

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

GENÉTICA E ESTIMATIVA POPULACIONAL DE UMA NOVA
UNIDADE EVOLUTIVA DE *Mazama* NO PARQUE
ESTADUAL DO RIO DOCE, MINAS GERAIS

Jeferson Lucas Sousa Freitas

Biólogo

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS
CÂMPUS DE JABOTICABAL

**GENÉTICA E ESTIMATIVA POPULACIONAL DE UMA NOVA
UNIDADE EVOLUTIVA DE *Mazama* NO PARQUE
ESTADUAL DO RIO DOCE, MINAS GERAIS**

Discente: Jeferson Lucas Sousa Freitas
Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
Coorientador: Dr. Pedro Henrique de Faria Peres

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

F866g

Freitas, Jeferson Lucas Sousa

Genética e estimativa populacional de uma nova unidade evolutiva de Mazama no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais / Jeferson Lucas Sousa Freitas. -- , 2023

106 p. : tabs., fotos, mapas

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

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Coorientador: Pedro Henrique de Faria Peres

1. Genética animal. 2. Ecologia populacional. 3. Biodiversidade. 4. Conservação. 5. Cervídeos. 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: GENÉTICA E ESTIMATIVA POPULACIONAL DE UMA NOVA UNIDADE EVOLUTIVA DE *Mazama* NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE, MINAS GERAIS

AUTOR: JEFERSON LUCAS SOUSA FREITAS

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

COORIENTADOR: PEDRO HENRIQUE DE FARIA PERES

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Mestre em Ciência Animal, área: Genética e Melhoramento Animal pela Comissão Examinadora:

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

Documento assinado digitalmente
 JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE
Data: 16/12/2023 15:08:40-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. ALEXANDRE VOGLIOTTI (Participação Virtual)
Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) / Foz do Iguaçu/PR

Documento assinado digitalmente
 ALEXANDRE VOGLIOTTI
Data: 18/12/2023 14:06:52-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. MERCIVAL ROBERTO FRANCISCO (Participação Virtual)
Departamento de Ciências Ambientais / Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) - Sorocaba/SP

Documento assinado digitalmente
 MERCIVAL ROBERTO FRANCISCO
Data: 18/12/2023 09:06:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Jaboticabal, 15 de dezembro de 2023

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Jeferson Lucas Sousa Freitas, natural de Limoeiro do Norte, Ceará, é Licenciado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual do Ceará (2014 – 2019). Durante a graduação, foi beneficiário de três bolsas de Iniciação Científica no Laboratório de Fisiologia e Controle da Reprodução (LFCR) pela Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico (FUNCAP; 08/2015 – 07/2016 e 04/2018 – 03/2019) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq; 01/2017 – 07/2017). Nesse período, participou de projetos de pesquisas envolvendo métodos de biologia molecular aplicados à reprodução e animal e parasitologia. Trabalhou como Analista Ambiental na SETEG – Soluções Geológicas e Ambientais (2019 – 2020), onde realizou atividades de consultoria em meio ambiente como licenciamento, auditoria, controle e monitoramento ambiental, bem como implementação de programas de manejo de fauna silvestre. Ingressou em 2021 no Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, curso Mestrado, da Universidade Estadual Paulista, câmpus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, ocasião na qual passou a ser membro do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE). Foi bolsista de mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 01/2021 – 11/2021) e pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; 12/2021 – 08/2023). Também pela FAPESP, foi beneficiário de uma Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE; 08/2022 – 02/2023), executada na Universidade de Durham, Inglaterra, Reino Unido, sob orientação do Prof. Dr. Philip Andrew Stephens. Nesse estágio, se dedicou a análises de estimativa de densidade populacional de cervídeos florestais neotropicais a partir de amostragem fecal.

Look deep into nature, and then you will understand everything better

Albert Einstein

À minha mãe, Lúcia de Fátima Soares de Sousa,
dedico

AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; Processo nº 88887.597519/2021-00) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP; Processos nº 2021/02087-2 e 2022/06502-7), pelo financiamento que permitiu a execução deste mestrado, bem como pelo salário que permitiu minha manutenção ao longo de quase três anos.

À Maurício Barbanti, Pesquisador, Professor e Orientador, por ter sido exemplo de profissional compromissado, que não se acovarda frente a desafios que para muitos seria motivo de desistência, por todos os ensinamentos e oportunidades concedidas desde antes de me conhecer.

À Pedro Peres, que teve papel triplo durante minha trajetória como Coorientador, colaborar direto em várias esferas, e sobretudo amigo, pela parceria, trocas, acadêmicas e não acadêmicas, e constante incentivo.

À Philip Stephens, supervisor durante meu intercâmbio na Inglaterra, e demais membros do *Conservation Ecology Group* na Universidade de Durham, pela receptividade, vivências e aprendizados.

Ao Parque Estadual do Rio Doce (PERD), seus colaboradores e outros profissionais ligados a projetos na área, pelo acolhimento e colaboração que viabilizaram a coleta de dados.

À Nicks, cadela de faro responsável por ter encontrado as amostras fecais que formam a base deste mestrado, pelo companheirismo e momentos de alegria.

Aos amigos e colegas do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE),

Isabel Lima, conterrânea do Nordeste, meu primeiro contato e quem primeiro me ajudou a navegar nesse lugar desconhecido, pela amizade e parceria, por ter sido um pouco de “casa” para mim e ter me ajudado a compreender melhor minhas raízes.

Francisco Grotta-Neto e Rullian Ribeiro, pela amizade e companheirismo, dentro e fora do NUPECCE, e especialmente pelas vivências de campo que foram parte essencial na minha formação. Márcio Oliveira, sem o qual eu não teria realizado o sonho de estudar no exterior, pelo apoio e generosidade.

Agda Bernegossi, Dolores Vallejo, Eluzai Sandoval, Gabrielle Vacari, Juan Hernández, Liss Moreno, Raquel Bonato e Valdir Nogueira-Neto, amigos e colegas “da genética”, com os quais convivi diariamente, pela companhia agradável e momentos de distração.

Bianca Ferrari, Bruno Ricci, Claudia Ribas, Eduard Guevara, Isabela Trentini, Laís Souza, Lara Gragnanello, Maria Baldini, Thaylane Financi e Vinicius dos Santos, pelos bons momentos de convivência que deixaram a rotina diária mais leve. Eveline Zanetti, João Boer e Nayara de Oliveira, assim como os demais colaboradores, pela solicitude e gentileza.

Aos amigos fora do NUPECCE,

Em particular os que fiz durante meus últimos meses em Jaboticabal, enquanto morava na República Toca Foco, Armando Brito, Breno Santos, Fernanda Lefort, Francisco Amaral, Igor Vieira, Jardel Souza, Lucas Natan e Theodora Totti, pela amizade e pelos momentos de diversão, e, em última instância, por terem sido refúgio.

À Eduardo Triboni, Felipe Marques e Matheus Rocha, amigos brasileiros que fiz durante o intercâmbio, pela amizade e apoio, sobretudo emocional, mais que necessários durante esse período longe de casa – e de tudo que me era familiar.

À Luciana Melo, Orientadora durante minha graduação, responsável por minha base científica, sem a qual esse mestrado certamente teria sido (ainda) mais difícil, e à Vicente Freitas, pelos ensinamentos, oportunidades e amizade.

À Thaís, esposa, amiga, inspiração como pessoa e pesquisadora, com quem espero compartilhar o resto da minha vida, pelos nove anos juntos, preenchidos por carinho e amor, por acreditar e fazer de mim uma pessoa melhor.

À minha família, particularmente minha mãe Lúcia, irmã Paula e irmãos Armando e Mateus, por serem meu lugar no mundo e pelo amor e apoio incondicionais. E às minhas tias Francilúcia, Lucila, Maria, Nila e Socorro, pelo apoio, carinho e contribuição fundamental para minha formação, sobretudo na infância.

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

SUMÁRIO

	Página
RESUMO.....	III
ABSTRACT.....	IV
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	01
1 INTRODUÇÃO.....	01
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	06
2.1 Gênero <i>Mazama</i> Rafinesque, 1817.....	06
2.2 Veado-mateiro-pequeno (<i>Mazama jucunda</i> Thomas, 1913).....	09
2.3 Estimativas populacionais em cervídeos florestais.....	13
3 REFERÊNCIAS.....	16
CAPÍTULO 2 – DESCOBERTA DE UMA POPULAÇÃO DO VEADO-MATEIRO PEQUENO (<i>Mazama jucunda</i>) GENETICAMENTE ESTRUTURADA: UNIDADE EVOLUTIVA SIGNIFICATIVA OU NOVA ESPÉCIE?.....	22
1 INTRODUÇÃO.....	23
2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
2.1 Área de estudo.....	26
2.2 Amostras fecais.....	27
2.3 Amostras de animais de referência.....	29
2.4 Extração, amplificação e sequenciamento das amostras.....	34
2.5 Caracterização da matriz de DNA.....	37
2.6 Análise filogenética.....	37
2.7 Delimitação molecular de espécies.....	38
2.8 Rede de haplótipos e distância genética.....	39
3 RESULTADOS.....	40
3.1 Coleta e triagem das amostras fecais.....	40
3.2 Sequenciamento e caracterização da matriz de DNA.....	41
3.3 Filogenia e delimitação molecular de espécies.....	42
3.4 Rede de haplótipos e distância genética.....	44
4 DISCUSSÃO.....	46
5 CONCLUSÃO.....	49
6 REFERÊNCIAS.....	50
MATERIAL SUPLEMENTAR.....	57
CAPÍTULO 3 – NEOTROPICAL FOREST DEER DENSITY ESTIMATES BASED ON DUNG PILES COUNTS: ANALYTICAL IMPROVEMENTS.....	58
1 INTRODUCTION.....	59
2 MATERIALS AND METHODS.....	61
2.1 Study area.....	61
2.2 Dung pile sampling.....	62
2.3 Dog trial surveys.....	63

2.4 Parameters estimates.....	64
2.5 Density estimates.....	67
3 RESULTS.....	70
3.1 Dung pile sampling.....	70
3.2 Parameters estimates.....	71
3.3 Density estimates.....	73
4 DISCUSSION.....	77
5 CONCLUSION.....	84
6 REFERENCES.....	84
SUPPLEMENTARY MATERIAL.....	90

GENÉTICA E ESTIMATIVA POPULACIONAL DE UMA NOVA UNIDADE EVOLUTIVA DE *Mazama* NO PARQUE ESTADUAL DO RIO DOCE, MINAS GERAIS

RESUMO – A taxonomia do gênero *Mazama* apresenta lacunas devido a elevados níveis de divergência genética entre espécies morfologicamente muito semelhantes, além de serem elusivas, o que dificulta estudos como mapeamento da distribuição geográfica e estimativas populacionais. Recentemente foi descoberta uma população de *Mazama* no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Minas Gerais, entretanto, não foi possível realizar sua identificação ao nível de espécie. Além de identificar a espécie, dados demográficos são essenciais para conservação dessa população, posto que valores de densidade populacional são parâmetros-chave na avaliação de risco de extinção. Uma vez que métodos de estimativa populacional baseados em observação direta são pouco efetivos em espécies elusivas, abordagens indiretas são uma alternativa, por exemplo a coleta de amostras fecais seguida da identificação em nível de espécie. Entretanto, por se tratar de um método indireto, alguns parâmetros precisam ser estimados, requerendo tratamento estatístico minucioso. Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivos identificar a espécie de *Mazama* que ocorre no PERD e estimar a densidade populacional na área, servindo como estudo de caso para aperfeiçoar a abordagem analítica de estimativa populacional de cervídeos florestais a partir de amostragem fecal. Para identificação da espécie, amostras de referência e fecais, coletadas no PERD e de outras áreas, foram sequenciadas para seis fragmentos de regiões mitocondriais. Foram realizadas análises filogenéticas por Inferência Bayesiana e implementados métodos coalescentes de delimitação molecular de espécies (GMYC e bPTP) para identificar unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs). Ainda, foi construída uma rede de haplótipos e gerada uma matriz de distância genética. Para estimativa populacional, as amostras fecais coletadas foram usadas em dois métodos diferentes, Amostragem por Distância Indireta e o *Faecal Standing Crop* (FSC). Os parâmetros necessários para implementar esses métodos foram estimados por modelagem estatística específica para cada parâmetro. A hipótese filogenética recuperou as amostras do PERD e de *M. jucunda* no mesmo clado, porém de modo reciprocamente monofilético, correspondendo a duas MOTUs exclusivas. O PERD possui haplótipos exclusivos e sua distância genética com *M. jucunda* equipara-se àquela entre *M. jucunda* e *M. nana*. Os valores de densidade populacional variaram de $1,2 \pm 0,42$ a $2,03 \pm 0,69$ ind./km² (média $\pm$ erro padrão). Assim, considerando a área do PERD de aproximadamente 306 km², a população é composta de 367 a 621 indivíduos. Neste trabalho nós reportamos uma nova população de *M. jucunda*, representando uma Unidade Evolutiva Significativa na espécie. Entretanto, a estruturação genética observada e o contexto de isolamento do PERD evidenciam a possibilidade de serem espécies distintas. Os valores de densidade estão dentro da faixa relatada na literatura, e as análises implementadas representam um importante avanço nas abordagens de estimativa populacional de cervídeos florestais a partir de amostragem fecal.

Palavras-chave: *Mazama*, Unidade Evolutiva Significativa, Estimativa populacional

GENETICS AND POPULATION ESTIMATE OF A NEW *Mazama* EVOLUTIONARY UNIT IN THE RIO DOCE STATE PARK, MINAS GERAIS

ABSTRACT – The taxonomy of the genus *Mazama* presents gaps due to high levels of genetic divergence among morphologically very similar species, as well as their elusive nature, which pose challenges for studies such as geographical distribution mapping and population estimates. Recently, a *Mazama* population was discovered in the Rio Doce State Park (PERD), Minas Gerais; however, it was not possible to identify it to species level. In addition to the species identification, demographic data is essential for the conservation of this population, as population density values are key parameters in assessing the risk of extinction. Since direct observation-based population estimation methods are not effective for elusive species, indirect approaches are an alternative, such as dung pile collection followed by species identification. However, as it is an indirect method, some parameters need to be estimated, requiring careful statistical treatment. In this context, this study aimed to identify the *Mazama* species occurring in PERD and estimate the population density in the area, making it a case study to refine the analytical approach for population estimation of forest deer species based on dung pile sampling. For the species identification, reference and fecal samples, collected in PERD and other areas, were sequenced for six fragments of mitochondrial regions. Phylogenetic analyses were performed using Bayesian Inference, and coalescent molecular species delimitation methods (GMYC and bPTP) were implemented to identify Molecular Operational Taxonomic Units (MOTUs). Additionally, a haplotype network was constructed, and a genetic distance matrix was generated. For the population estimation, the fecal samples collected were used in two different methods, Indirect Distance Sampling and Faecal Standing Crop (FSC). The parameters required to implement these methods were estimated through statistical modeling specific to each parameter. As a result, the phylogenetic hypothesis recovered the samples from PERD and *M. jucunda* in the same clade, but in a reciprocally monophyletic manner, corresponding to two exclusive MOTUs. PERD has exclusive haplotypes, and its genetic distance from *M. jucunda* is similar to that between *M. jucunda* and *M. nana*. Population density values ranged from 1.2 ± 0.42 to 2.03 ± 0.69 individuals/km² (mean $\pm$ standard error). Thus, considering the approximate 306 km² area of PERD, the population consists of 367 to 621 individuals. In this study, we report a new population of *M. jucunda*, representing a Significant Evolutionary Unit. However, the observed genetic structuring and the isolation context of PERD highlight the possibility of a new species. The density values fall within the range reported in the literature, and the implemented analyses represent a significant advancement in population density estimation approaches for forest deer based on dung pile sampling.

Keywords: *Mazama*, Significant Evolutionary Unit, Population Estimation

CAPÍTULO 1 – Considerações gerais

1 INTRODUÇÃO

A família Cervidae, grupo dos cervídeos, cervos e veados, constitui-se de animais ungulados pertencentes à ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia, sendo a segunda família mais numerosa com 18 gêneros e pelo menos 55 espécies (Zurano et al., 2019; Prothero et al., 2022). Os primeiros cervídeos chegaram no continente sul americano pelo istmo do Panamá por volta de 2,5 milhões de anos atrás, no final do Plioceno (Stehli e Webb, 1985). A partir de pelo menos oito linhagens ancestrais, passaram por uma intensa irradiação adaptativa na colonização da América do Sul em decorrência, provavelmente, da ausência de outros ruminantes no continente (Webb, 2000; Duarte et al., 2008).

Na região Neotropical, os cervídeos podem ser divididos morfologicamente, de modo simplificado, em dois principais grupos – 1) espécies de áreas “fechadas” (Figura 01, A-C): animais de pequeno a médio porte, 30-65 cm de altura e 6-40 kg de peso, machos com chifres simples e adaptações para ambientes florestais densos, englobando os gêneros *Mazama*, *Subulo*, *Passalites* e *Pudu*; e 2) espécies de áreas “abertas” (Figura 01, D-F): animais de médio a grande porte, 65-130 cm de altura e 30-130 kg de peso, machos com chifres ramificados e adaptações para ambientes mais abertos, como florestas menos densas, campos e savanas, compreendendo os gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus* (Bernegossi et al., 2023; Merino e Rossi, 2010; Morales-Donoso et al., 2023).

Taxonomicamente, todos os cervídeos neotropicais integram a subfamília Capreolinae e tribo Odocoileini (Heckeberg et al., 2016), que é ainda dividida em dois grupos, denominados por Duarte et al. (2008) de “clado vermelho” e “clado cinza”. Já Heckeberg et al. (2016) definiram essa subdivisão em duas subtribos, Odocoileina (“clado vermelho”) e Blastocerina (“clado cinza”). São gêneros da subtribo Blastocerina: *Blastocerus*, *Ozotoceros*, *Hippocamelus*, *Subulo*, *Passalites*, *Pudu* e *Mazama*; e subtribo Odocoileina: *Odocoileus* e *Mazama* (Heckeberg et al., 2016; Bernegossi et al., 2023; Morales-Donoso et al., 2023).

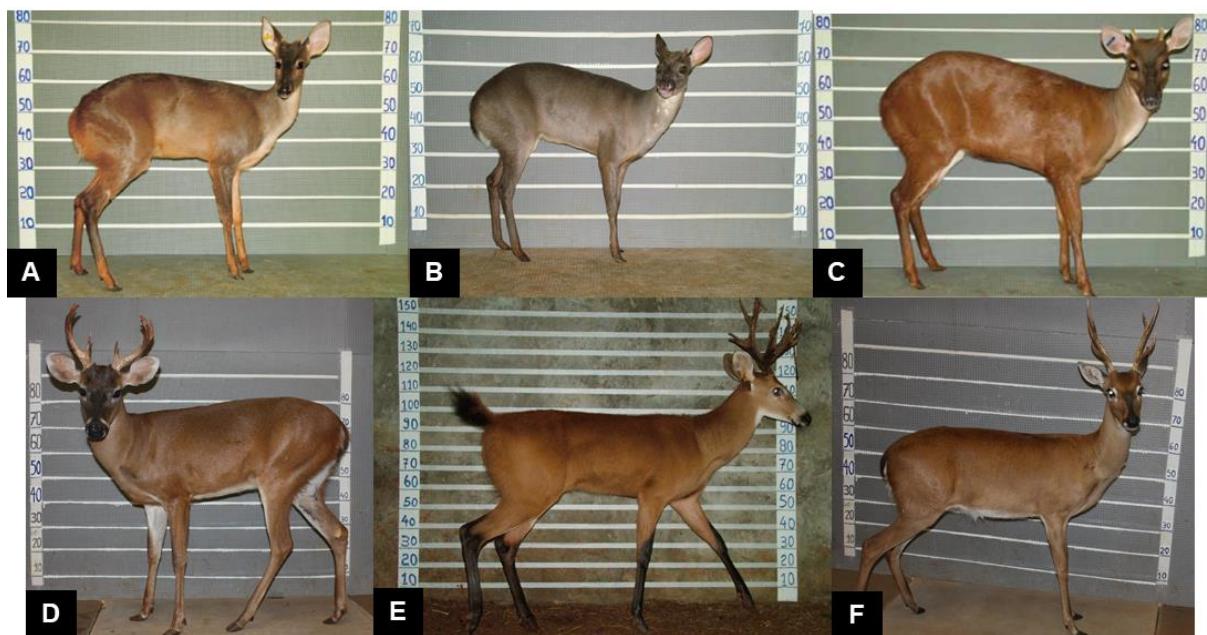


Figura 01. Cervídeos com ocorrência no Brasil representando espécies de áreas “fechadas” (A, B e C) e “abertas” (D, E e F). A = *Subulo gouazoubira*. B = *Passalites nemorivagus*. C = *Mazama rufa*. D = *Odocoileus virginianus cariacou*. E = *Blastocerus dichotomus*. F = *Ozotoceros bezoarticus*. Escala em centímetros. Fonte: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE).

Em nível específico, são consideradas 18 espécies para tribo Odocoileini (Merino e Rossi, 2010; Heckeberg et al., 2016), das quais apenas *Odocoileus hemionus* não ocorre no Neotrópico. Trabalhos taxonômicos recentes levaram a mudanças no arranjo taxonômico da tribo, incluindo, por exemplo, revalidação (Jorge e Benirschke, 1977; Duarte e Jorge, 2003; Peres et al., 2021a) e sinonimização de espécies (Gutiérrez et al., 2015; Mantellatto et al., 2022) e mudança de gênero (Bernegossi et al., 2023; Morales-Donoso et al., 2023; Sandoval et al., 2023), porém o número de espécies Neotropicais permanece, por enquanto, 17, conforme listado abaixo.

Tribo Odocoileini

Subtribo Odocoileina

Odocoileus hemionus (Rafinesque, 1817) – região Neoártica

Odocoileus virginianus (Zimmermann, 1780)

Odocoileus pandora (Merriam, 1901)

Mazama americana (Erxleben, 1777)

Mazama temama (Kerr, 1792)

Mazama rufa (Illiger 1811)
Mazama rufina (Bourcier e Pucheran, 1852)
Mazama nana (Hensel, 1872)
Mazama jucunda Thomas, 1913

Subtribo Blastocerina

Hippocamelus bisulcus (Molina, 1784)
Hippocamelus antisensis (d'Orbigny, 1834)
Blastocerus dichotomus (Illiger, 1815)
Ozotoceros bezoarticus (Linnaeus, 1758)
Subulo gouazoubira (Fischer, 1814)
Passalites nemorivagus (Cuvier, 1817)
Mazama chunyi Hershkovitz, 1959
Pudu puda (Molina, 1782)

Pudu mephistopheles (De Winton, 1896) – posição incerta entre as subtribos (Heckeberg, 2020)

Apesar de a região neotropical ser um *hotspot* de diversidade para os cervídeos, a evolução e sistemática do grupo nesta região ainda é desconhecida devido à escassez de registros fósseis (Webb, 2000). Entretanto, estudos realizados nas últimas décadas usando marcadores mitocondriais para reconstruir a história filogenética do grupo têm contribuído para mudar esse cenário. Destaca-se o trabalho realizado por Duarte et al. (2008) (Figura 02) usando um fragmento do gene mitocondrial Citocromo b (CYTB) para realizar análises filogenéticas incluindo representantes de todos os gêneros neotropicais. Entre os achados mais surpreendentes, ressaltam-se os elevados níveis de divergência molecular e citogenética entre espécies morfológicamente muito semelhantes, naquele momento todas incluídas no gênero *Mazama*, associadas em menor ou maior grau a ambientes florestais. Esse estudo serviu como marco para diversos trabalhos que seriam realizados posteriormente com intuito de auxiliar na resolução taxonômica do grupo, especialmente àqueles utilizando análises citogenéticas (González e Duarte, 2020).

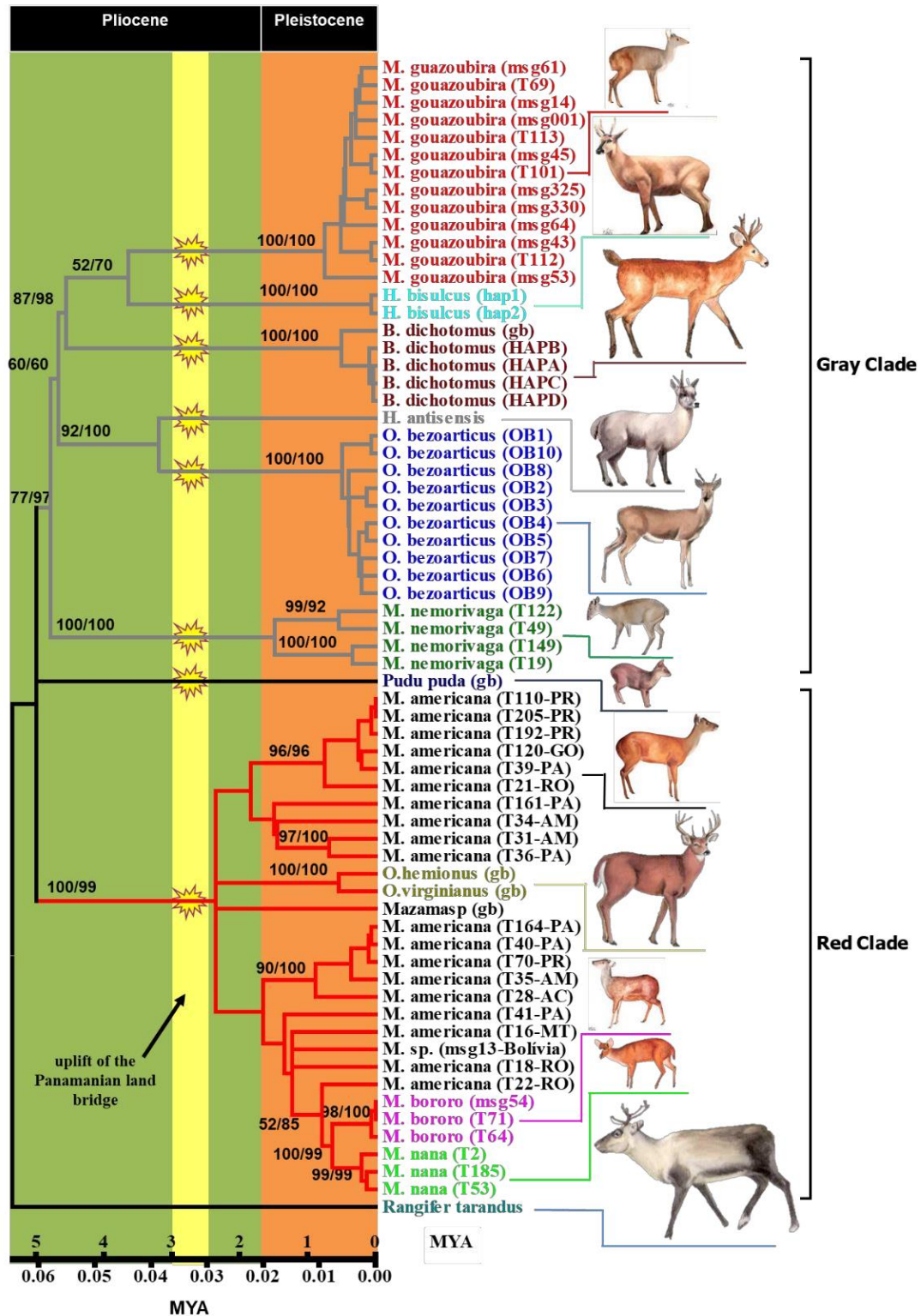


Figura 02. Relações filogenéticas de cervídeos neotropicals (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae) inferidas a partir de uma matriz de 934 pb do gene mitocondrial CYTB. O suporte dos clados é apresentado através de valores de bootstrap e probabilidade posterior (>50%). Os clados vermelho e cinza são, respectivamente, homólogos às subtribos Odocoileina e Blastocerina sensu Heckberg et al. (2016). Figura publicada por Duarte et al. (2008).

As espécies de cervídeos florestais com ocorrência no Brasil estão atualmente alocadas em três gêneros, *Subulo*, *Passalites* e *Mazama* (Figura 01, A-C). As duas primeiras são da subtribo Blastocerina; já *Mazama* possui representantes nas duas subtribos (vide lista de espécies anteriormente apresentada), sendo, portanto, classificado como um táxon não-monofilético (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Zurano et al., 2019; Heckeberg, 2020). A transferência de *M. chunyi* para o gênero *Subulo* já foi sugerida (Bernegossi et al., 2023) mas não foi formalmente avaliada.

Além da problemática taxonômica, há também escassez de estudos ecológicos com essas espécies pois, além do fato de serem morfologicamente semelhantes, são raras e extremamente elusivas (González e Duarte, 2020). Informações sobre a distribuição geográfica dessas espécies, por exemplo, ainda são incipientes. Tal realidade pode ser exemplificada pela descoberta recente de uma população da espécie amazônica *P. nemorivagus* na Mata Atlântica do Espírito Santo e Bahia (Oliveira et al., 2020). Uma lacuna importante é a identificação da espécie que ocorre no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), maior área contínua de Mata Atlântica em Minas Gerais (IEF, 2023). Usando DNA fecal, Oliveira et al. (2020) realizaram uma análise filogenética com fragmentos de um gene mitocondrial e demonstraram que essa população pertence ao gênero *Mazama*, podendo ser, em tese, qualquer espécie do gênero que ocorre no Brasil: *M. americana*, *M. rufa*, *M. jucunda* ou *M. nana*, ou ainda ser uma nova espécie.

Adicionalmente, além de saber quantas espécies existem, quais suas delimitações e onde ocorrem, dados demográficos são essenciais para conservação dessas espécies. Valores de densidade são parâmetros-chave em quatro dos cinco critérios da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) utilizados para avaliar o grau de risco de extinção de uma espécie (IUCN, 2012). No entanto, estimativas populacionais de espécies elusivas, como os cervídeos florestais neotropicais, são difíceis de obter porque os métodos mais comuns, baseados em observação direta, aérea ou terrestre, não se mostraram eficazes (Fragoso et al., 2016).

A coleta não invasiva de amostras fecais em determinada área, seguido da identificação das amostras em nível de espécie, é uma alternativa viável. Exemplos de tais abordagens são a Amostragem por Distância Indireta (Buckland et al., 2015) e o *Faecal Standing Crop* (FSC) (Eberhardt e Etten, 1956). Todavia, ambos os métodos exigem que sejam estimados alguns parâmetros, por exemplo a taxa de defecação diária da espécie focal e o tempo de persistência/ detectabilidade das amostras no campo. Estimativas confiáveis desses parâmetros requerem o uso de métodos estatísticos robustos para que possam de fato ser úteis em fundamentar ações de manejo e conservação.

Diante desse contexto, este trabalho teve dois objetivos centrais: 1) identificar a espécie de veado do gênero *Mazama* que ocorre no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, através de análises genéticas feitas com DNA fecal (capítulo dois); e 2) aperfeiçoar a abordagem analítica para estimativas de densidade populacional de cervídeos florestais a partir de amostragem fecal (capítulo três).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Gênero *Mazama* Rafinesque, 1817

As espécies do gênero *Mazama* se enquadram no grupo dos “pequenos cervídeos florestais”, animais geralmente noturnos, solitários, territorialistas, sedentários e que ocupam pequenas áreas de vida (Barrette, 1987). O gênero é composto por animais de pequeno e médio porte (15-40 kg de massa; 40-65 cm de altura), pelagem em tons marrons avermelhados, com chifres em forma de espeto e hábitos muito evasivos (Merino e Rossi, 2010). São espécies com alto grau de semelhança morfológica (Figura 03) dada a seleção convergente para habitarem áreas florestais. Portanto, análise de dados morfológicos são pouco informativas para inferir as relações filogenéticas e compreender sua diversidade, sendo necessário a implementação de ferramentas moleculares e sobretudo citogenéticas (Duarte et al., 2008; Heckeberg, 2020).

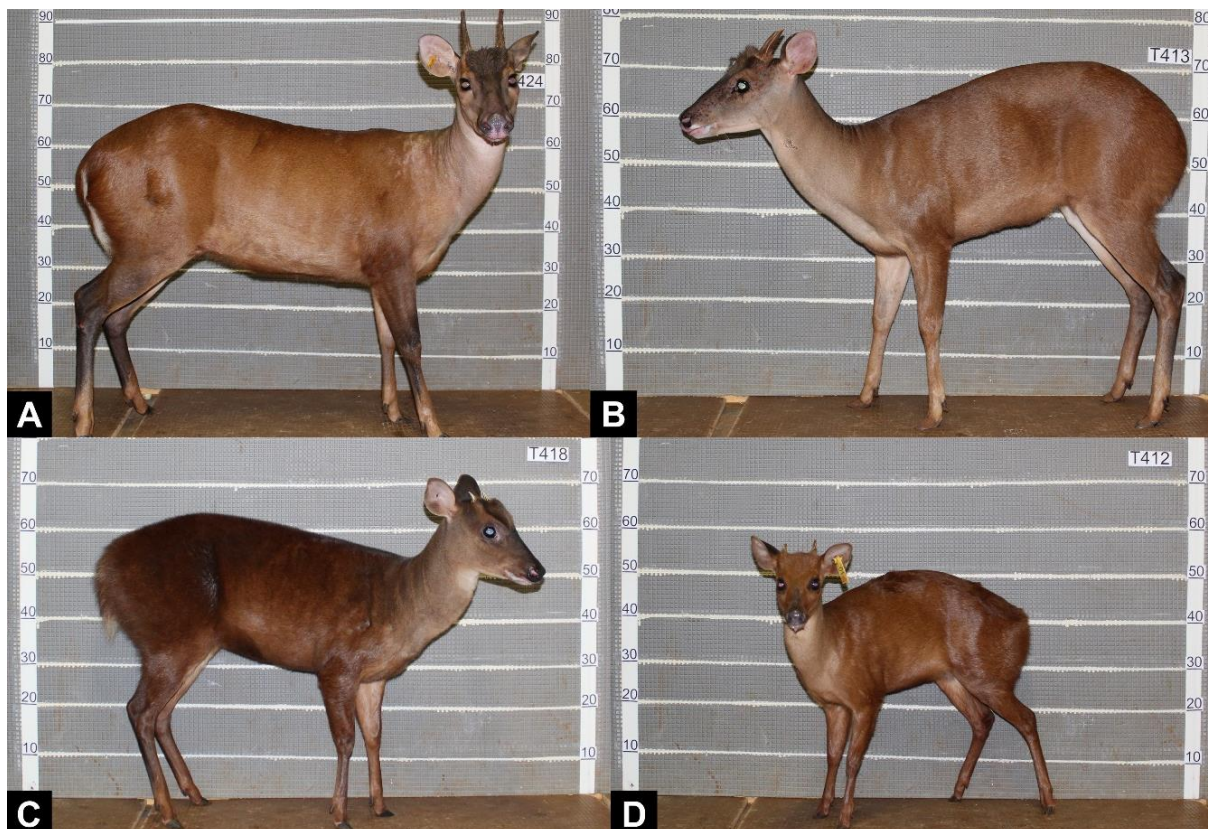


Figura 03. Espécies do gênero *Mazama* que ocorrem no Brasil. A = *Mazama americana*. B = *Mazama rufa*. C = *Mazama jucunda*. D = *Mazama nana*. Escala em centímetros. Fonte: Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE).

Apesar dos grandes esforços empregados nas últimas décadas (González e Duarte, 2020), a compreensão sobre a taxonomia do gênero *Mazama* ainda apresenta muitos gargalos, que em sua maioria estão relacionadas ao fato de esses animais serem extremamente elusivos e ainda apresentam elevado grau de homoplasia nos dados morfológicos, ao passo que são muito diferentes molecular e citogeneticamente (Duarte et al., 2008). Nesse contexto, diversos estudos evidenciam a condição não monofilética do gênero (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Zurano et al., 2019; Heckeberg, 2020).

Ademais, são identificados também complexos de espécies crípticas, isto é, duas ou mais espécies distintas que são erroneamente classificadas (e ocultadas) sob o mesmo nome de espécie (Bickford et al., 2007). É o caso da espécie *M. americana* (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017), para a qual foram identificados diferentes padrões cromossômicos, denominados citótipos (*M. americana* lato sensu), com

coerência geográfica ao longo da distribuição da espécie no Brasil (Abril et al., 2010). Posteriormente, Cifuentes-Rincón et al. (2020) indicaram um neótipo para a espécie, fixando assim o padrão cromossômico da espécie (*M. americana* stricto sensu). Assim, várias espécies relacionadas ao gênero recentemente passaram por rearranjos taxonômicos, por exemplo:

- **Validação:** *M. temama*, *M. bororo* e *M. rufa* foram reconhecidas como espécies distintas, saindo da sinonímia do complexo *M. americana* (Jorge e Benirschke, 1977; Duarte e Jorge, 2003; Peres et al., 2021a).
- **Sinonimização:** *M. bororo* Duarte 1996, inicialmente descrita como nova espécie, foi posteriormente considerada sinônimo júnior de *M. jucunda* (Mantellatto et al., 2022) e *M. bricenii* Thomas, 1908 foi considerada sinônimo júnior de *M. rufina* (Gutiérrez et al., 2015).
- **Mudança de gênero:** *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. pandora* saíram do gênero *Mazama*, tornando-se, respectivamente, *Subulo gouazoubira* (Bernegossi et al., 2023), *Passalites nemorivagus* (Morales-Donoso et al., 2023) e *Odocoileus pandora* (Sandoval et al., 2023).

Dessa forma, o gênero *Mazama* abriga atualmente sete espécies, seis das quais estão na subtribo Odocoileina – *M. americana*, *M. temama*, *M. rufa*, *M. rufina*, *M. nana* e *M. jucunda* – e uma está na subtribo Blastocerina, *M. chunyi*, que deve ter sua nomenclatura revista, uma vez que o gênero *Mazama* ficará restrito às espécies ligadas a sua espécie-tipo, *M. americana* (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012; Gutiérrez et al., 2017). Por fim, a medida que mais estudos sejam feitos, a perspectiva é que novas espécies sejam descritas ou revalidadas na região Neotropical (Peres et al., 2021a).

2.2 Veado-mateiro-pequeno (*Mazama juncunda* Thomas, 1913)

Espécie endêmica da Mata Atlântica, *M. juncunda* (Figura 03, C e Figura 04) é um cervídeo florestal de porte médio, com aproximadamente 25 kg de peso e 50 cm de altura. Sua coloração geral é avermelhada com tons cinza no pescoço, apresentando tonalidades mais claras nas laterais e mais escuras na região dorsal. Apresenta regiões brancas na base da orelha e na maior parte ventral do corpo, e cores enegrecidas no calcâneo (Duarte, 1996). As medidas corporais são intermediárias entre duas espécies mais correlacionais no gênero, *M. nana* e *M. americana* (Duarte e Jorge, 2003).

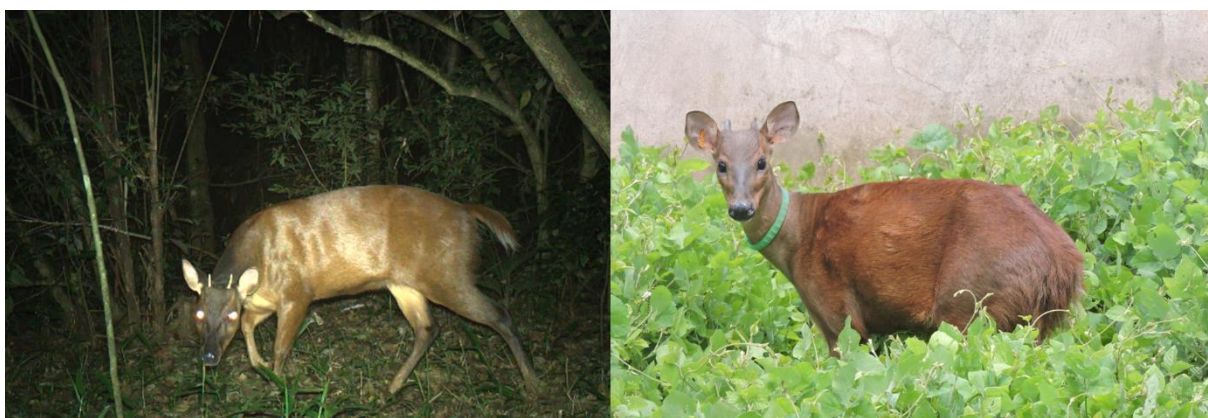


Figura 04. Indivíduo de vida livre (esquerda) e de cativeiro (direita) da espécie *Mazama juncunda*. Fonte: Francisco Grota-Neto (esquerda) e Jeferson Lucas Sousa Freitas (direita).

O padrão cromossômico da espécie (Figura 05), com número diploide de cromossomos ($2n$) = 32-34 e número fundamental (NF) = 46, é hoje sua característica diagnóstica em relação as demais espécies de *Mazama*, tendo sido a base para sua validação como espécie e representando o principal critério para sua correta identificação (Duarte e Jorge, 2003). Desconsiderando os cromossomos sexuais, o cariótipo da espécie é composto de cinco grupos: Grupo A (grandes submetacêntricos) = 8 a 10 cromossomos, Grupo B (supranumerários) = 4 a 6 cromossomos, Grupo C (pequenos submetacêntricos) = 2 cromossomos e Grupo D (grandes acrocêntricos) = 4 cromossomos e Grupo E (pequenos acrocêntricos) = 14 a 18 cromossomos (Duarte e Jorge, 2003).

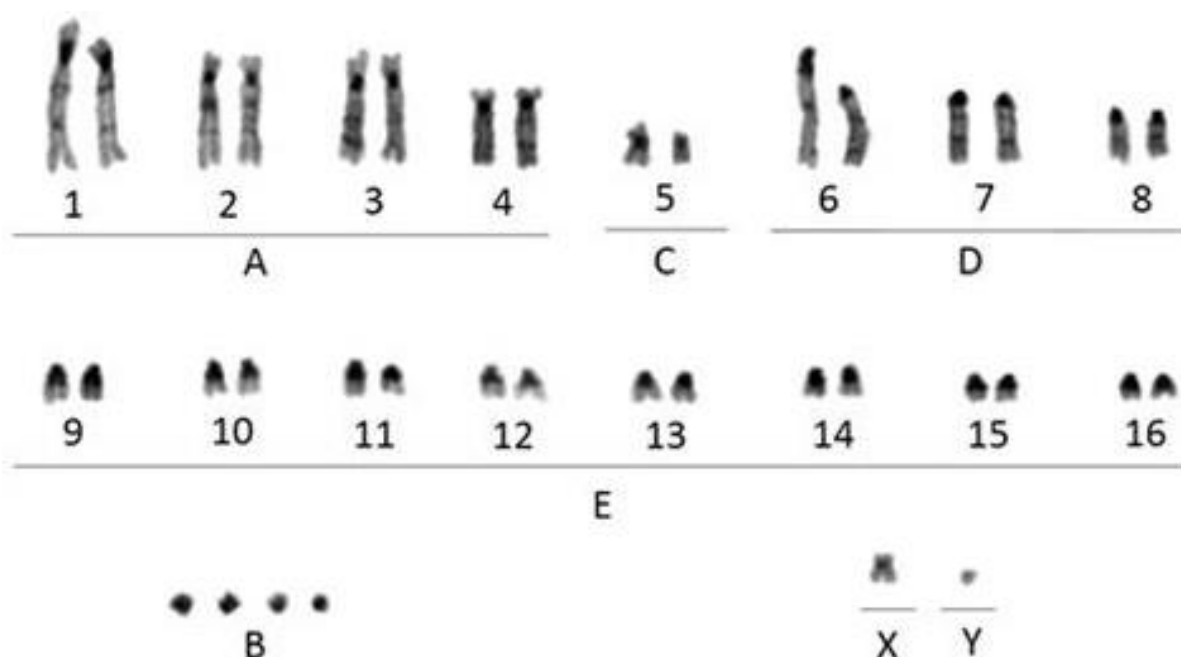


Figura 05. Cariótipo da espécie *Mazama jucunda*, apresentando $2n = 34$ e $NF=46$.
Fonte: José Maurício Barbanti Duarte.

Há poucas evidências sobre a distribuição histórica da espécie. Rossi (2000), ao analisar peles e crânios de *Mazama* depositados em museus, descobriu uma população de *M. americana* parcialmente diferenciada, proveniente da mesma região dos animais que foram usados na descrição de *M. bororo* [= *M. jucunda*] (Duarte e Jorge, 2003). Apesar de não ser possível afirmar com certeza que os animais analisados por Rossi (2000) correspondem à *M. jucunda*, a população analisada por esse autor representa, até então, uma das evidências mais razoáveis da distribuição histórica de *M. jucunda*. Assim, é levantada a hipótese de que essa espécie historicamente teria ocupado o complexo de montanhas que compõem a ecorregião de florestas costeiras da Serra do Mar, no Sudeste e Sul do Brasil (Vogliotti e Duarte, 2010).

A primeira proposta de distribuição recente da espécie foi baseada nas localidades dos animais de cativeiro usadas na sua descrição. Esses animais eram originários das cidades Capão Bonito e Barra do Turvo no estado de São Paulo, e São José dos Pinhais e Paranaguá no Paraná. A distribuição geográfica proposta seria

limitada a região entre o Sul do estado de São Paulo e leste do Paraná (Duarte, 1996; Duarte e Jorge, 2003).

Para determinar a distribuição geográfica de *M. jucunda* de modo mais preciso, um trabalho recente realizou uma ampla amostragem genética não invasiva utilizando cães farejadores para encontrar amostras fecais de cervídeos (Duarte et al., 2017). Foram amostradas 46 Unidades de Conservação dentro da potencial área de ocorrência da espécie e 555 amostras fecais foram coletadas. Usando um protocolo de PCR-RFLP (González et al., 2009; Souza et al., 2013) ou sequenciamento de um fragmento de DNA mitocondrial, 497 amostras foram identificadas em nível de espécie, sendo 116 de *M. jucunda* (Duarte et al., 2017).

A partir dos pontos de ocorrência, os autores propuseram uma área de ocorrência que engloba a Serra do Mar e Serra de Paranapiacaba, na porção leste dos estados São Paulo, Paraná e Santa Catarina, região de Mata Atlântica com fitofisionomia de Floresta Ombrófila Densa (Figura 07). Isso resulta em uma distribuição geográfica de 41.714 km², sendo a melhor estimativa disponível na literatura da distribuição atual da espécie (Duarte et al., 2017).

Outro trabalho recente realizou uma extensa compilação de ocorrências entre 2000 e 2020 de algumas espécies de cervídeos florestais brasileiras, incluindo *M. jucunda*, representando o conjunto de dados mais abrangente de cervídeos florestais neotropicais até então (Oliveira et al., 2022). As ocorrências incluíram identificações confiáveis por imagens e também por DNA fecal, adicionando registros ausentes em Duarte et al. (2017). Entretanto, no caso de *M. jucunda*, todos os novos registros estão dentro dos limites da distribuição geográfica proposta por Duarte et al. (2017). Nesse estudo foram verificadas 350 ocorrências de *M. jucunda*, cujas localidades estão discriminadas na Tabela 01.

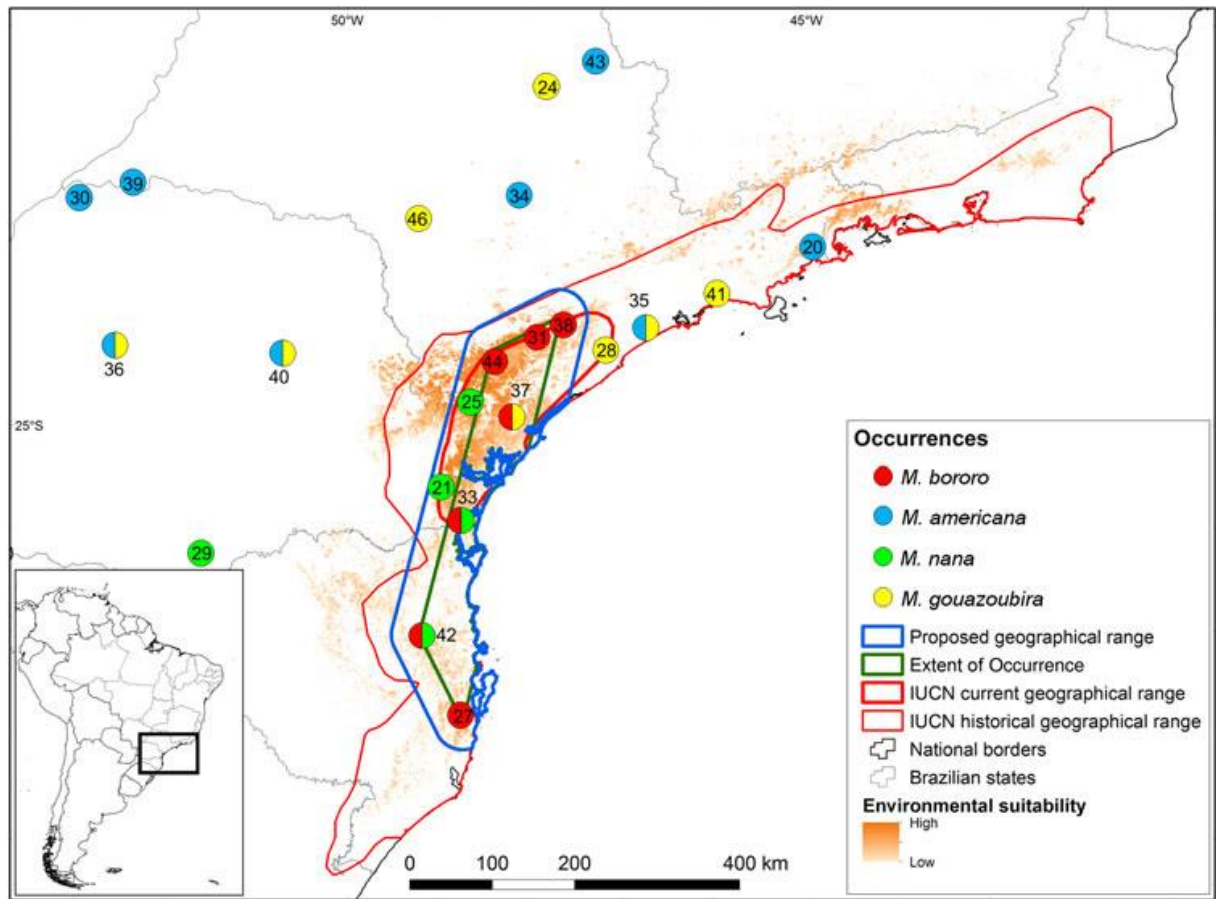


Figura 06. Modelo de distribuição de espécies para *Mazama jucunda*, com extensão de ocorrência, distribuição geográfica da IUCN, distribuição geográfica proposta e locais de ocorrência das espécies de *Mazama*, numerados como na Tabela 1 de Duarte et al. (2017). Um círculo com duas cores indica que duas espécies foram encontradas no mesmo local de amostragem. Figura publicada por Duarte et al. (2017).

Tabela 01. Localidades com ocorrência de *Mazama jucunda* de 2000 e 2020, segundo levantamento feito por Oliveira et al. (2022). APA = Área de Proteção Ambiental, PE = Parque Estadual, PN = Parque Nacional, RB = Reserva Biológica, RPPN = Reserva Particular do Patrimônio Natural.

Unidade de Conservação ou Cidade	Estado	Método da identificação e ano da ocorrência	
		DNA fecal*	Foto
APA Guaratuba	PR	2019	-
PE das Lauráceas	PR	2019	2019
PE de Campinhos	PR	2019	2019
PE Pau Oco	PR	2019	-
PE Pico do Marumbi	PR	2019	2019
PN Guaricana	PR	2019	2018
PN Saint-Hilaire/Lange	PR	2018	-

RB Bom Jesus	PR	-	2019
RPPN Salto Morato	PR	2019	2019
PE Serra do Tabuleiro	SC	2012	-
PN Serra do Itajaí	SC	2012	-
PE Carlos Botelho	SP	2011	2016, 2017
PE de Jacupiranga	SP	2002	-
PE Ilha do Cardoso	SP	-	2005, 2019
PE Intervalos	SP	2002	2000
PE Turístico do Alto Ribeira	SP	-	2018, 2019
Pilar do Sul, Fazenda João XXIII	SP	2002	-
RPPN Legado das Águas	SP	-	2017, 2018
RPPN Parque do Zizo	SP	-	2019
RPPN Trápaga	SP	-	2018

*PCR-RFLP ou análise filogenética por Inferência Bayesiana com um e dois fragmentos do gene mitocondrial Citocromo b, respectivamente (Oliveira et al., 2022).

Segundo a IUCN, *M. jucunda* é classificada como Vulnerável (Vogliotti et al., 2016). Porém, na última atualização da lista brasileira de espécies em risco de extinção, realizada em 2022, ela deixou de ser classificada como ameaçada (Brasil, 2022) devido, principalmente, a expansão da sua distribuição geográfica (Duarte et al., 2017) , e, conseqüentemente, do contingente populacional, em relação àquela inicialmente proposta (Duarte, 1996; Duarte e Jorge, 2003). A única estimativa de densidade disponível na literatura para essa espécie foi obtida usando genotipagem de amostras fecais e aplicando um método de captura e recaptura em um estudo feito no Parque Estadual de Intervalos, SP, entre 2002 e 2004, chegando a um valor médio de 1,51 indivíduo/km² (Duarte et al., 2004).

2.3 Estimativas populacionais em cervídeos florestais

Os cervídeos são componentes ecológicos fundamentais de muitos ecossistemas (Linnell et al., 2020). Enquanto populações de algumas espécies estão em declínio, outras são consideradas superabundantes (Valente et al., 2020). Dados de densidade são parâmetros-chave em quatro dos cinco critérios da IUCN usados para avaliar se uma espécie se enquadra em uma categoria de ameaça (IUCN, 2012).

Portanto, estimativas confiáveis de densidade populacional são cruciais para embasar a gestão da biodiversidade (Williams et al., 2002).

Estimativas populacionais de espécies elusivas, como pequenos cervídeos neotropicais, são difíceis de obter porque os métodos mais comuns, baseados em observação direta, aérea ou terrestre, não se mostraram eficazes (Fragoso et al., 2016). As espécies do gênero *Mazama* – que inclui a maioria das espécies florestais neotropicais –, por exemplo, são geralmente noturnas, solitárias e restritas ou associadas a ambientes florestais, frequentemente de difícil acesso (Barrette, 1987).

Armadilhas fotográficas, embora sejam uma das metodologias alternativas mais comuns para o estudo de espécies elusivas, fornecem informações limitadas nesse caso, uma vez que as espécies de *Mazama* são morfologicamente muito semelhantes e identificações incorretas são comuns (Peres et al., 2021b). A coleta de amostras fecais é um método alternativo que permite a análise de DNA e fornece diferentes informações, como a espécie e o indivíduo ao qual as amostras pertencem (Mantellatto et al., 2017). Porém, uma vez que a identificação em nível de indivíduo ainda é um método caro e que precisa de aperfeiçoamento para ungulados de florestas neotropicais (Oliveira e Duarte, 2013), uma opção economicamente mais viável é a contagem pilhas fecais em uma área previamente determinada de ocorrência da espécie (Neff, 1968), seguido da identificação das amostras fecais em nível de espécie (Duarte et al., 2017; Oliveira et al., 2019).

O método *Faecal Standing Crop* (FSC) (Eberhardt e Etten, 1956) é frequentemente usado para estimar a densidade populacional e tem sido aplicado em estudos populacionais de diversas espécies (Ahrestani et al., 2018). Uma vez que o uso de cães farejadores aumenta consideravelmente a eficácia da coleta (Smith et al., 2001), um estudo recente propôs a incorporação de parâmetros específicos relacionados à detecção de amostras por cães farejadores (Silva et al., 2020). A fórmula geral do método FSC é:

$$D = \frac{\left(\frac{N}{W \times L} \right)}{R \times T}$$

Onde D = densidade, N = número amostras fecais, W = largura da faixa amostral, L = comprimento da faixa amostral, R = taxa média de defecação diária por animal da espécie, T = tempo médio de persistência/ detectabilidade da amostral fecal em campo.

Embora o método FSC seja promissor, existem algumas limitações relacionadas à estimativa dos parâmetros usados na fórmula, que exigem um tratamento estatístico minucioso. Idealmente, todos os parâmetros usados devem ser o mais específicos possível para a espécie em estudo, o local e estação do ano em que a amostragem foi feita (Laing et al., 2003). No entanto, isso nem sempre é viável devido a restrições financeiras e logísticas ou limitações inerentes à ecologia da espécie. A taxa de defecação (R), às vezes estimada apenas em indivíduos em cativeiro (Rivero et al., 2004), e o tempo médio de persistência/ detectabilidade das fezes (T), por exemplo, geralmente são obtidos a partir da literatura (Silva et al., 2020), em vez de serem estimados a partir de dados empíricos adquiridos localmente (Marques et al., 2001).

Uma outra abordagem possível, também baseada na contagem de pilhas fecais, é a Amostragem por Distância Indireta (Buckland et al., 2015). Nesse caso, são registradas as distâncias perpendiculares de cada amostra fecal coletada em relação ao respectivo transecto, e uma função de detecção é implementada (Figura 07), permitindo estimar a densidade de fezes. Em seguida, a densidade fecal é convertida na densidade de animais levando em consideração a taxa de defecação e o tempo de persistência/ detectabilidade da amostra (Laing et al., 2003; Buckland et al., 2015). De qualquer forma, ainda é necessário estimar alguns parâmetros para obter uma estimativa final de densidade, portanto, há incerteza em torno dela, requerendo, tal qual o método FSC, tratamento estatístico minucioso.

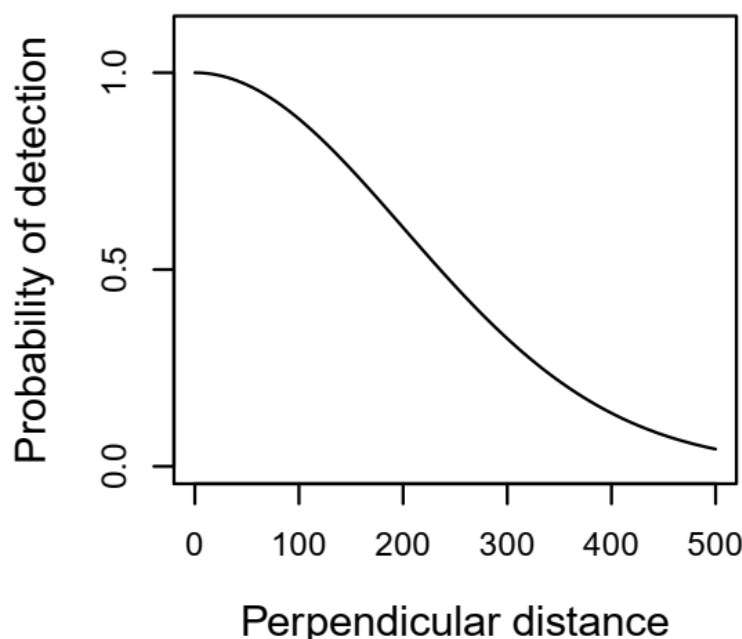


Figura 07. Exemplo hipotético de uma função de detecção implementada com dados de transecto linear pelo método de amostragem de distância. Figura adaptada de Miller et al. (2019).

3 REFERÊNCIAS

Abril VV, Carnelossi EAG, González S, Duarte JMB (2010) Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research** 128(1–3):177–187. <https://doi.org/10.1159/000298819>

Ahrestani FS, Kumar NS, Vaidyanathan S, Hiby L, Jathanna D, Karanth KU (2018) Estimating densities of large herbivores in tropical forests: Rigorous evaluation of a dung-based method. **Ecology and Evolution** 8(15):7312–7322. <https://doi.org/10.1002/ece3.4227>

Barrette C (1987) The comparative behavior and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: Wemmer CM (Ed.) **Biology and management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 200–213.

Bernegossi AM, Borges CHS, Sandoval EDP, Cartes JL, Cernohorska H, Kubickova S, Vozdova M, Caparroz R, González S, Duarte JMB (2023) Resurrection of the genus *Subulo* for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy** 104(3):619–633. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyac068>

Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution** 22(3):148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>

Brasil (2022). **Ministério do Meio Ambiente. Portaria MMA nº 148, de 7 de junho de 2022.** <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/portaria-mma-n-148-de-7-de-junho-de-2022-406272733>.

Buckland ST, Rexstad EA, Marques TA, Oedekoven CS (2015) **Distance Sampling: Methods and Applications.** Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19219-2>

Cifuentes-Rincón A, Morales-Donoso JA, Sandoval EDP, Tomazella IM, Mantellatto AMB, Thoisy B, Duarte JMB (2020) Designation of a neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla, Cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. **ZooKeys** 958:143–164. <https://doi.org/10.3897/zookeys.958.50300>

Duarte JMB (1996) **Guia de Identificação de Cervídeos Brasileiros.** Jaboticabal: FUNEP.

Duarte JMB, González S, Maldonado JE (2008). The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49(1):17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.009>

Duarte JMB, González S, Maldonado J, Garcia JE, Rodrigues FP, Vogliotti A, Oliveira EJF, Talarico ÂC, Cheffer R (2004). **Ecologia e Distribuição de *Mazama bororo* (Mammalia; Cervidae) - Relatório técnico.** Jaboticabal: FUNEP, UNESP, PROBIO - Ministério do Meio Ambiente, Banco Mundial, p. 103.

Duarte JMB, Jorge W (2003) Morphologic and Cytogenetic Description of the Small Red Brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia** 67(3):403–410. <https://doi.org/10.1515/mamm.2003.67.3.403>

Duarte JMB, Talarico ÂC, Vogliotti A, Garcia JE, Oliveira ML, Maldonado JE, González S (2017) Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx** 51(4):656–664. <https://doi.org/10.1017/S0030605316000405>

Eberhardt L, Etten RCV (1956) Evaluation of the Pellet Group Count as a Deer Census Method. **The Journal of Wildlife Management** 20(1):70–74.

Fragoso JMV, Levi T, Oliveira LFB, Luzar JB, Overman H, Read JM, Silvius KM (2016) Line Transect Surveys Underdetect Terrestrial Mammals: Implications for the Sustainability of Subsistence Hunting. **PLOS ONE** 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152659>

Gilbert C, Ropiquet A, Hassanin A (2006). Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40(1):101–117. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.017>

González S, Duarte JMB (2020). Speciation, evolutionary history and conservation trends of neotropical deer. **Mastozoología Neotropical** 27:37–46. https://doi.org/10.31687/saremMN_SI.20.27.1.05

González S, Maldonado JE, Ortega J, Talarico AC, Bidegaray-Batista L, Garcia JE, Duarte JMB (2009) Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources** 9(3):754–758. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02390.x>

Gutiérrez EE, Helgen KM, McDonough MM, Bauer F, Hawkins MTR, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, Maldonado JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** 697:87–131. <https://doi.org/10.3897/zookeys.697.15124>

Gutiérrez EE, Maldonado JE, Radosavljevic A, Molinari J, Patterson BD, Martínez-C JM, Rutter AR, Hawkins MTR, Garcia FJ, Helgen KM (2015) The Taxonomic Status of *Mazama bricenii* and the Significance of the Táchira Depression for Mammalian Endemism in the Cordillera de Mérida, Venezuela. **PLOS ONE** 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129113>

Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, van-Vuuren BJ, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen T, Couloux A (2012) Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus Biologies** 335(1):32–50. <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2011.11.002>

Heckeberg NS (2020) The systematics of the Cervidae: a total evidence approach. **PeerJ** 8:1-76. <https://doi.org/10.7717/peerj.8114>

Heckeberg N S, Erpenbeck D, Wörheide G, Rössner GE (2016) Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ** 4:1-31. <https://doi.org/10.7717/peerj.2307>

IEF (2023) **Plano de Manejo do Parque Estadual do Rio Doce**. Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais. <http://www.ief.mg.gov.br/component/content/195?task=view>.

IUCN (2012) **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition**. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, p. 32.

Jorge W, Benirschke K (1977) Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer, *Mazama americana temama* (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-Robertsonian translocation. **Cytologia** 42(3–4):711–721. <https://doi.org/10.1508/cytologia.42.711>

Laing SE, Buckland ST, Burn RW, Lambie D, Amphlett A (2003) Dung and nest surveys: estimating decay rates. **Journal of Applied Ecology** 40(6):1102–1111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2003.00861.x>

Linnell JDC, Cretois B, Nilsen EB, Rolandsen CM, Solberg EJ, Veiberg V, Kaczensky P, Van-Moorter B, Panzacchi M, Rauset GR, Kaltenborn B (2020) The challenges and opportunities of coexisting with wild ungulates in the human-dominated landscapes of Europe's Anthropocene. **Biological Conservation**, 244. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108500>

Mantellatto AMB, Caparroz R, Christofolletti MD, Piovezan U, Duarte JMB (2017) Genetic diversity of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) population in the Brazilian Pantanal assessed by combining fresh fecal DNA analysis and a set of heterologous microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology** 40(4):774–780. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0323>

Mantellatto AMB, González S, Duarte JMB (2022) Cytochrome b sequence of the *Mazama americana jucunda* Thomas, 1913 holotype reveals *Mazama bororo* Duarte, 1996 as its junior synonym. **Genetics and Molecular Biology** 45(1). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2021-0093>

Marques FFC, Buckland ST, Goffin D, Dixon CE, Borchers DL, Mayle BA, Peace AJ (2001) Estimating deer abundance from line transect surveys of dung: sika deer in southern Scotland. **Journal of Applied Ecology**, 38(2):349–363. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2664.2001.00584.x>

Merino ML, Rossi RV (2010) Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Brazil: FUNEP and Gland, Switzerland: IUCN, p. 2–11.

Miller DL, Rexstad E, Thomas L, Marshall L, Laake JL (2019) Distance Sampling in R. **Journal of Statistical Software**, 89(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v089.i01>

Morales-Donoso JA, Vacari GQ, Bernegossi AM, Sandoval EDP, Peres PHF, Galindo DJ, Thoisy B, Vozdova M, Kubickova S, Duarte JMB (2023) Revalidation of *Passalites* Gloger, 1841 for the Amazon brown brocket deer *P. nemorivagus* (Cuvier, 1817) (Mammalia, Artiodactyla, Cervidae). **ZooKeys** 1167:241–264. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1167.100577>

Neff DJ (1968). The Pellet-Group Count Technique for Big Game Trend, Census, and Distribution: A Review. **The Journal of Wildlife Management** 32(3):597–614.

Oliveira ML, Couto HTZ, Duarte JMB (2019) Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. **European Journal of Wildlife Research**, 65(21). <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1258-6>

Oliveira ML, Duarte JMB (2013) Amplifiability of mitochondrial, microsatellite and amelogenin DNA loci from fecal samples of red brocket deer *Mazama americana* (Cetartiodactyla, Cervidae). **Genetics and Molecular Research** 12(1):44–52.

Oliveira ML, Grotta-Netto F, et al. (2022) Elusive deer occurrences at the Atlantic Forest: 20 years of surveys. **Mammal Research**, 67(1):51–59. <https://doi.org/10.1007/s13364-021-00604-4>

Oliveira ML, Peres PHF, Gatti A, Morales-Donoso JA, Mangini PR, Duarte JMB (2020) Faecal DNA and camera traps detect an evolutionarily significant unit of the Amazonian brocket deer in the Brazilian Atlantic Forest. **European Journal of Wildlife Research** 66(28). <https://doi.org/10.1007/s10344-020-1367-2>

Peres PHF, Grotta-Netto F, Luduvério DJ, Oliveira ML, Duarte JMB (2021b) Implications of unreliable species identification methods for Neotropical deer conservation planning. **Perspectives in Ecology and Conservation** 19(4):435–442. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.08.001>

Peres PHF, Luduvério DJ, Bernegossi AM, Galindo DJ, Nascimento GB, Oliveira ML, Sandoval EDP, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Duarte JMB (2021a) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (Artiodactyla: Cervidae) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). **Frontiers in Genetics** 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.742870>

Prothero DR, Domning D, Fordyce RE, Foss S, Janis C, Lucas S, Marriott KL, Metais G, Naish D, Padian K, Rössner G, Solounias N, Spaulding M, Stucky RM, Theodor J, Uhen M (2022) On the Unnecessary and Misleading Taxon “Cetartiodactyla.” **Journal of Mammalian Evolution** 29(1):93–97. <https://doi.org/10.1007/s10914-021-09572-7>

Rivero K, Rumiz DI, Taber AB (2004) Estimating brocket deer (*Mazama gouazoubira* and *M. americana*) abundance by dung pellet counts and other indices in seasonal Chiquitano forest habitats of Santa Cruz, Bolivia. **European Journal of Wildlife Research** 50(4):161–167. <https://doi.org/10.1007/s10344-004-0064-x>

Romero-Castañón S, Román GV, Espino-Barros OV, Molina-Martínez A (2020) Defecation rate of Red brocket deer (*Mazama temama*) in captivity. **Caldasia** 43(1):202–204. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v43n1.79954>

Rossi RV (2000) **Taxonomia de *Mazama Rafinesque, 1817* do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 174 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas - Zoologia) - Universidade de São Paulo, São Paulo.

Sandoval EDP, Bernegossi AM, Gallina S, Reyna-Hurtado R, Duarte JMB. (2023) Cytogenetic, molecular, and morphological characterization of *Odocoileus pandora* (Merriam, 1901) (Artiodactyla, Cervidae). **Canadian Journal of Zoology**. <https://doi.org/10.1139/cjz-2022-0037>

Silva AR, Oliveira ML, Duarte JMB (2020) Incorporating the sampling effectiveness of detection dogs in the faecal standing crop method. **European Journal of Wildlife Research** 66(4):47. <https://doi.org/10.1007/s10344-020-01388-9>

Smith DA, Ralls K, Davenport B, Adams B, Maldonado JE (2001) Canine Assistants for Conservationists. **Science** 291(5503):435–435. <https://doi.org/10.1126/science.291.5503.435B>

Souza JN, Oliveira ML, Duarte JMB (2013) A PCR/RFLP methodology to identify non-Amazonian Brazilian deer species. **Conservation Genetics Resources** 5(3):639–641. <https://doi.org/10.1007/s12686-013-9870-3>

Stehli FG, Webb SD (Eds.) (1985) **The Great American Biotic Interchange**. New York and London: Plenum Press. <https://doi.org/10.1017/S0016756800033604>

Valente AM, Acevedo P, Figueiredo AM, Fonseca C, Torres RT (2020) Overabundant wild ungulate populations in Europe: management with consideration of socio-ecological consequences. **Mammal Review** 50(4):353–366. <https://doi.org/10.1111/mam.12202>

Vogliotti A, Duarte JMB (2010) Small Red Brocket Deer *Mazama bororo* (Duarte 1996). In: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Brazil: FUNEP e Gland, Switzerland: IUCN, p. 172–176.

Vogliotti A, Oliveira ML, Duarte JMB (2016) *Mazama bororo*. **The IUCN Red List of Threatened Species** 2016: e.T41023A22155086. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T41023A22155086.en>.

Webb DS (2000) Evolutionary History of new world cervidae. In: Vrba ES, Schaller GB (Eds.) **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation**. New Haven: Yale University Press, p. 38–64.

Williams BK, Nichols JD, Conroy MJ (Eds.) (2002) **Analysis and management of animal populations**. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.

Zurano JP, Magalhães FM, Asato AE, Silva G, Bidau CJ, Mesquita DO, Costa GC (2019) Cetartiodactyla: Updating a time-calibrated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 133:256–262. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.015>

CAPÍTULO 2 – Descoberta de uma população do veado-mateiro-pequeno (*Mazama juncunda*) geneticamente estruturada: unidade evolutiva significativa ou nova espécie?

RESUMO

A compreensão sobre a distribuição geográfica dos veados do gênero *Mazama* apresenta grandes lacunas devido aos hábitos elusivos e grande semelhança morfológica entre as espécies. Recentemente foi descoberta uma população de *Mazama* sp. no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Minas Gerais, entretanto não foi possível realizar sua identificação ao nível de espécie. Este trabalho objetivou identificar a espécie que ocorre no PERD por meio de análises genéticas usando DNA fecal. Amostras de animais de referência e amostras fecais coletadas no PERD e ao longo da Mata Atlântica foram sequenciadas para seis fragmentos de regiões do DNA mitocondrial, gerando uma matriz de 1450 pares de base (pb). Foram realizadas análises filogenéticas por Inferência Bayesiana e implementados métodos coalescentes de delimitação molecular de espécies (GMYC e bPTP) para identificar unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs). Ainda, foi construída uma rede de haplótipos e gerada uma matriz de distância genética. As amostras do PERD e de *M. juncunda* foram recuperadas no mesmo clado na hipótese filogenética, porém de modo reciprocamente monofilético, correspondendo a duas MOTUs exclusivas. O PERD possui haplótipos exclusivos e sua distância genética para *M. juncunda* equipara-se àquela entre *M. juncunda* e *M. nana*. Neste trabalho nós reportamos uma nova população de *M. juncunda*, representando uma Unidade Evolutiva Significativa na espécie. Entretanto, a estruturação genética observada e o contexto de isolamento do PERD evidenciam a possibilidade de serem espécies distintas. O presente estudo configura um importante avanço no conhecimento da distribuição geográfica das espécies de cervídeos florestais neotropicais, especialmente referente à *M. juncunda*, com implicações diretas e de curto prazo para sua conservação.

Palavras-chave: DNA fecal, mtDNA, estruturação genética.

1 INTRODUÇÃO

Os cervídeos neotropicais (subfamília Capreolinae, tribo Odocoileini) estão divididos em duas subtribos, Odocoileina e Blastocerina (Heckeberg et al., 2016). As espécies florestais brasileiras estão alocadas em três gêneros, *Subulo*, *Passalites* e *Mazama*. Os dois primeiros são da subtribo Blastocerina; já *Mazama* possui representantes nas duas subtribos, sendo classificado como um táxon não-monofilético (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Zurano et al., 2019; Heckeberg, 2020; Bernegossi et al., 2023; Morales-Donoso et al., 2023).

O gênero *Mazama* historicamente apresenta muitos gargalos taxonômicos (González e Duarte, 2020) relacionados, em grande parte, ao fato de esses animais serem extremamente elusivos e ainda apresentam elevado grau de homoplasia nos caracteres morfológicos, ao passo que são muito diferentes molecular e citogeneticamente (Duarte et al., 2008). Por exemplo, são identificados complexos de espécies crípticas, isto é, duas ou mais espécies distintas que são erroneamente classificadas (e ocultadas) sob o mesmo nome de espécie (Bickford et al., 2007). É o caso da espécie *M. americana* (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017), para a qual foram identificados diferentes padrões cromossômicos, denominados citótipos (*M. americana lato sensu*), com coerência geográfica ao longo da distribuição da espécie no Brasil (Abril et al., 2010a). Recentemente, Cifuentes-Rincón et al. (2020) indicaram um neótipo para a espécie, fixando assim o padrão cromossômico da espécie (*M. americana stricto sensu*). A diversidade cariotípica encontrada no complexo *M. americana* é tamanha ao ponto de atuar como mecanismo de isolamento reprodutivo entre os distintos citótipos, em menor ou maior grau, podendo levar à especiação (Abril et al., 2010a; Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021). Além da problemática taxonômica, informações sobre a distribuição geográfica dessas espécies ainda são escassas; somente para *M. jucunda* e *M. nana* já foram realizados estudos com o objetivo de modelar suas áreas de ocorrência (Duarte et al., 2017; Oliveira et al., 2019). A descoberta recente da espécie amazônica *P. nemorivagus* na Mata Atlântica do Espírito Santo e Bahia demonstra como os dados ainda são incipientes (Oliveira et al., 2020).

Uma lacuna importante dentro do contexto do *hotspot* da Mata Atlântica (Myers et al., 2000) é a identificação da espécie que ocorre no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), uma das maiores áreas contínuas do bioma na região central (Ribeiro et al., 2009). Usando DNA fecal, Oliveira et al. (2020) realizaram uma análise filogenética com fragmentos do gene mitocondrial Citocromo-b e demonstraram que essa população pertence ao gênero *Mazama*, podendo ser, em tese, qualquer espécie do gênero que ocorre no Brasil. Assim, não foi capaz de realizar a identificação em nível de espécie porque o marcador mitocondrial utilizado não foi suficientemente informativo, sendo necessário adicionar regiões mais polimórficas (Peres et al., 2021a). Além disso, mesmo tendo acesso, posteriormente, a imagens do animal que ocorre na área (Figura 01), não foi possível realizar a identificação devido a alta semelhança morfológica (Peres et al., 2021b).

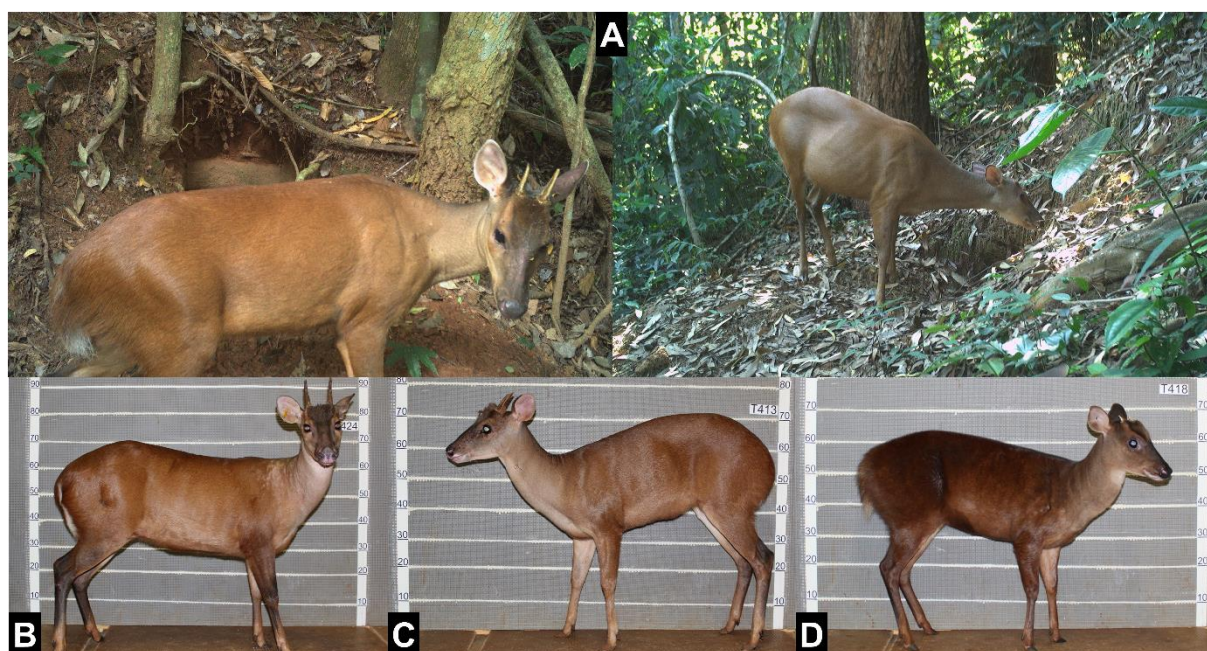


Figura 01. Indivíduos do Parque Estadual do Rio Doce (A) e espécies do gênero *Mazama* com porte e morfologia semelhantes (B = *Mazama americana*, C = *Mazama rufa* e D = *Mazama jucunda*). Escala em centímetros. Fonte: Instituto de Conservação de Animais Silvestres (ICAS; imagens em A) e Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE; imagens em B, C e D).

Considerando informações existente sobre a distribuição geográfica dos veados da Mata Atlântica (Oliveira et al., 2022), a hipótese mais plausível é de que a

espécie que ocorre no PERD seja *M. jucunda*. Vale ressaltar que essa espécie é classificada como Vulnerável pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN; Vogliotti et al., 2016). Assim, a confirmação da presença de *M. jucunda* nessa área seria extremamente relevante pois a inclusão de uma nova população teria um impacto positivo na avaliação de risco de extinção da espécie, especialmente no critério C, referente a tamanho populacional pequeno e declínio (IUCN, 2012), sob o qual essa espécie foi enquadrada (Vogliotti et al., 2016).

Além disso, esse seria o primeiro registro de *M. jucunda* para o Estado de Minas Gerais. Considerando a localização do PERD, disjunta e distante da atual área de distribuição da espécie (Duarte et al., 2017), essa população potencialmente pode representar uma Unidade Evolutiva Significativa (ESU; *Evolutionary Significant Unit*). Isso implicaria na existência de haplótipos exclusivos no PERD e demandaria em ações de manejo e conservação personalizadas para essa área.

Habitats florestais, frequentemente densos e de difícil acesso, e o comportamento elusivo dessas espécies torna muito onerosa a captura de indivíduos para obtenção de dados morfológicos e células vivas para realizar análises citogenéticas, que são muito informativas na resolução taxonômica do grupo (Cifuentes-Rincón et al., 2020; Peres et al., 2021a; Bernegossi et al., 2023; Sandoval et al., 2022; Morales-Donoso et al., 2023). Nesse sentido, destacam-se os métodos de amostragem não invasiva.

Armadilhas fotográficas podem auxiliar na identificação das espécies registradas e fornecer dados ecológicos (Grotta-Neto et al., 2020). A identificação de veados florestais por esse método, todavia, é limitada devido à extrema semelhança, e padrão de coloração muito parecidos, como é o caso das espécies *M. americana*, *M. rufa* e *M. jucunda* (Figura 01; Peres et al., 2021b). Outra metodologia amplamente utilizada é a amostragem fecal seguida da identificação em nível de espécie por meio métodos genéticos usando DNA mitocondrial (Oliveira et al., 2022). Essa metodologia também permite a realização de estimativas de densidade populacional e distribuição geográfica (Duarte et al., 2017; Oliveira et al., 2019, Silva et al., 2020).

Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo identificar a espécie de Cervidae que ocorre no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, através de

análises genéticas feitas com DNA fecal e perante uma amostragem representativa das espécies potenciais.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

O Parque Estadual do Rio Doce (PERD) foi criado em julho de 1944 sob o Decreto Lei 1.119, 14/07/1944 e Decreto 5.831 de 06/07/1960, sendo a primeira Unidade de Conservação de Minas Gerais. O PERD é gerido pelo Instituto Estadual de Florestas (IEF) e está localizado na região do Vale do Rio Doce, leste mineiro (Figura 02), possuindo uma área de 35.976 ha. É o terceiro maior complexo lacustre do Brasil e a principal área contínua de Mata Atlântica de Minas Gerais. O Parque está presente nos municípios Marliéria, Timóteo e Dionísio, e a zona de amortecimento abrange áreas dos municípios Bom Jesus do Galho, Jaguaráçu, Caratinga, Raul Soares, Pingo D'água e Córrego Novo (IEF, 2023).

Há duas bacias hidrográficas associadas ao PERD, o Rio Doce ao leste, coincidindo, em parte, com o limite do Parque, e o Rio Piracicaba ao norte. Destaca-se a presença de cerca de 42 lagoas naturais, que ocupam 6% da área. O PERD se enquadra na unidade geomorfológica “Depressão Interplanáltica do Rio Doce”, caracterizada por presença de colinas, também denominada mares de morro, com altitudes variando de 150 a 500 metros. O regime pluviométrico consiste em duas estações bem definidas, uma chuvosa de outubro a março e uma seca, de abril a setembro. O clima pode ser classificado como tropical, quente e semiúmido, com temperaturas médias entre 21 °C e 22 °C e pluviosidade média anual, variando entre 1.250 e 1.500 mm (IEF, 2023).

A tipologia vegetal predominante na área é a Floresta Estacional Semidecidual Submontana. A fauna do PERD apresenta alta diversidade de espécies, muitas ameaçadas de extinção, algumas das quais são endêmicas da Mata Atlântica, por exemplo muriqui-do norte (*Brachyteles hypoxanthus*), bugio-ruivo (*Alouatta guariba*), sagui-da-serra-escuro (*Callithrix aurita*), tatu-canastra (*Priodontes maximus*), anta (*Tapirus terrestris*), onça-pintada (*Panthera onca*) e lontra (*Lontra longicaudis*) (IEF,

2023). Apesar de o Plano de Manejo do parque (IEF, 2023) indicar a presença de apenas uma espécie de veado, o veado-mateiro (*Mazama americana*), há ainda indícios da presença de outro veado florestal, o veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*), cuja presença dentro da unidade ou apenas nos arredores precisa ser confirmada.

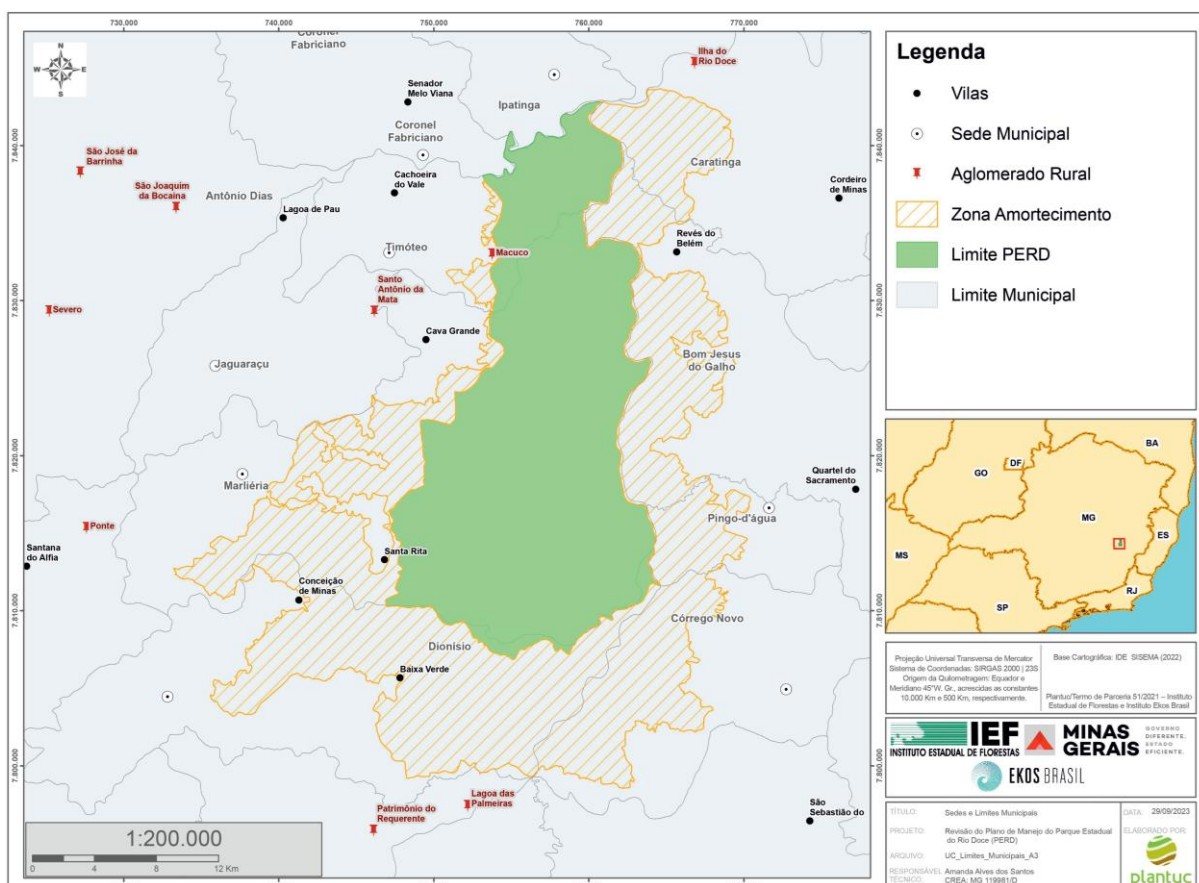


Figura 02. Mapa de localização do Parque Estadual do Rio Doce. Fonte: IEF (2023).

2.2 Amostras fecais

Amostras fecais foram coletadas no PERD para obtenção de material genético e para estimar a densidade populacional (tema do capítulo 3). Toda a coleta de dados teve anuência dos órgãos ambientais competentes conforme autorizações IEF-MG nº 015/2021 e SISBIO nº 77907.

A equipe de coleta foi composta por dois profissionais e um cão farejador especialmente treinado para encontrar fezes de cervídeos. Uma pessoa era

responsável pela condução do cão e outra pela navegação no receptor de GPS. As buscas ocorreram em transectos ao longo de toda extensão do parque, onde o cão buscava por amostras livremente, sem guia, movimentando-se num raio máximo de 20 metros ao redor do condutor. Foram feitas 20 transecções de aproximadamente 1 km cada. O cão utilizado é acostumado com a presença da fauna nativa e passou por um rigoroso controle sanitário para evitar a transmissão de enfermidades.

Cada amostra coletada foi georreferenciada e identificada com a sigla PERDJ mais numeração crescente a partir do número um, por exemplo PERDJ1, PERDJ2, PERDJ3 e assim por diante. As amostras foram colhidas sem contato direto com a mão e armazenadas em tubos plásticos de 50 mL contendo etanol absoluto (Figura 03).

Também foram usadas neste trabalho amostras coletadas anteriormente, depositadas no banco fecal do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Jaboticabal. Algumas dessas amostras são do PERD (Oliveira et al., 2020) e as restantes são de outras áreas protegidas nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Oliveira, 2015; Grotta-Neto, 2020). Com exceção das amostras do PERD, as demais já foram identificadas como *M. jucunda* e sua inclusão na matriz de dados teve como objetivo aumentar a representatividade genética dessa espécie. Dentre todas as amostras disponíveis, foram selecionadas 11 para compor a matriz final de dados. No caso do PERD, foram selecionadas amostras espacialmente dispersas ao longo do parque e com relação as demais áreas, foi selecionada uma amostra por localidade.



Figura 03. (A) Cadela de faro usada para encontrar amostras fecais de veados (Nicks, sem raça definida). (B) Deslocamento na área de estudo para acessar os locais de amostragem. (C) pilha fecal veado encontrada em campo.

2.3 Amostras de animais de referência

A matriz final de dados contou também com amostras de referência de espécies do gênero *Mazama*. As amostras se limitaram a esse gênero pois é o táxon dentro do qual a população do PERD está inserida. Foram incluídos indivíduos cuja identificação específica é precisa e confiável, uma vez que tais animais passaram por avaliação morfológica e citogenética. Todos esses espécimes compõem o banco de animais, amostras e sequências sob gestão do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV), Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Jaboticabal

Foram selecionadas 36 amostras abrangendo as espécies *M. americana* (*stricto sensu*), *M. jucunda*, *M. nana*, *M. rufa* e *M. temama*. Além dessas, também

foram inseridos indivíduos de *M. americana* (*lato sensu*), incluindo os citótipos Acre, Carajás, Juína e Rondônia.

Com exceção de três animais para os quais foi necessário realizar o sequenciamento Sanger de dois fragmentos de genes mitocondriais, todos os demais possuem mitogenoma completo sequenciado referente a trabalhos em andamentos no NUPECCE. A recuperação desses mitogenomas seguiu os mesmos procedimentos descritos em (Bernegossi et al., 2023). Dessa forma, para essas amostras, os fragmentos dos genes mitocondriais de interesse deste estudo foram recuperados a partir do mitogenoma.

Por fim, foram adicionadas ainda cinco amostras de referência obtidas no GenBank, uma amostra de *M. americana* (*stricto sensu*), uma de *M. temama* e três de outras espécies da família Cervidae, *Alces alces*, *Capreolus pygargus* e *Rangifer tarandus*, totalizando 41 animais (Tabela 02), que somados às amostras fecais (Tabela 01) resultaram em uma matriz final com 52 amostras. A Figura 04 apresenta a localização das amostras do PERD e demais amostras identificadas como *M. jucunda*, incluindo amostras fecais e de referência, proveniente de localidades em São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Figura 04).

Tabela 01. Amostras e sequências utilizadas na matriz de dados fecal para análise filogenética. PE = Parque Estadual, PN = Parque Nacional, RPPN = Reserva Particular do Patrimônio Natural, UF = Unidade da Federação, pb = pares de base. A coleta é identificada como proveniente do banco fecal do NUPECCE ("Banco") ou feita neste trabalho ("Atual"). A origem das sequências é identificada como produzidas neste trabalho ("Atual"), pelos trabalhos de origem ou pelo número de acesso no GenBank.

Sigla	Local	Espécie	Coleta	UF	Origem das sequências					
					CYTB ¹	CYTB ²	ND5 ¹	ND5 ²	ND2	COI
PERD2	PE Rio Doce	-	Banco	MG	MT008200	MT008228	Atual	Atual	Atual	Atual
PERD4	PE Rio Doce	-	Banco	MG	MT008201	MT008229	Atual	Atual	Atual	Atual
PERD7	PE Rio Doce	-	Banco	MG	MT008203	MT008231	Atual	Atual	Atual	Atual
PERDJ12	PE Rio Doce	-	Atual	MG	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual
PERDJ17	PE Rio Doce	-	Atual	MG	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual	-
PECB1	PE Carlos Botelho	<i>M. jucunda</i>	Banco	SP	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual
PEL34	PE Lauráceas	<i>M. jucunda</i>	Banco	PR	Grotta-Neto, 2020	Grotta-Neto, 2020	Atual	Atual	Atual	Atual
PEST3	PE Serra do Tabuleiro	<i>M. jucunda</i>	Banco	SC	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual
PNG2	PN Guaricana	<i>M. jucunda</i>	Banco	PR	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual
PNSI4	PN Serra do Itajaí	<i>M. jucunda</i>	Banco	SC	Oliveira, 2015	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual
SM20	RPPN Salto Morato	<i>M. jucunda</i>	Banco	PR	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual	Atual

CYTB¹ = 224 pb; CYTB² = 306 pb; ND5¹ = 305 pb; ND5² = 249 pb; ND2 = 463 pb; COI = 149 pb.

Tabela 02. Espécimes e sequências utilizados na matriz de dados de referência para análise filogenética. PE = Parque Estadual, pb = pares de base. A matriz é identificada como grupo interno ("*Ingroup*") ou externo ("*Outgroup*"). A origem das sequências é identificada como produzidas neste trabalho ("Atual"), provenientes do banco de sequências do NUPECCE ("NUPECCE") ou pelo número de acesso no GenBank.

Espécie	Voucher NUPECCE	Citótipo	Local	Matriz	Origem das sequências					
					CYTB ¹	CYTB ²	ND5 ¹	ND5 ²	ND2	COI
<i>M. americana</i>	T358	-	Guiana Francesa	<i>Ingroup</i>	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T424	-	Brasil, RR	<i>Ingroup</i>	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	-	-	Guiana Francesa	<i>Ingroup</i>	JN632656	JN632656	JN632656	JN632656	JN632656	JN632656
<i>M. americana</i>	T327	Acre	Brasil, AC	<i>Ingroup</i>	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE

Espécie	Voucher NUPECCE	Citótipo	Local	Matriz	Origem das sequências					
					CYTB ¹	CYTB ²	ND5 ¹	ND5 ²	ND2	COI
<i>M. americana</i>	T328	Acre	Brasil, AC	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T329	Acre	Brasil, AC	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T039	Carajás	Brasil, PA Paraupébas	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T274	Carajás	Brasil, MA Imperatriz	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T297	Carajás	Brasil, PA Marabá	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T311	Carajás	Brasil, PA Marabá	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T248	Juína	Brasil, MT Juína	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T251	Juína	Brasil, MT Juína	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T253	Juína	Brasil, MT Juína	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T021	Rondônia	Brasil, RO Ariquemes	Ingroup	DQ789216	DQ789216	MZ488895	MZ488895	Atual	Atual
<i>M. americana</i>	T211	Rondônia	Brasil, RO Ariquemes	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T269	Rondônia	Brasil, RO Buritis	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. americana</i>	T342	Rondônia	Brasil, RO Porto Velho	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. jucunda</i>	T064	-	Brasil, PR	Ingroup	DQ789228	DQ789228	MZ488898	MZ488898	Atual	Atual
<i>M. jucunda</i>	T071	-	Brasil, PR Barra do Turvo	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. jucunda</i>	T215	-	Brasil, SP PE Intervalles	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. jucunda</i>	T373	-	Brasil, PR Bocaúva do Sul	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. jucunda</i>	T401	-	Brasil, SC Campo Alegre	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. nana</i>	T002	-	Paraguai	Ingroup	DQ789214	DQ789214	MZ488902	MZ488902	Atual	Atual
<i>M. nana</i>	T089	-	Brasil, RS	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE

Espécie	Voucher NUPECCE	Citótipo	Local	Matriz	Origem das sequências					
					CYTB ¹	CYTB ²	ND5 ¹	ND5 ²	ND2	COI
			Santa Maria							
<i>M. nana</i>	T098	-	Brasil, SC Concordia	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. nana</i>	T107	-	Paraguai	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. nana</i>	T185	-	Brasil, PR Céu Azul	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. nana</i>	T353	-	Brasil, PR Pitanga	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. nana</i>	T443	-	Brasil, SC Concórdia	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. nana</i>	T452	-	Brasil, SC Irani	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. rufa</i>	MT04	-	Brasil, MT	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. rufa</i>	T255	-	Brasil, GO Anápolis	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. rufa</i>	T268	-	Brasil, PR Foz do Iguaçu	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. rufa</i>	T385	-	Brasil, PR Foz do Iguaçu	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. temama</i>	T366	-	México	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. temama</i>	T362	-	México	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. temama</i>	T363	-	México	Ingroup	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE	NUPECCE
<i>M. temama</i>	-	-	Colômbia	Ingroup	JN632673	JN632673	JN632673	JN632673	JN632673	JN632673
<i>Alces alces</i>	-	-	-	Outgroup	MF784602	MF784602	MF784602	MF784602	MF784602	MF784602
<i>Capreolus pygargus</i>	-	-	-	Outgroup	NC025271	NC025271	NC025271	NC025271	NC025271	NC025271
<i>Rangifer tarandus</i>	-	-	-	Outgroup	KM506758	KM506758	KM506758	KM506758	KM506758	KM506758

CYTB¹= 224 pb; CYTB²= 306 pb; ND5¹= 305 pb; ND5²= 249 pb; ND2 = 463 pb; COI = 149 pb.

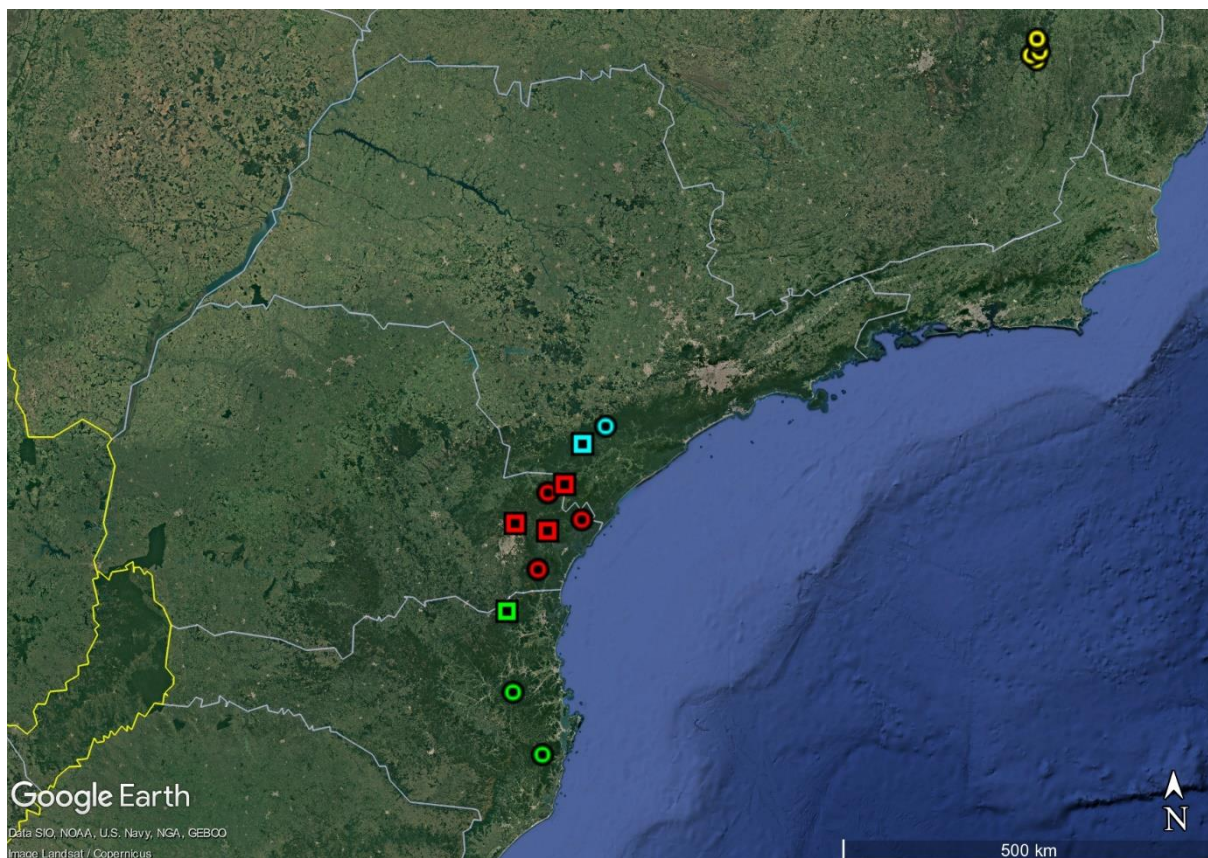


Figura 04. Amostras do Parque Estadual do Rio Doce (pontos amarelos) e de *Mazama jucunda* (Azul = SP; Vermelho = PR; Verde = SC) usadas neste trabalho. Círculos representam amostras fecais e quadrados, amostras de referência.

2.4 Extração, amplificação e sequenciamento das amostras

A extração de DNA fecal foi realizada com protocolo não comercial baseado em sílica adaptado de Boom et al. (1990) e Höss e Pääbo (1993). Os procedimentos laboratoriais contaram com o uso de controle branco em todas as etapas de extração e amplificação para detecção de contaminações e todos os processos ocorreram em laboratório exclusivo para amostras de DNA fecal. Não foi necessário realizar a extração de DNA das três amostras de referência para as quais foi necessário realizar o sequenciamento neste trabalho (Tabela 02) pois já havia material extraído no banco de amostras do NUPECCE, proveniente de trabalhos anteriores (Peres, 2020). As etapas de amplificação e sequenciamento seguiram os mesmos protocolos aplicados para as amostras fecais.

Inicialmente, antes de prosseguir para a etapa de amplificação dos fragmentos de genes mitocondriais para sequenciamento, todas as amostras do PERD coletadas neste trabalho foram triadas para excluir amostras pertencentes à espécie *S. gouazoubira* (subtribo Blastocerina). Para isso foi realizado um protocolo de PCR-RFLP baseado na amplificação de um fragmento de 224 pb do gene mitocondrial Citocromo b (CYTB), seguido de digestão enzimática com a enzima de restrição SSPI (González et al., 2009). Esse protocolo é capaz de discriminar amostras de *S. gouazoubira* das demais espécies de gênero *Mazama* (subtribo Odocoileina). Essa etapa foi necessária considerando que não é estatisticamente seguro identificar as espécies de cervídeos brasileiros pela morfometria das fezes (Costa et al., 2017).

Conforme citado anteriormente, foram selecionadas 11 amostras fecais para compor a matriz de dados fecal, uma de São Paulo, três do Paraná, duas de Santa Catarina e cinco do PERD (Tabela 01). No caso do PERD, foram selecionadas amostras espacialmente dispersas ao longo do parque, de modo que a menor distância entre um par de amostras foi de aproximadamente 4,5 km. Com base em estudos de área de vida para o veado florestais (Vogliotti, 2003; Grotta-Neto et al., 2020; Peres et al., 2023), 1 km de distância já seria suficiente para garantir amostras independentes. Assim, estamos assumindo a premissa de que todas as amostras do PERD incluídas na matriz são de animais diferentes. Com relação às demais áreas, foi selecionada uma amostra por localidade, assim aumentando a representatividade genética dessa espécie na matriz final de dados.

A amplificação do DNA fecal foi feita por PCR utilizando oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) desenhados para amplificar fragmentos dos genes mitocondriais Citocromo b (CYTB), NADH desidrogenase subunidade 5 e subunidade 2 (ND5 e ND2) e Citocromo c oxidase subunidade 1 (COI). Considerando que o material genético contido em amostras fecais é mais degradado em comparação a outras matrizes biológicas como sangue ou tecido (Beja-Pereira et al., 2009), foram amplificados apenas pequenos fragmentos. Com exceção de um produto de PCR de 463 pb, todos os demais não passaram de 306 pb (Tabela 03).

Tabela 03. Características dos *primers* utilizados para amplificar DNA mitocondrial das amostras fecais. pb= pares de base.

Região	Tamanho	Identificação	Iniciador (5' – 3')	Fonte
CYTB	224 pb	IDMAZ 224 L IDMAZ H	CATCCGACACAATAACAGCA TCCTACGAATGCTGTGGCTA	González et al., 2009
CYTB	306 pb	CytB 306 F CytB 306 R	CCATCAGACGCAGACAAA GCGTTGTTTAGATGTGTGAAG	Leandro, 2019*
ND5	305 pb	ND5a F Fec ND5a R Fec	TCTCAAAGTACACTGACTTAC TGCATCTGTTTCGTCCATATC	Peres, 2020
ND5	249 pb	ND5b F Fec ND5b R Fec	CCAACCCTACCTAGCATTCTC TACGACGTATTGGCGGTTTC	Peres, 2020
ND2	463 pb	ND2A F ND2A R	CATACCCCGAAAATGTTGGT GTACGGATATGGGTGCCAGT	Ricoldi, 2021
COI	149 pb	COI 149 F COI 149 R	GTGCTCCAGATATAGCATTTCC GCTAGATTGCCAGCTAAAGGG	González, 2023**

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

A reação de PCR foi padronizada para um volume final de 30 µL (25 µL de mix e 5 µL de DNA), contendo 1x de tampão e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (ambos Platinum™, Thermo Fisher Scientific); 2 mM de MgCl₂; 0,6 mM de dNTP; 1,3 mg/ml de BSA e 0,5 pM de cada primer. As reações foram realizadas em um termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler em um protocolo *touch down* que totalizou 45 ciclos sob as seguintes condições: um passo inicial de 94 °C por 2 min; seguido de 5 ciclos de 94°C-50 seg/ 58°C-50 seg/ 72°C-50 seg; 6 ciclos de 94°C-50 seg/ 57°C-45 seg/ 72°C-50 seg; 8 ciclos de 94°C-50 seg/ 56°C-40 seg/ 72°C-50 seg; 13 ciclos de 94°C-50 seg/ 55°C-35 seg/ 72°C-50 seg; 13 ciclos de 94°C-50 seg/ 54°C-30 seg/ 72°C-50 seg e por fim uma extensão a 72 ° C durante 10 min.

Na sequência, os fragmentos de interesse foram confirmados por meio da visualização do produto da PCR por eletroforese em gel de agarose a 2%. Os fragmentos amplificados foram purificados através do kit *Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System* (Promega) e enviados para sequenciamento.

Finalmente, os fragmentos amplificados foram sequenciados nos dois sentidos pelo método Sanger em um sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™) por meio do serviço prestado pelo Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), câmpus de Botucatu. Para cada amostra, os eletroferogramas das sequências *forward* e *reverse* foram revisados

visualmente no programa BioEdit 7.2.5 (Hall, 1999), as regiões *primers* foram removidas e, ao final, foi gerada a sequência consenso.

2.5 Caracterização da matriz de DNA

As sequências consenso de cada amostra, as sequências recortadas a partir dos mitogenomas e as sequências obtidas no GenBank foram agrupadas por fragmento e alinhadas no servidor on-line MAFT (Kato et al., 2019. <https://mafft.cbrc.jp/alignment/server/>). Os alinhamentos foram revisados e editados no programa BioEdit e em seguida foram concatenados no programa Mesquite 2.75 (Maddison e Maddison, 2023), formando, assim, a matriz final de dados com 1450 pb.

O polimorfismo da matriz foi analisado no programa MEGA 11 (Tamura et al., 2021) pela contabilização dos sítios variáveis (sítios com mutação em pelo menos uma amostra) e sítios parcimoniosamente informativos (PICs; sítios com mutações em pelo menos duas amostras). Por fim, o modelo evolutivo foi estimado no programa MrModelTest 2.4 (Nylander, 2004), sendo selecionado aquele com menor valor de AIC dentre os 24 modelos testados. Foram estimados dois modelos, um para a matriz final completa e outro também para a matriz final completa, porém sem grupo externo. Isso foi necessário porque a árvore filogenética usada como arquivo de entrada para uma das análises de delimitação molecular de espécies requer a ausência de grupo externo.

2.6 Análise filogenética

A análise filogenética, com e sem grupo externo, foi realizada por Inferência Bayesiana (IB) no pacote BEAST 1.10.4 (Suchard et al., 2018). O grupo interno conteve espécies do gênero *Mazama* (amostras fecais e de referência), bem como as amostras fecais coletadas no PERD. Já o grupo externo foi composto por uma sequência das espécies *Rangifer tarandus* (grupo mais externo dentro da tribo Odocoileini), *Alces alces* (tribo Alceini) e *Capreolus pygargus* (tribo Capreolini).

O modelo evolutivo estimado e os parâmetros de corrida da análise por IB foram configurados por meio do programa BEAUti (pacote BEAST) para gerar o arquivo de entrada da análise, que foi implementada em três corridas distintas no servidor on-line CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). A análise de MCMC (*Monte Carlo Markov Chains*) contou com 50 milhões de gerações e teve a amostragem feita a cada mil gerações. Foram utilizados o modelo de relógio *lognormal uncorrelated relaxed clock*, que não assume uma taxa de substituição constante, e o modelo de árvore de especiação através de *Yule process*, que assume uma taxa constante de especiação entre linhagens.

Os dados das três corridas independentes (arquivos com extensão “.log”), assim como as árvores geradas (arquivos com extensão “.trees”), foram combinados no programa Log Combiner (pacote BEAST) aplicando um *burn-in* de 25%. A convergência da análise foi verificada no programa Tracer 1.7.2 (Rambaut et al., 2018), sendo considerada satisfatória quando apresentou valores a partir de 200 no parâmetro ESS (*Estimated Sample Size*). Os valores de suporte dos clados – probabilidade posterior (PP) – foram anotados no programa Tree Annotator (pacote BEAST) e a árvore final foi visualizada e graficamente editada do programa FigTree 1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>)

Além das duas árvores filogenéticas geradas BEAST, que são ultramétricas, também foi gerada uma árvore não-ultramétrica (com grupo externo), no programa MrBayes (Ronquist et al., 2012) para ser utilizada em um dos métodos de delimitação molecular de espécies. A análise também foi executada no servidor on-line CIPRES Science Gateway, e os parâmetros de corrida e os critérios de avaliação do resultado foram equivalentes aos descritos para o BEAST.

2.7 Delimitação molecular de espécies

As análises de delimitação molecular de espécies para identificação das MOTUs (*molecular operational taxonomic units*) foi realizada através de duas abordagens, GMYC (*General Mixed Yule Coalescent*, Fujisawa e Barraclough, 2013) e bPTP (implementação bayesiana do *Poisson Tree Process*, Zhang et al., 2013).

A análise GMYC foi realizada usando o pacote ‘splits’ (Ezard et al., 2021) no programa R 4.2.2 (R Core Team, 2022). Foi usada uma árvore filogenética ultramétrica gerada por IB no BEAST, sem grupo externo, e foi testado dois limiares de delimitação, único e múltiplos. As probabilidades dos modelos GMYC foram comparadas perante a probabilidade de um modelo nulo, no qual apenas uma MOTU é identificada, e a hipótese de que os modelos eram estatisticamente diferentes foi aceita quando apresentaram $p < 0,05$.

O método bPTP foi executado em seu servidor on-line (<https://species.hits.org/>). Foi testada a utilização de uma árvore filogenética ultramétrica gerada por IB no BEAST e uma árvore não-ultramétrica gerado no MrBayes, que tiveram o grupo externo retirado no momento da implementação da análise. Dessa forma, ao final foram geradas quatro hipóteses de delimitação de espécies: (1) limiar único e (2) limiares múltiplos do método GMYC e (3) árvore não-ultramétrica e (4) ultramétrica pela abordagem bPTP.

2.8 Rede de haplótipos e distância genética

Para ambas as análises foi utilizada a matriz final de dados, sem grupo externo, e as sequências foram agrupadas pela espécie à qual pertencem (amostras de referência e amostras fecais previamente identificadas) ou como provenientes do PERD. A rede de haplótipos foi gerada no programa PopART 1.7 (Leigh e Bryant, 2015) pelo método *median-joining* (Bandelt et al., 1999). À cada agrupamento foi designada uma cor, escolhida automaticamente a partir da paleta selecionada, para facilitar a interpretação da rede. A distância genética par-a-par média entre os agrupamentos foi estimada usando o modelo Kimura 2-parâmetros (K2P) no programa MEGA 11.

3 RESULTADOS

3.1 Coleta e triagem das amostras fecais

Os transectos realizados com o auxílio de cão farejador para encontrar amostras fecais de veados no Parque Estadual do Rio Doce (PERD) somaram aproximadamente 24 km e levaram em torno de 40 horas para serem feitos, resultando na coleta de 108 pilhas fecais. Cinco amostras foram identificadas como *S. gouazoubira* (PERDJ51, 54, 55, 56 e 58) (Figura 05, pontos verdes) e 3 amostras falharam da etapa de amplificação (PERDJ49, 62 e 75), resultando em 100 amostras triadas e disponíveis para etapa seguinte, sequenciamento e análise filogenética (Figura 05, pontos vermelhos).

Outro trabalho do nosso grupo de pesquisa (Oliveira et al., 2020) coletou no PERD 12 amostras (Figura 05, pontos azuis), das quais 5 (PERD2, 4, 6, 7 e 11) foram identificadas como pertencentes ao gênero *Mazama* através de análise filogenética feita a partir de dois fragmentos do gene mitocondrial Citocromo b (CYTB). Portanto, considerando as amostras disponíveis, sua distribuição espacial no PERD e as sequências disponíveis, produzidas nos trabalhos citados, cinco amostras do PERD foram selecionadas para compor a matriz final de dados: PERD2, 4 e 7, e PERDJ 12 e 17 (Figura 05, destacas por alfinetes).

Vale ressaltar que o protocolo completo do método PCR-RFLP permitiria, em tese, identificar amostras de *M. jucunda* (González et al., 2009). No entanto, ao analisar as sequências de amostras do PERD, produzidos por Oliveira et al. (2020) e neste trabalho, foi verificado uma mutação no sítio de corte da enzima que discriminaria *M. jucunda* de *M. nana* – BstN –, impossibilitando a identificação em nível de espécie (dados não apresentados).

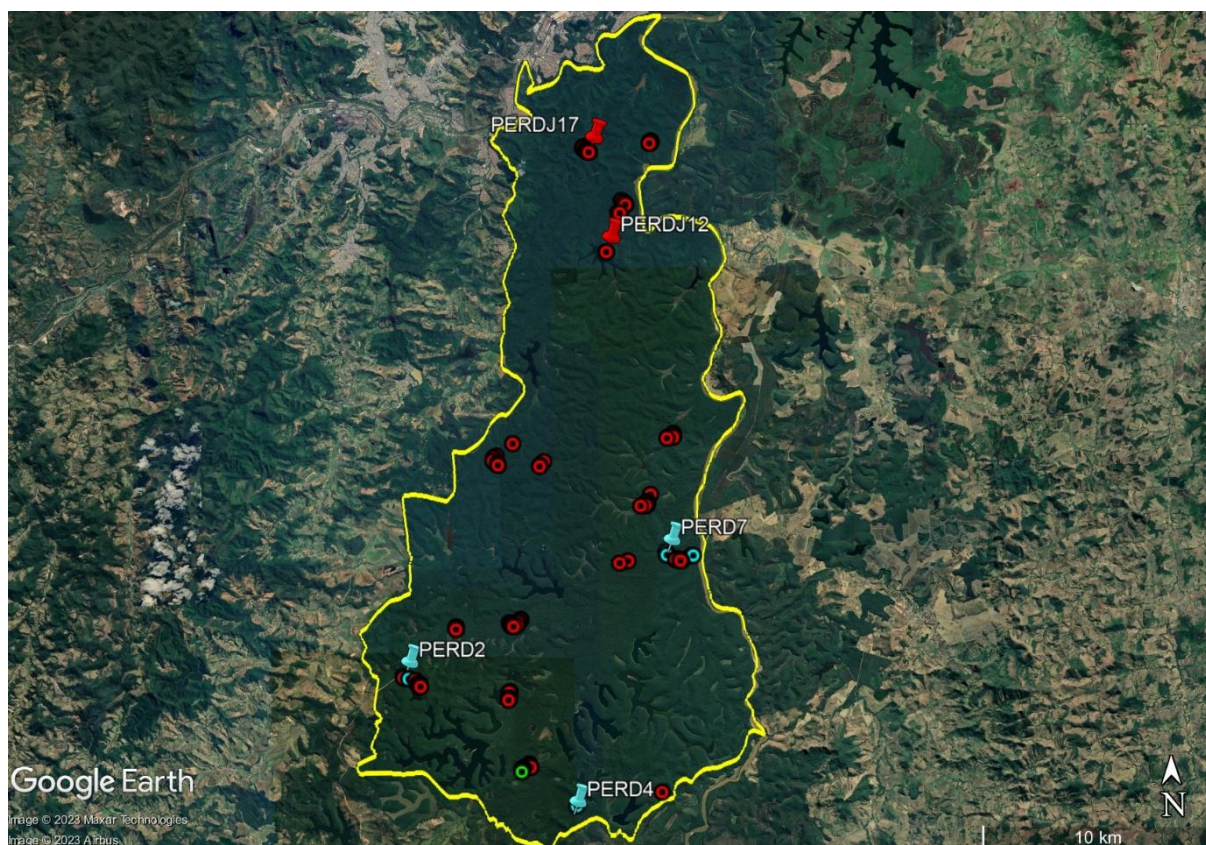


Figura 05. Amostras fecais coletadas no Parque Estadual do Rio Doce (PERD). Em azul = amostras coletadas por Oliveira et al. (2020); vermelho = este trabalho; e verde = amostras identificados *S. gouazoubira* neste trabalho. Amostras destacadas por alfinetes foram selecionadas para sequenciamento e análise filogenética neste trabalho.

3.2 Sequenciamento e caracterização da matriz de DNA

Todas as amostras fecais (Tabela 01) e de referência (T002, T021 e T064, Tabela 02) selecionadas foram sequenciadas com sucesso, complementando o esquema de fragmentos propostos (Tabela 03) para compor a matriz final de dados. A única exceção foi o fragmento do gene mitocondrial Citocromo oxidase subunidade 1 (COI) da amostra fecal PERDJ17, que não foi sequenciado porque o DNA extraído esgotou-se e não foi possível realizar uma nova extração em tempo hábil para obter a sequência. Para essa amostra e sequência, e somente nesse caso, a região correspondendo na matriz foi preenchida com o símbolo 'N'.

A matriz final de dados foi composta por 52 amostras (incluindo as três amostras do grupo externo) e 1450 pb, dos quais 395 são sítios variáveis e 258 são

sítios parcimoniosamente informativos (PICs) (Tabela 04). A quantificação e representatividade frente ao total dos sítios variáveis e PICs de cada fragmento estão discriminadas na Tabela 04. O modelo evolutivo selecionado para matriz final com grupo externo foi GTR+G; e sem grupo externo, HKY+I+G.

Tabela 04. Tamanho e polimorfismo da matriz final de dados e dos cinco fragmentos que a compõem. PICs = sítios parcimoniosamente informativos; pb = pares de base.

Região	Tamanho*	Sítios variáveis	PICs
CYTB-224	185 pb (12.76%)	50 (12.66%)	34 (13.18%)
CYTB-306	267 pb (18.41%)	89 (22.53%)	55 (21.32%)
ND5a	263 pb (18.14%)	72 (18.23%)	47 (18.22%)
ND5b	207 pb (14.28%)	60 (15.19%)	44 (17.05%)
ND2	423 pb (29.17%)	97 (24.56%)	65 (25.19%)
COI	105 pb (7.24%)	27 (6.84%)	13 (5.04%)
Matriz final	1450 pb (100%)	395 (100%)	258 (100%)

*Após retirada dos *primers*.

3.3 Filogenia e delimitação molecular de espécies

A inferência filogenética gerada por IB possibilitou posicionar com alto suporte (PP > 0,9) a população do PERD frente as demais espécies do gênero *Mazama*, especialmente *M. jucunda* (Figura 06, IB). As duas abordagens de delimitação molecular de espécies geraram resultados bastante distintos: o número de MOTUs variou entre 12 e 25. No método GMYC, tanto a hipótese de limiar único quanto limiares múltiplos foram estatisticamente significativas, com $p = 0,001$ e 0.04 , respectivamente. A hipótese de limiar simples resultou em 12 MOTUs; e limiares múltiplos, 15 MOTUs. Na abordagem bPTP, a análise feita com a árvore não-ultramétrica gerou 18 MOTUs; com a árvore ultramétrica, 25 MOTUs. A sumarização das quatro hipóteses geradas encontra-se no material suplementar (Figura S01). Nesta sessão serão apresentados apenas os resultados de delimitação de espécies provenientes da abordagem mais coerente frente a literatura, que foi a hipótese de limiar simples do GMYC (Figura 06, GMYC). As demais hipóteses geradas apresentaram uma excessiva subdivisão de MOTUS em espécies consolidadas como *M. jucunda*, *M. nana*, *M. americana* e *M. temama*.

A fim de evitar redundância nas terminologias, a partir deste ponto os citótipos do complexo *M. americana* serão citados no texto pelo nome do citótipo (Acre, Carajás, Juína ou Rondônia) ou usando a seguinte composição: [*M. americana*] + [as duas principais letras, em caixa alta, que nomeiam o citótipo]. Por exemplo, *M. americana* citótipo Acre será referenciado como “citótipo Acre” ou “*M. americana* AC”.

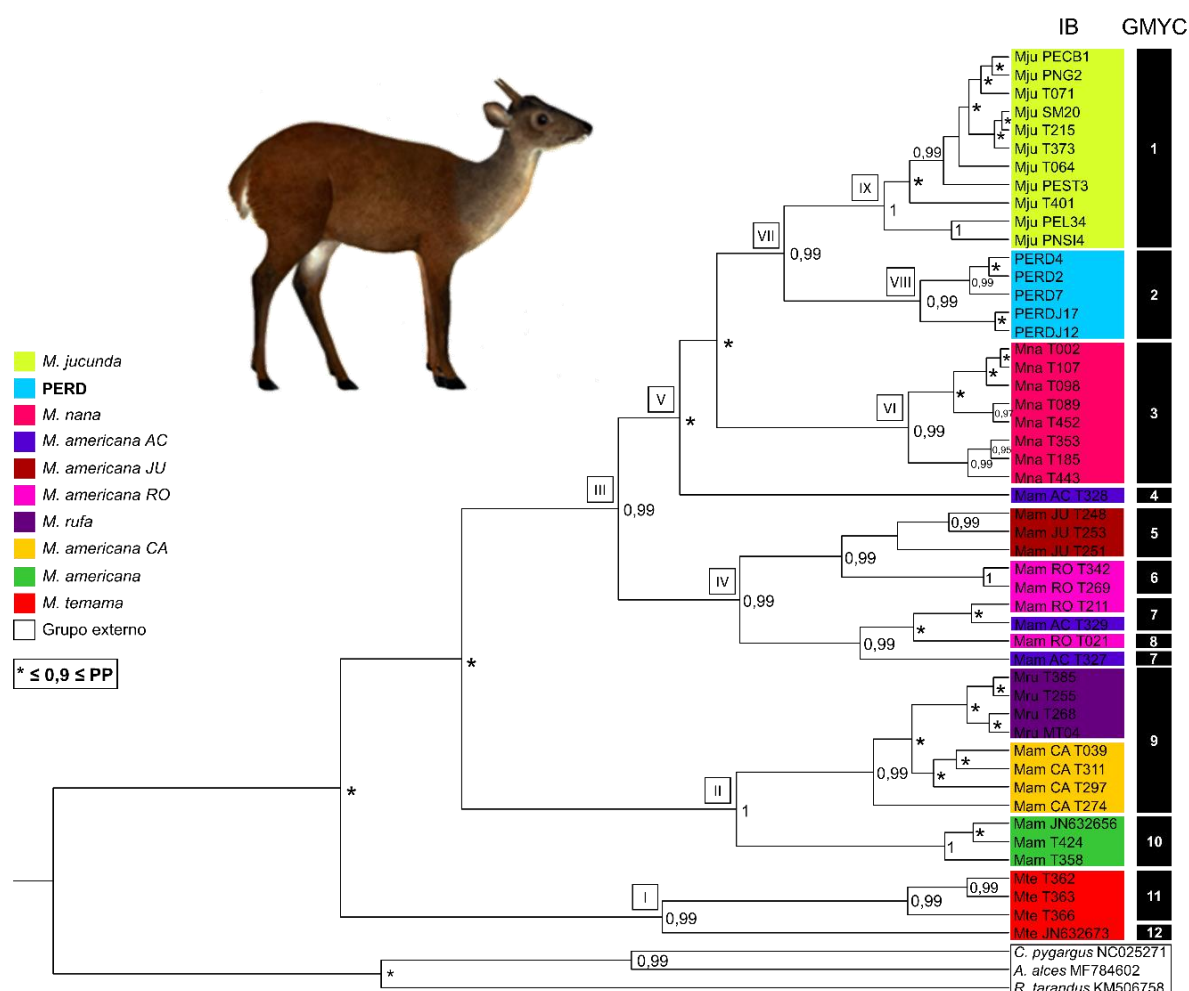


Figura 06. Análise filogenética por inferência bayesiana (IB; gerada no BEAST, árvore ultramétrica) e delimitação molecular de espécies pelo método *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC; limiar único, $p = 0,001$). Os valores de suporte dos clados estão representados pela probabilidade posterior (PP). Os números em algarismos romanos (I – IX; caixas brancas com bordas pretas) identificam clados em destaques e os números em algarismos arábicos (1 – 12; caixas pretas) identificam as MOTUs (*molecular operational taxonomic units*), ambos citados ao longo do texto. Amostras identificadas com T#### (“T” + três dígitos) representam vouchers do NUPECCE e amostras ##### (oito dígitos) representam a identificação das sequências obtidas no GenBank. Fonte da ilustração: Natália de Azevedo (Azevedo et al., 2021).

Analisando a topologia da árvore, observamos a presença de três clados principais. O primeiro (clado I) reúne amostras de *M. temama*; o segundo (clado II), grupo com alto número diploide de cromossomos ($2n = 49-53$): *M. americana*, *M. rufa* e *M. americana* citótipo Carajás; e o terceiro (clado III), linhagens com baixo número diploide ($2n = 42-45$): *M. americana* citótipos Acre, Juína e Rondônia, *M. nana*, *M. jucunda* e as amostras do PERD. Destaca-se a composição do clado VII, que reúne, de modo reciprocamente monofilético, as amostras do PERD (clado VIII) e de *M. jucunda* (clado IX), correspondendo a duas MOTUS exclusivas, 2 e 1, respectivamente (Figura 06).

Esses resultados indicam que a população do PERD compõe a espécie *M. jucunda*. Entretanto, existe uma estruturação filogenética clara, com alto suporte estatístico, separando o PERD das demais sequências de *M. jucunda*.

3.4 Rede de haplótipos e distância genética

Para verificar se existe um isolamento por distância genética entre as amostras do PERD e *M. jucunda*, foi construída uma rede de haplótipos e gerada uma matriz de distância genética entre as espécies. A análise da rede de haplótipos (Figura 07) evidencia que a população do PERD apresenta haplótipos únicos e exclusivos, não compartilhados com nenhuma outra espécie. Além disso, é possível observar que 5 passos mutacionais separam o agrupamento de haplótipos do PERD do agrupamento de *M. jucunda*, enquanto a separação entre essa e *M. nana* são 3 passos mutacionais.

A menor distância genética da população do PERD para qualquer outra espécie é com *M. jucunda*, 0.0158. Esse valor é próximo da distância genética entre *M. jucunda* e *M. nana*, que é de 0.0165 (Tabela 05). Esses resultados sugerem uma ausência histórica de fluxo gênico entre a população do PERD e *M. jucunda* e reforçam a existência de um estruturamento genético.

4 DISCUSSÃO

Neste trabalho nós reportamos uma nova população do veado-mateiro-pequeno (*Mazama jucunda*) no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), sendo o primeiro registro para Estado de Minas Gerais, mais de 700 km da atual distribuição geográfica da espécie (Vogliotti et al., 2016; Duarte et al., 2017). Entretanto, a estruturação genética observada nas análises e o contexto de isolamento geográfico do PERD sugerem claramente que esta população representa uma Unidade Evolutiva Significativa (ESU; *Evolutionary Significant Unit*), existindo a possibilidade de serem espécies distintas.

Os resultados da análise filogenética por Inferência Bayesiana (Figura 06, IB) indicam que a população do PERD compõe a espécie *M. jucunda*. Entretanto, existe uma estruturação filogenética clara, com alto suporte estatístico, apresentando, inclusive, coerência geográfica. O PERD está localizado em Minas Gerais e todas as demais amostras são provenientes de regiões ao Sul, incluindo amostras de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (Tabela 01 e 02). As análises com essa população feitas por Oliveira et al. (2020) (530 pb do CYTB) não foram suficientes para realizar a identificação da espécie, se limitando a posicionar a população como pertencente ao gênero *Mazama* e subtribo Odocoileina. Neste estudo, o uso de seis marcadores mitocondriais e uma amostragem ampliada, tanto do PERD quanto de *M. jucunda*, permitiu posicionar a população de forma robusta.

Os resultados da delimitação de espécies (Figura 06, GMYC) corrobora a existência de uma estruturação genética entre a população PERD e as demais amostras de *M. jucunda*. A abordagem GMYC com limiar único se mostrou mais robusta do que as demais – GMYC com limiares múltiplos e bPTP com árvore ultramétrica e não-ultramétrica – porque apresentou maior congruência com as delimitações baseadas no atual arranjo taxonômico do grupo (Merino e Rossi, 2010; Peres et al., 2021a) e na hipótese taxonômica dos citótipos (Abril et al., 2010a; Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021). De modo geral, as outras abordagens implementadas, especialmente as baseadas no método bPTP, apresentaram excessivas subdivisões (Figura S01).

Conjuntamente, os resultados obtidos a partir da rede de haplótipos (Figura 07) e da matriz de distância genética (Tabela 05) sugerem uma ausência histórica de fluxo gênico entre a população do PERD e *M. jucunda* e reforçam a existência de uma estruturação genética. Inclusive, evidencia-se a possibilidade de serem espécies diferentes, considerando que as diferenças aqui observadas entre a população do PERD e *M. jucunda* equiparam-se às aquelas entre *M. jucunda* e *M. nana*.

É importante ressaltar que *M. nana* é a espécie filogeneticamente mais próxima de *M. jucunda*, sendo recuperadas como espécies irmãs, com monofilia recíproca, tanto neste estudo (Figura 06, IB) quanto em outros na literatura (Duarte et al., 2008; Gutierrez et al., 2017; Peres et al., 2021a), tendo sido separadas a partir de um ancestral comum hipotético no início do Pleistoceno, cerca de 1 milhão de anos atrás (Duarte et al., 2008). As duas espécies são amplamente reconhecidas do ponto de vista taxonômico (Abril et al., 2010b; Vogliotti e Duarte, 2010). Seus padrões morfológicos são claramente diferenciados (Rossi, 2000) e seus padrões cromossômicos já foram descritos: *M. jucunda* apresenta número diploide de cromossomos ($2n$) = 32 – 34 e número fundamental (NF) = 46 (Duarte e Jorge, 2003; Vogliotti e Duarte, 2010); *M. nana*, $2n$ = 36 – 39 e FN = 58 (Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010b;). Tais diferenças cromossômicas representam um importante mecanismo de isolamento reprodutivo, se enquadrando no conceito biológico de espécie (Abril et al., 2010a; Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021).

Diante desse contexto, se as diferenças cromossômicas entre a população do PERD e *M. jucunda* forem tão significativas quanto as diferenças genéticas moleculares observadas neste estudo, como observa-se entre *M. jucunda* e *M. nana*, provavelmente estaremos diante de espécies distintas. Portanto, faz-se urgente a coleta de tecido vivo de animais do PERD para realização de análises citogenéticas, dado a importância das divergências cromossômicas para auxiliar na resolução taxonômica do gênero *Mazama* (Jorge e Benirschke, 1977; Duarte e Jorge, 2003; Peres et al., 2021a).

O uso exclusivo de marcadores mitocondriais para as análises genéticas e a ausência de dados citogenéticos, que são muito informativos para definições taxonômicas nesse grupo, são limitações importantes deste estudo. Assim, a

interpretação dos resultados apresentados deve ser feita com a devida cautela, uma vez que árvores de genes baseadas em regiões mitocondriais podem subestimar processos de introgressão e hibridização (Shaw, 2002). Apesar dessa restrição, marcadores mitocondriais têm sido vastamente utilizados em estudos filogenéticos em cervídeos neotropicais nos últimos anos (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2015, 2017; Escobedo-Morales et al., 2016, 2023; Heckeberg et al., 2016, 2020; Cifuentes-Rincón et al., 2020; Peres et al., 2021a; Bernegossi et al., 2023; Sandoval et al., 2022). Ainda, alguns estudos testaram a utilização de marcadores nucleares, mas eles não foram informativos na recuperação das relações filogenéticas entre linhagens com diversificação recente (Gilbert et al., 2006; Heckeberg, 2020; Vozdova et al., 2021).

Adicionalmente, vale esclarecer que o protocolo de PCR-RFLP, que em tese permitiria identificar amostras de *Mazama* da Mata Atlântica (González et al., 2009), não foi capaz de realizar a identificação em nível de espécie neste estudo porque as amostras do PERD têm uma mutação no sítio de corte da enzima que discriminaria *M. jucunda* de *M. nana*. A mesma mutação foi observada também em amostras previamente identificadas como *M. jucunda*, por exemplo o animal T401, originário de Campo Alegre, SC (Tabela 02), e as amostras PEL34 e PNSI4, provenientes, respectivamente, do Parque Estadual de Lauráceas, PR, e do Parque Nacional da Serra do Itajaí, SC (Tabela 01). Tal mutação já havia sido reportada (Grotta-Neto, 2020) e alerta para a cautela necessária ao aplicar o método PCR-RFLP para identificação específica de amostras, considerando que essa abordagem é limitada às amostras que usou como base comparativa para estabelecer os sítios de corte enzimático.

A despeito das limitações apontadas acima, o presente estudo configura um importante avanço no conhecimento da distribuição geográfica das espécies de cervídeos florestais neotropicais, especialmente referente à *M. jucunda*, maior espécie animal endêmica do Brasil, de ocorrência da Mata Atlântica, que é um dos principais *hotspot* de biodiversidade global (Myers et al., 2000). A ampla amostragem fecal ao longo da área de distribuição de *M. jucunda*, a matriz de referência representativa para o gênero *Mazama* e a utilização de seis marcadores mitocondriais para as análises genéticas permitiram demonstrar a existência de uma nova população de *M. jucunda* no PERD. Tal população apresenta clara estruturação genética e representa uma

ESU. Adicionalmente, diante do nível de estruturação observado e do complexo contexto taxonômico do gênero *Mazama*, é perfeitamente plausível a possibilidade de a população do PERD ser uma espécie distinta. No entanto, enquanto não há confirmação de uma nova espécie, assume-se que a espécie em questão é de fato *M. jucunda*.

A curto prazo, a implicação para conservação da espécie mais premente provavelmente será a mudança na avaliação do risco de extinção. Atualmente, *M. jucunda* é classificada como Vulnerável pela IUCN segundo o critério C2a_{ii} (Vogliotti et al., 2016), que significa que a espécie tem uma população estimada em menos de 10 mil indivíduos, em declínio, e com todos os indivíduos maduros em uma subpopulação (IUCN, 2012). Com a população do PERD, a espécie passa a ter duas subpopulações e tem um incremento no tamanho populacional, assim, *M. jucunda* deixaria de ser Vulnerável. Entretanto, pelo seu status de ESU, ações de manejo deverão ser personalizadas para essa população de modo separado do planejamento para a população ao Sul. Próximas pesquisas devem objetivar a captura de um indivíduo para realizar uma caracterização completa analisando dados morfológicos, aprofundando as análises moleculares, e, mais importante, incluindo dados citogenéticos. Isso permitirá confirmar se a população representa apenas uma ESU ou se é uma espécie nova. Em caso de nova espécie, a descrição de sua área de distribuição deve ser avaliada em estudos futuros. Nesse sentido, os dados de estimativa populacional gerados (capítulo 3 da dissertação) serão essenciais para entender o grau de ameaça da espécie.

5 CONCLUSÃO

Nós reportamos uma nova população do veado-mateiro-pequeno (*Mazama jucunda*) no Parque Estadual do Rio Doce (PERD), Minas Gerais, sendo o primeiro registro para o Estado de MG, mais de 700 km da atual distribuição geográfica da espécie. Entretanto, a estruturação genética observada nas análises e o contexto de isolamento geográfico do PERD sugerem claramente que esta população representa uma ESU distinta de *M. jucunda*, existindo a possibilidade de ser uma nova espécie.

6 REFERÊNCIAS

- Abril VV, Carnelossi EAG, González S, Duarte JMB (2010a) Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research** 128(1–3):177–187. <https://doi.org/10.1159/000298819>
- Abril VV, Duarte JMB (2008) Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology** 31(1):53–57. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000100011>
- Abril VV, Vogliotti A, Varela DM, Duarte JMB, Cartes JL (2010b) Brazilian Dwarf Brocket Deer *Mazama nana* (Hensel 1872). In: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Brazil: FUNEP e Gland, Switzerland: IUCN, p. 160–165.
- Azevedo NA, Oliveira ML, Duarte JMB (2021). **Guia ilustrado dos cervídeos brasileiros**. Sociedade Brasileira de Mastozoologia. <https://doi.org/10.32673/9788563705037>
- Bandelt HJ, Forster P, Rohl A (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. **Molecular Biology and Evolution** 16(1):37–48. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026036>
- Beja-Pereira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G (2009) Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources** 9(5):1279–1301. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2009.02699.x>
- Bernegossi AM, Borges CHS, Sandoval EDP, Cartes JL, Cernohorska H, Kubickova S, Vozdova M, Caparroz R, González S, Duarte JMB (2023) Resurrection of the genus *Subulo* for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy** 104(3):619–633. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyac068>
- Bickford D, Lohman DJ, Sodhi NS, Ng PKL, Meier R, Winker K, Ingram KK, Das, I (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution** 22(3):148–155. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2006.11.004>
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology** 28(3):495–503. <https://doi.org/10.1128/jcm.28.3.495-503.1990>
- Cifuentes-Rincón A, Morales-Donoso JA, Sandoval EDP, Tomazella IM, Mantellatto AMB, Thoisy B, Duarte JMB (2020) Designation of a neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla, Cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. **ZooKeys** 958:143–164. <https://doi.org/10.3897/zookeys.958.50300>

Costa EBV, Oliveira ML, Peres PHF, Grotta-Neto F, Vogliotti A, Piovezan U, Duarte JMB (2017) Low accuracy of identifying Neotropical deer species by scat morphology. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 52(1):37–42. <https://doi.org/10.1080/01650521.2016.1263418>

Cursino M, Salviano M, Abril V, Zanetti ES, Duarte JMB (2014) The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology** 14(1):40. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-40>

Duarte JMB, González S, Maldonado JE (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49(1):17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.009>

Duarte JMB, Jorge W (2003) Morphologic and Cytogenetic Description of the Small Red Brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia** 67(3):403–410. <https://doi.org/10.1515/mamm.2003.67.3.403>

Duarte JMB, Talarico ÂC, Vogliotti A, Garcia JE, Oliveira ML, Maldonado JE, González S (2017) Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx** 51(4):656–664. <https://doi.org/10.1017/S0030605316000405>

Escobedo-Morales LA, Mandujano S, Eguiarte LE, Rodríguez-Rodríguez MA, Maldonado JE (2016) First phylogenetic analysis of Mesoamerican brocket deer *Mazama pandora* and *Mazama temama* (Cetartiodactyla: Cervidae) based on mitochondrial sequences: Implications for Neotropical deer evolution. **Mammalian Biology** 81(3):303–313. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2016.02.003>

Ezard T, Fujisawa T, Barraclough T (2021) **splits: Species' Limits by Threshold Statistics (R package version 1.0-20/r56)**. <https://R-Forge.R-project.org/projects/splits/>.

Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. **Systematic Biology** 62(5):707–724. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syt033>

Galindo DJ, Martins GS, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Bernegossi A M, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2021) Chromosomal Polymorphism and Speciation: The Case of the Genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). **Genes** 12(2). <https://doi.org/10.3390/genes12020165>

Gilbert C, Ropiquet A, Hassanin A (2006) Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40(1):101–117. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2006.02.017>

González S, Duarte JMB (2020) Speciation, evolutionary history and conservation trends of neotropical deer. **Mastozoología Neotropical** 27:37–46. https://doi.org/10.31687/saremMN_SI.20.27.1.05

González S, Maldonado JE, Ortega J, Talarico AC, Bidegaray-Batista L, Garcia JE, Duarte JMB (2009) Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources** 9(3):754–758. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02390.x>

Grotta-Neto F (2020) **Ecologia de cervídeos florestais simpátricos na Mata Atlântica**. 113 f. Tese (Doutorado em Ecologia e Conservação) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

Grotta-Neto F, Peres PHF, Piovezan U, Passos FC, Duarte JMB (2020) Camera Trap Feasibility for Ecological Studies of Elusive Forest Deer. **Wildlife Society Bulletin** 44(3):640–647. <https://doi.org/10.1002/wsb.1121>

Gutiérrez EE, Helgen KM, McDonough MM, Bauer F, Hawkins MTR, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, Maldonado JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** 697:87–131. <https://doi.org/10.3897/zookeys.697.15124>

Gutiérrez EE, Maldonado JE, Radosavljevic A, Molinari J, Patterson BD, Martínez-C JM, Rutter AR, Hawkins MTR, Garcia FJ, Helgen KM (2015) The Taxonomic Status of *Mazama bricenii* and the Significance of the Táchira Depression for Mammalian Endemism in the Cordillera de Mérida, Venezuela. **PLOS ONE** 10(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0129113>

Hall TA (1999) BioEdit: A User-Friendly Biological Sequence Alignment Editor and Analysis Program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series** 41:95–98.

Heckeberg NS (2020) The systematics of the Cervidae: a total evidence approach. **PeerJ** 8:1–76. <https://doi.org/10.7717/peerj.8114>

Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rössner GE (2016) Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ** 4:1–31. <https://doi.org/10.7717/peerj.2307>

Höss M, Pääbo S (1993) DNA extraction from Pleistocene bones by a silica-based purification method. **Nucleic Acids Research** 21(16):3913–3914. <https://doi.org/10.1093/nar/21.16.3913>

IEF (2023) **Plano de Manejo do Parque Estadual do Rio Doce**. Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais. <http://www.ief.mg.gov.br/component/content/195?task=view>.

IUCN (2012) **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition**. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, p. 32.

Jorge W, Benirschke K (1977) Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer, *Mazama americana temama* (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-Robertsonian translocation. **Cytologia** 42(3–4):711–721. <https://doi.org/10.1508/cytologia.42.711>

Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics** 20(4):1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>

Leigh JW, Bryant D (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution** 6(9):1110–1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>

Maddison WP, Maddison DR (2023) **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis (3.81)**. <http://www.mesquiteproject.org>.

Merino ML, Rossi RV (2010) Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Brazil: FUNEP e Gland, Switzerland: IUCN, p. 2–11.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **2010 Gateway Computing Environments Workshop (GCE)** 1–8. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:11513586>

Morales-Donoso JA, Vacari GQ, Bernegossi AM, Sandoval EDP, Peres PHF, Galindo DJ, Thoisy B, Vozdova M, Kubickova S, Duarte JMB (2023) Revalidation of *Passalites* Gloger, 1841 for the Amazon brown brocket deer *P. nemorivagus* (Cuvier, 1817) (Mammalia, Artiodactyla, Cervidae). **ZooKeys** 1167:241–264. <https://doi.org/10.3897/zookeys.1167.100577>

Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403(6772):853–858. <https://doi.org/10.1038/35002501>

Nylander JAA (2004) **MrModeltest (2.4)**. Program distributed by the author. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.

Oliveira ML (2015) **Distribuição e estimativa populacional do veado-mão-curta (*Mazama nana*) utilizando amostragem não invasiva**. 60 f. Tese (Doutorado em Ciências. Área de concentração: Ecologia Aplicada) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Oliveira ML, Couto HTZ, Duarte JMB (2019) Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. **European Journal of Wildlife Research** 65(21). <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1258-6>

Oliveira ML, Grotta-Netto F, et al. (2022) Elusive deer occurrences at the Atlantic Forest: 20 years of surveys. **Mammal Research** 67(1):51–59. <https://doi.org/10.1007/s13364-021-00604-4>

Oliveira ML, Peres PHF, Gatti A, Morales-Donoso JA, Mangini PR, Duarte JMB (2020) Faecal DNA and camera traps detect an evolutionarily significant unit of the Amazonian brocket deer in the Brazilian Atlantic Forest. **European Journal of Wildlife Research** 66(28). <https://doi.org/10.1007/s10344-020-1367-2>

Peres PHF (2020) **Filogenia e delimitação molecular de espécies do gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 (Cetartiodactyla: Cervidae)**. 95 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Peres PHF, Grotta-Netto F, Luduvério DJ, Oliveira ML, Duarte JMB (2021b) Implications of unreliable species identification methods for Neotropical deer conservation planning. **Perspectives in Ecology and Conservation** 19(4):435–442. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.08.001>

Peres PHF, Grotta-Netto F, Nascimento GB, Piovezan U, Duarte JMB (2023) Comparing GPS collar and fecal sampling using detection dogs for habitat selection analysis in brocket deer (*Mazama*). **Journal of Mammalogy** 104(4):867–878. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyad014>

Peres PHF, Luduvério DJ, Bernegossi AM, Galindo DJ, Nascimento GB, Oliveira ML, Sandoval EDP, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Duarte JMB (2021a) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (Artiodactyla: Cervidae) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). *Frontiers in Genetics*, 12. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fgene.2021.742870>

Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior Summarization in Bayesian Phylogenetics Using Tracer 1.7. **Systematic Biology** 67(5):901–904. <https://doi.org/10.1093/sysbio/syy032>

R Core Team (2022) **R: A language and environment for statistical computing (4.2.2)**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni FJ, Hirota MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142(6):1141–1153. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.02.021>

Ricoldi MC (2021) **Prospecção de regiões informativas do genoma mitocondrial de Cervidae**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Ronquist F, Teslenko M, van der Mark P, Ayres DL, Darling A, Höhna S, Larget B, Liu L, Suchard MA, Huelsenbeck JP (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian Phylogenetic Inference and Model Choice Across a Large Model Space. **Systematic Biology** 61(3):539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>

Ricoldi MC (2021) **Prospecção de regiões informativas do genoma mitocondrial de Cervidae**. 64 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Salviano MB, Cursino MS, Zanetti ES, Abril VV, Duarte JMB (2017) Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction** 96(6):1279–1287. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox041>

Shaw KL (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: What mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99(25):16122–16127. <https://doi.org/10.1073/pnas.242585899>

Suchard MA, Lemey P, Baele G, Ayres DL, Drummond AJ, Rambaut A (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. **Virus Evolution** 4(1). <https://doi.org/10.1093/ve/vey016>

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. **Molecular Biology and Evolution** 38(7):3022–3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>

Vogliotti A (2003) **História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Vogliotti A, Duarte JMB (2010) Small Red Brocket Deer *Mazama bororo* (Duarte 1996). In: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Brazil: FUNEP e Gland, Switzerland: IUCN, p. 172–176.

Vogliotti A, Oliveira ML, Duarte JMB (2016) ***Mazama bororo*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T41023A22155086**. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T41023A22155086.en>.

Vozdova M, Kubickova S, Martínková N, Galindo DJ, Bernegossi AM, Cernohorska H, Kadlcikova D, Musilová P, Duarte JMB, Rubes J (2021) Satellite DNA in Neotropical Deer Species. **Genes** 12(1). <https://doi.org/10.3390/genes12010123>

Zhang J, Kapli P, Pavlidis P, Stamatakis A (2013) A general species delimitation method with applications to phylogenetic placements. **Bioinformatics** 29(22):2869–2876. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt499>

Zurano JP, Magalhães FM, Asato AE, Silva G, Bidau CJ, Mesquita DO, Costa GC (2019) Cetartiodactyla: Updating a time-calibrated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 133:256–262. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.015>

MATERIAL SUPLEMENTAR

A – Hipótese filogenética (IB)

B – GMYC (limiar único)

C – GMYC (limiares múltiplos)

D – bPTP (árvore não-ultramétrica)

E – bPTP (árvore ultramétrica)

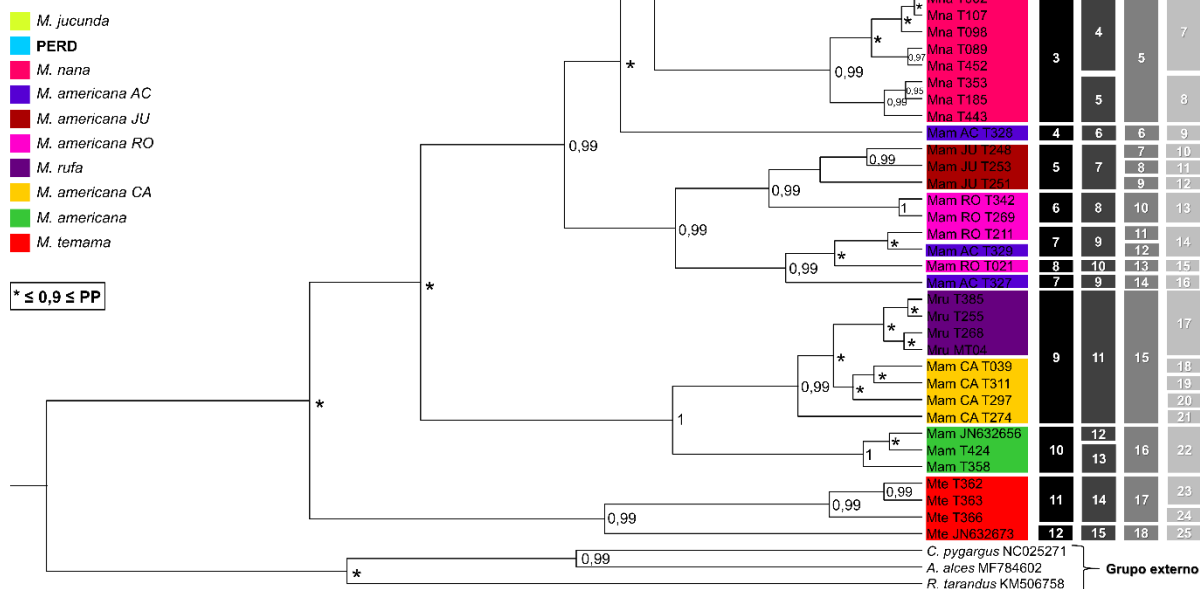


Figura S01. (A) Análise filogenética por inferência bayesiana (IB; gerada no BEAST, árvore ultramétrica). (B-E) Delimitação molecular de espécies pelo método *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC), (B) limiar único ($p = 0,001$) e (C) limiares múltiplos ($p = 0,04$); e pela implementação bayesiana do método *Poisson Tree Process* (bPTP), (D) árvore não-ultramétrica e (E) árvore ultramétrica. Os valores de suporte dos clados estão representados pela probabilidade posterior (PP). Os números em algarismos arábicos (1 – 25; caixas pretas e em tons de cinza) identificam as MOTUs (*molecular operational taxonomic units*). Amostras identificadas com T### (“T” + três dígitos) representam vouchers do NUPECCE e amostras ##### (oito dígitos) representam a identificação das sequências obtidas no GenBank.

CAPÍTULO 3 – Neotropical forest deer density estimates based on dung piles counts: analytical improvements

ABSTRACT

Deer are key ecological components of many ecosystems and while some species are declining, others are considered overabundant. Either to increase threatened populations or to reduce overabundant ones, reliable estimates of population density are essential to inform management effectively. Population estimates of elusive species, such as small neotropical forest deer, are difficult to obtain because the most common methods, based on aerial or land-based direct sightings, have not proved effective. As an alternative, a viable option is the identification of faecal samples to species level, followed by counting the faeces in a pre-determined area of species occurrence. This project aimed to improve the analytical approach for estimating forest deer density based on dung pile surveys, especially in the context of dense tropical forests where it is necessary to use a detection dog to find the samples. To do so, we used as a case study data collected in Rio Doce State Park (PERD), Brazil, regarding the Small Red Brocket (*Mazama jucunda*). The area was divided into 20 plots and dung piles were collected in each one of them performing a transect with the aid of a detection dog. Next, we estimated the parameters related to the dog sampling effectiveness – the sampling effective (half) strip width (ESW) – and the parameters necessary to infer animal density from dung pile density – the sample mean detectability time (T) and the species mean defecation rate per animal per day (R). ESW was estimated using distance sampling analysis; T was estimated employing regression modelling and R was calculated from observations made with captive forest deer individuals. After that, we applied three different methods to calculate the animal density: Faecal Standing Crop (FSC), Distance sampling and Strip transect. The density results ranged from 1.2 to 2.67 ind./km², providing the first density estimate for this recently-found, isolated population and the second-ever published estimate for this species.

KEY-WORDS: Abundance, Wildlife Management, Indirect approach.

1 INTRODUCTION

Deer (family Cervidae) are key ecological components of many ecosystems (Linnell et al., 2020). While some deer populations are declining, others are considered overabundant (Valente et al., 2020). Density values are key parameters in four of the five IUCN criteria used to extinction risk assessment (IUCN, 2012). Thus, reliable estimates of population density are essential to inform management effectively (Williams et al., 2002).

Population estimates of elusive species, such as small neotropical forest deer, are difficult to obtain because the most common methods, based on aerial or land-based direct sightings, have not proved effective (Fragoso et al., 2016). For example, the majority of forest deer native to South America (encompassing the genus *Mazama*, *Subulo* and *Passalites*) are generally solitary, evasive, and restricted to, or associated with, forest environments (Barrette, 1987).

Camera traps, although one of the most common alternative methodologies for studying elusive species, provide limited information because these forest deer species are morphologically very similar, leading to misidentifications (Duarte et al., 2008; Peres et al., 2021). The collection of faecal samples is an alternative method, allowing for DNA analysis and providing different information, such as species and individual identification (Mantellatto et al., 2017). Since identification at the individual level is still an expensive method in need of refinement for neotropical forest ungulates (Oliveira e Duarte, 2013), a more economically viable option for estimating population density is the identification of faecal samples to species level (Duarte et al., 2017), followed by counting the faeces in a pre-determined area of species occurrence (Neff, 1968).

The Faecal Standing Crop (FSC) method is frequently used for estimating population density (Eberhardt and Etten, 1956) and has been applied in population studies of various species (Ahrestani et al., 2018). Additionally, a recent study proposed the incorporation of parameters specific to faecal detection dogs (Silva et al., 2020), which considerably increases the collection effectiveness (Smith et al., 2001) and has been widely used for searching for faecal pellets, including those of *Mazama*,

Subulo and *Passalites* species (Duarte et al., 2017; Oliveira et al., 2019). The general equation for the FSC method is as follows:

$$D = \frac{\left(\frac{N}{W \times L} \right)}{R \times T}$$

Where D = Density; N = Number of dung piles; W = Sampling strip width; L = Sampling strip length; R = Species mean defecation rate per animal per day; T = Sample mean decay/ detectability time.

Although the FSC method is promising for estimating forest deer density, there are some constraints related to the estimated parameters in the equation, which demand careful treatment. Ideally, all parameters used should be as specific as possible to the species being studied and to the sampling site and season. Nonetheless, this is not always feasible due to financial and logistical holdbacks or natural limitations related to the species' ecology.

Another possible approach is an indirect Distance Sampling survey where the distance of all dung piles to the transect line is recorded and a detection function is fitted, allowing for the estimate of dung density. Next, the density of dung is converted to the density of animals by accounting for the mean defecation rate and sample mean decay/ detectability time (Buckland et al., 2015). Anyhow, it is still necessary to estimate parameters to obtain a final density estimate, therefore, there is uncertainty around it.

Given the background, the major goal of this work was to improve the analytical approach for estimating forest deer density based on dung piles surveys, especially in the context of dense tropical forests where it is necessary to use a detection dog to find the samples. To do so, we used as a case study data collected in Rio Doce State Park (PERD), Brazil, regarding the Small Red Brocket (*Mazama jucunda*), which is classified as Vulnerable by the IUCN (Vogliotti et al., 2016). As demographic data is the basis for extinction risk assessment (IUCN, 2012), this study will contribute to monitoring and management programs of this and other neotropical forest deer species. Specially, we had the following goals: (1) To estimate all parameters necessary for the density estimates, including the Sampling strip width (W), Species

mean defecation rate per animal per day (R) and Sample mean detectability time (T); (2) To propagate uncertainty in the final density estimates associated with the parameters estimated, W, R and T and (3) To compare three different approaches to estimate the density: FSC, Distance sampling and Strip transect.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Study area

The Rio Doce State Park (PERD) was created in July 1944 under Decree Law 1,119, 14/07/1944, and Decree 5,831 of 06/07/1960, being the first Protected area in the state of Minas Gerais. PERD is managed by the Instituto Estadual de Florestas (IEF) and is located in the Rio Doce Vale region, eastern Minas Gerais, covering an area of 35,976 ha. It is the third-largest lake complex in Brazil and the main continuous area of Atlantic Forest in Minas Gerais. The park spans the municipalities of Marliéria, Timóteo and Dionísio, and the buffer zone includes areas of the municipalities Bom Jesus do Galho, Jaguarapu, Caratinga, Raul Soares, Pingo D'água, and Córrego Novo (IEF, 2023).

There are two hydrographic basins associated with PERD, the Rio Doce to the east, coinciding in part with the park's boundary, and the Rio Piracicaba to the north. The park is characterized by the presence of approximately 42 natural lakes, covering 6% of the area. PERD falls within the geomorphological unit "Rio Doce Interplanaltic Depression" characterized by hills, also known as hill seas, with altitudes ranging from 150 to 500 meters. The rainfall regime consists of two well-defined seasons, a rainy one from October to March and a dry one from April to September. The climate can be classified as tropical, hot, and semi-humid, with average temperatures between 21 °C and 22 °C and an annual average rainfall ranging from 1,250 to 1,500 mm (IEF, 2023).

The predominant vegetation type in the area is the Submontane Semideciduous Seasonal Forest. PERD's fauna exhibits a high diversity of species, many of which are endangered, some of them endemic to the Atlantic Forest, such as the Northern Muriqui (*Brachyteles hypoxanthus*), Brown Howler Monkey (*Alouatta guariba*), Buffy-tufted-ear Marmoset (*Callithrix aurita*), Giant Armadillo (*Priodontes maximus*), Lowland

Tapir (*Tapirus terrestris*), Jaguar (*Panthera onca*) and Neotropical Otter (*Lontra longicaudis*) (IEF, 2023).

There are two deer species in PERD, the Gray Brocket Deer, *Subulo gouazoubira*, allocated in the Blastocerina subtribe, and other species whose preliminary identification, based on genetic evidence (see Chapter 1), is the Small Red Brocket Deer, *Mazama juncunda*, assigned to Odocoileina subtribe. The latter is the focus species of this study.

2.2 Dung pile sampling

Dung piles were collected in the study area in two fieldwork expeditions, September 2021 and June 2022, with the aid of a detection dog specifically trained to find deer dung. The area was divided into 20 plots of approximately 16 km² and in each one a transect between 1 km and 1.5 km was performed. Only one transect were done in each plot; 13 plots were surveyed in the September 2021 and the remaining plots were surveyed in June 2021. The exact location of each transect was chosen for convenience according to the logistical ease of access to each plot (presence of trails or roads), but all transects had a minimum distance of 1 km. The data from the transects were combined to generate one global density estimate. All samples had their location recorded and were stored in absolute ethanol for further genetics analysis. All data collection was approved by the competent environmental bodies under the authorizations IEF-MG n° 015/2021 and SISBIO n° 77907.

The effort regarding the sampling strip length (L) was recorded for all transects using a GPS receptor. The survey team consisted of a handler, the dog, and an orienteer who did the GPS navigation. The transects were determined as the team walked into each plot, trying to make a route as straight as possible, but allowing for flexibility due to the difficulty of walking through the dense forest. While the team walked in the direction established by the orienteer, the dog searched offlead for samples around the handle no more than 20 m away. Every time the dog found a sample, the team went to the dung location to collect it, which took about 10 minutes, and then restarted the transect from there. The GPS receptor kept recording points during all this time, from the beginning to the end of the transect.

2.3 Dog trial surveys

To estimate the two parameters used in the FSC equation that relate to the detection dog performance, the sampling effective (half) strip width (ESW) and the sample mean detectability time (T), two dogs were used in controlled experiments performed in a reforested area at the State University of São Paulo, Jaboticabal, São Paulo, Brazil. Both dogs, herein designated as 01 and 02, are owned by the Deer Research and Conservation Centre (NUPECCE), also located in Jaboticabal. Dog 01 was used in the past for several sampling expeditions, but only Dog 02 is currently active and was the one used for the dung pile sampling in this work. The dung pile samples used in the experiments were collected from captive animals (*Mazama americana*) at NUPECCE.

For the first experiment, we evaluated the dog's detectability as a function of distance to estimate the sampling effective (half) strip width, ESW – the width in which it is assumed that the dog will find all samples present. We placed 120 dung piles (20 pellets per pile) every 10 m along a transect of 1200 m. The samples were placed randomly, without repetition, at varying distances (0, 3, 6, 9, 12, and 15 m) perpendicular to the central line of the transect, to both sides. After 2 h of faecal deposition, a handler walked the length of the transect on a non-windy day accompanied by the dog, who walked freely, searching for samples. The handler always walked the central line of the transect, and the dog searched both sides of the transect with no handler's interference. However, after each detection, the dog was ordered back to the central line of the transect to start over. The number of samples detected at every distance class was recorded and used for further analysis. We combined two data sets from this experiment, one for Dog 01, produced in 2018 by Silva et al. (2020), and one for Dog 02, produced in 2020 by Pinho (2021).

It is important to note that the distribution of samples in this experiment was not homogeneous because the central line had 20 samples in only one line, while all other distance classes had 20 samples allocated in two lines, one on each side of the central line. As a consequence, the density of samples in the central line was twice of that one

at any other line. To circumvent this, the detections at the central line were cut in half for further analysis.

For the second experiment, we evaluated the dog's detectability as a function of the age of the samples to estimate the sample mean detectability time, T – the average age of the samples, in days, that the dog would be able to detect in a given survey. We worked with a set of four transects, each in a different reforested area of the university. Only one of these transects was used at each sampling event to prevent the dog from remembering the sample locations. Thus, one of the four transects was visited on day 0 with the start of the experiment and another transect alternately after 7, 14, 21, 28, 33, 41, 48, 62, 76, 89, and 114 days. In each 200-m transect, we distributed 20 fresh samples (20 pellets per pile), spaced 10 m apart along the transect's central line. The searches were performed as described in our first experiment. The number of samples detected at every sampling event – corresponding to the age of the sample – was recorded and used for further analysis. We used one data set from this experiment, corresponding to Dog 02, produced in 2020 by Pinho (2021).

2.4 Parameters estimates

Sampling strip length, L

The team search methodology resulted in an excess of movement caused by the dog's natural behaviour while sniffing for samples and by the fact that the GPS receptor kept recording points all the time during the survey. As a consequence, the effort provided by the GPS was overestimated, being necessary to correct it to represent the reality of the sampling strip length (L).

The simplification process of the transects was achieved with the coding language R (R Core Team, 2022) using the packages 'spatstat.geom' (Baddeley et al., 2015), 'rmapshaper' (Teucher e Russell, 2022) and 'sf' (Pebesma, 2018). The R version used for this and all following analyses was 4.2.2. The simplification process involved identifying points within the transects where the line crossed itself and then reducing the number of vertices to a point where no crossing points were present. This

provided us with a transect length that was not overestimated and a line that better represented the route done in the forest. The summed values of all transect lengths, after simplification, were used as the sampling strip length (L) in the FSC equation.

Sampling effective (half) strip width, ESW

The distance data produced in the first dog trial survey was used as input to perform a distance sampling analysis (Buckland et al., 2015). It was done using the 'Distance' package in R (Miller et al., 2019). Because the distances in the experiment were fixed, the data set was binned and the cut points – 0, 1.5, 4.5, 7.5, 10.5, 13.5, 16.5 – were chosen so each distance class would be in the midpoint of every bin. The truncation distance was 10.5 m, about 8% of the date (Buckland et al., 2015).

For the model selection, three combinations of key functions and adjustment terms were tested: uniform and half normal with cosine adjustment and hazard rate with simple polynomial adjustment. The model chosen was the one that fitted the data, based on the Chi-square test, and had the lowest AIC criterium value. The ESW value to be used in the FSC equation was calculated by multiplying the proportion of dung piles detected, P_a , based on the detection function fitted, by the truncated distance, W . The standard error (SE) and coefficient of variance (CV) of the ESW were derived from the uncertainty around the P_a estimate.

Mean detectability time, T

The data produced in the second dog experiment were treated as binary (detected and non-detected) and used as input to fit a model expressing the relationship between the probability of detection and the age of the sample. It was done using the 'glm' function from the 'stats' package in R (R Core Team, 2022). The model was fitted using the family 'quasibinomial' and link function ' $1/\mu^2$ '. Next, based on the model, we predicted the probability of detection from day 0 to the number of days since the end of the rainy season (early April), which was around 150 days for the September 2021 survey and about 80 days for the June 2022 survey. In both cases, the mean detectability time was calculated by dividing the sum of all probabilities of

detection times the equivalent day by the sum of all probabilities of detection. The mean, SE and CV of the detectability time were calculated using a parametric bootstrap approach. We used two values for the mean detectability time for the density estimates using the FSC equation, one for each survey expedition. As a result, we had two density estimates, one for September 2021 and one for June 2020, and the average density for the area was calculated by taking the arithmetic mean of the survey-specific densities.

We decided to estimate the mean detectability time based on the number of days since the end of the rainy season considering the results of two dung decay experiments realized in the study area in February 2022 (rainy season) and June 2022 (dry season). We placed 9 dung piles (20 pellets per pile) in three different sites and monitored the pellet decay. In the rainy season, all dung piles decayed in just five days (i.e. all pellets from all dung piles had decayed). In the dry season, however, all dung piles persisted for 88 days (i.e. all dung piles had at least one pellet). Therefore, we are assuming that the limiting factor to dung persistence in the area is the rain. Thus, we hypothesize that the number of days since the end of the rainy season corresponds to the period that the dung had to accumulate and, based on that, we used this value to estimate the mean detectability time.

Mean defecation rate, R

The species mean defecation rate per animal per day (R) was calculated based on direct observation of 19 forest deer specimens held in captivity at NUPECCE: *Mazama americana* (n = 7), *M. jucunda* (n = 1), *M. nana* (n = 2), *Passalites nemorivagus* (n = 2) and *Subulo gouazoubira* (n = 7). This data set was produced by Silva (2017). To approximate the animals' diet to the one they would probably have in the wild, they were fed only with palatable fresh leaves and fruit 72 hours before and during the whole observation period. The animal enclosures were cleaned of dung before the experiment started and were monitored every 6 h for 3 to 5 days. At every monitoring event, the number of dung piles produced was recorded and the enclosure was cleaned again. The mean, SE and CV of the defecation rate were calculated from all observations made.

2.5 Density estimates

Faecal standing crop, FSC

After all parameters necessary were estimated, the density of deer in the area was calculated using the following proposed equation, based on the FSC method:

$$D = \frac{\left(\frac{N}{2 \times ESW \times L} \right)}{R \times T}$$

Equation 1

Where:

D = Density of deer (m², but converted to km² by multiplying per 1 million);

N = Number of dung piles collected;

ESW = Sampling effective (half) strip width (m);

L = Sampling strip length (m);

R = Species mean defecation rate per animal per day;

T = Sample mean detectability time (days).

To propagate the uncertainty associated with the estimated parameters – ESW, R and T – in the final density estimate, we applied the delta method, as in Equation 2 from Laing et al. (2003), by using the following equation:

$$[CV(D)]^2 \approx [CV(ESW)]^2 + [CV(R)]^2 + [CV(T)]^2$$

Equation 2

Where:

CV(D) = Coefficient of variance (CV) of the density estimate;

CV(ESW) = CV of the ESW;

CV(R) = CV of the R;

CV(T) = CV of the T.

Once we had the density CV we were able to calculate the standard deviation (SD) and standard error (SE) of the final density estimate. We calculated the density of deer in the area for the two surveys, September 2021 and June 2022, using the equivalent mean detectability time. Next, we took the mean of the survey-specific densities to have a global estimate for the study period, and the propagation of uncertainty was done as described above, via the delta method.

Distance sampling

Another approach we applied to estimate the density was using distance sampling (Buckland et al., 2015). It was done using the 'Distance' package in R (Miller et al., 2019). First, we measured the distance from all samples to the respective transect (after simplification). This data was also used in the strip transect approach, described in the following topic. Second, we estimated the density of dung piles by fitting a detected function. The truncation distance was 8.3 m, 5% of the data (Buckland et al., 2015). Three combinations of key functions and adjustment terms were tested for the model selection: uniform and half normal with cosine adjustment and hazard rate with simple polynomial adjustment. The model chosen was the one that fitted the data, based on the Cramer-von Mises test, and had the lowest AIC criterium value. Finally, the density of deer was calculated by using the following equation:

$$D = \frac{D_d}{R \times T}$$

Equation 3

Where:

D = Density of deer (km²);

D_d = Density of dung piles (km²; from the distance sampling analysis);

R = Species mean defecation rate per animal per day;

T = Sample mean detectability time (days).

As performed for the FSC, the propagation of uncertainty in the final density estimate was done by applying the delta method, using the following equation:

$$[CV(D)]^2 \approx [CV(D_d)]^2 + [CV(R)]^2 + [CV(T)]^2$$

Equation 4

Where:

CV(D) = Coefficient of variance (CV) of the density estimate;

CV(D_d) = CV of the density of dung estimate (from the distance sampling analysis);

CV(R) = CV of the R;

CV(T) = CV of the T.

The procedures regarding the survey-specific and global density estimates and propagation of uncertainty were done as described for the FSC estimates.

Strip transect

Finally, we also applied a strip transect approach to estimate the density, in which we assumed perfect dung detectability within a fixed sampling strip width. It was done using the 'Distance' package in R (Miller et al., 2019). First, we fitted a uniform key function model with no adjustment terms and estimated the density of dung piles based on the resulting detection function. The truncation distance was 2 m. This distance was chosen because the probability of detection dropped abruptly as it moved away from 2 meters. Next, deer density was calculated using Equation 3. The procedures regarding the survey-specific and global density estimates and propagation of uncertainty were done as described for the FSC estimates.

3 RESULTS

3.1 Dung pile sampling

In total, 101 dung piles were collected throughout the 20 plots (Figure 1). No samples were found in plots 3, 5, 7, 18 and 19. To exclude samples belonging to *S. gouazoubira*, a PCR-RFLP protocol was performed (González et al., 2009). Five samples were identified as belonging to *S. gouazoubira* (Figure 1, red pins) and one sample failed to have its DNA amplified in the PCR-RFLP protocol, thus 95 samples were used for the density estimates in this work. Considering only the samples screened, the average number of dung piles collected was 4.75 per plot. The transects summed 24.47 km and took 40.48 h to complete, averaging 1.22 km and 2.02 h per plot, respectively (Table S1). This resulted in 3.84 samples/km considering only screened samples, or 4.08 samples/km considering all samples. Throughout this session, the results will be presented as estimate $\pm$ standard error (SE).

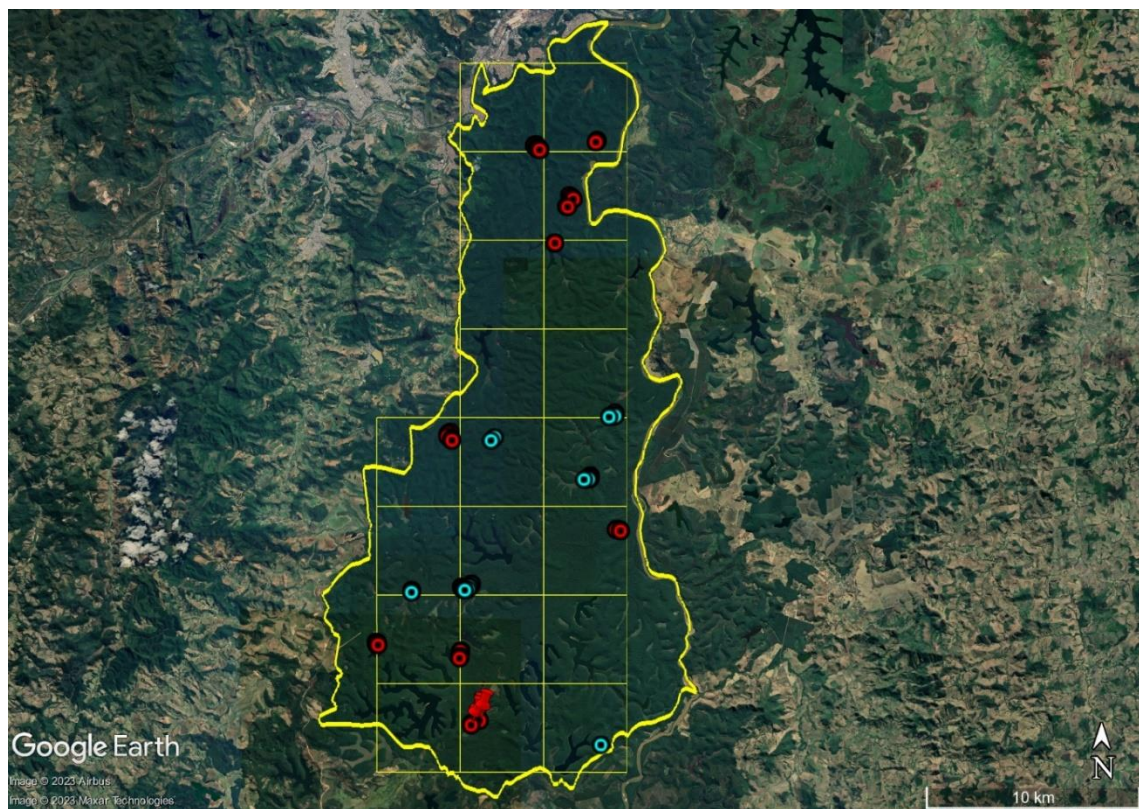


Figure 1. Dung piles collected in September 2021 (red dots) and June 2022 (blue dots). Samples identified as *Subulo gouazoubira* are marked with pins.

3.2 Parameters estimates

Sampling strip length, L

The summed value of all transect lengths before the simplification process was 37.38 km, average of 1.89 km/plot; after the simplification, it was 24.47 km, average of 1.22 km/plot. This represents an average reduction of 33% in the transect length. All transect lengths, before and after simplification, can be consulted in Table S2. A transect line before and after simplification is illustrated in Figure 2. Thus, the sampling strip length (L) used for the density estimates was the sum of all simplified transect lines – 24.47 km.



Figure 2. Example of a transect line before (red) and after (blue) the simplification process. The white dots represent samples.

Sampling effective (half) strip width, ESW

From the data produced in dog experiment 01, which evaluated the detectability as a function of distance (Table S3), a distance sampling analysis was performed to estimate the ESW. The model that best fitted the data was a half-normal key function with no adjustment terms (Figure 3), which fitted the data ($P = 0.65$; Chi-square test) and had the lowest AIC value among the models tested. The resulting ESW value, calculated by multiplying the proportion of dung piles detected ($P_a = 0.55 \pm 0.056$) by the truncated distance ($W = 10.5$ m), was $5.83 \text{ m} \pm 0.59$.

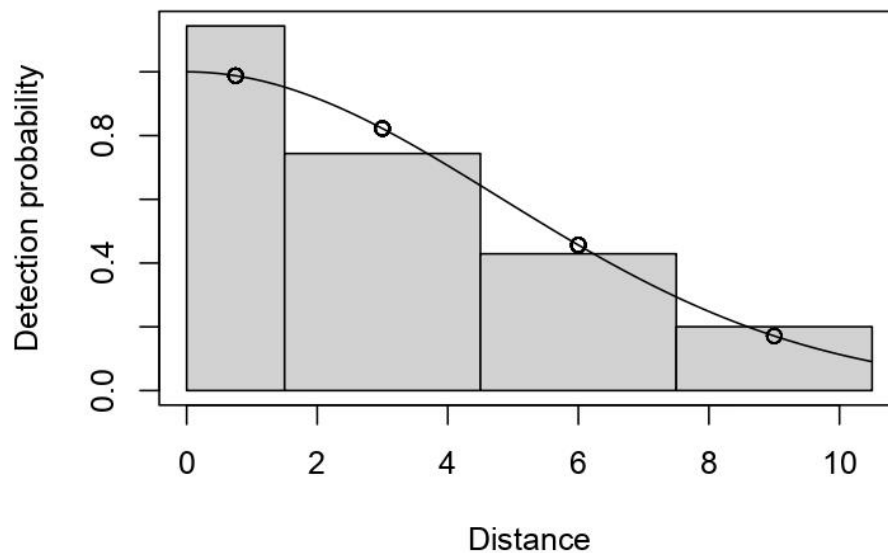


Figure 3. Half normal key function, with no adjustment terms, fitted to estimate the sampling effective (half) strip width, ESW.

Mean detectability time, T

From the data produced in dog experiment 02, which evaluated the detectability as a function of time (Table S4), a 'glm' model was fitted to estimate the mean detectability time (T) (Figure 4). The T value was calculated for both surveys – September 2021 and June 2022 – considering the number of days since the end of the rainy season. We did it by dividing the sum of all probabilities of detection times the equivalent day by the sum of all probabilities of detection. As a result, the T values

were $62.19 \text{ days} \pm 0.050$ and 34.76 ± 0.027 for the September 2021 and June 2022 surveys, respectively.

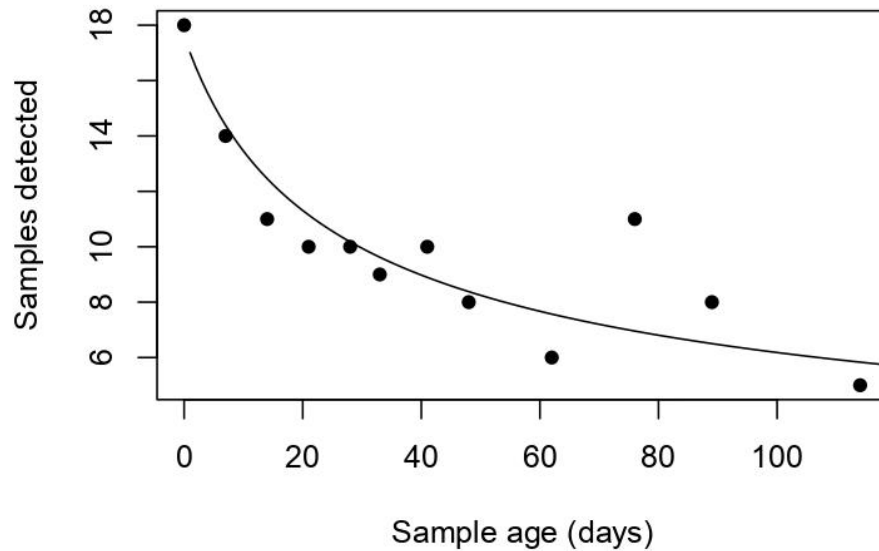


Figure 4. Quasibinomial model expressing the probability of detection as a function of time fitted to estimate the mean detectability time, T .

Mean defecation rate, R

The species mean defecation rate per animal per day (R), calculated from the monitoring of 19 forest deer specimens in captivity (Table S5), was 6.19 ± 0.47 .

3.3 Density estimates

Faecal standing crop, FSC

After all parameters necessary were estimated, Equation 1 was used to estimate the density of deer in the area through the FSC method as follows:

September 2021

$$D = \frac{\left(\frac{62 \text{ samples}}{2 \times 5.83 \text{ m} \times 15970 \text{ m}} \right)}{6.19 \text{ defecations} \times 62.1 \text{ days}}$$

June 2022

$$D = \frac{\left(\frac{33 \text{ samples}}{2 \times 5.83 \text{ m} \times 8500 \text{ m}} \right)}{6.19 \text{ defecations} \times 34.8 \text{ days}}$$

The resulting densities were $0.86 \text{ ind./km}^2 \pm 0.08$ for September 2021 and $1.54 \text{ ind./km}^2 \pm 0.2$ for June 2022, averaging $1.2 \text{ ind./km}^2 \pm 0.42$ (Table 1).

Distance sampling

From the distance data measured from all samples to their respective transect, a distance sampling analysis was performed to estimate the density of dung. The model that best fitted the data was a Hazard rate key function with no adjustment terms, which fitted the data ($P = 0.87$; Cramer-von Mises test) and had the lowest AIC value among the models tested. The proportion of samples detected, P_a , was 0.3 (Figure 5).

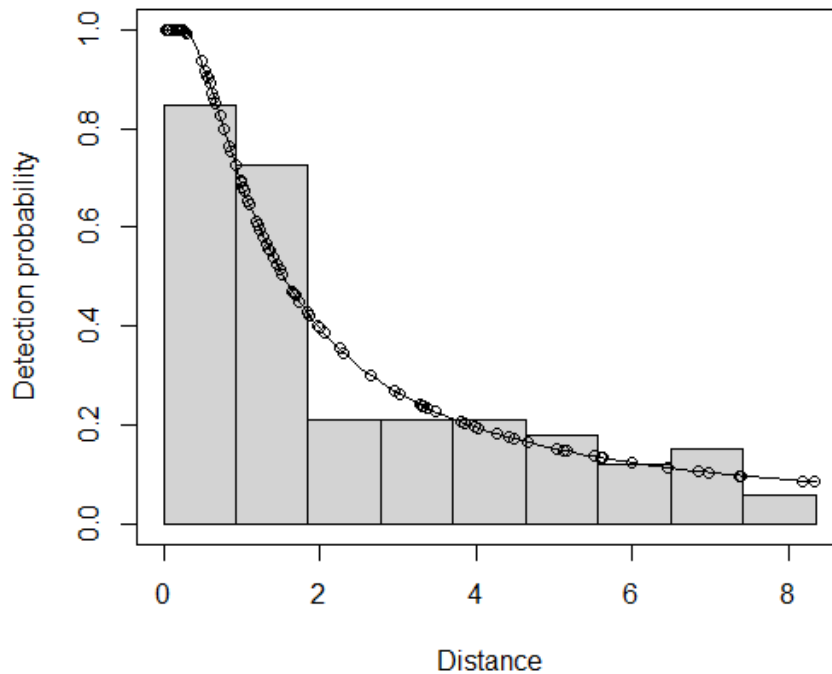


Figure 5. Hazard rate key function with no adjustment terms fitted to estimate the density of dung in the Distance sampling approach.

Next, the density of deer was calculated using Equation 3 as follows:

September 2021

$$D = \frac{719.45 \text{ samples/km}^2}{6.19 \text{ defecations} \times 62.1 \text{ days}}$$

June 2022

$$D = \frac{745.78 \text{ samples/km}^2}{6.19 \text{ defecations} \times 34.8 \text{ days}}$$

The resulting densities were $1.87 \text{ ind./km}^2 \pm 0.08$ for September 2021 and $3.46 \text{ ind./km}^2 \pm 0.26$ for June 2022, averaging $2.67 \text{ ind./km}^2 \pm 1.03$ (Table 1).

Strip transect

Finally, also using the distances of the samples to their respective transect, we fitted a Uniform key function model truncated at 2 m to estimate the density of dung (Figure 6). Next, the density of deer was calculated using Equation 3 as follows:

September 2021

$$D = \frac{563.55 \text{ samples/km}^2}{6.19 \text{ defecations} \times 62.1 \text{ days}}$$

June 2022

$$D = \frac{558.82 \text{ samples/km}^2}{6.19 \text{ defecations} \times 34.8 \text{ days}}$$

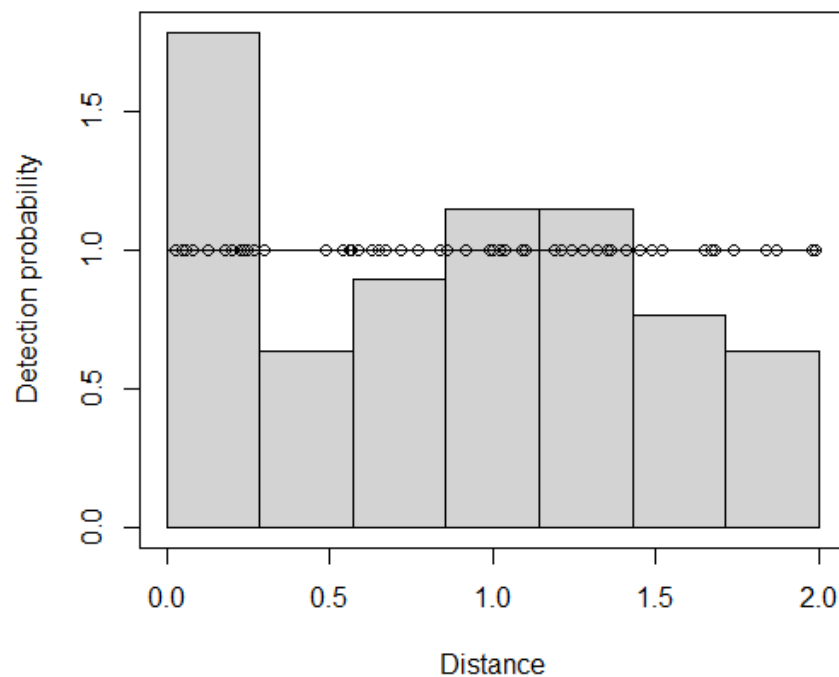


Figure 6. Uniform key function fitted to estimate the density of dung in the Strip transect approach.

The resulting densities were $1.46 \text{ ind./km}^2 \pm 0.07$ for September 2021 and $2.59 \text{ ind./km}^2 \pm 0.23$ for June 2022, averaging $2.03 \text{ ind./km}^2 \pm 0.69$ (Table 1).

Table 1. Density results from the three approaches applied: Faecal standing crop, Distance sampling and Strip transect.

Approach*	Survey**	Density (ind./km^2) $\pm$ SE	Average density (ind./km^2) $\pm$ SE
FSC	Sep.2021	0.86 ± 0.08	1.2 ± 0.42
	Jun.2022	1.54 ± 0.2	
Distance sampling	Sep.2021	1.87 ± 0.08	2.67 ± 1.03
	Jun.2022	3.46 ± 0.26	
Strip transect	Sep.2021	1.46 ± 0.07	2.03 ± 0.69
	Jun.2022	2.59 ± 0.23	

*FSC = Faecal standing crop; **Sep.2021 = September 2021 survey, Jun.2022 = June 2022 survey.

4 DISCUSSION

In this study we report an improved analytical approach to estimate forest deer density based on dung pile counts when a detection dog is used to find the samples, incorporating the dog's performance as a function of distance and age of the samples. We present an estimate of the defecation rate for neotropical forest deer calculated from empirical data and also compare three methods to obtain estimates of animal density derived from dung density. To showcase this approach, we used as a case study data collected in the Rio Doce State Park (PERD), regarding the Small Red Brocket (*Mazama juncunda*), providing the first density estimate for this recently-found, isolated population and the second ever-published estimate for this species. The mean density results ranged from 1.2 to 2.67 ind./km².

The simplification process applied to the sampling strip length, L , was necessary due to the excess of points recorded by the GPS receptor while searching for samples, and not doing so would cause the final density result to be underestimated. Future surveys should consider defining the transects before the survey and trying to stick to them as much as possible, so it would be possible to use the summed length of these pre-defined transects as the sampling strip length, L . If not feasible, strategies to minimize the excess of movements should be applied. Although it would be possible to avoid this analytical step if the transects were previously planned, it is important to stress that making transects in tropical, dense forest is quite challenging, especially in comparison to more sparse, temperate habitats. Therefore, if planning and creating trails ahead of time is not possible, due to financial or logistical issues, the correction method described herein provide a useful alternative to avoid overestimating the sampling strip length.

We used a detection dog specifically trained to find neotropical deer dung piles to overcome to difficulty of finding samples in forest environments, as the pellets are often covered by leaf litter or have been washed by rain (Viquerat et al., 2012; Barrera-Salazar et al., 2015), besides the fact the dogs are much more efficient in this task than humans (Oliveira et al., 2012; Grimm-Seyfarth et al., 2021). To incorporate the dog sampling effectiveness into the density calculations (Silva et al., 2020), we estimated two parameters: 1) the sampling effective (half) strip width, ESW (i. e. the

half width, in meters, in which it is assumed that the dog will find all samples present at the moment of the survey) and 2) the sample mean detectability time, T (i. e. the average age of the samples, in days, that the dog would be able to detect in a given survey).

The ESW was estimated to be $5.83 \text{ m} \pm 0.59$, so we are assuming that the dog was able to find all samples within 5.83 meters at each side of the transect, totalling 11.66 m of sampling width. Using the data sets combined in this work, two separate studies from our group also estimated the dog performance as a function of the distance of the samples to the transect (Silva et al., 2020; Pinho, 2021). However, they applied different, simpler approaches and estimated two distinct parameters, the dog sampling strip width, W_d , and the dog detection effectiveness, P .

Silva et al. (2020) used the data set from Dog 01 (Table S3), fitted a linear regression model and obtained 9.35 m as the (half) W_d and 0.47 as P ; while Pinho (2021) used the data set from Dog 02 (Table S3), fitted a negative exponential model and obtained 17.6 m as the (half) W_d and 0.31 as P . Herein, combined the two data sets and incorporated W_d and P into only one parameter – ESW –, reducing the level of uncertainty that would be necessary to propagate to final density estimate. Additionally, any of the estimates from these studies was accompanied by precision measurements, which weaknesses the power to make reliable inference (Forsyth et al., 2022).

Indirect methods to estimate animal density based on the abundance of their signs require the estimation of sign production rate and sign decay rate (Laing et al., 2003). In the case of deer, we first estimate the density of dung piles and then, to infer the density of animals, we take into consideration the availability of samples at the time of the survey, which is expressed by the species defecation rate (sign production) times the sample mean time to decay (sign decay). The last of these is usually the most troublesome and was the subject of several studies, typically referred to as mean persistence time (Laing et al., 2003; Viquerat et al., 2013; Delisle et al., 2022; Mohanarangan et al., 2022; Kamgaing et al., 2023).

However, when a detection dog is used to collate the dung, we must also consider the dog's detectability as a function of the age of the samples, which we named in this study as mean detectability time, T . In our study, we used the mean

detectability time assuming the premise that when we model it, we are also modelling the mean persistence time. The dog detectability is not only influenced by the age of the samples, but also by the dung pile decay, i.e., as the dog is less likely to detect older samples, it is also less likely to find dung piles with fewer pellets, and will not locate dung piles that completely decayed (no pellet remaining).

Thus, for the mean detectability time, T , the estimated values were 62.19 days $\pm$ 0.050 and 34.76 days $\pm$ 0.027 for the September 2021 and June 2022 surveys, respectively. Silva et al. (2020) and Pinho (2022) also evaluated the dog detectability as a function of time. Silva et al. (2020) used the data set from Dog 01 (Table S3), fitted a linear regression model and obtained 70 days as a result; while (Pinho, 2021) used the data set from Dog 02 (Table S3), fitted a negative exponential model and obtained 180 days. Nevertheless, they estimated the dung *maximum* age for dog detection instead of the *mean* age. We advocate for the use of the *mean* age of the samples detected by the dog – the mean detectability time used in this study – as the equivalent parameter widely used in the literature is the *mean* persistence time, not the *maximum* persistence time. Besides, the estimates from these studies did not provide any precision measurements.

It is important to note that the dog's performance – as a function of distance and age of the sample – might differ among different dogs, so it would be ideal to measure the performance of the dog used in the survey. If not possible, nonetheless, using parameters estimated with other dogs would be better than not incorporating the dog's performance into the analysis.

Regarding the mean defecation rate, R , it was calculated to be 6.19 ± 0.47 . Other studies have estimated the mean defecation rate of forest deer species based on animals in captivity. Rivero et al. (2004) obtained 5 defecations/animal/day (no precision measurements) by counting pellet groups of two *M. americana* and three *S. gouazoubira* over 8 days. Romero-Castañón et al. (2020) obtained a mean defecation rate of 10 ± 3.3 (estimate $\pm$ standard deviation) by counting defecation events of tree *M. temama* individuals over 4 days. Souza et al., (2022) calculated 12.3 ± 1.8 (estimate $\pm$ standard deviation) defecations/animal/day by counting dung pile depositions of 8 male *S. gouazoubira* every 2 h over 6 days. In turn, Chapman (2004) calculated a

defecation rate of 7 to 8.2 (no precision measurements) by performing a controlled experiment in two semi-captivity settings using 10 *Muntiacus reevesi* for 1 to 7 days.

Compared to our work, these studies used a lower number of animals (3 to 10 versus 19 in this work) and not all of them provided precision measurements. In addition to that, our estimate is representative of neotropical forest deer in general as we used five different species (Table S5), while the other studies were more species-specific. Despite this, our estimate is nested within the range of reported defecation rates – 5 to 12 defecations/animal/day. As obtaining defecation rates for free-ranging forest species is very difficult due to their elusive nature, our estimate can be used in studies that require a defecation rate value to infer animal density from dung pile density. It is important to stress, however, that these estimates are biased to the captivity conditions, probably been underestimated, and might not represent the reality in the wild as the defecation rate is affected by several factors, such as daily movement, foraging strategy and season.

For example, Rogers (1987) reported seasonal changes in the defecation rate for hand-reared but free-ranging white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*), which, once penned, had a considerable reduction in the frequency of defecation. Pronghorns (*Antilocapra americana*) also had an increase in the frequency of defecation with increased activity (Irby, 1981). Thus, caution is advised when using a defecation rate calculated only from captive animals, as an underestimated defecation rate will contribute to an overestimated density result. In that regard, (Periago and Leynaud, 2009), in a study that aimed to estimate the density of *S. gouazoubira* based on a dung piles count approach, argued that the defecation rate used by Rivero et al. (2004) was low because of food and daily activity factors, and decided to use instead the rate recommended by Neff (1968) of 13 defecations/day for small forest deer.

After all required parameters were estimated, we calculated the density using three different approaches: faecal standing crop (FSC), distance sampling and strip transect. For the FSC method, we used Equation 1 from this study, which is adapted from the original equation postulated by Eberhardt and Etten (1956) and similar to the one proposed by Silva et al. (2020) to incorporate the sampling effectiveness of detection dogs:

$$D = \frac{\left(\frac{N}{2 \times \text{ESW} \times L} \right)}{R \times T}$$

Equation 1 from this study

$$D = \frac{\left(\frac{N}{W_d \times L} \right)}{R \times \text{Min}(T, A)}$$

Equation from Silva et al. (2020)

Our equation differs from the one proposed by Silva et al. (2020) in two main aspects: 1) it combines the dog sampling strip width (W_d) and the dog detection effectiveness (P) in only one parameter – the effective (half) strip width (ESW) – and it adds a multiplication by 2 to consider both sides of the transect; and 2) it does not include the parameter related to the faeces maximum age for dog detection, assigned to the letter A; instead, we used the mean detectability time, to which we assigned the letter T, assuming it is equivalent to the sample mean persistence time, which is the parameter represented by 'T' in Silva et al. (2020).

The density estimate from all approaches applied in this work has three components: the density of dung piles, the defecation rate and the detectability time. The defecation rate was the same for all calculations, so the differences observed in the estimates from September-2021 and June-2022 can only be explained by the density of dung and/or the detectability time.

There were small differences in the density of dung piles between the surveys (see the “Density estimates” topic in the Results session). However, we cannot affirm that this represents the true density of dung. It is possible that the density of dung in September is supposed to be higher as a consequence of more time allowed for dung accumulation since the end of the rainy season, and the estimated dung density for September is actually underestimated, which, in turn, led to an underestimation of the final density. In the same way, with the same implications, the density of dung for June could be overestimated. On the other hand, the estimated mean detectability time for September was almost the double of that for June, so the final density result is very sensible to this parameter. Again, two situations are possible. The mean detectability time for June is underestimated (i.e. the average age of samples found by the dog in this survey is actually higher); or the mean detectability time for September is overestimated (i.e. the average age of samples found by the dog in this survey is

actually lower). A combination of all these aspects is also possible. Either way, it would (at least partially) explain the higher density values in June.

Regarding the performance of the three methods, we are inclined to advocate for the FSC results as it was most conservative and was the approach upon which we made the survey design. During the survey, we did not properly consider, for example, the independence assumption for the distance sampling approach, which states that all samples should be distributed independently of the transect. Our survey methodology produced an excess of samples located very close to the transect. This resulted in a detection function that dropped abruptly as it moved away from 2 meters (Figure 5), which resulted in a low probability of detection (P_a) and contributed to an overestimation of the final density estimate. As for the strip transect approach, it only considered the samples within 2 meters from the transect line, ignoring all remaining samples (Figure 6), while the FSC method used all samples.

Thus, based on the FSC results, the estimated density in the area is 1.2 ± 0.42 ind./km². Extrapolating this to the total area of the park (359,76 km) provides us with an abundance of about 431 animals. The density estimate is the first for this recently-found, isolated population (see Chapter 2) and the second ever published for the small red brocket (*M. jucunda*). This first estimate was obtained by means of faecal sample genotyping and applying a capture and recapture method, what generated an average value of 1.44 ind./km² (Andriolo et al., 2010). We stress, however, that this estimate lack important analytical and survey design details, and it was not accompanied by precision measurements, thus making it less reliable.

Other studies have estimated the density of a closely-related species, also forest-associated, the red brocket (*M. americana*), using different approaches. Rivero et al. (2004) applied the FSC method in seasonal the Chiquitano forest, Bolivia, and the average density estimates were $3.52 \text{ ind./km}^2 \pm 4.6$ in the wet season and $6.98 \text{ ind./km}^2 \pm 7.2$ in the dry season. Distance sampling approaches were also used and the density values reported varied greatly: Hurtado-Gonzales e Bodmer (2004) estimated a density of $1.14 \text{ ind./km}^2 \pm 0.44$ in the Amazon, northeast Peru; Desbiez et al. (2010) reported an estimate of 0.24 ind./km^2 in the Brazilian Pantanal; Ferreguetti et al. (2015) estimated a density of $15 \text{ ind./km}^2 \pm 1.5$ in an Atlantic Forest fragment, southeast Brazil; and Rocha et al. (2021) reported an estimate of 4.23 ind./km^2 in the

southern Amazon, Brazil. While there are discrepancies among the density values reported, the estimates produced in this study (1.2 to 2.67 ind./km²) are within the range of values found. Nevertheless, we recognize that any comparison should be made with caution because not only these estimates targeted another species, but they were also calculated using different detection methods and analytical approaches.

As the methods to estimate animal density applied in this study required the estimation of at least two parameters, proper analytical approaches are crucial to obtain reliable estimates. Therefore, we recognize the limitations related to the parameters estimated, as pointed out in the discussion. For example, the data used to estimate the sampling effective (half) strip width (ESW) and the mean detectability time (T) were not site- and time-specific. Additionally, the mean defecation rate was estimated based only on captive animals. Also, the sampling design did not properly consider the distance sampling premises. Despite of these holdbacks, our work represent a significant improvement of the analytical approach to estimate forest deer density based on dung pile counts, being the first density estimate of this recently-found, isolated population, and the second ever published estimate for this particular species.

Future studies should focus on making an appropriate survey design, planning ahead the transects and performing the data collection respecting all Distance sampling assumptions, as it is a well-established and statistically-robust method, besides, it eliminates the need to estimate the dog's performance as a function of distance – the ESW in this study. The defecation rate estimated here provide a useful parameter for small Neotropical deer and can be used in similar studies if any other, more specific estimate is available. An important improvement regarding this parameter would be estimating it using semi-captive animals. Finally, it is imperative that the mean persistence/ detectability time be both site- and time-specific, and is estimated in a retrospective analysis, not prospective.

5 CONCLUSION

In this study we report an improved analytical approach to estimate forest deer density based on dung pile counts when a detection dog is used to find the samples, incorporating the dog's performance as a function of distance and age of the samples. We present an estimate of the defecation rate for neotropical forest deer calculated from empirical data and also compare three methods to obtain estimates of animal density derived from dung density. To showcase this approach, we used as a case study data collected in the Rio Doce State Park (PERD), regarding the Small Red Brocket (*Mazama jucunda*), providing the first density estimate for this recently-found, isolated population and the second ever published estimate for this species. The density results ranged from 1.2 to 2.67 ind./km². As the methods to estimate animal density applied in this study required the estimation of at least two parameters, proper analytical approaches are crucial to obtain reliable estimates. Future studies should conduct a survey respecting all distance sampling premises and apply a more robust statistical approach to estimate the parameters necessary to obtain density estimates based on indirect approaches and also do it from data that is both site- and time-specific.

6 REFERENCES

- Ahrestani FS, Kumar NS, Vaidyanathan S, Hiby L, Jathanna D, Karanth KU (2018) Estimating densities of large herbivores in tropical forests: Rigorous evaluation of a dung-based method. **Ecology and Evolution** 8(15):7312–7322. <https://doi.org/10.1002/ece3.4227>
- Andriolo A, Rodrigues FP, Zerbini A, Barrio J (2010) Population estimates. In Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Brazil: FUNEP and Gland, Switzerland: IUC, p. 271–282.
- Baddeley A, Rubak E, Turner R (2015) **Spatial Point Patterns: Methodology and Applications with R**. London: Chapman and Hall/CRC Press. URL: <https://www.routledge.com/Spatial-Point-Patterns-Methodology-and-Applications-with-R/Baddeley-Rubak-Turner/9781482210200/>

Barrera-Salazar A, Mandujano S, Espino-Barros OAV, Jiménez-García D (2015) Classification of Vegetation Types in the Habitat of White-Tailed Deer in a Location of the Tehuacán-Cuicatlán Biosphere Reserve, Mexico. **Tropical Conservation Science** 8(2):547–563. <https://doi.org/10.1177/194008291500800217>

Barrette C (1987) The comparative behavior and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: Wemmer CM (Ed.) **Biology and management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 200–213.

Buckland ST, Rexstad EA, Marques TA, Oedekoven CS (2015) **Distance Sampling: Methods and Applications**. Springer. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-19219-2>

Chapman NG (2004) Faecal pellets of Reeves muntjac, *Muntiacus reevesi*: defecation rate, decomposition period, size and weight. **European Journal of Wildlife Research**. <https://doi.org/10.1007/s10344-004-0053-0>

Delisle ZJ, Swihart RK, Quinby BM, Sample RD, Kinser-Mcbee KJ, Tauber EK, Flaherty EA (2022) Density from pellet groups: Comparing methods for estimating dung persistence time. **Wildlife Society Bulletin** 46(3). <https://doi.org/10.1002/wsb.1325>

Desbiez ALJ, Bodmer RE, Tomas WM (2010) Mammalian Densities in a Neotropical Wetland Subject to Extreme Climatic Events. **Biotropica** 42(3):372–378. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7429.2009.00601.x>

Duarte JMB, González S, Maldonado JE (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49(1):17–22. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2008.07.009>

Duarte JMB, Talarico ÂC, Vogliotti A, Garcia JE, Oliveira ML, Maldonado JE, González S (2017) Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx** 51(4):656–664. <https://doi.org/10.1017/S0030605316000405>

Eberhardt L, Etten RCV (1956) Evaluation of the Pellet Group Count as a Deer Census Method. **The Journal of Wildlife Management** 20(1):70–74.

Ferreguetti ÂC, Tomás WM, Bergallo HG (2015) Density, occupancy, and activity pattern of two sympatric deer (*Mazama*) in the Atlantic Forest, Brazil. **Journal of Mammalogy** 96(6):1245–1254. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyv132>

Forsyth DM, Comte S, Davis NE, Bengsen AJ, Côté SD, Hewitt DG, Morellet N, Mysterud A (2022) Methodology matters when estimating deer abundance: a global systematic review and recommendations for improvements. **The Journal of Wildlife Management** 86(4). <https://doi.org/10.1002/jwmg.22207>

Fragoso JMV, Levi T, Oliveira LFB, Luzar JB, Overman H, Read JM, Silvius KM (2016) Line Transect Surveys Underdetect Terrestrial Mammals: Implications for the Sustainability of Subsistence Hunting. **PLOS ONE** 11(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152659>

González S, Maldonado JE, Ortega J, Talarico AC, Bidegaray-Batista L, Garcia JE, Duarte JMB (2009) Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources** 9(3):754–758. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02390.x>

Grimm-Seyfarth A, Harms W, Berger A (2021) Detection dogs in nature conservation: A database on their world-wide deployment with a review on breeds used and their performance compared to other methods. **Methods in Ecology and Evolution** 12(4):568–579. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.13560>

Hurtado-Gonzales JL, Bodmer RE (2004) Assessing the sustainability of brocket deer hunting in the Tamshiyacu-Tahuayo Communal Reserve, northeastern Peru. **Biological Conservation** 116(1):1–7. [https://doi.org/10.1016/S0006-3207\(03\)00167-8](https://doi.org/10.1016/S0006-3207(03)00167-8)

IEF (2023) **Plano de Manejo do Parque Estadual do Rio Doce**. Instituto Estadual de Florestas, Minas Gerais. <http://www.ief.mg.gov.br/component/content/195?task=view>.

Irby LR (1981) Variation in Defecation Rates of Pronghorns Relative to Habitat and Activity Level. **Journal of Range Management** 34(4):278-278. <https://doi.org/10.2307/3897850>

IUCN (2012) **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1. Second edition**. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN, p. 32.

Kamgaing TOW, Dzefack ZB, Dongmo NCB, Tchatat M, Yasuoka H (2023) Rapid dung removal by beetles suggests higher duiker densities in Central African rainforests. **Oryx** 57(2):180–187. <https://doi.org/10.1017/S0030605321001599>

Laing SE, Buckland ST, Burn RW, Lambie D, Amphlett A (2003) Dung and nest surveys: estimating decay rates. **Journal of Applied Ecology** 40(6):1102–1111. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2664.2003.00861.x>

Linnell JDC, Cretois B, Nilsen EB, Rolandsen CM, Solberg EJ, Veiberg V, Kaczensky P, Van-Moorter B, Panzacchi M, Rauset GR, Kaltenborn B (2020) The challenges and opportunities of coexisting with wild ungulates in the human-dominated landscapes of Europe's Anthropocene. **Biological Conservation** 244. <https://doi.org/10.1016/j.biocon.2020.108500>

Mantellatto AMB, Caparroz R, Christofolletti MD, Piovezan U, Duarte JMB (2017) Genetic diversity of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) population in the Brazilian Pantanal assessed by combining fresh fecal DNA analysis and a set of heterologous microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology** 40(4):774–780. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2016-0323>

Miller DL, Rexstad E, Thomas L, Marshall L, Laake JL (2019) Distance Sampling in R. **Journal of Statistical Software** 89(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v089.i01>

Mohanarangan A, Chinnaiyan S, Kaliyaperumal S, Shanmugavelu S, Desai AA (2022) Age-Specific differences in Asian elephant defecation, dung decay, detection and their implication for dung count. **Ecological Solutions and Evidence** 3(2). <https://doi.org/10.1002/2688-8319.12145>

Neff DJ (1968) The Pellet-Group Count Technique for Big Game Trend, Census, and Distribution: A Review. **The Journal of Wildlife Management**, 32(3):597–614.

Oliveira ML, Couto HTZ, Duarte JMB (2019) Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. **European Journal of Wildlife Research** 65(21). <https://doi.org/10.1007/s10344-019-1258-6>

Oliveira ML, Duarte JMB (2013). Amplifiability of mitochondrial, microsatellite and amelogenin DNA loci from fecal samples of red brocket deer *Mazama americana* (Cetartiodactyla, Cervidae). **Genetics and Molecular Research** 12(1):44–52.

Oliveira ML, Norris D, Ramírez JFM, Peres PHF, Galetti M, Duarte JMB (2012) Dogs can detect scat samples more efficiently than humans: an experiment in a continuous Atlantic Forest remnant. **Zoologia (Curitiba)** 29(2):183–186. <https://doi.org/10.1590/S1984-46702012000200012>

Oliveira ML, Peres PHF, Gatti A, Morales-Donoso JA, Mangini PR, Duarte JMB (2020). Faecal DNA and camera traps detect an evolutionarily significant unit of the Amazonian brocket deer in the Brazilian Atlantic Forest. **European Journal of Wildlife Research** 66(28). <https://doi.org/10.1007/s10344-020-1367-2>

Pebesma E (2018) Simple Features for R: Standardized Support for Spatial Vector Data. **The R Journal** 10(1). <https://doi.org/10.32614/RJ-2018-009>

Peres PHF, Grotta-Neto F, Luduvério DJ, Oliveira ML, Duarte JMB (2021) Implications of unreliable species identification methods for Neotropical deer conservation planning. **Perspectives in Ecology and Conservation** 19(4):435–442. <https://doi.org/10.1016/j.pecon.2021.08.001>

Periago M, Leynaud G (2009) Density estimates of *Mazama gouazoubira* (Cervidae) using the pellet count technique in the arid Chaco (Argentina). **Ecologia Austral** 19:73–77.

Pinho ME (2021) **Análise Comparativa de Metodologias não Invasivas para Estimativas de Densidade de Cervídeos**. 54 f. Trabalho de Conclusão de Curso – TCC (Bacharel em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

R Core Team (2022) **R: A language and environment for statistical computing (4.2.2)**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.

Rivero K, Rumiz DI, Taber AB (2004) Estimating brocket deer (*Mazama gouazoubira* and *M. americana*) abundance by dung pellet counts and other indices in seasonal Chiquitano forest habitats of Santa Cruz, Bolivia. **European Journal of Wildlife Research** 50(4):161–167. <https://doi.org/10.1007/s10344-004-0064-x>

Rocha EC, Lima CA, Batista NL, Castro ALS (2021) Encounter rates and density of medium and large-sized mammals with nocturnal habits in southern Amazon, Brazil. **Current Science** 121(8):1113. <https://doi.org/10.18520/cs/v121/i8/1113-1119>

Rogers LL (1987) Seasonal Changes in Defecation Rates of Free-Ranging White-Tailed Deer. **The Journal of Wildlife Management** 51(2):330–333. <https://doi.org/10.2307/3801011>

Romero-Castañón S, Román GV, Espino-Barros OV, Molina-Martínez A (2020) Defecation rate of Red brocket deer (*Mazama temama*) in captivity. **Caldasia** 43(1):202–204. <https://doi.org/10.15446/caldasia.v43n1.79954>

Silva A R (2017) **Definição de parâmetros para a estimativa populacional de veados do gênero *Mazama***. 32 f. Trabalho de Conclusão de Curso – TCC (Bacharel em Ciências Biológicas) – Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Silva AR, Oliveira ML, Duarte JMB (2020) Incorporating the sampling effectiveness of detection dogs in the faecal standing crop method. **European Journal of Wildlife Research** 66(4):47. <https://doi.org/10.1007/s10344-020-01388-9>

Smith DA, Ralls K, Davenport B, Adams B, Maldonado JE (2001) Canine Assistants for Conservationists. **Science** 291(5503):435–435. <https://doi.org/10.1126/science.291.5503.435B>

Souza LJ, Tanaka Y, Santo LG, Duarte JMB (2022) Effect of dietary fiber on fecal androgens levels: An experimental analysis in brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*). **General and Comparative Endocrinology** 321–322. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2022.114029>

Teucher A, Russell K (2022) **_rmapshaper: Client for “mapshaper” for “Geospatial” Operations_. R package version 0.4.6** <https://CRAN.R-project.org/package=rmapshaper>

Valente AM, Acevedo P, Figueiredo AM, Fonseca C, Torres RT (2020) Overabundant wild ungulate populations in Europe: management with consideration of socio-ecological consequences. **Mammal Review** 50(4):353–366. <https://doi.org/10.1111/mam.12202>

Viquerat S, Bobo KS, Kiffner C, Waltert M (2013) A comparison of regression-based estimates of dung decay in two African forest duiker species (*Philantomba monticola*, *Cephalophus Ogilbyi*). **Ecotropica** 19(1–2):33–38.

Viquerat SMA, Bobo KS, Müller M, Kiffner C, Waltert M (2012) Estimating Forest Duiker (Cephalophinae) Density in Korup National Park: A Case Study on the Performance of Three Line Transect Methods. **South African Journal of Wildlife Research** 42(1):1–10. <https://doi.org/10.3957/056.042.0110>

Vogliotti A, Oliveira ML, Duarte JMB (2016) *Mazama bororo*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T41023A22155086. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T41023A22155086.en>.

Williams BK, Nichols JD, Conroy MJ (2002) **Analysis and management of animal populations**. San Diego, California, USA: Elsevier Academic Press.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Table S1. Survey effort information.

Plot	Survey*	Transect time (h)	Transect length (km)**	N° dung piles***
1	Sep.2021	2.58	0.97	12
2	Sep.2021	2.52	1.53	4
3	Sep.2021	1.60	0.92	0
4	Sep.2021	3.13	1.41	7
5	Sep.2021	1.17	1.48	0
6	Sep.2021	1.43	1.00	3
7	Sep.2021	2.40	1.66	0
8	Jun.2022	1.42	1.00	5
9	Sep.2021	2.82	1.37	8
10	Jun.2022	1.60	1.10	2
11	Jun.2022	2.00	0.99	10
12	Jun.2022	1.57	1.38	4
13	Jun.2022	1.82	1.47	11
14	Sep.2021	2.00	0.98	7
15	Sep.2021	2.68	1.07	7
16	Sep.2021	2.82	1.07	7
17	Sep.2021	1.40	1.25	0
18	Jun.2022	1.78	1.46	0
19	Sep.2021	2.72	1.26	7
20	Jun.2022	1.03	1.10	1
Total		40.48	24.47	91
Average		2.02	1.22	4.55

*Sep.2021 = September 2021 survey, Jun.2022 = June 2022 survey; **Transect length after simplification; ***N° of dung piles after the a PCR-RFLP screening.

Table S2. Transect lengths before and after simplification, and proportion of reduction.

Plot	Transect length (km)*	Simplified length (km)	% of reduction
1	2.20	0.97	56%
2	2.64	1.53	42%
3	1.65	0.92	45%
4	2.72	1.41	48%
5	1.86	1.48	21%
6	1.60	1.00	38%
7	2.63	1.66	37%
8	1.31	1.00	24%
9	2.33	1.37	41%
10	1.38	1.10	20%
11	1.96	0.99	50%
12	1.81	1.38	24%
13	1.96	1.47	25%
14	1.43	0.98	31%
15	1.78	1.07	40%
16	1.75	1.07	39%
17	1.47	1.25	15%
18	1.77	1.46	17%
19	1.85	1.26	32%
20	1.28	1.10	14%
Total	37.38	24.47	-
Average	1.87	1.22	33%

*Original track given by the GPS receptor.

Table S3. Dog experiment 01: detectability as a function of distance (Silva et al., 2020; Pinho, 2021).

Distance (m)	N° of detections		N° of samples placed
	<i>Dog 01</i>	<i>Dog 02</i>	
0	10	10	10
3	16	10	20
6	9	6	20
9	0	7	20
12	0	0	20
15	0	6	20

Table S4. Dog experiment 02: detectability as a function of time (only Dog 02) (Pinho, 2021).

Day	N° of detections	N° of samples placed*
0	18	20
7	14	20
14	11	20
21	10	20
28	10	20
33	9	20
41	10	20
48	8	20
62	6	20
76	11	20
89	8	20
114	5	20

*At day 0.

Table S5. Data from the defecation monitoring experiment (Silva, 2017).

Species *	Sex	Monitoring days	Observations events	Defecations recorded	Defecation rate per day
<i>M. americana</i>	F	3	12	20	6.67
	F	3	12	15	5.00
	F	3	12	19	6.33
	M	3	12	35	11.67
	M	3	12	17	5.67
	F	8	32	65	8.13
	M	8	32	73	9.13
<i>M. jucunda</i>	F	5	20	18	3.60
<i>M. nana</i>	F	8	32	34	4.25
	M	8	32	43	5.38
<i>P. nemorivagus</i>	F	3	12	15	5.00
	M	3	12	10	3.33
<i>S. gouazoubira</i>	F	3	12	13	4.33
	F	3	12	21	7.00
	F	3	12	23	7.67
	M	3	12	15	5.00
	M	3	12	24	8.00
	F	8	32	38	4.75
	M	8	32	53	6.63
Average					6.19

*M. = *Mazama*; P. = *Passalites*; S. = *Subulo*.