

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FILOGENIA E TAXONOMIA DOS VEADOS CINZA
(*Mazama gouazoubira* E *M. nemorivaga*)**

**Marina Gomes de Figueirêdo
Bióloga**

2014

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**FILOGENIA E TAXONOMIA DOS VEADOS CINZA
(*Mazama gouazoubira* E *M. nemorivaga*)**

Marina Gomes de Figueirêdo

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

**Tese apresentada à Faculdade de Ciências
Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus
de Jaboticabal, como parte das exigências
para a obtenção do título de Doutor em
Genética e Melhoramento Animal**

2014

F475f Figueirêdo, Marina Gomes de
Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e
M. nemorivaga) / Marina Gomes de Figueiredo. -- Jaboticabal, 2014
xii, 57 p. ; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2014

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Banca examinadora: Susana González, Mercival Roberto
Francisco, Marcos Tulio Oliveira, Jesus Aparecido Ferro
Bibliografia

1. Cervídeos neotropicais. 2. Coalescência. 3. Espécies
crípticas. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 636.82:599.735.31

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

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FILOGENIA E TAXONOMIA DOS VEADOS CINZA (*Mazama gouazoubára*
E *M. nemorívaga*)

AUTORA: MARINA GOMES DE FIGUEIRÊDO

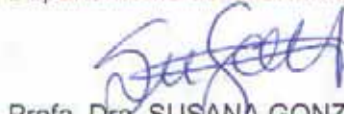
ORIENTADOR: Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de DOUTOR EM GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



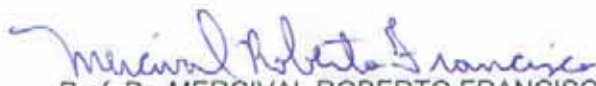
Prof. Dr. JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE

Departamento de Zootecnia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Profa. Dra. SUSANA GONZÁLEZ

Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable / Montevideú/Uruguai



Prof. Dr. MERCIVAL ROBERTO FRANCISCO

Universidade Federal de São Carlos / Câmpus de Sorocaba/SP



Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal



Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO

Departamento de Tecnologia / Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal

Data da realização: 23 de julho de 2014.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Marina Gomes de Figueiredo – Nascida em 5 de fevereiro de 1984, natural de Vitória – ES, Brasil, bacharel em Ciências Biológicas (formada em Julho de 2005) pela Universidade de Vila Velha – ES. Em Julho de 2006 ingressou no mestrado na UFSCar (Câmpus São Carlos), no Programa de Pós Graduação em Genética e Evolução. Durante o mestrado realizou a dissertação e trabalhos paralelos com área de concentração na Genética da Conservação com ênfase em mamíferos. Em 2010 ingressou no doutorado no Programa de Genética e Melhoramento Animal da Unesp (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Câmpus Jaboticabal). A aluna recebeu financiamento pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo durante o mestrado e doutorado.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

"If we lose the forests, we lose our only teachers."

Bill Mollison

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos animais e
a todos que trabalham pela conservação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus avôs, Chiquito (*in memoriam* – Jan/2011) e Vidico (*in memoriam* – Ago/2011), que fiquem as doces lembranças da infância!

Agradeço à minha mãe, por ser minha amiga, confidente e porto-seguro em vários momentos de variações de humor! Ao meu pai, por torcer tanto e fazer tudo por nossos sonhos sempre. À Ju, minha pequena irmã, que é parte de mim e me passa tantos ensinamentos com tanto amor!

À Família Figueiredo que sempre teve paciência com minha constante ausência nos últimos anos e ainda me recebe com tanto amor e carinho em BH.

Ao Prof. José M. Barbanti Duarte, inicialmente pelas palestras de 2003 e 2004 e pelo estágio de 2005 que foram de grande incentivo para que eu trabalhasse com Genética de Conservação. Por ser meu orientador e me dar a oportunidade de executar esse projeto tão apaixonante.

Aos Professores que ajudaram na minha formação de formas tão marcantes! Especialmente ao Prof. Eduardo Almeida (USP- RP) e à Prof. Susana González que me deram dicas preciosas durante meu doutorado.

Agradeço à Fapesp pela bolsa de financiamento, que tornou possível a realização desse projeto.

Ao João Boer, o nosso técnico que facilita a nossa vida em tantos momentos de drama!

Ao Prof. Manoel Vitor e ao pessoal do Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, principalmente à Eliane e à Camila, que me ajudaram com as clonagens na reta final.

Aos amigos São-carlenses que ainda fazem parte da minha história e que me deixam com tantas saudades!

Aos amigos da Irmandade do Caranguejo que me proporcionaram tantas alegrias, diversões e novos conceitos de limites! Sempre trutas! Aos amigos Biriteiros de Vitória – ES, que sempre me receberam tão bem e me trataram com tanto carinho.

Aos amigos do NUPECCE, que muito mais do que colegas de trabalho, foram amigos, parceiros e família! Os dias de trabalho são mais prazerosos com vocês por perto. Agradeço especialmente aos queridos irmãos da ecologia, Chico, Márcio e Max! Às meninas Lu, Ellen, Kokotinha, Iara, Jana, Mirela, Pici e Vanessa. Às minhas queridas filhas científicas, Livia e Bia. Estarei sempre na torcida por todos vocês!

Gostaria de agradecer aos amigos que se transformaram em família e tornaram essa caminhada muito mais agradável! À Eves, sempre tão doce, tão cheia de luz e bons conselhos, sempre estará no meu coração! Ao Mauzito, pacato, risonho, sempre trazendo tranquilidade ao seu redor! Aos meninos do Larzinho, Pedro e Power, super queridos, parceiros para tudo, os almoços de domingo são muito melhores com vocês por perto!

Ao Cervini que foi um grande companheiro em diversos momentos dessa caminhada, bons ou ruins! Sempre disposto a ouvir e ajudar no que fosse preciso! Meu eterno muito obrigada!

À Alê, querida! Nossa amizade e empatia imediatas são para a vida toda! Sem palavras para agradecer todas as mudanças de hábitos, adesão a boicotes e paciência com minhas bagunças! Não se preocupe, prometo que não sumirei no mundo!!!

A todos os amigos que acolheram a Cacildinha sempre que foi preciso, em especial à Debonis e seus amigos de república e à Rep. Nazarena.

Aos meninos da República Kasa Verde que foram um lar para mim e para a Cacildis em diversos momentos. Ficarão na memória os jogos de domingo, churrascos espontâneos, festa à fantasia e muitos momentos de risada!

Aos amigos peludos de quatro patas que me deram acalento em muitos momentos de estresse, principalmente minha filha Cacildis! Brisa e seus bebês também!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas	ii
1. Introdução	1
2. Revisão de Literatura	2
2.1. Ordem Cetartiodactyla	2
2.2. Família Cervidae	3
2.3. Gênero <i>Mazama</i>	6
2.4. Veados cinza: <i>M. gouazoubira</i> e <i>M. nemorivaga</i>	8
2.5. Conceitos de espécie	11
2.6. Análises filogenéticas	13
2.5. Genes nucleares x Genes mitocondriais	16
3. Objetivos	18
4. Materiais e Métodos	19
4.1. Amostras e extração de DNA	19
4.2. Amplificação, edição das sequências e alinhamento	21
4.3. Clonagem	26
4.4. Análises filogenéticas	26
4.4.1. Construção das árvores dos genes	26
4.4.2. Construção da árvore das espécies	27
5. Resultados	28
5.1. Problemas na amplificação/sequenciamento dos genes selecionados	28
5.1.1. Gene COII	29
5.1.2. Genes PLP, IL1A, CD8A, PTH E CP	31
5.1.3. Genes NGFB, GBA , MBP, NID, OBS e GNA11	31
5.1.4. Gene α-Lactoalbumina	31
5.1.5. Genes ligados aos cromossomos sexuais	32
5.2. Genes utilizados nas análises	32
5.3. Análises filogenéticas	34
6. Discussão	40
6.1. Heteroplasmia X Pseudogenes	40

6.2. Análises filogenéticas – Gênero <i>Mazama</i>	40
6.3. Sistemática de <i>M. gouazoubira</i> e <i>M. nemorivaga</i>	42
7. Conclusão	45
8. Referências bibliográficas	46

Lista de Abreviaturas

NUPECCE – Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos

Cytb – Citocromo b

COI – Citocromo oxidase subunidade I

COII – Citocromo oxidase subunidade II

LAC - α -lactoalbumina

MGF – gene que codifica o Fator de Crescimento de Mastócitos

IL16 – gene que codifica a Proteína Interleucina 16

PLP – gene que codifica a Proteína Proteolipídica

PTH – gene que codifica o Hormônio da Paratireóide

CP – gene que codifica a Proteína Ceruplasmina

IL1a – gene que codifica a Proteína Interleucina 1 alfa

CD8a – gene que codifica o Antígeno CD8

GBA – gene que codifica a Beta Glicosidase Ácida

NGFB – gene que codifica o Fator de crescimento do nervo beta

NID – Nidogene

OBS – gene da Obesidade

MBP – gene que codifica a Proteína básica de mielina

GNA11 – gene que codifica a Proteína de ligação dos nucleotídeos de Guanina alfa 11

AMELY – gene que codifica a Amelogenina

ZFY – codifica uma proteína Zinc Finger no cromossomo Y.

PEG - Polyethylene Glycol

PCR – Polymerase Chain Reaction – Reação em Cadeia da Polimerase

GTR - General Time Reversible – Tempo Reversível Generalizado

ML – Máxima Verossimilhança (Maximum Likelihood)

IB- Inferência Bayesiana (Bayesian Inference)

FILOGENIA E TAXONOMIA DOS VEADOS CINZA

(*Mazama gouazoubira* E *M. nemorivaga*)

RESUMO

O gênero *Mazama* (Mammalia: Cervidae) engloba as espécies de cervídeos neotropicais de pequeno porte e chifres simples. A alta taxa de convergência morfológica e diversificação rápida e recente dificultam a resolução das lacunas na sua história evolutiva. Estudos envolvendo análises moleculares indicaram que *Mazama* é um gênero polifilético, com uma subdivisão das suas espécies em dois clados (veados vermelhos e cinza). No presente estudo foram inferidas as relações filogenéticas e o tempo de divergência das espécies de veados cinza *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, utilizando dois genes mitocondriais (*Cytb* e *COI*) e dois genes nucleares (*IL16* e *MGF*). A análise de coalescência corroborou com os resultados anteriores, separando essas duas espécies do restante das espécies de *Mazama*. Além disso, as duas espécies são alocadas em clados separados e monofiléticos, representando diferentes gêneros. Os resultados obtidos indicaram que as duas espécies representam complexos de linhagens crípticas, com ambas as diversificações tendo iniciado no final do Pleistoceno (1,62-1,65 Myr). A espécie *M. gouazoubira* foi subdividida em cinco clados de distribuição simpátrica em grande parte da sua ocorrência. A espécie *M. nemorivaga* foi separada em três clados, com distribuições biogeográficas distintas e correspondentes às áreas de endemismo da Amazônia. O grande número de linhagens identificadas no presente estudo indica o caráter emergencial de uma delimitação e revisão sistemática acurada para as espécies desse gênero. Essas linhagens detectadas representam hipóteses taxonômicas a serem testadas utilizando outras metodologias de análise complementares como, citogenética, morfometria, ecologia, comportamento e reprodução.

PALAVRAS-CHAVE: Cervídeos neotropicais, genes nucleares, coalescência, sistemática, espécies crípticas.

PHYLOGENY AND TAXONOMY IN THE GRAY BROCKET DEER

(*Mazama gouazoubira* E *M. nemorivaga*)

ABSTRACT

The genus *Mazama* includes neotropical deer species of small sizes and simple antlers. Morphological convergences, in addition to rapid and recent diversification, make the resolution of gaps in their evolutionary history difficult. Initial molecular analyses indicated that *Mazama* is a polyphyletic genus with species subdivided into two clades (gray and red deer). In this study we inferred the phylogenetic relationships and divergence time of the gray brocket deer species *M. gouazoubira* and *M. nemorivaga* using two mitochondrial genes (*Cytb* and *COI*) and two nuclear genes (*IL16* and *MGF*). The coalescence analysis corroborated the previous results, separating these two species from the remaining *Mazama* species. Moreover, the two species were allocated into separate monophyletic clades, representing different genera. These results indicate that the two species represent complexes of cryptic lineages, whose diversifications started in the Late Pleistocene (1.62 to 1.65 Myr). The *M. gouazoubira* species was subdivided into five clades with sympatric distribution. The *M. nemorivaga* species was separated into three distinct clades, corresponding to areas of Amazon biogeographical endemism. The large number of lineages identified in this study indicates need for an accurate delimitation and systematic review for the *Mazama* species. These findings may represent hypotheses of taxonomic lineages to be tested using other analysis methods, such as cytogenetics, morphology, ecology, behavior and reproduction strategies.

KEYWORDS: Deer, gray brocket deer, cryptic species, phylogeny.

1.INTRODUÇÃO

As análises filogenéticas utilizando sequências de DNA têm sido realizadas para o esclarecimento das relações sistemáticas e da história evolutiva de diversos táxons (Frankham et al., 2006). A filogenia da família Cervidae apresenta classificação controversa em diversos níveis taxonômicos (Pitra et al., 2004; Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008). A resolução dessas lacunas é dificultada devido à escassez de registros fósseis e ao alto nível de homoplasia nos caracteres morfológicos (Duarte; Merino, 1997; Webb, 2000; Pitra et al., 2004; Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; González et al., 2010). Entre as incertezas taxonômicas dessa família, são ressaltados os cervídeos neotropicais do gênero *Mazama*.

A validade desse gênero foi questionada inicialmente devido às análises utilizando isoenzimas, as quais indicaram uma relação entre *Mazama americana* e *Odocoileus virginianus* mais próxima do que entre *M. americana* e *Mazama gouazoubira* (Smith et al., 1986). Posteriormente, análises moleculares utilizando genes nucleares e mitocondriais, com uma extensa amostragem dessa família, corroboraram com o resultado do estudo descrito acima, colocando *M. americana* e *M. gouazoubira* em clados distintos (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012).

Análises morfológicas e morfométricas dentro desse gênero indicaram um alto polimorfismo individual, dificultando a discriminação das espécies (Rossi, 2000). Para o esclarecimento dessas lacunas taxonômicas, é recomendada uma análise dessas espécies utilizando uma maior amostragem e diferentes marcadores moleculares.

O presente estudo focou nas espécies de veados cinza, que foram alocadas em um clado separado das outras espécies de *Mazama*, as espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, que possivelmente não serão mais classificadas dentro desse gênero. Além disso, o nível de diferenciação entre as duas espécies sugere a necessidade de uma revisão sistemática mais aprofundada para o esclarecimento do gênero(s) ao(s) qual(is) essas espécies são pertencentes.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. ORDEM CETARTIODACTYLA

A ordem Cetartiodactyla foi proposta a partir da década de 90 e representa a reunião das antigas ordens Artiodactyla e Cetácea. Essa junção teve como base vários estudos independentes de filogenia e sistemática, avaliando fósseis, morfologia e análises moleculares, os quais alocaram a ordem Cetácea dentro de Artiodactyla (Graur; Higgins, 1994; Gatesy et al., 1996; Gatesy, 1997; Montgelard et al., 1997; Shimamura et al., 1999; Gatesy et al., 1999; Gatesy; O'Leary, 2001; Gingerich et al., 2001; Thewissen et al., 2001; Rose et al., 2001; Boissarie et al., 2005; Agnarsson; May-Collado, 2008; O'Leary; Gatesy, 2008; Zhou et al., 2011; Hassanin et al., 2012).

Diversas análises moleculares indicavam a família Hippopotamidae como grupo irmão dos cetáceos (Gatesy et al., 1999; Agnarsson; May-Collado, 2008; Zhou et al., 2011; Hassanin et al., 2012). Entretanto, é improvável que esses dois grupos estejam intimamente relacionados, uma vez que os cetáceos originaram há cerca de 50 milhões de anos (Myr) no sul da Ásia, enquanto a família Hippopotamidae é de apenas 15 Myr de idade, sendo os primeiros hippopotamídeos registrados na Ásia há cerca de 6 Myr (Boissarie, et al. 2005).

Thewissen et al. (2007) realizaram análises morfológicas, utilizando fósseis e sugeriram que o grupo irmão dos cetáceos seria a extinta família de artiodáctilos Raoellidae. Essa família ocorreu no sul da Ásia, durante o Eoceno, e já utilizava o ambiente aquático para a alimentação e proteção, sendo provavelmente a mudança de dieta a principal característica da transição entre os artiodáctilos e cetáceos (Thewissen et al., 2007).

Apesar dos Cetartiodactyla ser um dos grupos mais estudados até o presente momento, a relação filogenética dessa ordem ainda apresenta diversas controvérsias (Price et al., 2005). Devido a isso, o presente estudo utilizou a classificação realizada por Hassanin et al. (2012), uma vez que nesse estudo foi analisada a diversificação de Cetartiodactyla utilizando o genoma mitocondrial

completo e a maior amostragem das espécies remanescentes realizada até o presente momento.

Atualmente, essa ordem é representada por cerca de 330 espécies que ocorrem em todos os continentes (com exceção da Antártida) e nos ambientes aquáticos: marinhos e de água doce (International Union for Conservation of Nature - IUCN, 2014). São encontradas cinco subordens: Cetacea, Suina, Tylopoda, Ancodonta e Ruminantia (Hassanin et al., 2012).

As espécies atuais da subordem Cetacea são exclusivamente aquáticas, representadas por baleias, golfinhos e botos (IUCN, 2014). Acredita-se que a transição do ancestral dos cetáceos do ambiente terrestre para o ambiente marinho foi acompanhada de uma adaptação rápida e radical, dificultando o estabelecimento da posição filogenética dessa linhagem na classe Mammalia (Arnasson et al., 2004). As outras quatro subordens (Suina, Tylopoda, Ancodonta e Ruminatia) eram reunidas na antiga ordem Artiodactyla, a qual foi considerada parafilética e invalidada (Montgelard et al., 1997; Hassanin et al., 2012).

A subordem Suina reúne os suídeos e taiassuídeos (suínos, catetos e queixadas). A subordem Tylopoda inclui os camelídeos (camelos e lhamas) e a subordem Ancodonta abrange os hipopótamos. A subordem mais representativa é a Ruminantia, abrangendo 59% dos gêneros e 65% das espécies descritas, sendo subdividida em cinco famílias, Bovidae, Cervidae, Giraffidae, Moschidae, e Tragulidae (Hassanin et al., 2012).

2.2. FAMÍLIA CERVIDAE

A família Cervidae é caracterizada pela sua grande diversidade e inconsistências acerca das suas relações evolutivas em diferentes níveis (Gilbert et al., 2006; Hassanin et al., 2012). A escolha de caracteres morfológicos para a classificação dentro dessa família se mostrou muito precária, devido à dificuldade de identificar quando os mesmos são herdados de um ancestral comum ou se estão relacionados com adaptações ecológicas, não sendo filogeneticamente informativos (homoplasia) (Webb, 2000; Pitra et al., 2004; Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; González et al., 2010).

Devido a essas dificuldades, diversos estudos utilizaram metodologias moleculares para a resolução de incertezas taxonômicas envolvendo essa família: Gene 12S e 16S (RNAs ribossômicos mitocondriais) (Miyamoto et al., 1990; Kraus; Miyamoto, 1991), genes mitocondriais (Irwin et al., 1991; Douzery; Randi, 1997; Pitra et al., 2004; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012; Wang; Yang, 2013), genes nucleares (Cronin et al., 1996), genes mitocondriais e nucleares (Hassanin; Douzery, 2003; Gilbert et al., 2006). Apesar desses estudos, muitas lacunas taxonômicas ainda são mantidas, principalmente devido à deficiente amostragem de táxons e o uso de poucos marcadores moleculares (Gilbert et al., 2006).

Diversos autores ressaltam a necessidade do uso de mais marcadores nucleares para a obtenção de sinal filogenético consistente e, com isso, uma maior compreensão da história evolutiva dessa família (Randi et al., 1998; Pitra et al., 2004; Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012). Entretanto, poucos estudos utilizaram esses marcadores com sucesso para os cervídeos, sendo que os respectivos autores detectaram poucos sítios informativos para esses genes, obtendo nós incongruentes com os marcadores mitocondriais e baixos suportes estatísticos na resolução de muitos clados (Hassanin; Douzery, 2003; Gilbert et al., 2006). Kraus e Miyamoto (1991) atribuem as dificuldades de resolução taxonômica dos Pecora (classificação taxonômica acima de família que engloba a família Cervidae), à rápida radiação em um curto período de tempo no fim do Oligoceno e início do Mioceno.

Até o presente momento foram descritas 55 espécies de cervídeos (IUCN, 2014), classificadas por meio de análises moleculares e de comportamento, em duas subfamílias: Cervinae e Capreolinae (Gilbert et al., 2006; Cap et al., 2008; Hassanin et al., 2012). Segundo a classificação de Gilbert et al. (2006), a qual abrangeu a maior amostragem taxonômica da família até o presente momento, a subfamília Cervinae contém as tribos Cervini e Muntiacini; e a subfamília Capreolini inclui as tribos Alceini, Capreolini e Odocoileini.

As tribos Cervini e Odocoileini são monofiléticas (Gilbert et al., 2006). Entretanto, os gêneros alocados nas mesmas apresentam os principais problemas taxonômicos dentro dessa família (Gilbert et al., 2006; Hassanin et al., 2012). A tribo Cervini ocorre basicamente na região da Eurásia, com exceção da espécie *Cervus*

elaphus e suas subespécies, que são encontradas no norte da África e América do Norte (IUCN, 2014). É estimada que a divergência dessa tribo ocorreu há cerca de 5 Myr. Atualmente, ainda são encontradas lacunas na sua filogenia envolvendo os gêneros *Cervus*, *Rucervus*, e *Rusa*, sendo considerados polifiléticos e/ou parafiléticos (Gilbert et al., 2006; Hassanin et al., 2012).

A tribo Odocoileini iniciou sua radiação no Norte do continente Americano no início do Plioceno (5 Myr), e com o soergimento do istmo do Panamá há cerca de 2,5-3,0 Myr, pôde migrar para o hemisfério sul desse continente (Webb, 2000; Duarte et al., 2008). Ao menos oito formas ancestrais ocuparam a América do sul e o grande sucesso de ocupação e diversificação dentro desse continente provavelmente está relacionado à ausência de outros ruminantes nessa região (Webb, 2000; Duarte et al., 2008).

As espécies neotropicais estão incluídas na tribo Odocoileini e são destacadas devido à ampla variedade morfológica e de habitats ocupados, além de diversos problemas e controvérsias taxonômicas (Gilbert et al., 2006). A polifilia foi detectada para alguns gêneros, ressaltando a necessidade de uma classificação acurada e revisão da nomenclatura. Os gêneros que apresentaram polifiletismo em análises anteriores foram: *Mazama* (Smith et al., 1986; Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012), *Hippocamelus* (Duarte et al., 2008) *Odocoileus* (Hassanin et al., 2012) e *Pudu* (Hassanin et al., 2012). No caso do gênero *Pudu*, os próprios autores advertem à possibilidade de erros de identificação da amostra de *Pudu mephistophiles* com a espécie *Mazama rufina*, por compartilharem o mesmo nome popular “venado chonta”, o que validaria novamente a monofilia do gênero *Pudu* (Hassanin et al., 2012).

2.3. GÊNERO *MAZAMA*

O gênero *Mazama* juntamente com o gênero *Pudu* agrupam todas as espécies de cervídeos neotropicais de pequeno porte e chifres simples, adaptadas para a movimentação em ambientes de florestas densas e vegetações fechadas (Eisenberg, 2000; Merino et al., 2005).

Atualmente a IUCN (2014) reconhece 10 espécies de *Mazama*: *M. temama*, *M. gouazoubira*, *M. rufina*, *M. chunyi*, *M. nana*, *M. americana*, *M. bricenii*, *M. nemorivaga*, *M. bororo* e *M. pandora*. Esse gênero é considerado um dos casos mais impressionantes (Gilbert et al., 2006) e surpreendentes de convergência morfológica entre os mamíferos (Duarte et al., 2008), permanecendo muitas dúvidas acerca das relações evolutivas entre as espécies descritas até o presente momento.

A polifilia desse gênero foi indicada inicialmente em análises morfológicas e moleculares utilizando isoenzimas com as espécies *M. gouazoubira* e *M. americana* (Smith et al., 1986). Apenas cerca de 20 anos depois a filogenia desse gênero foi avaliada novamente utilizando marcadores mitocondriais e nucleares (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012). A polifilia foi confirmada em todas essas análises moleculares. A monofilia desse gênero foi indicada apenas com estudos de morfometria craniométrica (Merino et al., 2005). Entretanto, os resultados encontrados foram discrepantes com os outros estudos moleculares realizados, reforçando as dificuldades de utilização de morfometria para essa tribo.

Até o presente momento, o estudo que abrangiu a maior amostragem dessa tribo foi realizado por Duarte et al. (2008), no qual utilizaram o gene mitocondrial do *citocromo b* para analisar as espécies de todos os gêneros de cervídeos sul-americanos, com o intuito de esclarecer a sistemática e a história evolutiva dos mesmos.

Nesse estudo foram incluídas mais espécies do gênero *Mazama* que os estudos anteriores, e os resultados encontrados foram similares àqueles de Smith et al. (1986) e Gilbert et al. (2006). As análises realizadas dividiram esse grupo de cervídeos em dois clados (chamados de vermelho e cinza, de acordo com a pelagem das espécies incluídas). O clado cinza incluiu *Mazama gouazoubira* (veado catingueiro), *M. nemorivaga* (veado-roxo), *Blastoceros dichotomus* (cervo-do-

Pantanal), *Hippocamelus bisulcus* (cervo Andino), *Hippocamelus antisensis* (Taruka) e *Ozotoceros bezoarticus* (veado-campeiro). O clado vermelho incluiu *M. bororo* (veado-bororó), *M. nana* (veado-de-mão-curta), *M. americana* (veado-mateiro), *M. temama* (veado-da-montanha), além do gênero *Odocoileus* (veado-de-cauda-branca) (Figura 1).

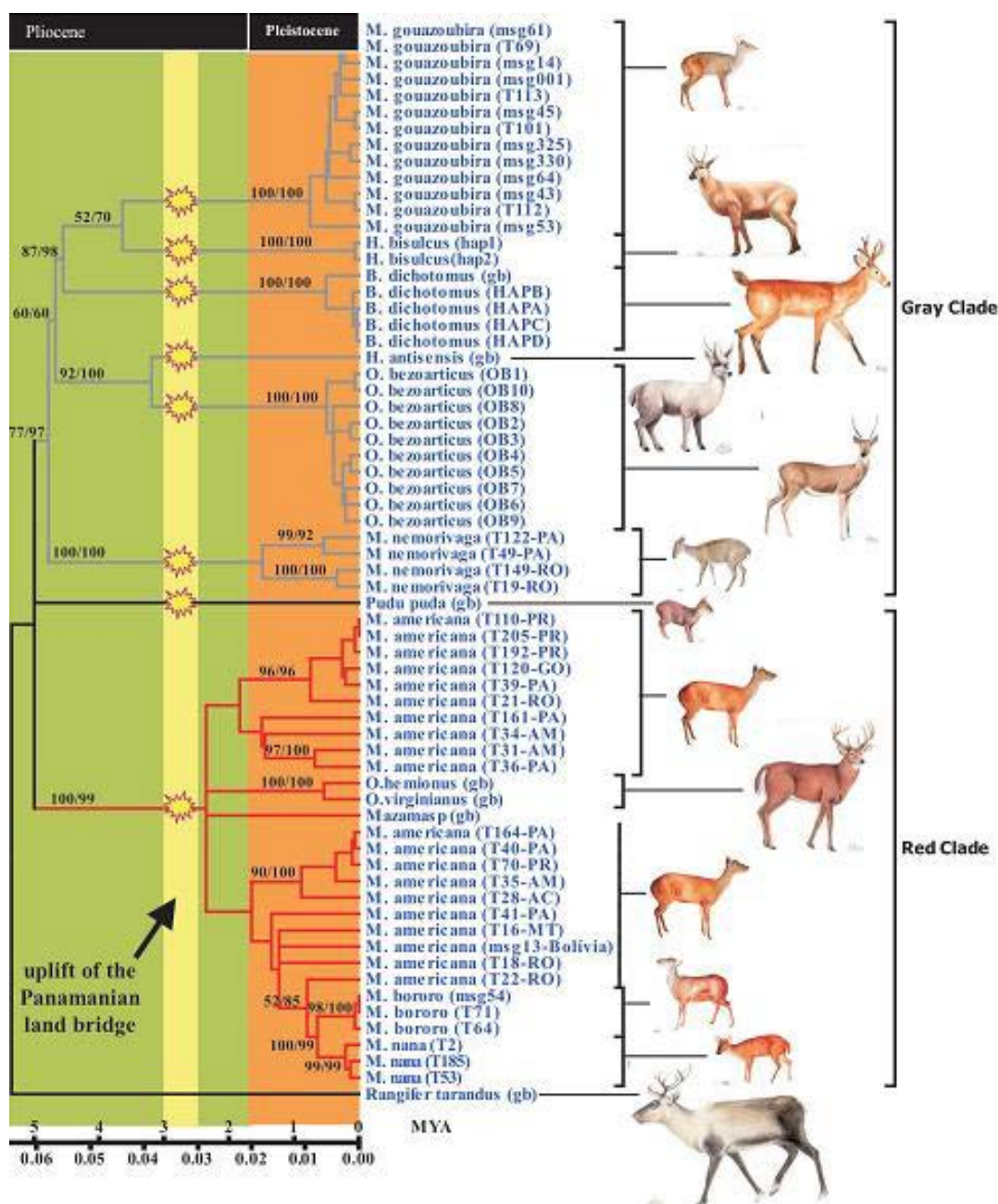


Figura 1. Relação filogenética dos cervídeos da América, utilizando o gene Citocromo *b* (Retirado de Duarte et al., 2008).

Os resultados encontrados por Duarte et al. (2008) indicaram que o grupo de veados vermelhos se diferenciou rapidamente durante o Pleistoceno no refúgio glacial. A grande diferenciação e isolamento genético encontrados entre os indivíduos desse grupo se deve principalmente à baixa plasticidade ecológica e dificuldade de movimentação entre esses refúgios (Duarte et al., 2008). Os resultados desse mesmo estudo também indicam a separação dos veados cinza (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) do gênero *Mazama*. O fato dos veados cinza do gênero *Mazama* não terem sido reunidos como um grupo monofilético indica a possível separação dessas duas espécies em gêneros distintos (Duarte et al., 2008).

2.4. VEADOS CINZA: *M. gouazoubira* E *M. nemorivaga*

A separação entre *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* foi considerada controversa até recentemente. Entretanto, análises morfológicas com as espécies do gênero *Mazama* indicaram que as mesmas representavam duas espécies distintas (Rossi, 2000). Estudos cariotípicos indicaram que a principal diferença entre essas duas espécies está na morfologia do cromossomo X (Resende, 2012).

A espécie *Mazama gouazoubira* Fisher (1814) conhecida popularmente como veado-catingueiro foi descrita anteriormente com mais de vinte distintas denominações científicas (sinonímias) (Rossi, 2000; Black-Décima et al.; 2010). A distribuição geográfica dessa espécie é ampla, incluindo regiões da Argentina e da Bolívia, todo o território do Uruguai e do Paraguai, e, no Brasil, não ocorre apenas na região Amazônica (Figura 2) (Pinder; Leeuwenberg, 1997; Black-Décima et al., 2010).

Devido à sua extensa distribuição podem ser observadas inúmeras variações regionais, ecológicas e individuais de coloração (Rossi, 2000; Black-Décima et al., 2010). Variações de tamanho também são observadas, seguindo um gradiente de padrão latitudinal, sendo os catingueiros provenientes do sul de maior porte que aqueles originários do nordeste (Duarte; Jorge, 1998; Black-Décima et al., 2010).

A grande diferenciação entre os indivíduos dessa espécie levou à descrição de seis subespécies de veado catingueiro. Rossi (2000), a partir de análises craniométricas nessas subespécies, considerou essas variações como individuais ou

geográficas, descartando a classificação de subespécies descritas anteriormente. Duarte et al. (2008) detectaram uma alta diversidade haplotípica para *M. gouazoubira*, provavelmente devido à sua plasticidade, além da expansão demográfica e geográfica na América do Sul.

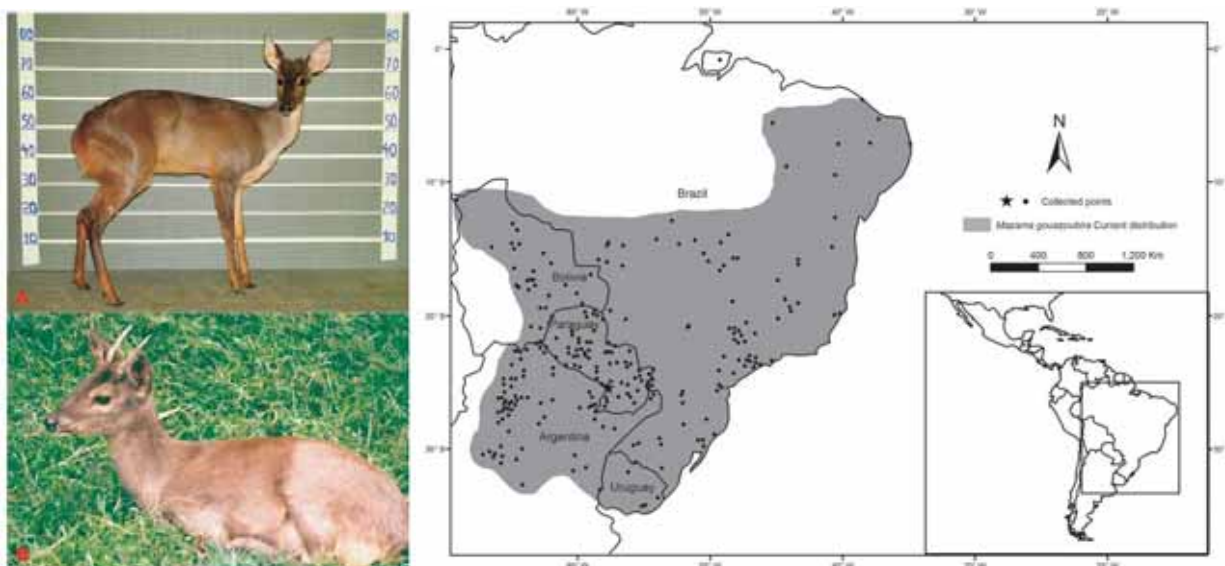


Figura 2. A espécie *M. gouazoubira* A e B - fotografias de machos adultos da espécie *Mazama gouazoubira*; C - distribuição geográfica com base nos registros de observação (Figuras retiradas de: Black-Décima et al., 2010)

Na região Amazônica não ocorre o veado catingueiro, sendo que a espécie *M. nemorivaga* (Cuvier 1817) se distribui por toda essa região, incluindo Brasil, Guiana Francesa, Suriname, Guiana, Venezuela, Colômbia, Ilha de São José (Panamá), Equador, Peru e provavelmente Bolívia (Figura 3) (Rossi et al., 2010). Atualmente, existem dúvidas a respeito da ocorrência em algumas dessas regiões, devido à fragmentação e mudanças em alguns habitats. Já foram relatadas cerca de dezoito sinonímias para essa espécie e outras treze que ainda apresentam identificações duvidosas (Rossi et al., 2010).

A espécie *M. nemorivaga* apresenta grande plasticidade ecológica, permitindo a sua movimentação por diferentes paisagens (Duarte et al., 2008). São encontradas descrições de sete subespécies de *M. nemorivaga*. Contudo, as mesmas utilizaram como base dados morfológicos, permanecendo controversas. Rossi (2000) analisou a espécie *M. rondoni* descrita no Brasil, não identificando diferenças morfológicas

significativas com relação à espécie tipo, rejeitando essa classificação e incluindo todos os morfotipos em *M. nemorivaga*.

As amostras utilizadas por Duarte et al. (2008) dessa espécie eram provenientes do Pará e de Rondônia, ocorrendo uma separação entre as mesmas. Devido à ocorrência de regiões de endemismo no bioma da Amazônia (Silva et al., 2005), essa separação pode indicar diferenciações genéticas significativas entre essas linhagens.

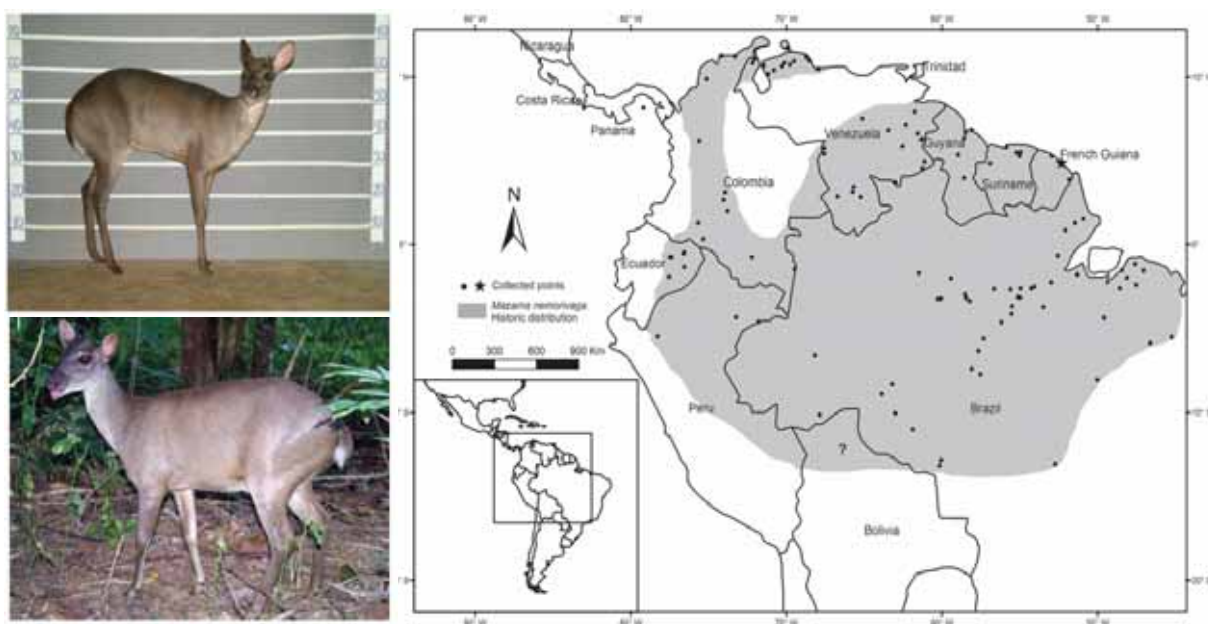


Figura 3. A espécie *M. nemorivaga*. A e B – Fotografia de um macho adulto e de uma fêmea adulta da espécie *Mazama nemorivaga* (respectivamente); C - Pontos de coleta e observação, indicando a sua provável distribuição (Figuras retiradas de: Rossi et al. 2010).

Análises mais detalhadas, com maior número de amostras e diferentes metodologias de análise são necessárias, devido à convergência de caracteres morfológicos e classificações taxonômicas controversas dentro desse grupo. Nesse contexto, as análises moleculares se mostram ideais para esclarecer essas relações evolutivas.

2.5. CONCEITOS DE ESPÉCIE

Um grande desafio para a conservação e gestão da biodiversidade é a parcela significativa de espécies que ainda permanecem desconhecidas ou não descritas (Wilson, 2003). Além disso, apesar do termo “espécie” representar uma das unidades mais importantes para a biologia, sua definição ainda é controversa (Hausdorf, 2011). Mayden (1997) listou vinte e quatro conceitos de espécies diferentes, e ainda mais sete definições alternativas. Apesar das divergências relativas ao conceito, a maioria dos biólogos acredita no “fenômeno espécie” que é representado pelas descontinuidades morfológicas, genéticas e ecológicas da diversidade biológica contemporânea (Niemiller et al., 2011).

A descrição da maioria das espécies foi feita utilizando o conceito morfológico ou tipológico, uma vez que foram precedentes ao conceito biológico de espécies (Mayden, 1997). Em um estudo avaliando as consequências do uso de diferentes conceitos de espécies, foi verificado um aumento de 48% de espécies reconhecidas e uma consequente diminuição no tamanho populacional e distribuição geográfica das mesmas, dependendo do conceito utilizado (Agapow et al., 2004).

O conceito de espécie também envolve a definição do que é especiação, além do que seria uma espécie (Hausdorf, 2011). Os mecanismos de especiação ainda são amplamente discutidos. O paradigma que esse processo é lento e envolve o acúmulo de mutações que levam à incompatibilidade genética tem sido substituído por uma visão mais complexa, que abrange mecanismos de especiação impulsionados por divergências ecológicas (Johannesson, 2001). Novos estudos relacionados com a especiação tem dado suporte para a sua ocorrência em simpatria e para o papel da seleção natural nesse processo (Johannesson, 2001; Via, 2001; Schluter, 2001).

A especiação pode ocorrer apesar de hibridização e introgressão entre diferentes espécies. Esses eventos já foram detectados em plantas e animais (cerca de 25% e 10% das espécies, respectivamente), sendo que a maioria desses fenômenos ocorre principalmente em espécies mais recentes (Mallet, 2005). As espécies podem permanecer com isolamento reprodutivo incompleto após milhões de anos da sua formação (Mallet, 2005). A maioria dos conceitos de espécie não

considera o intercâmbio genético entre diferentes espécies, se tornando inadequado nesses casos (Hausdorf, 2011).

Como a especiação nem sempre é acompanhada de mudanças morfológicas, o número de espécies tende a ser maior do que o descrito atualmente (Bickford et al., 2007). Nas últimas décadas, os estudos envolvendo espécies crípticas teve um crescimento exponencial, principalmente devido ao aumento do uso de metodologias moleculares (Bickford et al., 2007; Beheregaray; Caccone, 2007; Brown et al., 2007).

A resolução do *status* taxonômico e relações evolutivas entre os taxa são necessárias para a realização de ações conservacionistas, controle biológico, estudos ecológicos e comportamentais (Beheregaray; Caccone, 2007; Bickford et al., 2007; Hausdorf, 2011). As lacunas no conhecimento das relações filogenéticas podem levar à negligência de espécies ameaçadas, hibridização não natural e má alocação de recursos financeiros (Frankham et al., 2006).

No presente estudo será utilizado o conceito filogenético de espécie, no qual as espécies são consideradas populações diferenciadas das outras por ao menos um carácter derivado herdado, e podem ser representadas por clados monofiléticos (Mayden, 1997; Isaac et al., 2004; Mallet, 2005). O conceito filogenético de espécies é amplamente utilizado atualmente, porém alguns autores recomendam cautela na descrição de novas espécies utilizando esse conceito, principalmente quando possuem poucos dados genéticos ou morfológicos das mesmas (Zachos et al., 2013). Contudo, Groves (2013) destaca que esse é um dos únicos conceitos de espécie que poderiam ser testados, como qualquer hipótese científica deveria ser.

Com o intuito de contornar o problema de definição de espécie e sugerir uma unidade operacional funcional para a conservação, ou seja, unidades de manejo, foi criado em 1985 durante o encontro da “**Zoological Society of Philadelphia**”, o conceito de Unidades Evolutivas Significativas - ESUs (Evolutionarily Significant Units) (Ryder 1986). Segundo Ryder (1986) o mesmo representa populações com variações adaptativas significativas, identificadas por meio de diferentes tipos de análises e conjuntos de dados. Este termo foi introduzido com o objetivo de substituir a nomenclatura de subespécies (Ryder 1986), segundo Moritz (1994) esse conceito é complementar, e não substituto do conceito de espécie. O reconhecimento da diversidade genética intraespecífica na legislação de proteção/conservação da

biodiversidade de muitos países tornou o conceito de ESU muito utilizado pelos pesquisadores (Moritz, 1994).

2.6. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

Estudos envolvendo a identificação de espécies, assim como a inferência das suas respectivas histórias evolutivas aumentaram nos últimos anos, principalmente devido à crescente facilidade em gerar dados moleculares (Niemiller et al., 2011). Independente do mecanismo de especiação que ocorreu e da definição utilizada, as divergências entre as espécies devem refletir na maioria dos locos (Cummings et al., 2008). Muitos autores concluíram que a construção de árvores filogenéticas referentes a dados genéticos, é mais simples e apropriada que as abordagens anteriores (Liu, 2006).

Para a construção de filogenias utilizando dados biológicos, o método de parcimônia foi o modelo inicialmente utilizado (Nylander et al., 2004). A ideia geral do método da parcimônia foi introduzida por Cavalli-Sforza e Edwards (1967). Esse método é simples, sendo considerada a árvore mais parcimoniosa aquela que apresentar o menor número de passos evolutivos para explicar o padrão observado (Liu, 2006).

Devido à necessidade de mais modelos evolutivos para englobar os mecanismos de mutação e outros processos genéticos, métodos estatísticos mais complexos, como a Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana, foram adaptados para realização dessas análises (Liu, 2006; Edwards et al., 2007). Além disso, esses métodos avaliam a probabilidade dos dados para um conjunto de topologias de árvores e comprimentos dos ramos, com o intuito de inferir árvores com maior acurácia (Knowles; Kubatko, 2010).

Quando as análises são feitas utilizando sequências de apenas um gene, o método é chamado de reconstrução de árvore filogenética do gene (ou árvore do gene), enquanto que a concatenação de sequências de dois ou mais genes é chamada de árvore filogenética da espécie (ou árvore da espécie), assumindo que esses genes representam a história evolutiva da mesma (Liu, 2006).

Entretanto, estudos envolvendo espécies proximamente relacionadas tem demonstrado que diferenças entre as árvores dos genes e as das espécies são bem comuns (Maddison, 1997; Templeton, 2001; Funk; Omland, 2003). Uma possível solução para esse problema é o aumento do número de locos utilizados, com o intuito de que o sinal filogenético de vários locos sobreponha o ruído criado por eventos estocásticos que enviesam as análises (Rokas et al, 2003).

O fato que a maior parte das árvores dos genes são incongruentes com a árvore “real” da espécie representa uma advertência quanto ao uso de apenas um loco, assim como a concatenação simples de vários locos e ao uso da ferramenta de “*majority-rule*” (50% +1) que infere a árvore filogenética com base na topologia inferida pela maioria dos genes (Leaché, 2009).

O principal motivo dessas discrepâncias é que as árvores de espécie e de genes estão sujeitas a diferentes processos evolutivos (Knowles; Kubatko, 2010). A estrutura da árvore das espécies é determinada pela especiação, extinção e em alguns casos, hibridização, enquanto que a estrutura das árvores de genes refletem a proliferação e perda de linhagens de espécies, além de taxas de mutação, coalescência de linhagens de genes dentro de linhagens de espécies e alguns efeitos de migração entre linhagens de espécies (Knowles; Kubatko, 2010).

As árvores dos genes podem ser influenciadas por eventos como: transferência genética horizontal, hibridização, duplicação gênica, retenção de polimorfismo ancestral, fluxo gênico ou divergência (classificação ou sorteamento) incompleta das linhagens – “*incomplete lineage sorting*” (Broughton; Harrison, 2003; Cummings et al., 2008; Nosil et al. 2009). Essas incongruências são potencializadas no caso de especiações mais recentes e populações com tamanhos efetivos maiores (Maddison; Knowles, 2006). Entender esses processos evolutivos e seus efeitos sobre a relação entre árvores de genes e de espécies é, portanto, um problema de fundamental importância para o desenvolvimento de métodos eficientes de estimativa das filogenias das espécies (Knowles; Kubatko, 2010).

Apesar desses problemas terem sido detectados desde o final da década de 80 (Pamilo; Nei, 1988; Maddison, 1997), métodos que permitissem maior flexibilidade e adequação de modelos às histórias evolutivas foram desenvolvidos recentemente (Liu, 2006; Maddison; Knowles, 2006; Edwards et al., 2007).

Segundo Maddison; Knowles (2006), para reconstruir as árvores dos genes, deve-se considerar o processo de substituição dos nucleotídeos, enquanto que, para reconstruir árvores de espécies devemos considerar, além disso, os processos que ocorrem com as linhagens de genes dentro de populações. A classificação das linhagens (*lineage sorting*) é o processo envolvido para que cada linhagem de gene se torne fixa dentro de uma espécie e diferenciada de outras espécies, de forma que todos os alelos da mesma sejam ligados a um único alelo ancestral (Heckman et al., 2007). Caso essa fixação dos alelos ainda não tenha ocorrido, (classificação incompleta das linhagens), esse processo pode ser modelado matematicamente pelo processo de coalescência (Kingman, 1982). Os resultados incongruentes entre as árvores de genes são reflexos de tempos de coalescência incongruentes (Wiley; Lieberman, 2011).

A teoria da coalescência tem como base modelos matemáticos que inferem a distribuição esperada de tempo para encontrar um ancestral comum em uma amostra da população (Kuhner, 2008). Segundo Felsenstein (2004) pode-se fazer uma analogia da coalescência com uma caixa contendo k insetos: os mesmos caminhariam dentro dela aleatoriamente e, quando colidissem, um comeria o outro instantaneamente. A cada vez que isso ocorresse eles começariam a correr mais rápido e o número de insetos cairia de k para $k - 1$, $k - 2$ e assim por diante, até finalmente restar apenas um inseto na caixa. O número de pares de besouros que podem colidir é $k(k-1)/2$. A caixa representa a população, os besouros representam os alelos amostrados e cada vez que um come o outro representaria um evento de coalescência. Assim sendo, é possível perceber que quanto maior a caixa (tamanho da população) o processo de coalescência também será retardado (Felsenstein, 2004).

A teoria da coalescência permite relacionar os padrões de ancestralidade comum dentro de uma amostra com a estrutura da população em geral, inferindo os pontos de ascendência em comum entre os alelos amostrados (Kuhner, 2008). A fórmula utilizada é $\Theta / [k(k - 1)]$, onde a letra K representa o número de cópias de genes (alelos) e Θ é o produto do tamanho efetivo da população e da taxa de mutação.

Uma das falhas dos métodos filogenéticos tradicionais, utilizando a concatenação dos genes, é que não é possível estimar parâmetros importantes para a história evolutiva da espécie, como o tamanho da população e o tempo de especiação (Liu; Pearl, 2007). A coalescência integrada genética de populações com métodos filogenéticos, utilizando análises com vários locos e acomodando a classificação das linhagens (Leaché, 2009). Devido a essas características as análises de coalescência, envolvendo a genealogia nas análises, tem se tornado popular e tem auxiliado a desvendar histórias populacionais complexas.

2.7. GENES NUCLEARES X GENES MITOCONDRIAIS

A utilização de diferentes marcadores moleculares (DNA nuclear e mitocondrial) possibilita a obtenção de sinais filogenéticos mais consistentes. O DNA mitocondrial apresenta características desejáveis para estudos filogenéticos, como alto polimorfismo, taxa de mutação mais alta que o DNA nuclear, herança uniparental (geralmente materna) e baixas taxas de recombinação (Avice, 2000). Entretanto, a ocorrência de heteroplasmia, pseudogenes mitocondriais e taxa evolutiva variável, dificultam a utilização desses genes (Zhang; Hewitt, 1996; Avice, 2000; Williams; Knowlton, 2001; Maté et al., 2007; Dubey et al., 2009).

As cópias do DNA mitocondrial integradas no genoma nuclear, são chamadas de pseudogenes (ou *nuclear mitochondrial pseudogenes - Numt*). Esses *Numts* apresentam mutações diferenciadas do genoma mitocondrial e a co-amplificação dos mesmos com o gene de interesse dificulta a realização das análises filogenéticas (Bensasson et al. 2001).

É denominado heteroplasmia quando ocorre mais de um tipo de haplótipo mitocondrial em um organismo, gerado(s) por recombinações, mutações em pequenas escalas ou transmissão de genoma mitocondrial biparental (Kmiec et al. 2006). A heteroplasmia pode ser representada por diferentes números de repetições ou pontos de substituição (SNP – Single Nucleotide Polymorphism) (Budowle et al. 2003). O nível relativo dos diferentes haplótipos em um mesmo indivíduo pode ser variável entre os diferentes tecidos do mesmo (Budowle et al. 2003).

O tempo de coalescência dos genes nucleares é quatro vezes maior que o tempo de coalescência dos genes mitocondriais (Birky 1991). Além disso, a sua herança é biparental (com exceção dos genes ligados ao cromossomo Y), permitindo inferir a genealogia dos genes em um contexto mais amplo. As maiores dificuldades de utilização desse tipo de marcador são: analisar os haplótipos separadamente (no caso de heterozigotos) e encontrar regiões polimórficas informativas em grupos mais recentes (Avice, 2000).

No presente estudo, foi proposto esclarecer algumas lacunas da sistemática dos veados cinza do gênero *Mazama*. Para tanto, foram utilizados os marcadores mitocondriais Citocromo b (*Cytb*) e Citocromo oxidase subunidade I (*COI*), combinados com os marcadores nucleares Interleucina 16 (*IL16*) e Fator de Crescimento de Mastócitos (*MGF*), com o intuito de realizar análises mais robustas. Além disso, foi incluída a maior amostragem dessas espécies até o presente momento, buscando esclarecer relações evolutivas e possíveis padrões biogeográficos presentes nas mesmas.

3. OBJETIVOS

- Analisar a sistemática molecular dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*) e a validade de sua possível separação do gênero *Mazama*.
- Caracterizar os padrões de diversificação filogeográficos de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO DE DNA

No presente estudo foram analisadas 46 amostras de animais distribuídos pelo Brasil (e uma proveniente do Paraguai), sendo 36 amostras de *M. gouazoubira* e 11 de *M. nemorivaga* (Figura 4). Além destas, também foram amostradas as espécies *Blastoceros dichotomus* (Cervo do Pantanal), *Ozotoceros bezoarticus* (veado Campeiro) representantes do clado cinza, e *M. americana* (veado Mateiro) e *M. nana* (veado-de-mão-curta) como representantes do clado vermelho, estas últimas foram incluídas nas análises como grupo externo (Tabela 1). As amostras utilizadas se encontram estocadas no banco de amostras do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), sendo provenientes de capturas, apreensões e de criadores particulares e públicos (período de coleta de 1994 a 2013).

Para a extração de DNA das amostras de sangue foi utilizado o protocolo de Sambrook et al. (1989) com algumas modificações, e para as amostras de pelo o protocolo de Fenol-clorofórmio (Sambrook et al., 1989).

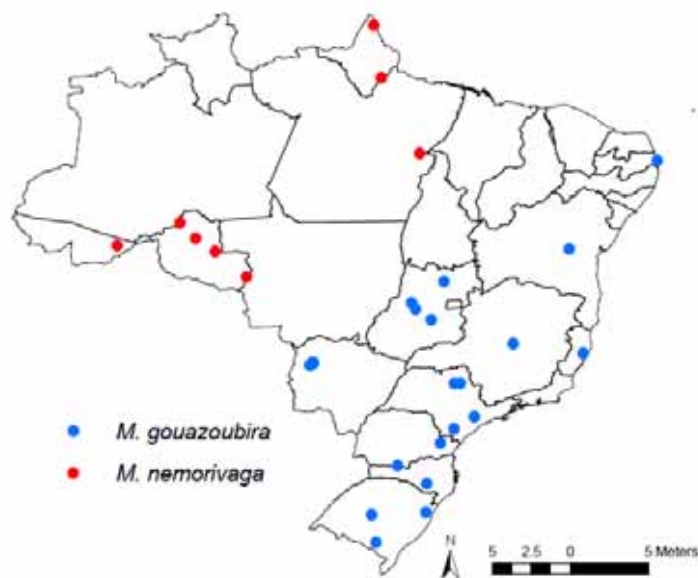


Figura 4. Mapa do Brasil com a representação da localidade das amostras de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* coletadas que foram utilizadas no presente estudo.

Tabela 1. Espécies analisadas, localidade e número de amostras coletadas.

Espécie	Localidade de Coleta	Número de amostras
<i>M. gouazoubira</i>	Goiás – BR	4
<i>M. gouazoubira</i>	Mato Grosso do Sul – BR	16
<i>M. gouazoubira</i>	Mato Grosso – BR	1
<i>M. gouazoubira</i>	Minas Gerais – BR	1
<i>M. gouazoubira</i>	Bahia – BR	1
<i>M. gouazoubira</i>	Espírito Santo – BR	1
<i>M. gouazoubira</i>	São Paulo – BR	4
<i>M. gouazoubira</i>	Rio Grande Sul – BR	3
<i>M. gouazoubira</i>	Paraná – BR	2
<i>M. gouazoubira</i>	Santa Catarina – BR	2
<i>M. gouazoubira</i>	Hernandárias – PY	1
<i>M. nemorivaga</i>	Rondônia – BR	6
<i>M. nemorivaga</i>	Pará – BR	2
<i>M. nemorivaga</i>	Acre – BR	1
<i>M. nemorivaga</i>	Amapá – BR	2
<i>O. bezoarticus</i>	Mato Grosso do Sul – BR	1
<i>M. americana</i>	Mato Grosso – BR	1
<i>M. nana</i>	Paraná – BR	1
<i>B. dichotomus</i>	São Paulo – BR	1

4.2. AMPLIFICAÇÃO, EDIÇÃO DAS SEQUÊNCIAS E ALINHAMENTO

Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando uma reação padrão, com modificações para alguns iniciadores: 300µM de dNTPs, 1,5mM de MgCl₂, Tampão 1x (200mM Tris-HCl pH8,4; 500mM KCl), 1U de *Taq Polimerase Platinum (Invitrogen)*, 15-20 pmol do iniciador direto, 15-20 pmol do iniciador reverso, 50-100 ng de DNA, em um volume final de 30 µL. O programa de amplificação utilizado foi: ciclo inicial de 5 min a 94° para a desnaturação do DNA; 35 ciclos de: 94° por 1 min, temperatura de hibridização específica de cada par de iniciadores (Tabela 2) 45-75 seg, 72° por 1 min, com uma extensão final de 72° por 30 min.

Inicialmente, para o DNA mitocondrial, foram incluídos os genes Citocromo b (*Cytb*) e Citocromo Oxidase subunidade II (*COII*), previamente utilizados para o gênero *Mazama* (Gilbert et al., 2006, Duarte et al., 2008). Entretanto, foram observados problemas de sobreposição dos picos nos eletroferogramas de *COII*, inviabilizando as análises. Dessa forma, esse gene foi descartado. Posteriormente foi incluído o gene Citocromo Oxidase subunidade I (*COI*) (Tabela 2).

Com relação ao genoma nuclear, apenas o gene α -Lactoalbumina – íntron 2 (*LAC*) havia sido utilizado com sucesso, apresentando polimorfismo para o gênero *Mazama* (Gilbert et al., 2006). Além deste, foram utilizados os genes Interleucina 16 (*IL16*) e Fator de Crescimento de Mastócitos (*MGF*), que já haviam sido amplificados para outros Cetartiodactyla (Rezaei et al. 2010; Matthee et al., 2001).

Outros genes nucleares que haviam sido utilizados com sucesso para outras espécies dessa ordem foram testados (com diversas condições de PCR), como o que codifica a proteína Proteolipídica (*PLP*), do Hormônio da Paratireóide (*PTH*) e da proteína ceruloplasmina (*CP*). Além destes, foram avaliados oito marcadores universais, desenvolvidos e testados em 26 espécies de diversas ordens de mamíferos (Lyons et al. 1997). Foram escolhidos os marcadores que apresentaram amplificação positiva para a espécie de veado testada (*Elaphurus davidianus*), sendo eles, *IL1a*, *CD8A*, *GBA*, *NGFB*, *NID*, *OBS*, *MBP*, *GNA11*.

Para os genes encontrados em cromossomos sexuais, foi testada a amplificação do éxon cinco do gene da amelogenina (*AMELY*), o qual é amplificado nos cromossomos X e Y, com este último geralmente apresentando uma deleção

detectável em gel de agarose. O gene *ZFY* (*Zinc Finger*), que está relacionado com o desenvolvimento dos testículos e é encontrado apenas no cromossomo Y, também foi testado. Ambos haviam sido utilizados previamente em estudos de filogenia com a antiga ordem Artiodactyla.

Os fragmentos foram visualizados em gel de agarose 2%, para a verificação de possíveis bandas inespecíficas. Para a purificação das amostras, foi utilizado o protocolo com PEG (Polyethylene Glycol) e glicogênio azul (Sambrook, 1989), para a visualização do produto de PCR e evitar a perda desse material. As amostras purificadas foram sequenciadas em sequenciador automático 3730XL *Applied Biosystems*.

A qualidade das sequências obtidas foi analisada utilizando o programa PHRED, contido nos pacotes do programa CodonCode Aligner versão 4.0.4 (licença gentilmente cedida por CodonCode Corporation). O CodonCode também foi utilizado para unir e editar as sequências diretas e reversas de cada amostra. Para os heterozigotos dos genes nucleares foi utilizada uma função deste programa que extrai as sobreposições dos cromatogramas causados por “concorrência” de Indels de heterozigotos, utilizando um algoritmo para criar pseudoalelos. Para os picos duplos dos heterozigotos foi utilizado o código da IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Todos os eletroferogramas foram inspecionados e as possíveis ambiguidades corrigidas manualmente.

A caracterização do polimorfismo dos genes foi feita no programa DNASP v5 (Librado & Rozas, 2009). Foram calculados: diversidade haplotípica, número de mutações e sítios informativos (mutações presentes em ao menos dois indivíduos).

Posteriormente as sequências foram alinhadas no programa MUSCLE (Edgar, 2004), contido no MEGA6 (Tamura et al., 2013). As sequências alinhadas foram submetidas ao programa Modeltest (Posada; Crandall, 1998), com o objetivo de inferir qual o modelo evolutivo que melhor se adequa para cada gene analisado, sendo utilizado o critério AIC (Akaike Information Criterion). Para todos os genes submetidos, o modelo HKY + G foi selecionado como o mais indicado.

Tabela 2. Características dos marcadores testados no presente estudo, e as suas respectivas referências.

Genes testados	Tamanho do fragmento (pb)	Iniciadores utilizados	Localização do fragmento	Temperatura de hibridização	Fonte dos iniciadores
Cytb	1130	ML103	Mitochondrial	50°	Chikuni et al. 1995
		MH104			
COI	658	VF1d	Mitochondrial	60°	Folmer et al. 1994; Ivanova et al. 2006
		VF1i			
		VR1d			
		VR1i			
		LCO1490			
COII	580	HCO 2198	Mitochondrial	60°	Hassanin ; Ropiquet 2004
		U1			
		U291 L374 L582			
α-Lalb	462	α -LAlb-F	Nuclear	60°	Hassanin ; Douzery 2003; * Desenhado no presente estudo
		α -LAlb-R			
		α -LAlb-1*			
PTH	310	PTH-F	Nuclear	55°	Lyons et al. 1997
		PTH-R			
PLP	1057	PLP-F	Nuclear	62°	Lyons et al. 1997
		PLP-R			
AMEL	270	CAPY1F	Nuclear – Cromossomo Y	50-65°	Pidancier et al. 2006
		CAPY1R			

ZFY	920	ZF2F ZF-Y	Nuclear – Cromossomo Y	50-65°	Lawson ; Hewitt 2002
CP	1263	CP-F CP-R	Nuclear	50-65°	Lyons et al. 1997
IL16	392	IL16-F IL16-R	Nuclear	55°	Rezaei et al. 2010
MGF	850	MGF-F MGF-R	Nuclear	58°	Lyons et al. 1997
NGFB	150	NGFB-F NGFB-R	Nuclear	57°	Lyons et al. 1997
GBA	±250	GBA-F GBA-R	Nuclear	57°	Lyons et al. 1997
NID	±1100	NID-F NID-R	Nuclear	50-65°	Lyons et al. 1997
CD8A	±800	CD8A-F CD8A-R	Nuclear	55°	Lyons et al. 1997
IL1a	±650	IL1a-F IL1a-R	Nuclear	54°	Lyons et al. 1997
MBP	-	MBP-F MBP-R	Nuclear	50-65°	Lyons et al. 1997

OBS	±800	OBS-F OBS-R	Nuclear	50-65°	Lyons et al. 1997
GNA11	±600	GNA11-F GNA11-R	Nuclear	50-65°	Lyons et al. 1997

4.3. CLONAGEM

Devido à sobreposição de picos detectada para o gene *COII*, dez produtos de PCR do mesmo foram clonados para a verificação da existência de pseudogenes. Foi selecionada ao menos uma amostra das espécies: *O. virginianus*, *B. dichotomus*, *O. bezoarticus*, *M. americana*, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*. Foi feita a comparação das distâncias genéticas par-a-par, entre os alelos obtidos dos clones utilizando o programa MEGA6.

Além destes, foram clonados dez fragmentos de indivíduos heterozigotos para o gene MGF visando a comparação com os pseudoalelos gerados pelo CodonCode.

As clonagens foram realizadas no Laboratório de Genética de Bactérias e Biotecnologia Aplicada, departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária (Unesp – FCAV). Os produtos selecionados para a clonagem foram ligados ao vetor pTZ57R/T utilizando o kit InsTAclone™ PCR Cloning Kit (Fermentas), seguindo as especificações do fabricante. Foram utilizadas as células competentes de *Escherichia coli* da linhagem DH10B. Foram selecionadas quatro colônias de cada amostra e posteriormente as mesmas foram enviadas para sequenciamento.

4.4. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

4.4.1. CONSTRUÇÃO DAS ÁRVORES DOS GENES

As análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana foram utilizadas para inferir as árvores dos genes. Para a realização destas análises o conjunto de dados foi separado em genes mitocondriais (*COI* + *Cytb*) e nucleares (*MGF* + *IL16*).

A análise de Máxima Verossimilhança (*Maximum Likelihood*) foi realizada utilizando o programa MEGA6, com a busca heurística “*Subtree-Pruning-Regrafting*” (SPR) extensiva. O *Bootstrap* foi calculado para a análise de suporte estatístico, incluindo 5000 pseudo-réplicas. Essa análise também foi realizada para as sequências obtidas para o gene *COII* para a realização de comparação das topologias obtidas.

A Inferência Bayesiana foi realizada com o programa MrBayes versão 3.1.2 (Huelsenbeck; Ronquist, 2001), utilizando 10.000.000 gerações (ou até o desvio padrão das frequências estarem abaixo de 0,01), com amostragem das árvores a cada 10 gerações e *burn in* de 25%. Para estimar a distribuição da probabilidade posterior foi utilizado a Metropolis-Coupled MCMC (Markov Chain Monte Carlo), também implementada no programa MrBayes. Todas as árvores obtidas foram editadas com auxílio do programa Fig Tree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

4.4.2. CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE DE ESPÉCIES

A árvore de espécies e as datações das divergências, utilizando o método de coalescência foram realizadas utilizando o método *BEAST - Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data (Heled; Drummond, 2010). Esse método se encontra implementado no pacote de programas BEAST e é utilizado para estimar as distribuições posteriores das árvores de espécies juntamente com as árvores dos genes em uma única análise Bayesiana com MCMC.

Para a realização dessa análise foram incluídos os quatro genes sequenciados (nucleares e mitocondriais), com o modelo evolutivo selecionado para os mesmo (HKY + G). Para a datação foi selecionado o relógio molecular relaxado com distribuição não relacionada e log normal, utilizando o modelo de Yule. Os eventos de calibração selecionados foram com base nas datações de Duarte et al. (2008). O primeiro evento foi a separação entre as espécies do clado vermelho *M. americana* e *M. nana* há cerca de 1,8 Myr (grupo monofilético), o segundo foi a separação entre os clados vermelho/cinza há cerca de 5 Myr, incluindo todas as espécies analisadas no presente estudo.

A análise foi realizada utilizando 400 milhões de gerações, com amostragens a cada 40 mil árvores e um descarte por *burn-in* de 50%. As árvores resultantes foram condensadas no programa TreeAnnotator e a árvore consenso resultante foi visualizada no programa FigTree.

5.RESULTADOS

5.1. PROBLEMAS NA AMPLIFICAÇÃO/SEQUENCIAMENTO DOS GENES SELECIONADOS

Para o presente estudo foram testados três marcadores mitocondriais, dois genes nucleares ligados aos cromossomos sexuais e doze genes nucleares presentes em cromossomos autossômicos. Entretanto, alguns deles apresentaram problemas de amplificação, bandas inespecíficas, sequenciamento com muitos artefatos e pseudogenes no presente estudo, impossibilitando o uso dos mesmos (Tabela 3).

Tabela 3. Genes nucleares e mitocondriais que apresentaram problemas impossibilitando a sua amplificação/utilização nas análises.

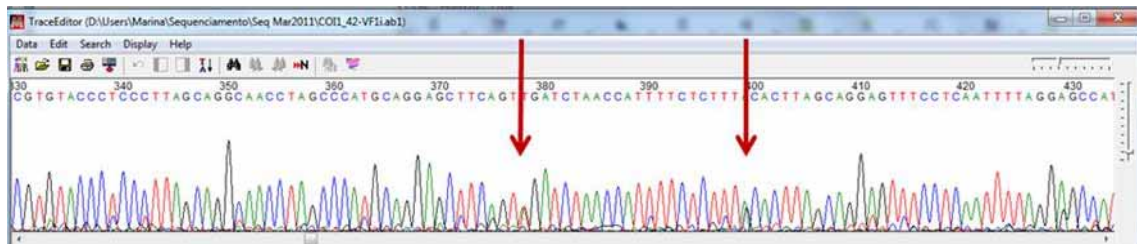
Genes	Problemas detectados
<i>COII</i>	Presença de pseudogene
<i>MBP, NID, OBS, GNA11</i>	Não foi possível a amplificação
<i>CP, AMEL, ZFY</i>	Muitas bandas inespecíficas na amplificação
<i>PTH</i>	Amplificação para apenas cerca de 30% das amostras
<i>NGFB, GBA</i>	Amplificação de fragmento pequeno (100-150pb)
<i>PLP, CD8a, IL1a</i>	Amplificação positiva/ eletroferogramas com artefatos
<i>LAC</i>	Presença de INDEL no início/final da sequência

As próximas seções descrevem detalhadamente os problemas encontrados para cada gene, os quais tiveram que ser descartados das análises realizadas no presente estudo.

5.1.1. GENE COII

Para o gene *COII*, foi detectada a presença de INDEL de 1 a 15 bases pelo programa CodonCode em cerca de 90% dos eletroferogramas obtidos (Figura 5). Apesar de o programa ter detectado o INDEL, não foi possível gerar pseudoalelos com qualidade, impossibilitando a inclusão dos mesmos para as análises seguintes com as sequências dos clones.

5A.



5B.



Figura 5A – Eletroferograma do gene *COII* evidenciando a sobreposição de “picos” em 2 pontos dessa amostra (indicados pela seta). **5B** – Eletroferograma do gene *COII* demonstrando a queda de qualidade do sequenciamento a partir da base 330.

Foram sequenciados quatro clones de cada indivíduo e posteriormente calculadas as distâncias genéticas par-a-par entre os mesmos. Foram detectados diferentes haplótipos para *M. nemorivaga* (0,002), *B. dichotomus* (0,002), *O. virginianus* (0,002-0,041) e *M. gouazoubira* (0,013-0,087). Além disso, foi feita a análise de Máxima Verossimilhança com os haplótipos obtidos (Figura 6).

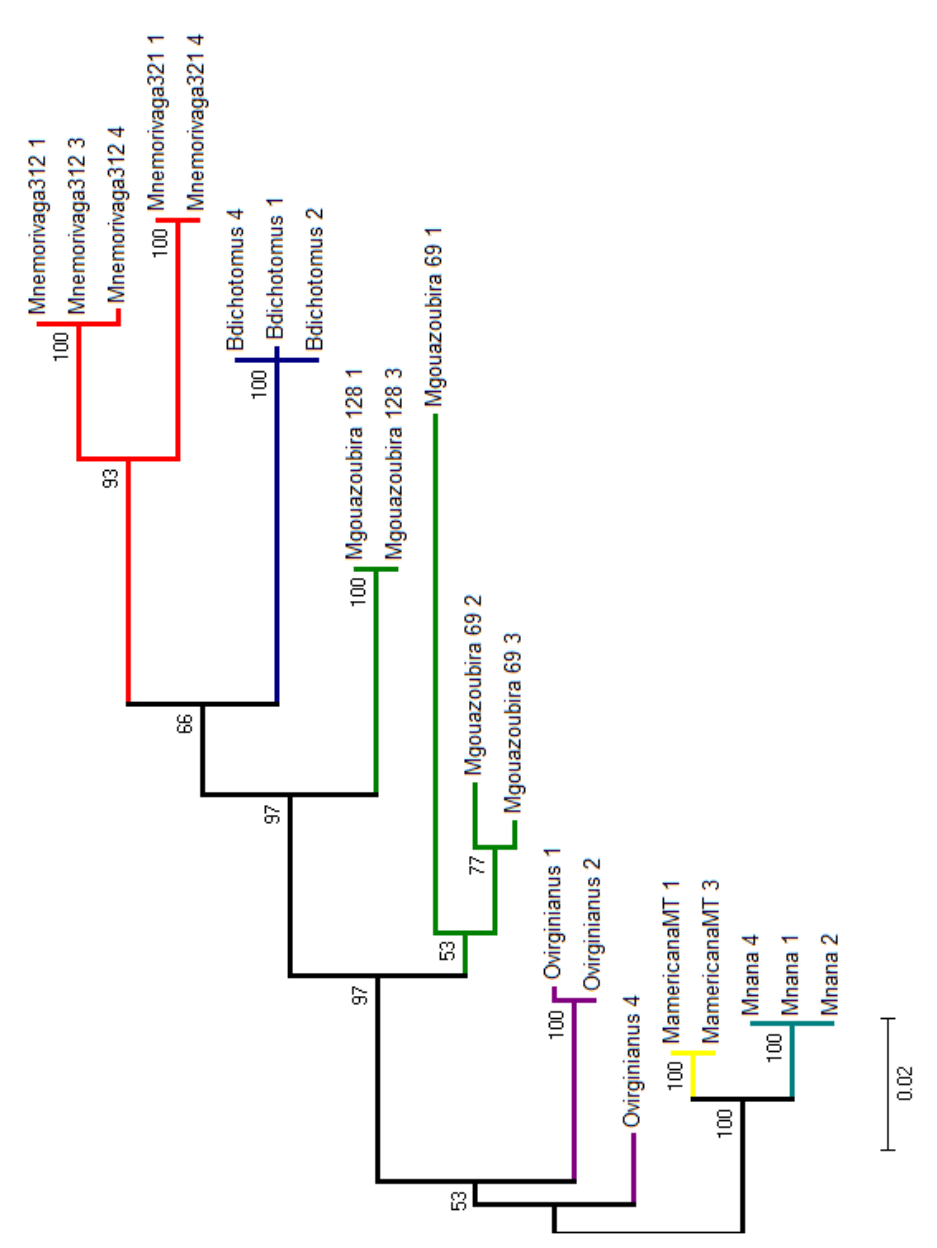


Figura 6. Análise de Máxima Verossimilhança com os clones do gene Citocromo Oxidase subunidade II. O modelo evolutivo utilizado foi HKY + G e os valores obtidos de *bootstraps* encontram-se acima de cada nó, respectivamente.

5.1.2. GENES PLP, IL1A, CD8A, PTH E CP

Fragmentos desses genes nucleares foram testados como candidatos a serem utilizados nas análises filogenéticas. Entretanto, diversos problemas foram observados nas padronizações iniciais de amplificação desses genes.

Os genes *IL1a* e *CD8A* apresentaram eletroferogramas dos fragmentos sequenciados sem qualidade, impossibilitando a leitura dos nucleotídeos pelo programa CodonCode e, conseqüentemente, a inutilização dos mesmos. No entanto, não foram detectadas bandas inespecíficas em gel, dificultando a resolução desse problema.

Para os genes *PLP* e *CP* foram testadas diferentes condições de PCR, devido à presença de diversas bandas inespecíficas nas amplificações. O gene *PTH* apresentou sucesso de amplificação para cerca de 30% das amostras. Foram testadas condições de PCR menos restritivas com o intuito de amplificar as amostras remanescentes, todavia não foi obtido sucesso.

5.1.3. GENES NGFB, GBA, MBP, NID, OBS E GNA11

As regiões dos genes *NGFB* e *GBA* apresentaram amplificação positiva, visualizada em gel de agarose. Entretanto, os fragmentos obtidos com a utilização dos seus respectivos iniciadores são pequenos (entre 100 e 150pb), tornando-os inviáveis para seqüenciamento e as análises seguintes, visto que o aproveitamento desses amplificados é baixo.

Apesar das inúmeras tentativas de padronização das condições de amplificação, não foi possível amplificar os fragmentos dos genes *MBP*, *NID*, *OBS* e *GNA11*.

5.1.4. GENE α -LACTOALBUMINA

O gene da α -Lactoalbumina (*LAC*) apresentou amplificação positiva, mas foi possível visualizar em gel de agarose 2% diferentes tamanhos de alelos (presença de INDEL), gerando seqüências de baixa qualidade. Com o intuito de minimizar esse problema, foi redesenhado um iniciador após essa região de INDEL. Apesar do novo iniciador e do seqüenciamento nos sentidos direto e

reverso, não foi possível obter eletroferogramas de qualidade para a maioria das amostras. Gilbert et al. (2006) já havia reportado a presença de INDELS na posição 70 e 218 (3 e 9 nucleotídeos, respectivamente) para *C. elaphus*. Devido à presença de INDELS no início e final das sequências, a qualidade das mesmas foi muito baixa, impossibilitando a geração de pseudoalelos pelo programa CodonCode. Esse gene foi descartado das análises.

5.1.5. GENES LIGADOS AOS CROMOSSOMOS SEXUAIS

Para os genes ligados ao cromossomo Y, *AMELY* e *ZFY*, foram utilizados os mesmos iniciadores e as mesmas condições de PCR que haviam sido utilizadas com sucesso de amplificação para o gênero *Capra* (Pidancier et al. 2006).

Foram detectadas bandas inespecíficas. Devido a isso, foram testadas diferentes condições de PCR. Mesmo com as modificações, foram mantidas as bandas inespecíficas visualizadas em gel de agarose. Dessa forma, esses genes foram removidos do presente estudo.

5.2. GENES UTILIZADOS NAS ANÁLISES

Para o genoma mitocondrial foram amplificados com sucesso, os genes *Cytb* e *COI* e para o genoma nuclear foram utilizados os genes *MGF* e *IL16*. Apenas o gene *COI* apresentou problemas nos eletroferogramas obtidos inicialmente (baixa qualidade na determinação da sequência). Todavia, a troca dos iniciadores utilizados permitiu a resolução desse problema e o uso do mesmo nas análises filogenéticas realizadas.

O gene nuclear *MGF* apresentou *INDELS* de 1 a 2 bases em quinze indivíduos e o gene *IL16* apresentou *INDELS* de 3 a 5 bases em seis indivíduos dos 51 (incluindo grupo externo) incluídos nas análises. As distâncias genéticas entre os fragmentos obtidos com a clonagem e os pseudogenes gerados pelo programa CodonCode foram superiores em relação às distâncias entre os pseudoalelos. Esse resultado indica que os pseudoalelos (os quais foram utilizados para as análises) são gerados apenas com as bases de qualidade

superior evitando superestimar as diferenciações genéticas. A Tabela 4 indica a diversidade genética obtida para cada espécie, com os quatro genes utilizados no presente estudo.

Tabela 4. Diversidade genética obtida para os quatro genes utilizados no presente estudo.

	Número de seqüências		Número de haplótipos		Diversidade haplotípica		Número de mutações				Sítios informativos			
	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>	<i>M.</i>
Cytb	<i>gouazoubira</i>	<i>nemorivaga</i>	<i>gouazoubira</i>	<i>nemorivaga</i>	<i>gouazoubira</i>	<i>nemorivaga</i>	<i>gouazoubira</i>	<i>nemorivaga</i>	<i>gouazoubira</i>	<i>nemorivaga</i>	<i>gouazoubira</i>	<i>nemorivaga</i>	<i>gouazoubira</i>	<i>nemorivaga</i>
	36	11	32	11	0,992	1,00	101	99	60	77				
COI	36	11	25	8	0,968	0,924	38	31	21	24				
MGF	72	22	49	9	0,986	0,804	111	18	84	17				
IL16	72	22	37	15	0,951	0,928	113	118	49	16				

5.3. ANÁLISES FILOGENÉTICAS

As análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana utilizando genes nucleares apresentaram baixa resolução e suporte estatístico, com altos níveis de polimorfismo compartilhado entre espécies distintas (Figura 7). Todos os indivíduos heterozigotos tiveram seus dois alelos agrupados no mesmo clado, devido a isso, foi utilizado apenas um deles nas análises posteriores, com intuito de melhor visualização dos resultados obtidos.

Os resultados obtidos com essas análises utilizando os genes mitocondriais foram congruentes com a árvore das espécies (utilizando a análise de Coalescência), excetuando alguns clados intra-específicos de *M.gouazoubira* e *M. nemorivaga* (Figuras 8 e 9).

A datação das divergências foi feita utilizando a análise de coalescência, e indicou que após a entrada de ao menos três espécies ancestrais pelo Istmo do Panamá, houve intensa diversificação no final do Plioceno e início do Pleistoceno. A Tabela 5 apresenta as datações com base nas divergências da árvore das espécies (Figura 9).

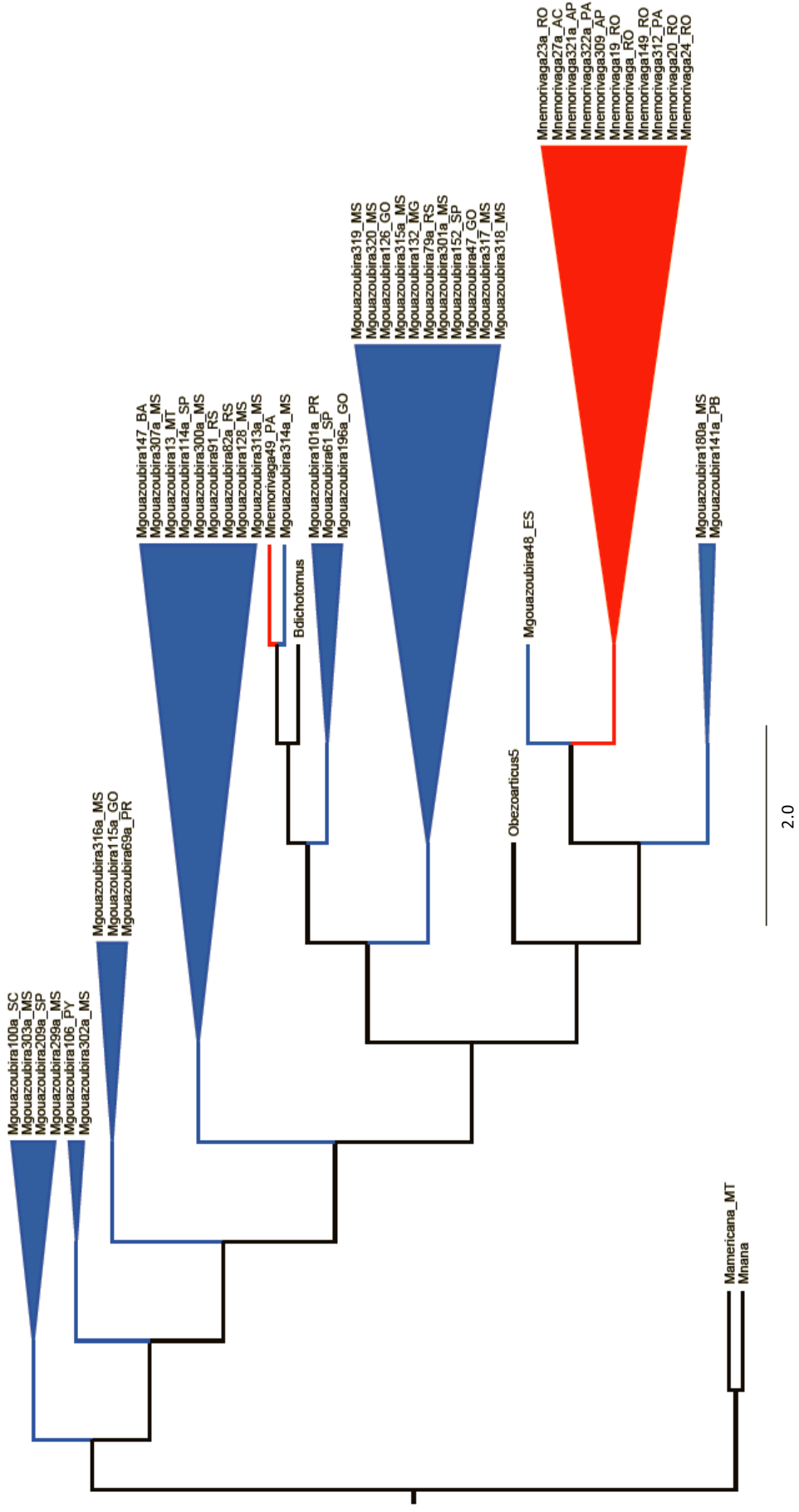


Figura 7. Árvore filogenética utilizando os marcadores nucleares (1124pb), modelo evolutivo utilizado HKY + G, análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Valor de probabilidade posterior bayesiana e de *bootstrap* (5000 pseudoreplicatas) acima do nó do grupo externo. Os outros nós foram incongruentes entre as duas análises realizadas.

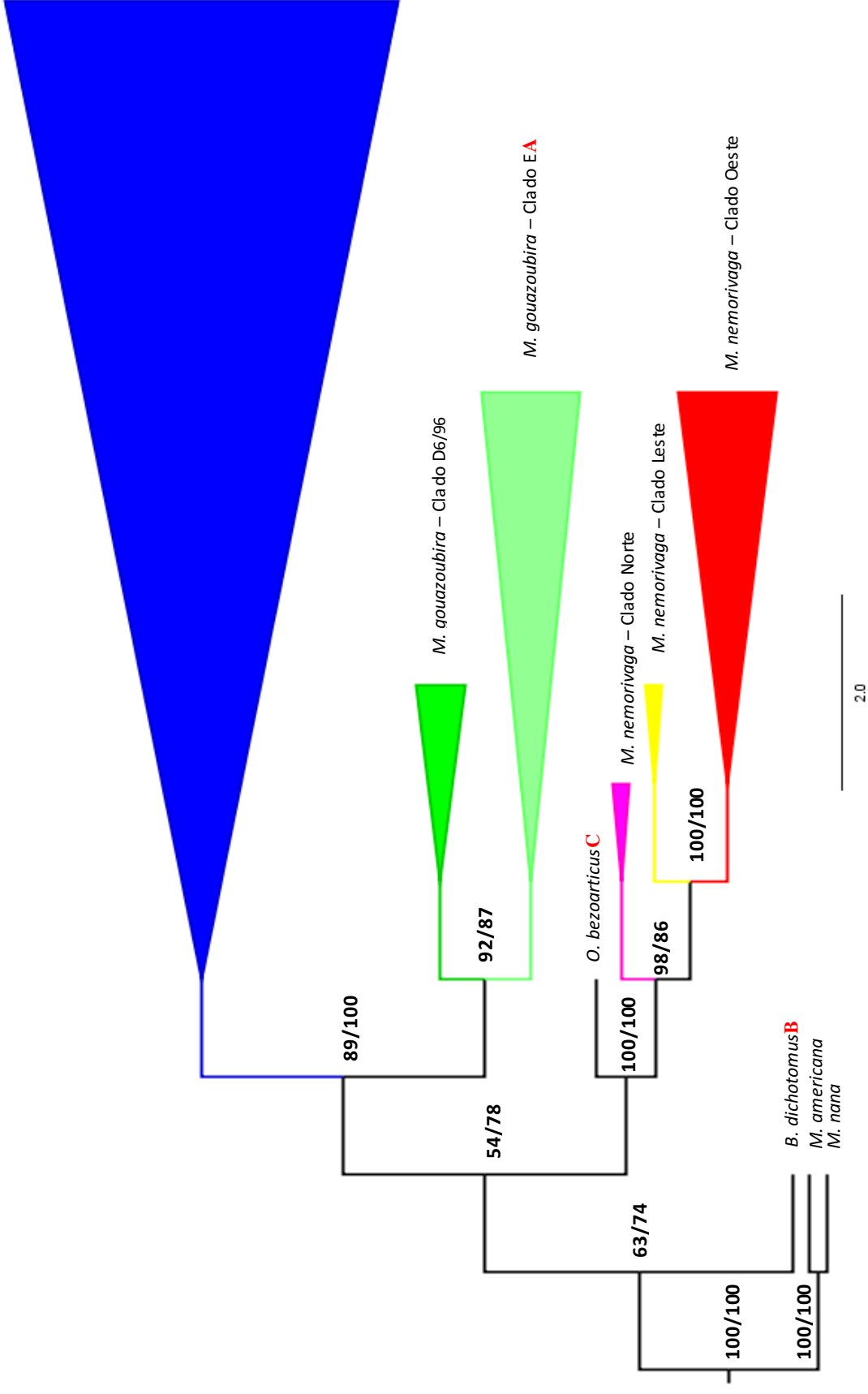


Figura 8. Árvore filogenética utilizando os marcadores mitocondriais *Cytb* e *COI* (1601 pb), modelo evolutivo utilizado HKY + G, análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana. Valores de probabilidades posteriores bayesianas e de *bootstrap* (5000 pseudoreplicatas) acima dos nós (respectivamente). As cores utilizadas seguem aquelas usadas na topologia de árvore das espécies (Figura 9).

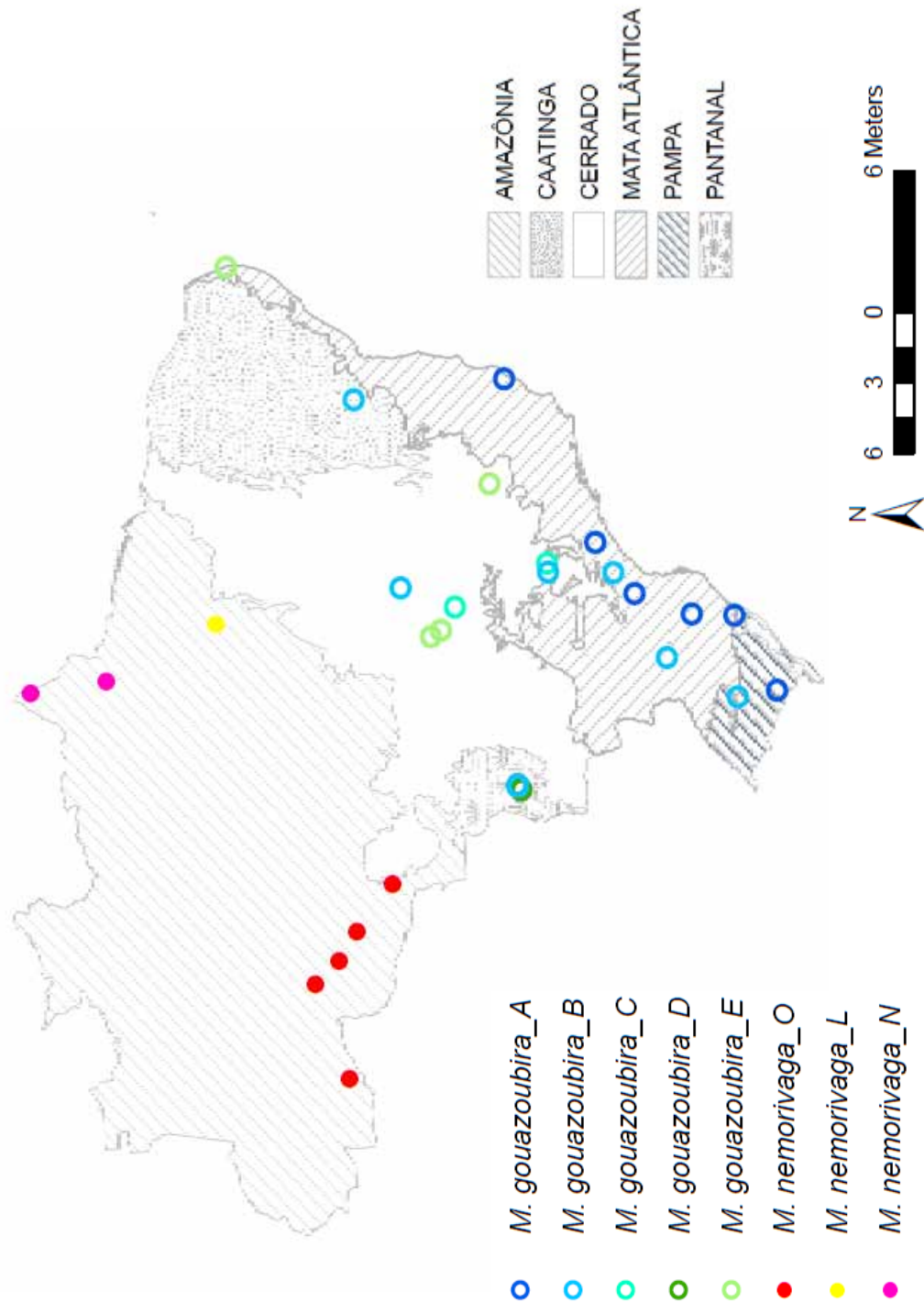


Figura 10. Mapa do Brasil, representando os diferentes biomas e a localização das amostras utilizadas no presente estudo. Os círculos com diferentes cores são referentes aos respectivos clados que as amostras foram alocadas com a análise de coalescência (Figura 9).

Tabela 5. Estimativas de tempos de divergências com os respectivos intervalos de confiança (95% High Posterior Density) entre as linhagens analisadas no presente estudo.

Nós	Divergência Myr (95% HPD)
1	4,25 (3,91-6,29)
2	3,85 (2,97-5,4)
3	3,23 (2,5-5,1)
4	2,68 (1,92-4,5)
5	1,95 (1,04-2,53)
6	1,65 (0,94-2,23)
7	1,62 (1,28-3,44)
8	1,38 (0,77-1,84)
9	1,25 (0,73-2,1)
10	1,23 (0,73-1,79)
11	1,04 (0,64-1,49)

6. DISCUSSÃO

6.1. HETEROPLASMIA X PSEUDOGENES

As principais causas de ocorrência da sobreposição de picos de fluorescência nos eletroferogramas, dificultando e/ou impossibilitando a utilização de alguns marcadores mitocondriais, são: pseudogenes ou heteroplasmia (excetuando a contaminação).

Os eletroferogramas obtidos para o gene *COII* apresentavam esse artefato em várias sequências analisadas. Para a família Cervidae não foram encontrados estudos que relatassem a presença de heteroplasmia ou de pseudogenes decorrentes da transferência do DNA mitocondrial para o genoma nuclear (*Numts*).

A ocorrência da heteroplasmia é caracterizada pela diferença entre os haplótipos em uma única base, podendo ocorrer também em diferenças em duas ou três bases (fato que ocorre com menor frequência) (Budowle et al., 2003). A presença de diferentes haplótipos (com INDELS de até 15pb) indica a presença de pseudoalelos do tipo *Numt* para essas espécies. Apesar de ter sido detectado em espécies de diferentes clados (*M. gouazoubira* e *O. virginianus*), aparentemente seriam decorrentes de eventos independentes, uma vez que os haplótipos obtidos foram agrupados no clado da espécie respectiva. A inferência de uma topologia incorreta é uma das principais consequências da presença de pseudogenes ancestrais (Bensasson et al., 2001), devido a isso esse gene não foi utilizado no presente estudo.

6.2. ANÁLISES FILOGENÉTICAS – GÊNERO MAZAMA

Compreender as relações históricas entre os organismos vivos é um dos principais objetivos das pesquisas da biologia. Os complexos de espécies que passaram por uma radiação rápida e recente representam os maiores desafios na sistemática molecular, uma vez que as relações entre as linhagens podem ser obscurecidas pela retenção do polimorfismo ancestral (Maddison, 1997). O

gênero *Mazama* é constituído por cervídeos sul-americanos caracterizados pela rápida diversificação, convergência morfológica e lacunas na sua sistemática.

No presente estudo o seu polifiletismo foi confirmado em todas as análises realizadas, corroborando com os resultados de estudos anteriores (Smith et al., 1986; Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012). Todavia, foram detectadas várias incongruências entre as análises filogenéticas (Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança) para os genes nucleares com relação às outras (genes mitocondriais e análise de coalescência). As análises utilizando genes nucleares mostraram pouca resolução e ineficiência para distinguir espécies morfológicas, genética e ecologicamente distintas, como *B. dichotomus* e *O. bezoarticus* do restante.

Os genes nucleares são mais susceptíveis a manter o polimorfismo ancestral (devido à taxa de mutação mais lenta) e à introgressão e hibridização causadas por um contato secundário, levando a genealogias incongruentes. Broughton e Harrison (2003) realizaram análises moleculares com três espécies de grilos distintas e detectaram um alto grau de polimorfismo compartilhado entre as mesmas para os genes nucleares. Fisher-Reid e Wiens (2011) realizaram uma revisão de filogenias de diferentes vertebrados e detectaram discordâncias entre os genes nucleares e mitocondriais em cerca de 30-70% dos nós por clado. Segundo Broughton e Harrison (2003), apenas uma pequena fração do genoma necessita estar diferenciada para que ocorra a especiação.

As mesmas análises utilizando genes mitocondriais mostraram resolução e suporte estatísticos elevados, apesar disso, devido à herança uniparental (materna), esses resultados podem ser considerados enviesados. A filopatria de fêmeas para a família Cervidae foi descrita anteriormente para espécies de cervídeos como, *Odocoileus hemionus* (Cullingham et al., 2011), *O. virginianus* (Purdue et al., 2000) e *Rangifer tarandus* (Côté et al., 2002), o que poderia elevar as divergências genéticas detectadas nas análises filogenéticas.

A análise de coalescência tem sido considerada vantajosa em relação às outras para minimizar as incongruências entre as árvores dos genes e a árvore das espécies (Knowles; Kubatko, 2010). A topologia inferida foi semelhante à topologia gerada com os genes mitocondriais, sendo detectados dois clados, o vermelho e o cinza (segundo classificação anterior realizada por Duarte et al. 2008). O grupo de veados vermelhos foi representado pelas espécies *M.*

americana e *M. nana*, o qual foi utilizado como grupo externo; enquanto que o grupo de veados cinza incluiu *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira*, *B. dichotomus* e *O. bezoarticus*. A espécie *M. americana* foi a primeira a ser descrita nesse gênero, devido a isso o clado vermelho deve manter a nomenclatura *Mazama*, enquanto que as espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* necessitam de uma revisão taxonômica. Para a realização dessa revisão seria necessária a amostragem dos espécimes de museu descritos como holótipos (ou parátipos), e preferencialmente das sinonímias descritas para cada espécie.

6.3. SISTEMÁTICA DE *M. gouazoubira* E *M. nemorivaga*

As análises filogenéticas com os genes mitocondriais e a árvore das espécies indicaram que as classificações de *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* representam dois complexos de espécies crípticas. A espécie *M. americana* foi identificada em estudos anteriores também como um complexo de espécies crípticas (com ao menos duas espécies distintas), apresentando grande diversidade cariotípica e molecular (Duarte et al. 2008; Abril et al. 2010; Cursino et al. 2014).

Niemiller et al. (2011) analisaram a acurácia da delimitação de espécies utilizando a análise de coalescência com vários locos. Os resultados obtidos indicaram que o aumento do número de indivíduos amostrados, pode inflar o número de espécies delimitadas, enquanto que o aumento de locos utilizados diminui o número de espécies delimitadas. Os autores sugerem essas análises como formas importantes de desenvolver hipóteses filogenéticas, taxonômicas e biogeográficas, e que as mesmas devem ser testadas envolvendo outros tipos de análises.

Rossi (2000) detectou, por meio de análises morfológicas, uma grande variação individual para *M. gouazoubira*, entretanto a existência de apenas uma espécie. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram uma diversificação rápida, recente (iniciada há cerca de 1,65 Myr) e com simpatria em diversas áreas de distribuição. A grande diversidade haplotípica detectada, corrobora com a hipótese de uma explosão demográfica recente.

A datação das análises filogenéticas indicou que a diversificação das linhagens ocorreu no período final do Plioceno/início do Pleistoceno. Segundo

Rull (2011), a grande diversidade das espécies neotropicais remanescentes está correlacionada com um complexo de acontecimentos ecológicos e evolutivos iniciados por eventos tectônicos e reorganizações paleogeográficas durante o Neogeno. As mudanças climáticas ocorridas no Pleistoceno auxiliaram a manutenção dessa grande biodiversidade (Rull, 2008).

Os clados de *M. gouazoubira* denominados A-C, D e E, foram recuperados nas análises com os genes mitocondriais (Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana) e na análise de coalescência com todos os genes. Todos os clados (com exceção do D) apresentaram uma ampla distribuição envolvendo diferentes estados.

O clado D apresentou ocorrência apenas no Pantanal, local que foi detectado quatro dos cinco clados, representando uma área de alta diversidade genética. Essa diversidade detectada para o Pantanal pode indicar que no passado essa região representou um centro de dispersão para essa espécie. A presença de um clado endêmico corrobora com essa hipótese, entretanto, Junk et al. (2006) destacam a baixa quantidade de espécies endêmicas descritas no Pantanal. Segundo os mesmos autores, os fluxos de inundações que essa região apresenta levam as espécies a se moverem frequentemente, levando ao intercâmbio genético com as regiões vizinhas.

O Pantanal também pode representar uma região a qual foi invadida pelas populações vizinhas, pertencentes a diferentes clados, levando a essa alta diversidade genética detectada. Todavia, a presença de um clado exclusivo para essa região é incongruente com essa hipótese. É necessária uma amostragem mais ampla, principalmente nas regiões menos amostradas e vizinhas ao Pantanal, para a obtenção de um padrão filogeográfico mais claro.

Apesar da monofilia desses clados e alto suporte estatístico dos mesmos, análises complementares ecológicas, comportamentais, cariotípicas e reprodutivas devem ser realizadas para testar se essas linhagens podem ser consideradas diferentes ESUs (divergências intraespecíficas) ou diferentes espécies. Estudos reprodutivos envolvendo indivíduos com diferentes cariótipos de *M. americana* confirmaram a existência de isolamento reprodutivo pós-zigótico (subfertilidade ou esterilidade) apenas no caso de acasalamentos híbridos (Cursino et al. 2014). Análises ecológicas podem esclarecer aspectos

da especiação em simpatria, geralmente relacionada com o isolamento reprodutivo induzido pela seleção natural (Johannesson, 2001).

A espécie *M. nemorivaga* apresentou três clados separados (análise de coalescência e com genes mitocondriais) com alto suporte estatístico e com diversificação há cerca de 1,62 Myr. Os clados foram alocados separadamente por regiões de endemismo da Amazônia. Silva et al. (2005) dividiu a Amazônia em ecorregiões, com base na ocorrência de endemismo de vertebrados terrestres. De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, o clado com as amostras do Amapá, clado Norte, acima do rio Amazonas, representa a região endêmica da Amazônia chamada de Guiana. O clado com as amostras do Pará, representando o clado Leste, englobaria as ecorregiões de Tapajós, Xingu e Belém. E o terceiro clado, o clado Oeste, incluiu amostras de Rondônia e do Acre representaria as ecorregiões de Rondônia e Inambari.

Essa separação de *M. nemorivaga* em diferentes clados pode representar a revalidação da espécie *M. rondoni*. Para a confirmação dessa hipótese deve ser realizada uma revisão taxonômica incluindo amostras de museus descritas como *M. rondoni*.

Os estudos anteriores envolvendo genética molecular dos cervídeos neotropicais revelaram uma grande diversidade e necessidade de mais análises complementares para a delimitação correta das espécies (Duarte et al. 2008; Abril et al. 2010; Cursino et al. 2014). A delimitação de espécies crípticas envolve a diminuição do tamanho populacional e a área de distribuição, assim como o aumento da vulnerabilidade das mesmas. Portanto, para a realização de medidas conservacionistas é emergencial o conhecimento mais refinado dessas espécies de cervídeos, envolvendo análises morfométricas, ecológicas e reprodutivas.

7. CONCLUSÕES

- Em todas as análises realizadas no presente estudo, o gênero *Mazama* foi polifilético, invalidando essa nomenclatura para as espécies *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.

- *Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga* foram alocados em clados separados, corroborando com os resultados anteriores que indicam a separação dessas espécies em dois gêneros diferentes. É necessária uma revisão taxonômica das mesmas incluindo espécimes de Museus (holótipos e parátipos).

- A espécie *M. gouazoubira* foi subdividida em cinco clados, também com alto suporte estatístico, porém não apresentou separações biogeográficas, com os mesmos ocorrendo em simpatria. Análises complementares devem ser realizadas para a confirmação da existência de um complexo de espécies crípticas e uma revisão sistemática/taxonômica mais acurada.

- A espécie *M. nemorivaga* apresentou três clados separados com alto suporte estatístico, incluídos em regiões de endemismos da Amazônia. A revalidação da espécie *M. rondoni* deve ser avaliada, realizando análises que incluem amostras descritas para essa espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, V. V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZALES, S., DUARTE J. M. B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic Genome Research**, v. 128, p. 177–187, 2010.

AGAPOW, P-M.; BININDA-EMOND, O. R. P.; CRANDALL, K. A.; GITTLEMAN, J. L.; MACE, G. M.; MARSHALL, J. C.; PURVIS, A. The Impact of Species Concept on Biodiversity Studies. **The Quarterly Review of Biology**, Chicago, v. 79, n. 2, p. 161-179, 2004.

AGNARSSON, I.; MAY-COLLADO, L. J. The phylogeny of Cetartiodactyla: The importance of dense taxon sampling, missing data, and the remarkable promise of cytochrome b to provide reliable species-level phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 48, p. 964-985, 2008.

ARNASSON, U.; GULLBERG, A.; JANKE, A. Mitogenomic analyses provide new insights into cetacean origin and evolution. **Gene**, v. 333, p. 27-34, 2004.

AVISE, J.C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. Harvard University Press: Cambridge, Massachusetts, 2000. p. 203.

BENSASSON, D.; ZHANG, D.; HARTL, D. L.; HEWITT, G. Mitochondrial pseudogenes: evolution's misplaced witnesses. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 16, n. 6, p. 314-321, 2001.

BEHEREGARAY, L. B.; CACCONE, A. Cryptic biodiversity in a changing world. **Journal of Biology**, v. 6, n. 9, 2007. Disponível em: <<http://jbiol.com/content/6/4/9/about>>.

BICKFORD, D.; LOHMAN, D.J.; SODHI, N. S.; NG, P. K. L.; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-155, 2007.

BIRKY, C. W. J. Evolution and population genetics of organelle genes: mechanisms and models. in Selander, R.K.; Clark, A.G.; Whittam, T.S. (Eds.) **Evolution at the molecular level**. Massachusetts: Sinauer Associates, 1991, p. 112-134.

BLACK-DÉCIMA, P.; ROSSI, R. V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; JULIÁ, J. P. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: Duarte, J.M.B.; Gonzalez, S. (Org.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal/Gland: Funep/IUCN, 2010. p. 190-201.

BOISSERIE, J-R.; LIHOREAU, F.; BRUNET, M. The position of Hippopotamidae within Cetartiodactyla. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1537-1541, 2005.

BROUGHTON, R. E.; HARRISON, R. G. Nuclear gene genealogies reveal historical, demographic and selective factors associated with speciation in field crickets. **Genetics**, v. 163, p. 1389–1401, 2003.

BROWN, D. M.; BRENNEMAN, R. A.; KOEPFLI, K-P; POLLINGER, J. P.; MILÁ, B.; GEORGIADIS, N. J.; LOUIS JR, E. E.; GREYER, G. F.; JACOBS, D. K.; WAYNE, R. K. Extensive population genetic structure in the giraffe. **BioMed Center Biology**, v.5, n. 57, 2007. Disponível em < <http://www.biomedcentral.com/1741-7007/5/57/>>.

BUDOWLE, B.; ALLARD, M. W.; WILSON, M. R.; CHAKRABORTY, R. Forensics and mitochondrial DNA: applications, debates, and foundations. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 4, p. 119-141, 2003.

CAP, H.; DELEPORTE, P.; JOACHIMA, J.; REBY, D. Male vocal behavior and phylogeny in deer. **Cladistics**, v. 24, p. 1-15, 2008.

CAVALLI-SFORZA, L. L.; EDWARDS, A. W. F. Phylogenetic Analysis Models and Estimation Procedures. **American Journal of Human Genetics**, v. 19, n. 3, p. 233-257, 1967.

CHIKUNI, K.; MORI, Y.; TABATA, T.; MOMMA, M.; KOSUGIYAMA, M. Molecular phylogeny based on the k-Casein and Cytochrome b sequences in the Mammalian suborder Ruminantia. **Journal of Molecular Evolution**, v. 41, p. 859-866, 1995.

CÔTÉ, S. D.; DALLAS, J. F.; MARSHALL, F.; IRVINE, R. J.; LANGVATN, R.; ALBON, S. D. Microsatellite DNA evidence for genetic drift and philopatry in Svalbard reindeer. **Molecular Ecology**, v. 11, p. 1923–1930, 2002.

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

CULLINGHAN, C. I.; MERRILL, E. H.; PYBUS, M. J.; BOLLINGER, T. K.; WILSON, G. A.; COLTMAN, D. W. Broad and fine-scale genetic analysis of white-tailed deer populations: estimating the relative risk of chronic wasting disease spread. **Evolutionary Applications**, v. 4, n. 1, p. 116-131, 2011.

CUMMINGS, M. P.; NEEL, M. C.; SHAW, K. L. A genealogical approach to quantifying lineage divergence. **Evolution**, v. 62, p. 2411–2422, 2008.

CURSINO, M. S.; SALVIANO, M. B.; ABRIL, V. V.; ZANETTI, E. S.; DUARTE, J. M. B. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology**, 14:40, 2014.

DOUZERY, E.; RANDI, E. The mitochondrial control region of Cervidae: Evolutionary patterns and phylogenetic content. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, p. 1154–1166, 1997.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M.L. Taxonomia e Evolução. In: Duarte, J.M.B. (Ed.), **Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 1997, p. 1-21.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Análise citotaxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*). in: Duarte, J.M.B. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. 45 f. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. 2008. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, p. 17-22, 2008.

DUBEY, S.; MICHAUX, J.; BRÜNNER, H.; HUTTERER, R.; VOGEL, P. False phylogenies on Wood mice due to cryptic cytochrome-b pseudogene. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 50, n. 3, p. 633-641, 2009.

EDGAR, R.C. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 5, 1792-1797, 2004.

EDWARDS, S. V.; LIU, L.; PEARL, D. K. High-resolution species trees without concatenation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, v. 104, n. 14, p. 5936-5941, 2007.

EISENBERG, J.F. The contemporary Cervidae of Central and South America. In: Vrba, E.S., Shaller, G.B. (Eds.). **Antelopes, Deer, and Relatives**. London: Yale University Press, 2000, pp. 189–202.

FELSENSTEIN, J. **Inferring Phylogenies**. Massachusetts: Sinauer Associates, 2004, p. 450-470.

FISHER-REID, M. C.; WIENS, J. J. What are the consequences of combining nuclear and mitochondrial data for phylogenetic analysis? Lessons from *Plethodon* salamanders and 13 other vertebrate clades. **BMC Evolutionary Biology**, v.11, p. 300.

FUNK, D. J.; OMLAND, K. E. Species-level paraphyly and polyphyly: Frequency, causes, and consequences, with insights from animal mitochondrial DNA. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 34, p. 397-423, 2003.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology And Biotechnology**, v. 3, p. 294-299, 1994.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Introduction to Conservation Genetics**. United Kingdom: Cambridge University Press, 2006, p. 370-371.

GATESY, J.; HAYASHI, C.; CRONIN, M. A.; ARCTANDER, P. Evidence from Milk Casein Genes that Cetaceans are Close Relatives of Hippopotamid Artiodactyls. **Molecular Biology and Evolution**, v. 13, n. 7, p. 954-963, 1996.

GATESY, J. More DNA Support for a Cetacea/Hippopotamidae Clade: The Blood-Clotting Protein Gene γ -Fibrinogen. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 537-543, 1997.

GATESY, J.; MILINKOVITCH, M.; WADDEL, V.; STANHOPE, M. Stability of Cladistic Relationships between Cetacea and Higher-Level Artiodactyl Taxa. **Systematics Biology**, v. 48, n. 1, p. 6-20, 1999.

GATESY, J.; O'LEARY, M. A. Deciphering whale origins with molecules and fossil. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 10, p. 562-570, 2001.

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

GINGERICH, P. D.; HAQ, M. U.; ZALMOUT, I. S.; KHAN, I. H.; MALKANI, M. S.; Origin of Whales from Early Artiodactyls: Hands and Feet of Eocene Protocetidae from Pakistan. **Science**, v. 293, p. 2239-2242, 2001.

GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B.; MALDONADO, J. E. Molecular Phylogenetics and Evolution. In: Duarte, J.M.B.; Gonzalez, S. (Org.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal/Gland: Funep/IUCN, 2010. p. 12-17.

GRAUR, D.; HIGGINS, D. G. Molecular Evidence for the Inclusion of Cetaceans within the Order Artiodactyla. **Molecular Biology and Evolution**, v. 11, n. 3, p. 357-364, 1994.

GROVES, C. P. The nature of species: A rejoinder to Zachos et al. **Mammalian Biology**, v. 78, p. 7-9, 2013.

HASSANIN, A.; DOUZERY, E. J. P. Molecular phylogeny of Ruminantia and the alternative position of the Moschidae. **Systematic Biology**, v. 52, p. 206-228, 2003.

HASSANIN, A.; ROPIQUET, A. Molecular phylogeny of the tribe Bovini (Bovinae, Bovini) and the taxonomic status of the kouprey, *Bos sauveli* Urbain, 1937. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 36, 154-168, 2004.

HASSANIN, A.; DELSUC, F.; ROPIQUET, A.; HAMMER, C.; VAN VUUREN, B.J.; MATTHEE, C.; RUIZ-GARCIA, M.; CATZEFLIS, F.; ARESKOUG, V.; NGUYEN, T. T.; COULOUX, A. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 335, p. 32-50, 2012.

HAUSDORF, B. Progress toward a general species concept. **Evolution**, v. 65, n. 4, p. 923-931, 2011.

HECKMAN, K. L.; MARIANI, C. L.; RASOLOARISON, R.; YODER, A. D. Multiple nuclear loci reveal patterns of incomplete lineage sorting and complex species history within western mouse lemurs (*Microcebus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 43, p. 353–367, 2007.

HELED, J.; DRUMMOND, A.J. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular Biology and Evolution**, v. 27, p. 570–580, 2010.

HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MR BAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001.

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

ISAAC, N. J. B.; MALLET, J.; MACE, G. M. Taxonomic inflation: its influence on macroecology and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 19, n. 9, p. 464-469, 2004.

IUCN Red list of threatened species. Version 2010.4. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>. Acesso em 10 jan. 2014.

IVANOVA, N. V.; DEWAARD, J. R.; HEBERT, P. D. N. An inexpensive, automation-friendly protocol for recovering high-quality DNA. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, p. 998-1002, 2006.

JOHANNESON, K. Parallel speciation: a key to sympatric divergence. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 3, p. 148-153, 2001.

JUNK, W.; CUNHA, C. N.; WANTZEN, K. M.; PETERMANN, P.; STRUSSMANN C.; MARQUES, M. I.; ADIS, J. Biodiversity and its conservation in the Pantanal of Mato Grosso, Brazil. **Aquatic Sciences**, v. 68, p. 278-309, 2006.

KINGMAN, J. F. C. The coalescent. **Stochastic Processes and Their Applications**, v. 13, p. 235 – 248, 1982.

KMIEC, B.; WOLOSZYNSKA M.; JANSKA, H. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. **Current Genetics**, v. 50, p. 149-159, 2006.

KNOWLES, L. L.; KUBATKO, L. S. Estimating species trees: an Introduction to concepts and models. In: knowles, L. L.; kubatko, L. S (Eds.). **Estimating Species Trees: Practical and Theoretical Aspects**. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2010, p. 1-14.

KRAUS, F.; MIYAMOTO, M. Rapid cladogenesis among the pecoran ruminants: Evidence from mitochondrial DNA sequences. **Systematic Zoology**, v. 40, p. 117–130, 1991.

KUHNER, M. K. Coalescent genealogy samplers: windows into population history. **Trends in Ecology and Evolution**, v.24, n.2, p. 86-93, 2008.

LAWSON, L-J.; HEWITT, G. Comparison of substitution rates in ZFX and ZFY introns of sheep and goat related species supports the hypothesis of male-biased mutation rates. **Journal of Molecular Evolution**, v. 54, p. 54-61, 2002.

LEACHÉ, A. D. Species Tree Discordance Traces to Phylogeographic Clade Boundaries in North American Fence Lizards (Sceloporus). **Systematic Biology**, v. 58, n. 6, p. 547-559, 2009.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

LIU, L. **Reconstructing posterior distributions of A species phylogeny using estimated gene tree distributions**. 2006. 115f. Tese (Doutorado em Filosofia) – Programa de Bioestatística, Universidade do Estado de Ohio, 2006.

LIU, L.; PEARL, D. K. Species Trees from Gene Trees: Reconstructing Bayesian Posterior Distributions of a Species Phylogeny Using Estimated Gene Tree Distributions. **Systematic Biology**, v. 56, n. 3, p. 504-514, 2007.

LYONS, L.A.; LAUGHLIN, T. F.; COPELAND, N. G.; JENKINS, N. A.; WOMACK, J. E.; O' BRIEN, S. J. Comparative anchor tagget sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genome. **Nature**, v. 15, p. 47-56 1997.

MADDISON, W. P. Gene trees in species trees. **Systematic Biology**, v. 46, n. 3, p. 523-536, 1997.

MADDISON, W. P.; KNOWLES, L. L. Inferring Phylogeny Despite Incomplete Lineage Sorting. **Systematic Biology**, v. 55, n. 1, p. 21-30, 2006.

MALLET, J. Hybridization as an invasion of the genome. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 20, n. 5, p. 229-237, 2005.

MATÉ, M. L.; ROCCO, F.; VIDAL-RIOJA, L. Mitochondrial heteroplasmy in control region DNA of South America camelids. **Small Ruminant Research**, v. 71, p. 123-129, 2007.

MATTHEE, C. A.; BURZLAFF, J. D.; TAYLOR, J. F.; DAVIS, S. K. Mining the Mammalian Genome for Artiodactyl Systematics. **Systematic Biology**, v. 50, n. 3, p. 367-390, 2001.

MAYDEN, R. L. A hierarchy of species concepts: The denouement in the saga of the species problem. In: M. F. Claridge, H. A. Dawah, and M. R. Wilson (Ed.). **Species: The units of biodiversity**. Londres: Chapman and Hall, 1997, p. 381–424.

MERINO, M. L.; MILNE, N.; VIZCAÍNO, S.F. A cranial morphometric study of deer (Mammalia, Cervidae) from Argentina using three-dimensional landmarks. **Acta Theriologica**, v. 50, n. 1, p. 91-108, 2005.

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

MONTGELARD, C.; CATZEFLIS, F. M.; DOUZERY, E. Phylogenetic Relationships of Artiodactyls and Cetaceans as Deduced from the Comparison of Cytochrome b and 12s rRNA Mitochondrial Sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 14, n. 5, p. 550-559, 1997.

MORITZ, C. Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 9, n. 10, p. 373-375, 1994.

NIEMILLER, M. L.; NEAR, T. J.; FITZPATRICK, B. M. Delimiting species using multilocus data: diagnosing cryptic diversity in the southern cavefish, *Typhlichthys subterraneus* (Teleostei: Amblyopsidae). **Evolution**, v. 66, n. 3, p. 846-866, 2011.

NOSIL, P.; FUNK, D. J.; ORTIZ-BARRIENTOS, D. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 375–402, 2009.

NYLANDER, J. A. A.; RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P.; NIEVES-ALDREY, J. L. Bayesian Phylogenetic Analysis of Combined Data. **Systematic Biology**, v. 53, n.1, p. 47–67, 2004.

O'LEARY, M. A.; GATESY, J. Impact of increased character sampling on the phylogeny of Cetartiodactyla (Mammalia): combined analysis including fossils. **Cladistics**, v. 24, p. 397-442, 2008.

PAMILO, P.; NEI, M . 1988 . Relationships between gene trees and species trees. **Molecular Biology and Evolution**, v. 5, p. 568 – 583, 1988.

PIDANCIER, N.; JORDAN, S.; LUIKART, G.; TABERLET P. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): Discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 40, p. 739-749, 2006.

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

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

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

PRICE, S. A.; BININDA-EMONDS, O. R. P.; GITTLEMAN, J. L. A complete phylogeny of the whales, dolphins and even-toed hoofed mammals (Cetartiodactyla). **Biological Reviews**, v. 80, p. 445-473, 2005.

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

RANDI, E.; MUCCI N.; PIERPAOLI M.; DOUZERY, E. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial

cytochrome *b* gene. **Proceedings of the Royal Society B**, London, v. 265, p. 793–801, 1998.

RESENDE, J. P. A. **Comparação cariotípica entre *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga*, Artiodactyla; Cervidae).** 2012. 58 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2012.

REZAEI, H. R.; NADERI, S.; CHINTAUAN-MARQUIER, I. C.; TABERLET, P.; VIRK, A. T.; NAGHASH, H. R.; RIOUX, D.; KABOLI, M.; POMPANON, F. Evolution and taxonomy of the wild species of the genus *Ovis* (Mammalia, Artiodactyla, Bovidae). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 54, p. 315-326, 2010.

ROKAS, A.; WILLIAMS, B. L.; KING, N.; CARROLL, S. B. Genome-scale approaches to resolving incongruence in molecular phylogenies. **Nature**, v. 425, p. 798-802, 2003.

ROSE, K.D. The Ancestry of Whales. **Science**, v. 293, p. 2216-2217, 2001.

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

ROSSI, R. V.; BODMER, R.; DUARTE, J. M. B.; TROVATI, R. G. Amazonian brown brocket deer *Mazama nemorivaga* (Cuvier 1817). In: Duarte, J.M.B.; Gonzalez, S. (Org.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer.** Jaboticabal/Gland: Funep/IUCN, 2010, p. 202-210.

RULL, V. Speciation timing and neotropical biodiversity: the Tertiary–Quaternary debate in the light of molecular phylogenetic evidence. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 2722–2729, 2008.

RULL, V. Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 26, n. 10, p. 508-513, 2011.

RYDER, O. Species Conservation and Systematics: The Dilemma of Subspecies. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 1, n. 1, p. 508-513, 1986.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, p. 508, 923.

SCHLUTER, D. Ecology and the origin of species. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 7, p. 372-380, 2001.

SHIMAMURA, M.; ABE, H.; NIKAIDO, M.; OHSHIMA, K.; OKADA N. Genealogy of Families of SINEs in Cetaceans and Artiodactyls: The Presence of a Huge Superfamily of tRNAGlu-Derived Families of SINEs. **Molecular Biology and Evolution**, v. 16, n. 8, p. 1046-1060, 1999.

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

SMITH, M. H.; BRANAN, W. V.; MARCHINTON, L.; JOHNS, P. E.; WOOTEN, M. C. Genetic and morphologic comparisons of red brocket and white tailed deer. **Journal of Mammalogy**, v. 67, p. 103-111, 1986.

TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TEMPLETON, A. R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 779-791, 2001.

THEWISSEN, J. G. M.; WILLIAMS, E. M.; ROE, L. J.; HUSSAIN, S. T. Skeletons of terrestrial cetaceans and the relationship of whales to artiodactyls. **Nature**, v. 413, p. 277-281, 2001.

THEWISSEN, J. G. M.; COOPER, L. N.; CLEMENTZ, M. T.; BAJPAI, S.; TIWARI, B. N. Whales originated from aquatic artiodactyls in the Eocene epoch of India. **Nature**, v. 450, p. 1190-1195, 2007.

VIA, S. Sympatric speciation in animals: the ugly duckling grows up. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 7, p. 381-390, 2001.

WANG, Q.; YANG, C. The Phylogeny of the Cetartiodactyla Based on Complete Mitochondrial Genomes. **International Journal of Biology**, v. 5, n. 3, p. 30-36, 1998.

WEBB, S. D. Evolutionary history of new world deer. In: Vrba, E.S., Shaller, G.B. (Eds.), **Antelopes, Deer, and Relatives**. London: Yale University Press, 2000, p. 38–64.

WILEY, E. O.; LIEBERMAN, B. S. **Theory and Practice of Phylogenetic Systematics**. New Jersey: Wiley-Blackwell, 2011, p. 150-155.

WILLIAMS, S.T., KNOWLTON, N. Mitochondrial pseudogenes are pervasive and often insidious in the Snapping shrimp genus *Alpheus*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 8, p. 1484-1493, 2001.

WILSON, E. O. The encyclopedia of life. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 18, n.2, p. 77-80, 2003.

ZACHOS, F. E.; APOLLONIO, M.; BARMANN, E. V.; FESTA-BIANCHET, M.; GOHLICH, U.; HABEL, J. C.; HARING, E.; KRUCKENHAUSER, L; LOVARI, S.; MCDEVITT, A. D.; PERTOLDI, C.; ROSSNER, G. E.; SANCHEZ-VILLAGRA, M. R.; SCANDURA, M.; SUCHENTRUNK; F. Species inflation and taxonomic artefacts—A critical comment on recent trends in mammalian classification. **Mammalian Biology**, v. 78, p. 1-6, 2013.

ZHANG, D.; HEWITT, G. Nuclear integrations: challenges for mitochondrial DNA markers. **Tree**, v. 11, n. 6, p. 247-251, 1996.

ZHOU, X.; XU, S.; YANG, Y.; ZHOU, K.; YANG, G. Phylogenomic analyses and improved resolution of Cetartiodactyla. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 61, p. 255-264, 2011.