND5i (D) e ND2i (E). O diagrama ilustra as relações entre haplótipos e frequência observada dos indivíduos das diferentes regiões geográficas. Em laranja são os indivíduos do nordeste brasileiro, em verde do centro oeste, rosa do sudeste, roxo do sul, azul do Paraguai e amarelo da Colômbia. O comprimento do ramo corresponde à distância genética entre os haplótipos. Tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de amostras em cada haplótipo.

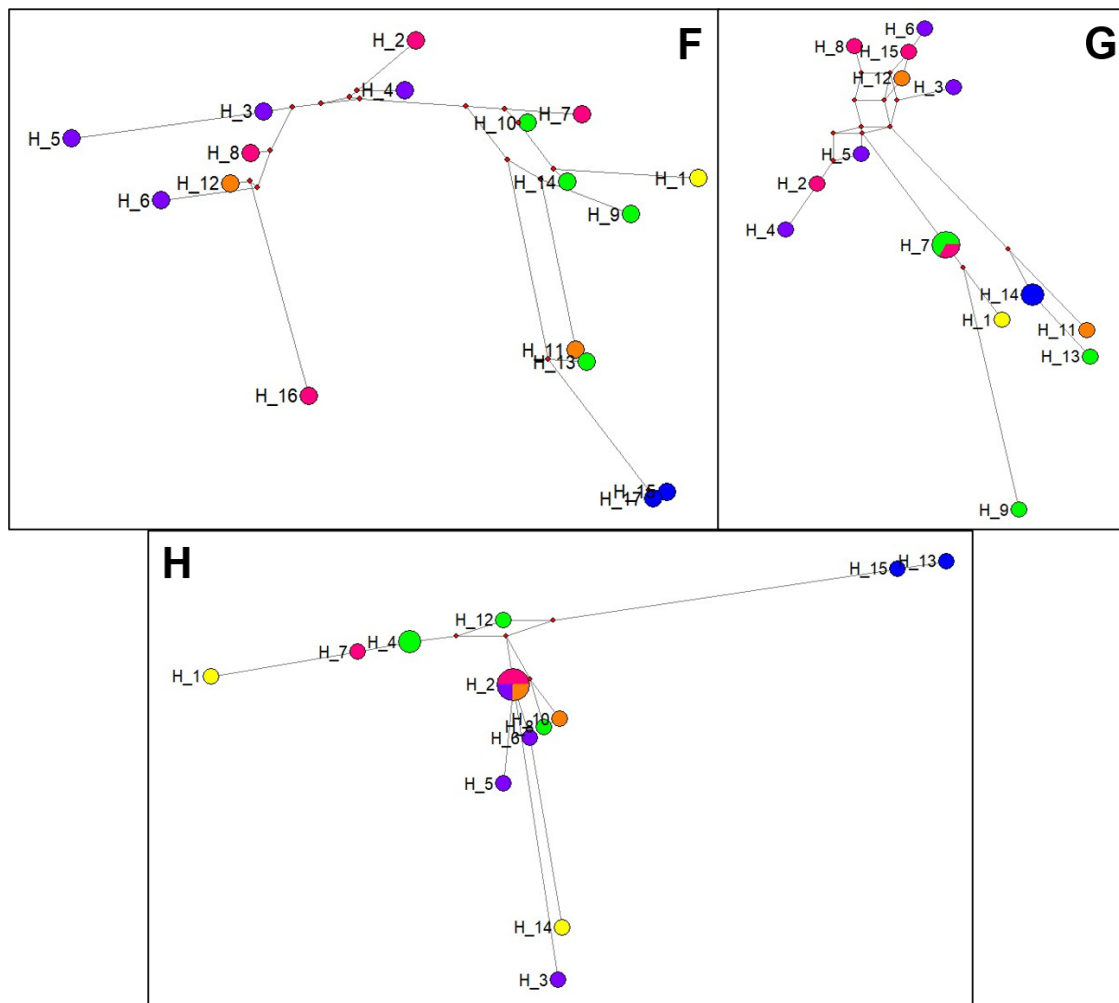


Figura 2. Diagrama do “Median Joining Network” da espécie *M. gouazoubira*, a partir das matrizes Concatenada (F), CytBc (G), e ND5c (H). O diagrama ilustra as relações entre haplótipos e frequência observada dos indivíduos das diferentes regiões geográficas. Em laranja são os indivíduos do nordeste brasileiro, em verde do centro oeste, rosa do sudeste, roxo do sul, azul do Paraguai e amarelo da Colômbia. O comprimento do ramo corresponde à distância genética entre os haplótipos. Tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de amostras em cada haplótipo.

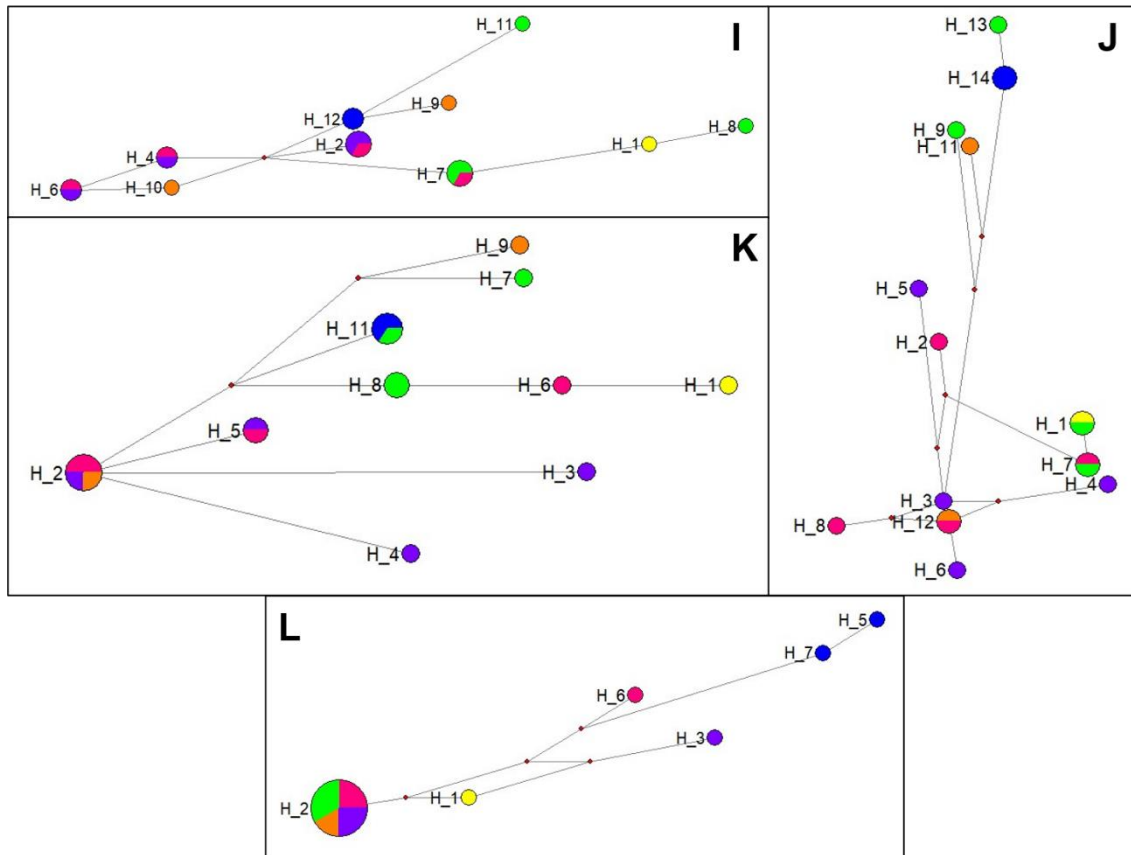


Figura 3. Diagrama do “Median Joining Network” da espécie *M. gouazoubira*, a partir das matrizes CytB224 (I), CytB305 (J), ND5224 (K) e ND5251 (L). O diagrama ilustra as relações entre haplótipos e frequência observada dos indivíduos das diferentes regiões geográficas. Em laranja são os indivíduos do nordeste brasileiro, em verde do centro oeste, rosa do sudeste, roxo do sul, azul do Paraguai e amarelo da Colômbia. O comprimento do ramo corresponde à distância genética entre os haplótipos. Tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de amostras em cada haplótipo.

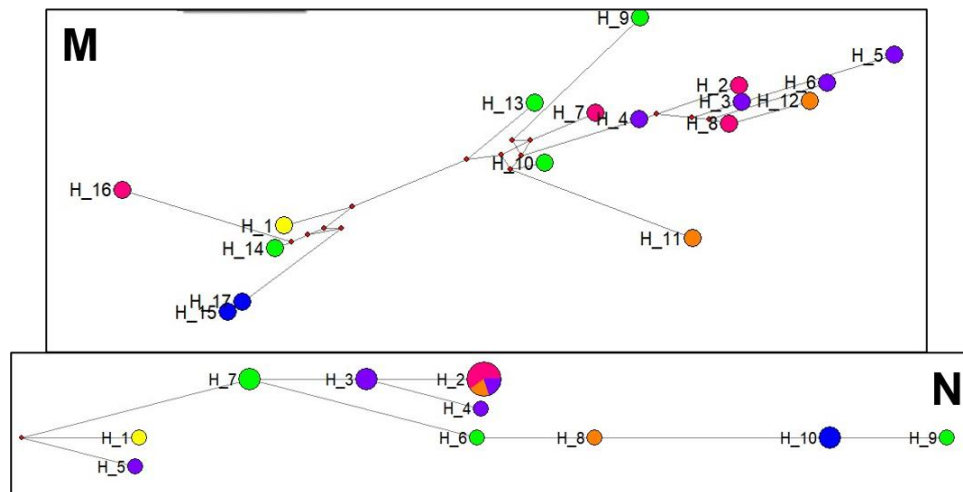


Figura 4. Diagrama do “Median Joining Network” da espécie *M. gouazoubira*, a partir das matrizes Dloop_F (M), ND2_F (N). O diagrama ilustra as relações entre haplótipos e frequência observada dos indivíduos das diferentes regiões geográficas. Em laranja são os indivíduos do nordeste brasileiro, em verde do centro oeste, rosa do sudeste, roxo do sul, azul do Paraguai e amarelo da Colômbia. O comprimento do ramo corresponde à distância genética entre os haplótipos. Tamanho dos círculos é proporcional à quantidade de amostras em cada haplótipo.

Os diagramas resultantes das matrizes de primers menores que 300 pb apresentam maior compartilhamento de haplótipos entre as regiões.

Nas redes de haplótipos a correspondência entre diversidade nucleotídica e as relações entre os haplótipos tornou-se evidente. Quanto menor é a diversidade nucleotídica, mais relações os haplótipos possuem. Assim como a diversidade nucleotídica e haplotípica.

Em todos os diagramas os haplótipos do Paraguai estão sempre próximos. O mesmo ocorre com os haplótipos da região sul do Brasil nos diagramas B, C, D, H e L. Os haplótipos das regiões sul e sudeste do Brasil tendem a ficar próximos. Já os haplotipos da região nordeste tendem a ficar distantes.

4. Discussão

Nós analisamos se as regiões genicas menores que 300 pb possuem informações de diversidade genética similares as das regiões inteiras. Nos resultados observamos que as informações de diversidade genética dependem mais do local analisado dos genes do que o tamanho em pares de base.

Os resultados permitem inferir as regiões com maior variabilidade genética. Para o gene CytB é o fragmento de 305 pb, para o ND5 é o fragmento de 224 pb, o fragmento do Dloop possui maior π que a região inteira, o mesmo pode ser observado no gene ND2.

A variabilidade parece estar bem distribuída entre as localidades, fato que é corroborado pela alta diversidade haplotípica, pelas redes haplotípicas e pelos resultados de Figueiredo (2014), no qual constatou uma subdivisão de *M. gouazoubira* em cinco clados com distribuição simpátrica em sua maioria.

Essa conexão espacial foi relatada por Aristimuño (2013) em espécimes do Uruguai, Brasil, Paraguai, Argentina e Bolívia, através de um estudo com enfoque populacional da região controle do DNA mitocondrial (D-loop 159 pb), no qual relatou altos níveis de variabilidade genética e baixos níveis de diferenciação geográfica. Bidegaray et al. (2003) e Elizondo (2010) encontraram resultados parecidos com um fragmento do gene do CytB.

Quando a matriz apresenta alta diversidade nucleotídica, terá maior sensibilidade para agrupar os indivíduos e detectar haplótipos exclusivos. Podendo conter informações sobre eventos evolutivos mais recentes daquela região genica, sendo recomendados para estudos de diversidade intra-específica.

Estudos com mais indivíduos nas regiões geográficas com ocorrência de *M. gouazoubira* devem ser feitos, pois ainda temos poucas ou nenhuma amostra de algumas dessas regiões, que pode ser resolvido através da amostragem não invasiva e dos marcadores mitocondriais. Para enfim entendermos mais a fundo a relação dos marcadores mitocondriais com a diferenciação geográfica dessas regiões.

5. Conclusão

As informações de diversidade genética são mais dependentes do local gênico analisado, do que do tamanho dos marcadores mitocondriais, sendo assim, fragmentos de região podem apresentar resultados de diversidade genética similares ao da região inteira, como o fragmento do ND5 de 224 pb e o fragmento do ND2 .

6. Referências

ARISTIMUÑO, M. P. Variabilidad genética em poblaciones de *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae Fisher, 1814) de Uruguay y la región. Bachelor dissertation. Facultad de Ciencias, Universidad de la República Oriental del Uruguay. 2013.

BIDEGARAY, L, et al. Variabilidad genética en *Mazama gouazoubira* (MAMMALIA: CERVIDAE). IV Taller de Cérvidos del Uruguay-VII Jornadas de Zoología del Uruguay. **Sociedad Zoológica del Uruguay**. P. 173, 2003.

BLACK-DÉCIMA, P. et al. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). Pp. 190-201. In: **Neotropical cervidology: Biology and medicine of Latin American deer** (Duarte, J.M.B.; González, S., Eds.) FUNEP/IUCN, Jaboticabal, Brasil e Gland, Switzerland, 393 p. 2010.

DUARTE J. M. B, JORGE W. Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**. 1996.

DUARTE, J. M. B., GONZALEZ, S. Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal: **FUNEP e IUCN**, 394p, 2010.

EISENBERG, J.F. The contemporary Cervidae of Central and South America. In: Vrba, E.S., Shaller, G.B. (Eds.). **Antelopes, Deer, and Relatives**. London: Yale University Press, 2000.

ELIZONDO, C. Estudio de la variabilidad genética del *Mazama gouazoubira* (Mammalia: Cervidae) Fischer, 1814. Dissertação de Mestrado, Departamento de Genética, Laboratorio de Genética de la Conservación, IIBCE - Facultad de Ciencias, Udelar. Montevideo, Uruguay, 2010.

FIGUEIREDO, M. G. Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*). UNESP / Campus Jaboticabal: Molecular Ecology Resources, 2014. 57 p. Tese (Doutora em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2014.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado Catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fisher, 1814). 42-58 p. In: **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama** (Duarte, J. M. B., Ed.) FUNEP, Jaboticabal, Brasil. 1997.

ROSSI, R. V. Taxonomia de *Mazama* (Rafinesque, 1817) do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). Tesis de Maestría, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2000.

ROZEN S, SKALETISKY H. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. **Bioinformatics Methods and Protocols**. Totowa, NJ: Humana Press; pp. 365–386, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH E.; MANIATIS T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Press**, New York. 1989.

CAPÍTULO 4 - Potencial de amplificação de marcadores mitocondriais de *Mazama gouazoubira* em DNA fecal

Resumo

A espécie *Mazama gouazoubira* ocupa todos os biomas brasileiros, exceto a Amazônia. Ela apresenta uma alta diversidade haplotípica, variações regionais, ecológicas e individuais de coloração. Análises genéticas são importantes, já que, fornecem informações valiosas para a determinação da existência de estruturação populacional e, conseqüentemente, unidades evolutivamente significativas distintas dentro de toda sua área de ocorrência. Para cervídeos, devido à dificuldade de captura, o DNA fecal se apresenta como ferramenta importante para o estudo de suas populações. As características desse DNA dificultam o uso de marcadores nucleares, permanecendo o DNA mitocondrial como a opção mais viável para este tipo de matriz biológica. Sendo assim, comparamos diferentes tamanhos de amplicons do mtDNA em 100 amostras de fezes de *M. gouazoubira* do banco de amostras do NUPECCE, sendo testada a capacidade de amplificação para os diferentes marcadores mitocondriais: CytB (660, 480, 305 e 224 pares de base (bp)), ND5 (669, 669, 252 e 224 bp), ND2 (675, 463 e 241 bp) e D-loop (660 e 479 bp). Os resultados mostraram que os primers de 224 e 252 bp do ND5, 480, 305 e 224 bp do CytB e os três do ND2 tiveram uma amplificação maior que 70%, já os de 669 bp do ND5 e 660 do CytB foram menores que 40%. Os primers do D-loop amplificaram menos que 10% das amostras. Os resultados mostram que os amplicons menores tem maior facilidade de amplificação no material fecal e que sua concatenação pode gerar um marcador de importância para análises filogenéticas em cervídeos.

Palavras-chave: Amplificação; DNA fecal; Cervídeos.

1. Introdução

O gênero *Mazama* tem a maior distribuição geográfica entre os cervídeos neotropicais, ocupando desde centro sul do México ao norte da Argentina (ROSSI, 2000). Seus representantes são cervídeos de pequeno porte, com chifres simples e adaptados para a movimentação em ambientes florestais e savanas arbóreas (DUARTE; GONZALES, 2010). A IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza) reconhece dez espécies de *Mazama*: *M. americana*, *M. bororo*, *M. bricenii*, *M. chunyi*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. pandora*, *M. rufina* e *M. temama*.

Para cervídeos, devido à dificuldade de captura, a amostragem tradicional não apresenta resultados positivos, pois obtiveram poucas amostras e com falha na distribuição geográfica da espécie. Nesse cenário o DNA fecal se apresenta como ferramenta importante para o estudo de suas populações. A utilização de amostras fecais é facilitada pelo uso de cães treinados, como foi mostrado no estudo feito por Oliveira et al. (2012). As fezes são um dos materiais não invasivos mais utilizados, detendo uma poderosa fonte de informações sobre os animais, as quais vão desde a genética até a endocrinologia (OLIVEIRA; DUARTE, 2013).

A coleta de amostras fecais tem permitido amplas amostragens e o DNA mitocondrial (mtDNA) tem se mostrado viável de ser amplificado (OLIVEIRA; DUARTE 2013; DUARTE et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2019). Além da fácil amplificação, o DNA mitocondrial apresenta como características o alto polimorfismo, taxa de mutação mais alta que o DNA nuclear, uma herança uniparental materna e baixas taxas de recombinação (AVISE, 2000).

Entretanto é necessário ressaltar que o DNA fecal está geralmente degradado devido à exposição ambiental e da presença de inúmeros inibidores de PCR como: polissacarídeos complexos, produtos da degradação de alimentos e bactérias (BEJA-PEREIRA et al., 2009). Algumas das alternativas para driblar esses reveses são os protocolos para armazenamento / extração de DNA e os iniciadores (primers) específicos para cada espécie, posto que, quanto mais pares de base maior é a dificuldade de amplificação na reação de PCR.

Dentro deste contexto, o presente trabalho pretende analisar o potencial de amplificação dos marcadores selecionados do mtDNA que se adequem para estudos populacionais e filogeográficos em veado-catingueiro. Para tanto, partiremos da

hipótese que primers com amplicons menores que 300bp possuem maior facilidade de amplificação em comparação com os primers de amplicons maiores que 400 bp.

2. Material e Métodos

2.1. Primers e Amostras fecais

Para o presente estudo, decidiu-se optar por quatro regiões do genoma mitocondrial, são elas: D-loop (região controle), ND5 (NADH dehydrogenase subunit 5), ND2 (NADH dehydrogenase subunit 2) (Figura 1) visto que, são regiões hipervariáveis, promissoras na investigação da história evolutiva e no estudo taxonômico de *M. gouazoubira* (CAPARROZ et al., 2015) e o CytB (citocromo B) que é muito utilizado em trabalhos para identificação de espécies, estudos populacionais e filogeográficos e, portanto, possui um banco importante de sequências disponível para análise (DUARTE et al., 2008; HASSANIN et al., 2012; GOZÁLEZ et al., 2015).

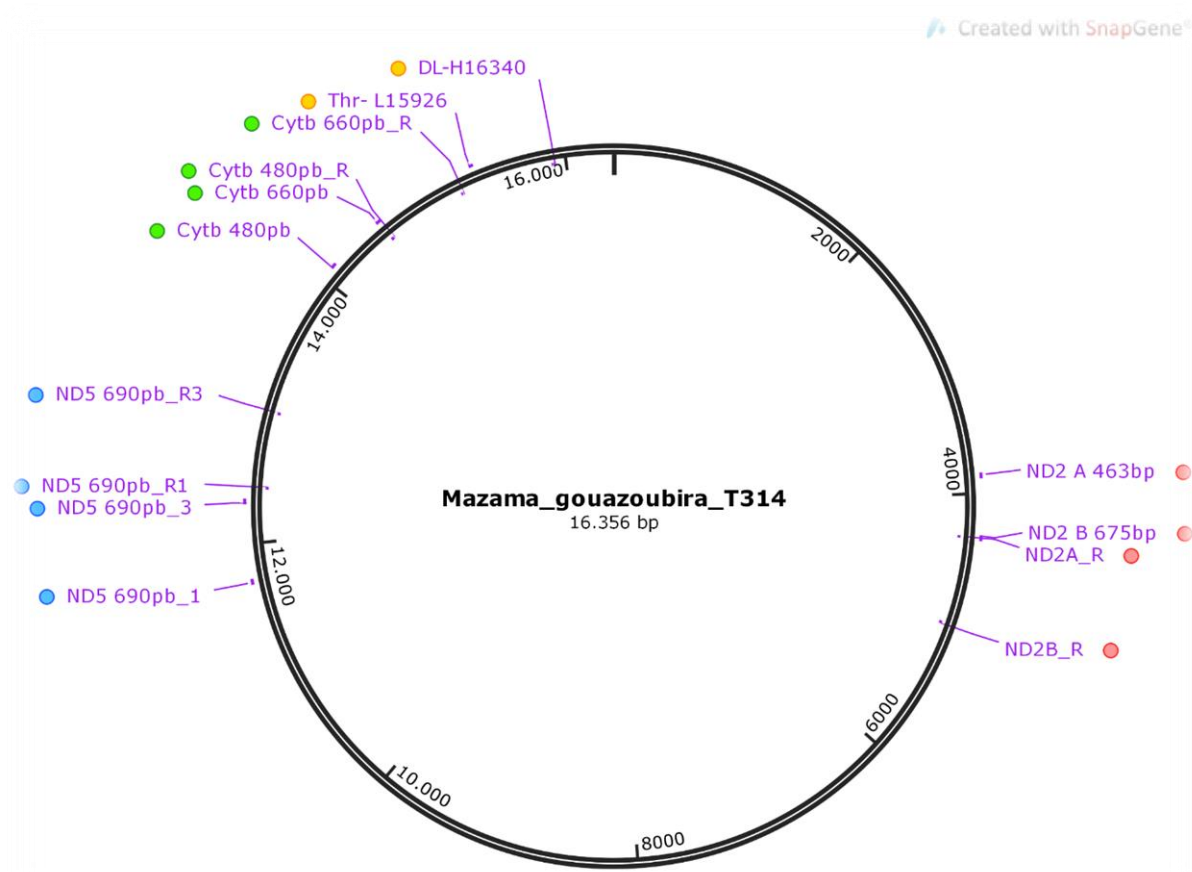


Figura 1. Mitogenoma da espécie *Mazama gouazoubira* evidenciando as posições dos primers para os genes ND2 em vermelho (ND2 A e ND2 B sendo os foward e o ND2A_R e ND2B_R os reverse), ND5 em azul (ND5 690pb_1 e ND5 690pb_3 sendo os foward e o ND5 690pb_R1 e ND5 690pb_R3 os reverse), CytB em verde (Cytb 480 pb e Cytb 660 pb sendo os foward e o Cytb 480 pb_R e Cytb 660 pb_R os reverse) e D-loop em amarelo (Thr-L15926 sendo o foward e o DL-HH16340 o reverse). Acervo pessoal.

Os primers das regiões D-loop, Cytb, ND5 e ND2 (Tabela 1) foram avaliados de acordo com seu potencial de amplificação em DNA extraído de 100 amostras fecais, encontradas por cães farejadores em localidades do Brasil, do sul ao nordeste do país, as quais representem a distribuição geográfica da espécie (Tabela 2). Comparamos a eficiência das amplificações das regiões grandes (amplicons com mais de 400 bp) com as regiões pequenas (amplicon com aproximadamente 300 bp ou menores).

Tabela 1. Características dos primers para amplificação de DNA fecal de *M. gouazoubira* (Fisher, 1814).

Região	Identificação	Iniciador (5'-3')	Tamanho fragmento (pb)	Temperatura pareamento	Fonte
ND5	Leu11775 ND512427	GGTGCAACTCCAAATAAAAG TTTTCCRGTTGCAGCTARTG	690	58°C	CAPARROZ et al. (2015)
ND5	ND512326 ND512988	TCTAGCAATAGCATGATTYC TGTTATTAGGAGGGCTCAGG	690	58°C	CAPARROZ et al. (2015)
ND5	ND5 F ND5 R	TGTCACATGGTCCATCATAG GCAGAGCTGCTGTGTTT	224	58°C	atual
ND5	ND5_252_F ND5_252_R	CTCTACATCCAGTCAATTAGGC CCAGTAAGAAAAGGCATTCCTG	252	58°C	atual
CytB	L14724 H15149	CGAGATCTGAAAAACCATCGTTG AACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	480	50°C	IRWIN et al. (1991)
CytB	FAR-L FAR-H	CCATGAGGACAAATATCATTCTGAT TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTTCA	660	55°C	DUARTE et al. (2008)
Cytb	IDMAZ224L IDMAZH	CATCCGACACAATAACAGCA TCCTACGAATGCTGTGGCTA	224	52°C	GONZÁLEZ et al 2009
Cytb	Cit305 F Cit305 R	CCATCAGACGCAGACAAA GCGTTGTTTAGATGTGTGAAG	305	52°C	LEANDRO, 2019*
D-loop	Thr- L15926 DL-H16340	CAATTCCCCGGTCTTGTAACC CCTGAAGTAGGAACCAGATG	660	55°C	VILÀ et al. (1999)
D-loop	D-loop F D-loop R	GCGGCATGGTAATTAAGCTC CATTACATTATATGCCCCATGC	479	56°C	Não publicado
ND2	ND2A_F ND2A_R	CATACCCCGAAAATGTTGGT GTACGGATATGGGTGCCAGT	463	58°C	atual
ND2	ND2B_F ND2B_R	CTGGCACCCATATCCGTACT GCTTTGAAGGCTCTTGGTCT	675	58°C	atual
ND2	ND2A_F ND2A_R	ACCCAATCAACAGCCTCAAT GTACGGATATGGGTGCCAGT	241	58°C	atual

*Relatório Científico Final FAPESP processo 2017/26529-9.

Tabela 2. Lista de localidades e quantidade de amostras fecais de *M. gouazoubira*.

Localidade das amostras	Número de amostras
Pantanal (MS)	13
Faz Xaraés (MS)	6
Parque Nacional S. Bodoquena (MS)	1
Barra do Garças (MT)	7
Parque Estadual Altamiro M P (GO)	1
Parque Nacional Emas (GO)	1
Parque Nacional Serra das Confusões (PI)	1
Parque Nacional Serra de Itabaiana (SE)	8
Parque Nacional Chapada Diamantina (BA)	12
Parque Nacional Recanto das Antas (ES)	1
ReBio Sooretama (ES)	1
R. B. Mata Escura (MG)	7
ReViS Libélulas da S. de S. José (MG)	1
Estação Ecológica Serra das Araras (MT)	3
Estação Ecológica Santa Barbara (SP)	10
Parque Estadual Serra do Mar (SP)	1
Parque Estadual Campos do Jordão (SP)	2
Estação Ecológica Mata preta (SC)	6
Parque Nacional Araucárias (SC)	6
R. B. Ibicui Mirim (RS)	4
Fazenda São Francisco de Paula (RS)	8

2.2. Teste de eficiência de amplificação

As condições da reação de PCR foram padronizadas para um volume final de 30µl (25µl de mix e 5µl de DNA aproximadamente com 45ng/ul), seguindo as seguintes concentrações dos reagentes: 0,6 mM de dNTP; 0,5 pM de cada iniciador (forward/ reverse); 1x tampão de reação; 3 mM de MgCl₂, 1U de DNA Taq polimerase (tampão, MgCl₂ e Taq polimerase GoTaq® DNA Polymerase, Promega); 1,7 µg/µL de BSA; água ultrapura qsp 25,0 µl.

A reação de PCR foi realizada em termociclador Bio-rad C-1000 Touch® ThermalCycler, sob as seguintes condições – Protocolo 1: um passo inicial de 94 ° C durante 4 min seguido de 45 ciclos de (1) 94 ° C durante 45 segundos, (2) temperatura de pareamento ° C durante 30 segundos, (3) 72 ° C durante 50 segundos e, ao final, uma extensão a 72 ° C durante 5 min.

Um segundo protocolo foi testado na tentativa de melhorar a amplificação dos marcadores que não amplificaram nas condições citadas acima e foram testados com o protocolo “*Touchdown*”, o qual consiste em: um ciclo inicial de (1) 94° C durante 7

min, (2) 58° C durante 1 min, (3) 72° C durante 1 min, seguido de 5 ciclos de (4) 94° C durante 50 segundos, (5) 56° C durante 50 segundos, (6) 72° C durante 1 min, seguido de 9 ciclos de (7) 94° C durante 50 segundos, (8) 55° C durante 50 segundos, (9) 72° C durante 1 min, seguido de 9 ciclos de (10) 94° C durante 50 segundos, (11) 54° C durante 50 segundos, (12) 72° C durante 1 min, seguido de 11 ciclos de (13) 94° C durante 50 segundos, (14) 52° C durante 50 segundos, (15) 72° C durante 1 min e, ao final, uma extensão a 72 ° C durante 10 min.

A amplificação das regiões de interesse foi confirmada por meio da visualização do produto da PCR por eletroforese em gel de agarose 2%, na qual só consideramos a amplificação dos amplicons quando não apresentavam bandas inespecíficas (possíveis contaminantes). Para contabilizar o sucesso de amplificação foi levado em consideração primeiramente o protocolo 1 e quando não ocorria nenhuma amplificação das amostras era testado o protocolo “*Touchdown*”. Os primers que obtiveram um valor superior a 70% de amplificação no teste binomial foram validados e recomendados para estudos populacionais e filogenéticos de *M. gouazoubira*.

3. Resultados

3.1. Teste de eficiência de amplificação

Para avaliar o potencial de amplificação dos marcadores mitocondriais selecionados, realizamos a amplificação do DNA extraído de 100 amostras fecais, para cada primer.

Como observado na figura 2 a maioria dos primers apresenta uma taxa significativa de amplificação próxima ou superior a 70%. Os primers Dloop_479, Dloop_660, Cytb_660, ND5_1 e ND5_3 obtiveram uma probabilidade de amplificação menor que 0,4 (Tabela 3), sendo que, Dloop_479 não amplificou nenhuma amostra.

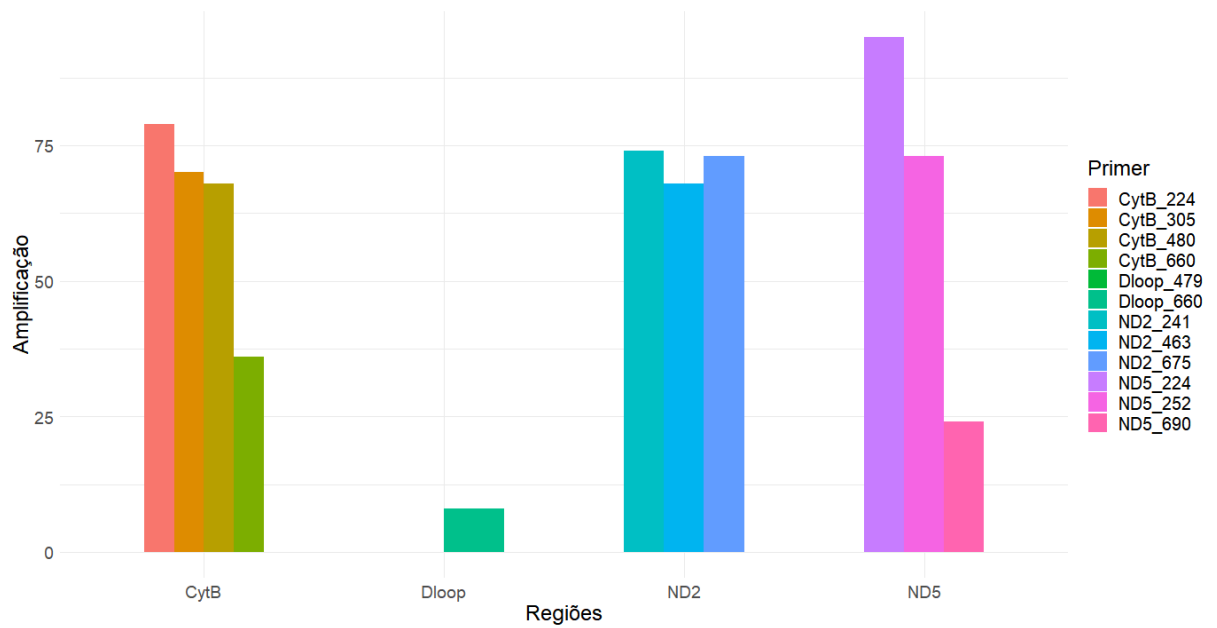


Figura 2. Comparação entre as amplificações de cada primer. No eixo X estão as regiões mitocondriais e no eixo Y a porcentagem de amplificações.

Tabela 3. Sucesso de amplificação dos primers. Com a porcentagem (%) de amplificação, p-value e a probabilidade de sucesso.

Primer	% amplificação	p-value	Probabilidade sucesso
CytB_660	36	2,35E-09	0,36
CytB_480	68	0.3669	0,68
CytB_305	70	0.5377	0,70
CytB_224	79	0.02883	0,79
Dloop_660	8	2.2e-16	0,08
Dloop_480	0	2.2e-16	0
ND5_1	21	2.2e-16	0,21
ND5_3	24	2.2e-16	0,24
ND5_224	95	3,99E-07	0,95
ND5_252	73	0.2964	0,73
ND2_A	68	0.3669	0,68
ND2_B	73	0.2964	0,73
ND2_241	74	0.2244	0,74

*Intervalo de confiança = 95%.

Esses resultados indicam que primers com amplicons menores (aproximadamente 300 pb) possuem uma maior capacidade de amplificação em amostras fecais.

4. Discussão

Nós avaliamos primers com amplicons menores que 300 bp possuem maior capacidade de amplificação em relação com os primers de amplicons maiores que 400 bp. Nos resultados encontramos que os primers menores, principalmente os com amplicons de 224 pb, tem mais probabilidade de amplificação em amostras fecais.

A qualidade do DNA fecal é um importante fator para que a amplificação dos marcadores menores ocorra com facilidade, uma vez que, a probabilidade de regiões com até 300 pb estarem degradadas, seja por exposição ambiental ou deterioração por mofo e/ou bactérias, é menor do que regiões acima de 500 pb.

Outro ponto relevante são os marcadores mitocondriais usados, os quais foram desenvolvidos para cervídeos. Uma característica importante no trabalho com dna degradado, pois diminui a chance de amplificações não específicas e também contribui para uma reação mais eficiente, visto que, os iniciadores são mais específicos para espécie.

Nesse estudo tivemos uma comparação entre os diferentes marcadores mitocondriais disponíveis para *M. gouazoubira* e observamos suas probabilidades de amplificação e quais são os mais indicados para uso em DNA fecal. Oferecendo assim, um ponto de partida para novas análises na espécie e uma projeção para outros cervídeos.

Contudo não realizamos os sequenciamentos das amostras amplificadas, ou seja, não temos dados sobre a qualidade e pureza das sequencias amplificadas além das bandas dos géis de agarose. Portanto é interessante o estudo dessas sequências, com finalidade de aumentar a acurácia dos estudos com DNA fecal e diminuir o tempo e investimento nas amplificações desse material biológico.

5. Conclusões

Os primers menores que 300 pb tem maior probabilidade de amplificação em amostras fecais e a concatenação deles pode gerar um marcador de importância para análises filogenéticas em cervídeos.

6. Referências

- AVISE, J.C. Phylogeography: The History and Formation of Species. Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, 203 p. 2000.
- CAPARROZ, R. et al. Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. Brasil: **Genetics and Molecular Biology**, 338-345 p. 2015.
- DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 17–22 p. 2008.
- DUARTE, J. M. B., GONZALEZ, S. Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer. Jaboticabal: **FUNEP e IUCN**, 394p, 2010.

DUARTE, J. M. B. et al. S. Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama Bororo*. **Oryx**, 1-9, 2016.

GONZÁLEZ, S, et al. Population Structure of mtDNA Variation due to Pleistocene Fluctuations in the South American Maned Wolf (*Chrysocyonbrachyurus*, Illiger, 1815): Management Units for Conservation. **Journal of Heredity**, 2015.

HASSANI, A. et al. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes.C. R. **Biologies** 335, 2012.

_____. The IUCN red list of threatened species: version 2018.2. Gland; Cambridge, 2018. Disponível em: <https://www.iucnredlist.org>. Acesso em: 21 jan. 2019.

OLIVEIRA, M. L. et al. Dogs can detect scat samples more efficiently than humans: an experiment in a continuous Atlantic Forest remnant. **Zoologia**, 183–186 p. 2012.

OLIVEIRA, M. L.; DUARTE, J. M. B. Amplifiability of mitochondrial, microsatellite and amelogenin DNA loci fecal samples of red brocket deer *Mazama americana* (Cetartiodactyla, Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, 2013.

OLIVEIRA, M. L.; COUTO, H. T. Z.; DUARTE J. M. B. Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. **European Journal of Wildlife Research**, 2019.

ROSSI, R. V. Taxonomia de *Mazama* (Rafinesque, 1817) do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). Tesis de Maestría, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil, 2000.

APÊNDICE

APÊNDICE A

**TABELA COM AS IDENTIFICAÇÕES DAS AMOSTRAS DE DNA FECAL
UTILIZADAS NOS TESTES DE AMPLIFICAÇÃO.**

Id	Local	Estado
Fnh709	Pantanal	MS
Fnh713	Pantanal	MS
Fnh714	Pantanal	MS
Fnh729	Pantanal	MS
Fnh730	Pantanal	MS
Fnh739	Pantanal	MS
Fnh751	Pantanal	MS
Fnh761	Pantanal	MS
Fnh774	Pantanal	MS
Fnh782	Pantanal	MS
Fnh795	Pantanal	MS
Fnh807	Pantanal	MS
Fnh827	Pantanal	MS
SB09	EsEC St Bárbara	SP
SB11	EsEC St Bárbara	SP
SB28	EsEC St Bárbara	SP
SB35	EsEC St Bárbara	SP
SB38	EsEC St Bárbara	SP
SB52	EsEC St Bárbara	SP
SB59	EsEC St Bárbara	SP
SB69	EsEC St Bárbara	SP
SB81	EsEC St Bárbara	SP
SB94	EsEC St Bárbara	SP
XAR012	Faz Xaraés	MS
XAR019	Faz Xaraés	MS
XAR020	Faz Xaraés	MS
XAR026	Faz Xaraés	MS
XAR027	Faz Xaraés	MS
XAR029	Faz Xaraés	MS
ARA126	Barra do Garças	MT
ARA127	Barra do Garças	MT
ARA128	Barra do Garças	MT
ARA129	Barra do Garças	MT
ARA131	Barra do Garças	MT
ARA132	Barra do Garças	MT
ARA136	Barra do Garças	MT

PNSB042	PN S. Bodoquena	MS
PEAMP048	PE Altamiro M P	GO
PNE 051	PN Emas	GO
EESA107	EE Serra das Araras	MT
EESA108	EE Serra das Araras	MT
EESA125	EE Serra das Araras	MT
EEMP002	EsEc Mata Preta	SC
EEMP004	EsEc Mata Preta	SC
EEMP012	EsEc Mata Preta	SC
EEMP013	EsEc Mata Preta	SC
EEMP014	EsEc Mata Preta	SC
EEMP015	EsEc Mata Preta	SC
PNAR014	ParNa Araucárias	SC
PNAR015	ParNa Araucárias	SC
PNAR016	ParNa Araucárias	SC
PNAR017	ParNa Araucárias	SC
PNAR018	ParNa Araucárias	SC
PNAR019	ParNa Araucárias	SC
RBIM001	ReBio Ibicuí Mirim	RS
RBIM002	ReBio Ibicuí Mirim	RS
RBIM003	ReBio Ibicuí Mirim	RS
RBIM004	ReBio Ibicuí Mirim	RS
FNSF001	Flona São F. de Paula	RS
FNSF002	Flona São F. de Paula	RS
FNSF003	Flona São F. de Paula	RS
FNSF004	Flona São F. de Paula	RS
FNSF005	Flona São F. de Paula	RS
FNSF007	Flona São F. de Paula	RS
FNSF008	Flona São F. de Paula	RS
FNSF009	Flona São F. de Paula	RS
RBME001	ReBio Mata Escura	MG
RBME002	ReBio Mata Escura	MG
RBME003	ReBio Mata Escura	MG
RBME008	ReBio Mata Escura	MG
RBME009	ReBio Mata Escura	MG
RBME010	ReBio Mata Escura	MG
RBME013	ReBio Mata Escura	MG
RBSO008	ReBio Sooretama	ES
RPPA001	RPPN Refúgio das Antas	ES
PNCD002	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD003	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD005	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD006	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD007	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD008	ParNa Chapada Diamantina	BA

PNCD009	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD011	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD013	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD014	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD015	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCD016	ParNa Chapada Diamantina	BA
PNCF001	ParNa Serra das Confusões	PI
PNIT001	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PNIT002	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PNIT003	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PNIT004	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PNIT005	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PNIT006	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PNIT007	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PNIT009	ParNa Serra de Itabaiana	SE
PECA001	ParEs Serra do Mar - Caragua	SP
RVSJ001	ReViS Libélulas da S. de S. José	MG
PECJ002	ParEs C. do Jordão	SP
PECJ003	ParEs C. do Jordão	SP