UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

Unidades evolutivas e conservação do Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) no Brasil

Rullian César Ribeiro

2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”

FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS

Unidades evolutivas e conservação do Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) no Brasil

Discente: Me. Rullian César Ribeiro

Orientador: 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

2023

R484u

Ribeiro, Rullian César
Unidades evolutivas e conservação do Veado-campeiro (Ozotoceros bezoarticus Linnaeus, 1758) no Brasil / Rullian César Ribeiro. -- Jaboticabal, 2023
104 p. : il., tabs., mapas

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Genética. 2. Genética animal. 3. Genética de populações. 4. Ecologia. 5. Cervidae. I. Título.

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

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: UNIDADES EVOLUTIVAS E CONSERVAÇÃO DO VEADO-CAMPEIRO (Ozotoceros bezoarticus Linnaeus, 1758) NO BRASIL

AUTOR: RULLIAN CESAR RIBEIRO
ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

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

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

gov.br Documento assinado digitalmente
JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE
Data: 25/07/2023 16:58:08-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. CYNTIA PERALTA DE ALMEIDA PRADO (Participaçao Virtual)
Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal / UNESP FCAV Jaboticabal

gov.br Documento assinado digitalmente
CYNTIA PERALTA DE ALMEIDA PRADO
Data: 26/07/2023 17:59:00-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Prof. Dr. ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI (Participaçao Virtual)
Departamento de Zootecnia / Universidade Federal de Sergipe (UFS) - Nossa S

gov.br ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI
Data: 26/07/2023 14:54:07-0300
Documento assinado digitalmente

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

gov.br SAURA RODRIGUES DA SILVA
Data: 25/07/2023 17:57:06-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Profa. Dra. SUZANA GONZALEZ (Participaçao Virtual)
Departamento Biodiversidad y Genética / Insituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Montevidéu/UR

Susana González

Jaboticabal, 06 de julho de 2023

Dados curriculares do autor

O autor possui licenciatura (2012) e bacharelado (2013) em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP), Câmpus de Jaboticabal, foi bolsista Capes/CNPq de iniciação científica junto ao departamento de fisiologia e morfologia da FCAV-UNESP atuando na área de fisiologia do stress em peixes. Atuou como representante discente junto ao conselho do curso de ciências Biológicas, e junto ao departamento de biologia, ambos pertencentes a FCAV-UNESP. Titulado como mestre em genética (2016) pelo Programa de Pós-Graduação em Genética do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas - UNESP, Câmpus de São José do Rio Preto, sendo bolsista CNPq por 24 meses. Atuou como professor de Ensino Médio, Técnico, Educador Ambiental e EJA na rede pública e privada na região de Jaboticabal. É membro do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) desde 2018. É doutor em Genética e Melhoramento Animal pelo programa de Genética e Melhoramento Animal da UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sendo bolsista CNPq por quatro meses e Bolsista FAPESP por 44 meses. Suas principais áreas de atuação são genética geral, genética de populações e genética da conservação.

“-Wahanararai wahanararai, marinawah kinadih marinawah kinadih; tabarinih hidja hidyanih, hidja-hidjanih.”

Canto Kanamari

Dedico essa tese a todos aqueles que lutam
de alguma forma em prol da ciência e do meio ambiente no Brasil.

Agradecimentos

Esse trabalho não seria possível ser realizado da maneira que foi se não fosse o financiamento e bolsa outorgada a mim pela FAPESP (**Projeto 2019/07655-9**) e pelo suporte laboratorial, científico e intelectual dados pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), sob a coordenação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, o qual me orientou e confiou a execução deste projeto que me deu a oportunidade de conhecer nosso país de uma perspectiva única, e caminhar em direção a uma carreira científica. Ressalto a obra do Professor Barbanti, traduzida no NUPECCE, que por vezes funciona como um organismo vivo por meio de todos os colaboradores que ali estão e que ali passaram, fazendo com que o trabalho iniciado a mais de trinta anos continue produzindo tantos frutos em prol da conservação dos cervídeos e da ciência no Brasil.

Muitas foram as relações construídas ao longo do desenvolvimento deste trabalho, seja em discussões científicas, execução de trabalhos paralelos, me acompanhando nas aventuras de coleta pelo Brasil ou mesmo durante um simples café. Sem estas relações não seria tão prazeroso ter trilhado o caminho que me trouxe até aqui. Deixo aqui meu agradecimento aos contemporâneos de laboratórios os quais muitos chamo de amigos: Marcio de Oliveira Leite, Pedro Henrique de Faria Peres (Parlito), Francisco Grotta Neto (Chico), Eluzai Dinai Pinto Sandoval (Elu), Gabriela Vaccari (Gabi), Agda Bernegossi, Jeferson Freitas, Isabel Lima (Bel), Valdir, Eduard e Thaylâne. Um agradecimento especial ao João, nosso técnico de laboratório que possui uma paciência e calma invejável com todos os que ali passam.

Dois outros membros fundamentais no desenvolvimento dessa tese foram nossos cães farejadores Thunder e Nicks. Sem eles, e principalmente a Nicks que me acompanhou por praticamente todas as coletas realizadas, seria impossível realizar esse trabalho. Eles não só possibilitaram a realização desse trabalho como foram fundamentais na mudança da minha percepção em relação a relação com os animais. Muito obrigado.

Ao longo das coletas de campo tive a oportunidade de poder trabalhar com amigos antigos como a Alessandra Bertassoni (Alê) e de conhecer muitas pessoas que me auxiliaram, indicaram os caminhos e deram abrigo a mim e a meus companheiros na busca das amostras. Deixo um agradecimento especial ao seu Luiz, Vilhena - RO, Maurício Scherer, Parque Estadual do Espinilho – RS, Junior, PARNA da Serra Geral do Tocantins – TO, A equipe de brigadistas dos PARNA da Serra da Canastra, PARNA dos Campos Amazônicos, PARNA do Mapinguari, PARNA das Nascentes do Rio Parnaíba – PI, ao Carlos (RPPN Yta-Y-Tiba), Fernanda G. Braga, Secretaria do Meio Ambiente do Paraná, Tatiane, PARNA da Chapada dos Veadeiros – GO, a professora Dra. Suzana Gonzalez.

Agradeço a meus pais, Rose e Marcos, pelo apoio e incentivo, mesmo sem entender direito o que eu estava fazendo atrás de fezes de veados com uma cachorra por tantos lugares, que sempre me foi dado. Através da luta e trabalho deles e de meus avós, Bida e Laura, consegui chegar até esse momento.

Mais uma vez agradeço a minha companheira de vida, amiga, cientista e agora mãe da minha filha, Amanda de Faria Santos (Dou). Sem seu apoio, paciência, compreensão, amor e dedicação não teria trilhado meu caminho da forma que fazemos. Tantos foram as situações ao longo do deste Doutorado que sua participação foi essencial que descrevê-las seria leviano. E junto a ela agradeço a meu filho Enzo, e minha filha Elis, que tanto me inspiram e me motivam diariamente a construir uma vida com essa família. O papai ama vocês.

Sumário

Resumo - Unidades evolutivas e conservação do Veado-campeiro 10
Abstract - Evolutionary units and conservation of Pampas deer 11
CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais 12
1. Introdução geral 12
2. Revisão de literatura 14
2.1. Relações filogenéticas 14
2.2. Taxonomia histórica de *Ozotoceros bezoarticus* 15
2.3. Citogenética 18
2.4. Genética populacional 18
2.5. Ecologia 21
2.6. Ciclo reprodutivo 23
2.7. Conservação 24
3. Referências bibliográficas 27
CAPÍTULO 2 - Padrões filogeográficos e definição de unidades evolutivas significativas e unidades de Manejo de Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*, LINNAEU 1758) 36
Resumo 36
1. Introdução 38
2. Material e Métodos 42
2.1. Obtenção de amostras 42
2.2. Extração, amplificação e identificação enzimática 45
2.3. Individualização das amostras 45
2.4. Sequenciamento 46
2.5. Análises 47
2.5.1. Diversidade genética e teste de neutralidade. 47
2.5.2. *Mismatch distribution* e distância genética 48
2.5.3. Comparação entre conjuntos amostrais 48
2.5.3.1. Rede haplotípica 48
2.5.3.2. Estruturação genética 48
2.5.3.3. História Evolutiva 49
3. Resultados 50
3.1. Diversidade genética e teste de neutralidade 50
3.2. Distribuição par-a-par 51
3.3. Rede de haplótipos 51

3.4. Estruturação genética 54
3.5. Análise de agrupamentos 55
3.6. História evolutiva 58
3.7. Teste de Mantel 60
4. Discussão 60
4.1. Diversidade genética 61
4.2. Padrão demográfico e teste de neutralidade 61
4.3. Padrões filogeográficos 62
4.4. Unidades evolutivas significativas e áreas prioritárias para a conservação 66
5. Conclusão 66
6. Referências bibliográficas 67
CAPÍTULO 3 - Distribuição e influência das transformações de campos naturais na conservação do Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* LINNAEU, 1758) 74
Resumo 74
1. Introdução 76
2. Material e métodos 79
2.1. Área de estudo 79
2.2. Obtenção dos pontos amostrais 80
2.3. Extração, amplificação e identificação enzimática 81
2.4. Individualização dos indivíduos 81
2.5. Modelagem de nicho ecológico 82
2.6. Distribuição geográfica histórica e atual 82
3. Resultados 84
3.1. Modelagem de nicho ecológico 84
3.2. Distribuição histórica e atual 85
4. Discussão 87
5. Conclusão 90
6. Referências bibliográficas 91
Anexo I 102

Resumo - Unidades evolutivas e conservação do Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758) no Brasil

O veado-campeiro é uma espécie que pertencente à família Cervidae e possui sua distribuição histórica em áreas abertas desde o sul amazônico até o norte da argentina. Seu período de atividade é diurno e possui busca ativa por alimento sendo um podador pastador, com preferência alimentar para brotos e flores. Até o momento existem cinco subespécies reconhecidas que foram descritas com base na sua morfologia e composição genética. Devido aos seu fácil avistamento e especificidade de *habitat* as pressões antrópicas têm causado impactos na conservação da espécie, sendo a conversão de vegetação nativa em áreas de plantio, caça, atropelamentos e entradas de doenças do gado as principais ameaças para a espécie. Esse trabalho teve como objetivo delimitar a estruturação genética das populações relictuais de veados-campeiros ao longo de sua distribuição no Brasil, utilizando pequenos fragmentos mitocondriais extraídos de DNA fecal partindo da hipótese que essas populações tenham se estruturado devido ao isolamento por distância. Foi realizada a modelagem de nicho ecológico da espécie, com o intuito de prospectar as áreas com a maior probabilidade de ocorrência da espécie baseando-se em variáveis climáticas e dados de cobertura do solo. Através das análises populacionais foi possível perceber que as populações amostradas possuem uma história filogeográfica representada por um clina genética o que refuta a hipótese de isolamento por distância e traz uma nova perspectiva sobre as conexões entre as populações da espécie. A partir da modelagem de nicho ecológico foi inferido que a área atual de distribuição da espécie sofre com o avanço da agropecuária sendo o plantio de soja o cultivo que possui o maior avanço sobre os campos naturais.

Palavras-chave: Genética de populações, nicho ecológico, veado-campeiro, filogeografia, soja.

Abstract - Evolutionary units and conservation of Pampas deer (Ozotoceros bezoarticus Linnaeus, 1758) in Brazil

The pampas deer (Cervidae) is a species that presents a historical distribution in open areas from the southern Amazonia to the northern Argentina. It is a browser and diurnal activity species, preferring sprouting grass and flowers as food. Until now, that are five recognized subspecies that was described based on their morphology and genetic composition. Due to easy sighting and habitat specificity, the anthropical pressures are causing impacts in the conservation of the species. The conversion of native vegetation into planting areas, hunting, road kills, and introducing of cattle diseases are the mainly threats for the species. This study aimed to delimit the genetic structure of the remaining populations of the pampas deer along its Brazilian distribution, using, for this, short mitochondrial genetic fragments obtained from faecal DNA. The initial hypothesis was that these populations were structured due to the process of isolation by distance. The niche modeling was performed aiming to prospect the areas with higher probability of species occurrence, based on climatic variables and soil covering data. The genetic population analyzes showed that the sampled populations present a phylogeographical history represented by a genetic cline, which refutes the isolation by distance hypothesis. This data also highlights a new perspective about connections among the populations of the species. From de niche modelling results, we also inferred that the current distribution area of the species is suffering due to advancement of agriculture, being the soybean planting the crop that has the greatest advance over natural fields.

Key words: Populations genetics, ecological niche, Pampas deer, phylogeography, soybean

CAPÍTULO 1 - Considerações Gerais

1. Introdução geral

O Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* LINNAEUS, 1758) é encontrado em fitofisionomias de formações abertas, como o Cerrado, o Pampa e o Pantanal no Brasil. Seu período de atividade é diurno, portanto, visto com certa facilidade nos ambientes em que habita (Gonzalez *et al*., 1998; 2002). Ele possui tamanho médio, variando de 1,20 a 1,50 metro de comprimento e 0,7 a 0,75 metro de altura, com peso entre 30 e 40 Kg (Gimenez-dixon, 1986).

A espécie é seletiva em relação a sua alimentação, preferindo brotos, folhas e flores mais tenras, que sejam de fácil digestão e alto valor energético, sendo considerado um animal podador-pastador que procura ativamente e continuamente seu alimento (Mcarthur; Pianka, 1966; Rodrigues, 1996; Duarte *et al*., 2012). Apesar de ser seletivo em relação ao seu alimento, o Veado-campeiro possui plasticidade para se adaptar às condições do meio onde está inserido, podendo variar sua dieta escolhendo plantas que, geralmente, não são suas preferências em condições de ampla variedade de alimento (Cosse, 2010).

Atualmente, estão descritas cinco subespécies de veado-campeiro: *O. b. arerunguaensis* e *O. b. uruguayensis*, ambas identificadas no Uruguai (Gonzalez *et al*., 1998; 2002); O. b. celler, que vive na região do Pampa argentino, pé das cordilheiras dos Andes e Sul do Rio Negro; O*. b. Leucogaster*, encontrado no sudoeste brasileiro, sudeste boliviano, norte da Argentina e Paraguai; e, por fim, *O. b. bezoarticus*, que vive desde o sul amazônico até a região do Pantanal mato-grossense. Essas três últimas subespécies foram descritas por Cabrera (1943), baseando-se em dados morfológicos.

No que tange às questões conservacionistas, alguns fatores podem ser apontados como principais causas do declínio populacional da espécie em ambientes naturais, como a caça predatória e de subsistência, e a perda de habitat (Thornback; Jenkins, 1982; Robinson; Bennett, 1999; Peres, 2000; Weber; Gonzalez, 2003).

A perda de habitat foi um dos fatores que mais contribuíram para que este cervídeo se tornasse uma espécie ameaçada, visto que, de 1900 até o momento,

esta área foi reduzida a apenas 1% de seu tamanho original (Weber; Gonzalez, 2003; Gonzalez *et al*., 2010). Junto a isto, os atropelamentos em rodovias e dentro das lavouras, a substituição de campos por plantações e pastos, e a transmissão de enfermidades por outros ungulados domésticos são fatores agravantes para a conservação da espécie (Weber;Gonzalez, 2003; Duarte *et al*., 2012; Gonzalez *et al*, 2016).

Uma vez entendidas as possíveis ameaças para a espécie, é necessário que ações sejam determinadas para que ocorra a conservação das populações que ainda restam pelo Brasil. O Plano Nacional para a Conservação de Cervídeos Ameaçados de Extinção (PNCCAE) (Duarte *et al*., 2012) possui como um de seus objetivos a manutenção da viabilidade populacional genética e demográfica dos cervídeos encontrados em território nacional.

Entretanto, essas populações se encontram em um mosaico de biomas fragmentados, sofrendo forte pressão das ações antrópicas, o que deve contribuir para o agravamento demográfico da espécie nos próximos anos.

Conhecendo o perfil genético das populações relictuais e sua potencial distribuição, é possível que sejam determinadas Unidades Evolutivas Significativas (ESUs). Estas são definidas como linhagens de determinada espécie que possuam fluxo gênico altamente restrito em relação a outras linhagens do mesmo táxon e que sejam separadas filogeneticamente, apresentando monofilia para haplótipos mitocondriais ou diferença significativa na frequência de alelos nucleares de determinado locus (Moritz, 1994; Fraser; Bernatchez, 2001).

Este trabalho possui como objetivo caracterizar as populações de Veado-campeiros relictuais de acordo com seu padrão genético; testar a hipótese de isolamento por distância sob a estruturação das populações da espécie; determinar unidades evolutivas significativas (ESUs) para a espécie; modelar a distribuição potencial da espécie; compreender os impactos dos avanços agropecuários sobre as populações relictuais da espécie nos últimos 30 anos.

2. Revisão de literatura

2.1. Relações filogenéticas

O Veado-campeiro pertence a família Cervidae, subfamília Capreolinae, Tribo Odocoileini, subtribo Blastocerina, gênero *Ozotoceros* (Heckberg *et al*., 2016). Sua posição filogenética é bem estabelecida dentro do grupo tanto para dados morfológicos quanto para dados moleculares (Broke, 1879; Cabrera, 1943; Duarte *et al*.; 2008; Gonzalez *et al*., 1998; 2002; Hassanin *et al*., 2012; Heckeberg *et al*., 2016; Gutierrez *et al*., 2017).

O gênero *Ozotoceros* apresenta uma pequena diferença morfológica entre o macho e a fêmea em relação a largura do crânio e a fileira superior dos dentes quando as espécies são analisadas isoladamente de outros cervídeos (Gonzalez 1997; 2002), no entanto não há suporte estatístico para essas diferenças (Merino *et al.*, 2005). As medidas craniométricas apresentaram uma grande similaridade com o gênero *Blastocerus*, no entanto, a posição das orbitas direcionadas mais anteriormente e um osso frontal menor entre os olhos no Veado-campeiro, separam os dois gêneros (Merino *et al*., 2005).

Para os dados craniométricos, os dois gêneros, *Blastocerus* e *Ozotoceros* apresentam alta similaridade formando um grupo que se mostra relacionado com *Hippocamelus (*Merino *et al*., 2005*)*. Outros dados morfológicos também recuperam *Ozotoceros* e *Blastocerus* como grupo irmão de *Hippocamelus* (Merino;Rossi, 2010).

Apesar dos dados moleculares apresentarem suporte para a monofilia de *Ozotoceros bezoarticus* e seu pertencimento a tribo Odocoileini, suas relações filogenéticas com as espécies dentro da tribo apresentam divergências. Duarte (2008) recuperou *Ozotoceros bezoarticus* ao lado de *Hippocamelus antisensis*, utilizando um fragmento de 934 pares de bases (pb) do gene CytB, sendo corroborado por Heckenberg (2016), com a mesma hipótese filogenética a partir da utilização também de um fragmento de CytB de 747 pb. Já para, Gutierrez (2017), também utilizando sequências de CytB obteve um posicionamento diferente dos trabalhos anteriormente mencionados. O gênero *Ozotoceros* é recuperado como grupo irmão de um clado formado por *Blastocerus dichotomus* e um clado formado por *Hippocamelus antisensis*, *Hippocamelus bisulcus,*

Mazama chunyi e *Mazama gouazoubira.* Com a utilização do mitogenoma de 183 espécies de Artiodactyla e Ceatácea, Hassanin (2012) recuperou *Ozotoceros bezoarticus* como grupo irmão de *Mazama gouazoubira* e *Hippocamelus antisensis*. Por uma questão nomenclatural é importante ressaltar que Bernegossi *et al*. (2022) propôs a reutilização de *Subulo gouazoubira* no lugar de *Mazama gouazoubira.*

Com a utilização de DNA satélites (sat DNA) (Vozdova *et al*., 2021), a relação filogenética construída a partir das sequencias de sat II DNA para as espécies neotropicais refletem a reconstrução contada pelos fragmentos de CytB nos trabalhos já mencionados. O Veado-campeiro se apresenta como grupo irmão de *Blastocerus dichotomus* e ambos se relacionam com *Odocoileaus virginianus*. É importante ressaltar que não foram utilizadas amostras de *Hipocamelus* spp., assim como em outras filogenias baseadas em mtDNA, portanto a topologia final da árvore de DNA satélite para a espécie possui um ruido amostral para a comparação com os outros trabalhos. As sequencias sat I e sat III não recuperam *O. bezoarticus* como um grupo monofilético e a sequência sat IV, apesar de recuperar a monofilia da espécie não reflete as relações filogenéticas obtidas para marcadores mitocondriais.

Como visto, tanto os trabalhos baseados em morfologia e as recentes propostas filogenéticas baseadas em dados moleculares, até o momento, confirmam a monofilia de *Ozotoceros bezoarticus* como unidade taxonômica reconhecida dentro do grupo dos cervídeos.

2.2. Taxonomia histórica de *Ozotoceros bezoarticus*

O gênero *Ozotoceros* Ameghino 1891, possui apenas a espécie *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus, 1758), com sua localidade tipo descrita como sendo em Pernambuco. A descrição da espécie feita por Linnaeus, foi retirada de Marcgrave (1648) o qual deve-se atribuir a primeira menção a espécie chamando-a pelo nome de “Cuguaçu-apara”, segundo Cabrera (1943), ou Cuguaçu-ete segundo Tomas, (1911).

Tempos depois, o próprio Marcgrave reconheceu que sua identificação se tratava de um espécime de gvasú-pihtá como era chamado pelos Guaranis (*Mazama americana* Erxlebem). Essa menção foi atribuída a uma fêmea, jovem,

de um cervídeo de ocorrência no norte da Amazônia, o que trouxe uma discussão aos pesquisadores posteriores pois o Cuguaçu-apara poderia se tratar de um Veado-mateiro (*Mazama americana* Erxlebem), Cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*) ou alguma espécie pertencente ao gênero *Odocoileaus* (Cabrera, 1943). No entanto, Cabrera (1943) chama a atenção para a impossibilidade do Veado-campeiro ser confundido com espécimes pertencentes aos gêneros *Blastocerus* ou *Odocoileaus.*

Após a avaliação de estudos prévios que levaram em consideração as medidas morfológicas, a descrição de medidas cranianas e a coloração da espécie, Cabrera (1943) reconhece três subespécies de Veado-campeiro, *O. b. bezoarticus* (Linnaeus, 1758), *O. b. leucogaster* (Goldfiiss, 1817, *apud* Cabrera 1943) e *O. b. celer* (Cabrera, 1943), cujo a localidade tipo é Campos del Tuyu, General Lavalle, Buenos Aires Province, Argentina. Já se era conhecida a existência da espécie na República Oriental do Uruguai, porém não possuíam dados para classificá-las junto as demais subespécies (Cabrera, 1943; Jackson, 1987).

Gonzalez (1998), utilizando o marcador mitocondrial Dloop (453 pb), realizou o primeiro estudo molecular para a espécie, com o intuito de entender as diferenças genéticas existentes entre as populações isoladas de ocorrência no Brasil, Parque Nacional de EMAS e Pantanal; Argentina, Bahía de Samborombón e San Luís; Uruguai, El Tapado e Los Ajos. Esse estudo corroborou os dados morfológicos encontrados (Gonzalez, 1992) através de comparações craniométricas que sugeriam que as populações do Uruguai deveriam ser tratadas como duas subespécies distintas das demais.

Duas novas subespécies de Veado-campeiro foram descritas por Gonzalez (2002) por meio de um estudo morfológico comparativo entre populações representativas das unidades genéticas pertencentes ao Brasil (pantanal), Argentina (Bahia de Samborobón, San Tiago del Esteros e Missiones) e Uruguai (El tapado e Los Ajos). Os dados morfométricos apresentaram uma diferenciação entre os espécimes do Uruguai e os demais. Ainda, dentro das amostras uruguaias foram encontradas diferenças que corroboraram os dados genéticos para a determinação de duas subespécies distintas.

As novas subespécies descritas por Gonzalez (2002) foram: *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*, com sua localidade tipo em Uruguai, Rocha Department, Sierra de Los Ajos, 33º50'01"S; 54001'34"W; *Ozotoceros bezoarticus arerunguaensis,* com sua localidade tipo descrita no Uruguai; Salto Department, Arerunguai, El Tapado, 31'41'51"S, 56043'3 1"W.

Após o histórico de classificações da espécie, Tabela 1, e as descrições morfológicas e genéticas (Cabrera, 1943; Gonzalez *et al.*, 1998;2002) são reconhecidas até o momento cinco subespécies de Veado-campeiro: *O. b. arerunguaensis* e *O. b. uruguayensis*, ambas identificadas no Uruguai; *O. b. celler*, que vive na região do Pampa argentino, pé das Cordilheiras dos Andes e sul do Rio Negro; *O. b. leucogaster*, encontrado no sudoeste brasileiro, sudeste boliviano, norte da Argentina e Paraguai; e, por fim, *O. b. bezoarticus*, que vive desde de o sul amazônico até a região do Pantanal mato-grossense.

Tabela 1. Nomenclatura histórica da espécie *Ozotoceros bezoarticus,* Linnaeu 1758.

Nome	Referência	Localidade tipo
Cervus bezoarticus	Linn. Syst. Nat. Ed. 12, vol.i. (1766)	Pernambuco
Cervus cuguapara	Ker, 1792, The animal kingdom, or zoological system, of the celebrated Sir Charles Linnaeus	---
Cervus campestris	F. Cuvier, Dict. Sci. Nat. Vol. Vii. P. 484(1817); Burmeister, descript. Phys. Répud. Argent. Vol. Iii. P. 463 (1879) Goeldi, mamíferos do Brasil, p. 107 (1893)	--- --- ---
Cervus leucogaster	Goldfuss, D. A. in Schreber, Säugethiere, vol. V. p. 1127 (1817)	Paraguai
Cervus (Mazama) campestris	H. Smith, in Griffith's Animal Kinodm, vol. iv p. 317 (1827)	---
Cervus azarae	Wigmann, Isis, 1833, p.954	Paraguai
Mazama campestris	Jardine, Naturalist's library- Mamm.vol.iii.p. 174 (1835) Gray, List Mamm. Brit. Mus. P. 176 (1843)	--- ---
Darcelaphus campestris	Gloger, Handbuch Naurgeschichte , p.140 (1841)	---
Cariacus campestris	Lesson, Nouv. Table Hist, Nat. P. 173 (1842) Brooke, Proc. Zool. Soc.p.923 (1878) Aplin, ibid. p. 313 (1894) Ward, Records of Big Game, p. 59 (1869)	--- --- --- ---
Cervus (Elaphus Blastocerus) campestris	Wagner, Schreber's Saugethiere, vol. iv. P. 369 (1844)	---
Cervus (Elaphus Blastocerus) comosus	Wagner, op. Cit. p. 368 (1844)	Pernambuco
Furcifer campestris	Gray, Knovozley Menagerie, p. 68 (1850)	---
Blastocerus campestris		---

	Gray, Proc. Zool. Soc. p. 237, Cat. Ungulata (1850) Brit. Mus. p. 224 (1852) Brit. Mus. p.87 (1872) Hand-list Ruminants Brit. Mus. P. 158 (1873)	--- --- ---
Cervus pampaeus	Bravard, A. Fauna pliocena de la America del Sur. P. 15, in Geologia de los Pampas. Registro Estadistico del Estado de Buenos Aires, 1:1-44. (1857)	Paraná
Blastoceros campestris	Fitzinger, SB. Ak. Wien, vol. lxviii. Part i. p. 359 (1873) lxxviii. part i. p. 364 (1879)	--- ---
Blastoceros comosus	Fitzinger, op. cit. P.359 (1873)	---
Blastocerus sylvestris	lxxviii. p.356 (1879) Gray, J. E. On the wood-deer of Brazil (*Blastocerus silvestris*). Ann. Mag. Nat. Hist., 4:426-427. (1873)	--- ---
Blastoceros azarae	Fitzinger, op. cit. Lxxviii,p.359 (1879)	---
Cervus comosus	Burmeister, descript. Phys. Répud. Argent. Vol. iii. p. 465 (1879)	---
Ozotoceros campestris	Ameghino, Ver. Arg. Hist. Nat. Vol. i. p. 243 (1891)	---
Ozotoceros (Blastoceros) campestris	Ihering, Mammiferos de S. Paulo, p.15 (1894)	---

2.3. Citogenética

O cariótipo do Veado-campeiro possui 2n = 68 e FN = 74 (Nietzel, 1979; Duarte;Giannoni, 1995) com dois cromossomos autossômicos e o cromossomo X metacêntrico, e o restante acrocêntrico. O cromossomo X é o maior do cariótipo e possui uma grande quantidade de heterocromatina e uma grande região telomérica, enquanto o cromossomo Y é pequeno e acrocêntrico (Duarte; Giannoni,1995).

Vozdova (2022) por meio da realização da técnica de pintura cromossômica (FISH) identificou uma alta quantidade de DNA satélite (sat DNA) pertencente tipo I e II refletindo um alto grau de hibridização entre as espécies neotropicais de cervídeos. Para o Veado-campeiro foram encontradas diferenças significativas, no bloco sat IV DNA, em relação as espécies *B. dichotomus* e *O. virginianus*.

2.4. Genética populacional

Dentre os trabalhos realizados para as populações de Veado-campeiro, podemos distinguir aqueles que utilizaram marcadores mitocondriais e aquele que utilizaram marcadores nucleares. Gonzalez *et al*. (1998) identificou 45

haplótipos diferentes para o fragmento mitocondrial D-Loop (453 pares de bases, pb) em seis localidades, distribuídas entre o Brasil, Uruguai e Argentina como já discutido na seção relacionada a taxonomia da espécie. As análises mostraram um alto grau de polimorfismo para essa região, como esperado (Arctander *et al*., 1996), o que possibilitou a confirmação de estudos prévios (Cabrera 1943; Jackson, 1987) indicando a estruturação da espécie e a conseguinte descrição de duas novas subespécies, *O. b. arerunguaensis* e *O. b. uruguayensis* (Gonzalez *et al.*, 2002).

Nas populações argentinas, Bahía de Samborabón e San Luís, foi encontrado um alto índice de sítios migrantes entre as duas populações (Gonzalez *et al.*, 1998). É sugerido que isto tenha ocorrido devido a translocações de indivíduos, porém esta hipótese não é documentada, ou ainda, teriam existido corredores ecológicos ligando essas populações, mas estes não são mais vistos atualmente. No Brasil foi encontrada um alta diferenciação genética entre as populações residentes no Parque Nacional de EMAS e no pantanal da Nhecolândia. Essas diferenças genéticas são corroboradas por diferenças fisiológicas relacionadas ao período de ocorrência ciclo reprodutivo e da troca dos chifres (Gonzalez *et al.*, 1998).

Braga e colaboradores (2005), analisaram uma população de Veados da região de Piraí do Sul-PR, utilizando os fragmentos D-Loop (601 pb) e CytB (486 pb). Dentre 11 sequências nucleotídicas, foram encontrados quatro haplótipos diferentes em relação aos descritos por Gonzalez (1998) para o fragmento D-Loop. Além disso, os autores também encontraram dois haplótipos, dentre 8 sequências, para o fragmento mitocondrial CytB. Com este resultado é sugerido pelos autores, que para fins de manejo de conservação, essa população deve ser tratada diferentemente em relação as populações já estudas até aquele momento.

No trabalho de Rodrigues *et al*. (2007) foi utilizada a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic* DNA) como uma outra ferramenta molecular para investigar a divergência populacional e a variação genética das populações existentes no Parque Nacional de EMAS e no Pantanal. O autor encontrou fenótipos únicos para cada um dos indivíduos que compõe as populações, inferindo uma variabilidade genética moderada/alta, que corrobora os resultados encontrados por Gonzalez *et al* (1998). É sugerido que essa diversidade genética

esteja relacionada com a com um grande número populacional histórico que sofreu um recente declínio populacional. No entanto, devido ao tipo de marcador utilizado por Rodrigues e colaboradores alguns de seus resultados diferem dos encontrados por Gonzalez (1998), como por exemplo a árvore filogenética gerada através da análise de *neighbor-joining*. O resultado desta análise não separou as populações estudadas em clados distintos, como ocorreu no estudo de Gonzalez (1998). Os autores discutem este resultado assumindo que o tipo de marcador utilizado por eles não é o mais adequado para utilização em filogenias, no entanto esse pode ser um indício que a história genética da espécie necessita da utilização de novos marcadores e uma ampla abordagem para o melhor entendimento das relações filogenéticas dentro da espécie.

Em relação a estudos populacionais que envolvam o trabalho com marcadores nucleares, temos alguns trabalhos realizados com microssatélites heterólogos de ungulados (Cosse *et al*., 2007; Mantelato *et al*., 2017; Raimondi *et al*., 2012). Cosse e colaboradores (2007), após testarem 15 marcadores deste tipo, obtiveram dados informativos para cinco deles, que geraram análises de estruturação da população, relações intra e interpopulacionais, estratégias de acasalamento e relações evolutivas.

Duas populações de Veados-campeiro da região central do Pantanal foram caracterizadas com a utilização de um conjunto de microssatélites heterólogos bovinos, através de uma abordagem não invasiva utilizando a coleta de fezes frescas (Mantelato *et al*., 2017). Os dados gerados pelo trabalho mostraram uma alta diversidade genética, mesmo sendo menor que a encontrada por Cosse e colaboradores (2007).

Em uma tentativa de suprir o problema da não especificidade dos marcadores heterólogos, Raimondi e colaboradores (2012) desenvolveram 15 microssatélites específicos para a espécie, sendo três *loci* monomórficos e 12 polimórficos. Para gerar os parâmetros de variabilidade genética os autores utilizaram quatro populações argentinas. Foram encontrados erros pontuais em todos os *loci* devido ao *stutering* e a presença de alelos nulos, os quais três destes, apresentaram desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este trabalho trouxe uma base para estudos a *posteriori,* utilizando microssatélites específicos para a espécie, o que não foi feito até o momento.

Para avanço no entendimento das relações intrapopulacionais da espécie se faz necessário uma grande amostragem ao longo da distribuição atual das populações relictuais do Veado-campeiro. Uma das alternativas para a obtenção de uma ampla amostragem é a utilização de técnicas não invasivas, como é o caso da utilização de cães farejadores para encontrar amostras fecais (Oliveira *et al.,* 2012; Duarte *et al.,* 2017). No entanto, amplificar fragmentos de genes em amostras fecais é problemático devido ao DNA estar fragmentado. Como uma alternativa para estudos populacionais em Veado-campeiro, Leandro *et al*. (2022) propuseram a confecção primers para amplificação de pequenos fragmentos de genes mitocondriais CytB (306 pb), ND5 (224 pb); e o teste em relação ao sinal filogenético e a saturação nucleotídica, deste e de outros pequenos fragmentos já descritos na literatura (CytB, 224 pb; D-loop, 159 pb; COI, 159 pb) (Gonzalez *et al*., 2009; 2012; 2018). Os resultados mostraram especificidade e qualidade para a amplificação de amostras forenses, o que abre a possibilidades para seu uso em novos estudos populacionais e filogenéticos, no entanto, a árvore filogenética revelou clados polifiléticos entre as populações do Pantanal e do PARNA de Emas, não recuperando a monofilia recíproca para estas populações. Os autores (Leandro *et al*., 2022) destacam a importância de utilizar o fragmento Dloop (159 pb), mas alertam sobre sua saturação nucleotídica, que pode afetar os resultados das análises.

2.5. Ecologia

Historicamente, o Veado-campeiro é considerado como uma espécie de fácil visualização, sendo encontrado em grandes bandos em áreas abertas (Cabrera 1943, Gonzalez *et al*., 2010). Darwin (1860) relatou que a espécie podia ser encontrada em enormes rebanhos na região do norte da Patagônia e no entorno do Rio da Prata. Sua distribuição ocorre entre a latitude de 4º e 41ºS, em fitofisionomias de formação aberta no Brasil, como o Cerrado, o Pampa o Pantanal, e nos enclaves de Cerrado na Amazônia, bem como em áreas abertas em outros países, como Uruguai, Argentina, Paraguai e Bolívia (Gonzalez *et al*., 2002; 2010). No entanto, atualmente, as populações relictuais são encontradas isoladas em grupos pequenos de animais ao longo de sua distribuição (Ungerfeld, *et al*. 2008; Semeñiuk *et al*., 2015; Rocha *et al*., 2019).

A área de vida do Veado-campeiro possui variações, essa discrepância está relacionada ao tipo de metodologia utilizada, ao bioma estudado, ao fotoperíodo e às diferenças sexuais (Zucco, 2015). Para o macho e a fêmea a variação pode ser, respectivamente, de 9,9 Km² a 80 Km² e 5.9 Km² a 64 Km², no Cerrado (Leeuwenberg *et al*. 1997; Rodrigues; Monteiro-Filho 2000), 0,32 a 5,6 e 0,35 a 5,4, no Pampa (Vila *et al*., 2008; Cosse, 2010; González, 2004) e 0,8 a 4,3 e 0,96 a 5,5 no Pantanal (Lacerda, 2008; Versiani, 2011; Zucco, 2015).

A espécie é diurna, e possui um padrão de movimentação relacionado ao comportamento de forrageamento atrelado a lugares com o mínimo de cobertura arbórea. No Pantanal, eventualmente, indivíduos do grupo utilizam as trilhas feitas pelo gado para passarem de uma área aberta para a outra, mas nunca se fixam nas áreas com cobertura arbórea (Zucco, 2015).

No Brasil a vinda do gado remonta do século IXX, com ampla ocupação do Pantanal e Pampa. Nessas áreas, existe um sistema de criação extensivo em que o gado é criado de forma semi-cativa. Isso permite à cobertura de gramíneas, não havendo a necessidade de remoção da vegetação natural para o plantio de capim (Abreu *et al*., 2010; Viana *et al*., 2021). No Uruguai e Argentina (Jackson; Langguth, 1987), Pantanal, Pampa, e em grandes áreas de Cerrado, como no PARNA da Serra Geral do Tocantis (comunicação pessoal), é comum encontrar populações de Veado-campeiro convivendo com as criações de gado.

A proximidade com criações de gado pode levar ao compartilhamento de doenças interespecíficas, como por exemplo a doença da língua azul. Presente em criações de gado, esta já foi identificada nas espécies de cervídeos neotropicais como *Blastocheros dichotomus* e espécies do gênero *Mazama* (Araújo-Júnior *et al*., 2010; Ruder *et al*., 2015; Kawanami *et al*, 2018). Considerando a alta capacidade de infecções cruzadas que os vírus apresentam, essa pode ser considerada uma ameaça potencial para o adoecimento de populações de Veado-campeiro. Na Reserva de Campos de Tuyú, Argentina, ainda foram encontrados resultados positivos para leptospirosi e parainfluenza (Uhart *et al*., 2003).

Em relação a alimentação, o Veado-campeiro é considerado seletivo, um animal podador-pastador que procura ativamente e continuamente seu alimento, preferindo brotos, folhas e flores mais tenras, de fácil digestão e alto valor energético (Mcarthur; pianka, 1966; Duarte *et al*., 2012). A dieta da espécie

possui maior consumo de plantas C3 podendo haver algumas populações que consumam plantas C4. Esse padrão deriva do holoceno e persiste até as populações atuais, o que explica a predileção da espécie por brotos de fácil digestão preferencialmente de plantas C3 (Scheifler, *et al.* 2023). Com isso, mesmo sendo seletivo em relação à sua alimentação, o Veado-campeiro possui flexibilidade para se adaptar às condições do ambiente. Podendo variar sua dieta em decorrência da disponibilidade de alimento, escolhendo plantas que normalmente não consumiria (Cosse, 2001).

2.6. Ciclo reprodutivo

O ciclo estral da fêmea dura aproximadamente 21 dias, com um período gestacional de sete meses, e o período de nascimento pode variar de acordo com a região e com a disponibilidade de alimentos (Gonzalez *et al*., 2010). Durante o período de gravidez a fêmea tende a manter suas atividades normais junto ao grupo, no entanto, próximo ao nascimento ela se afasta e se mantém isolada até parir (Ungerfeld *et al.*, 2008).

Há uma tendência dos nascimentos se concentrarem entre setembro e novembro no Pampa argentino, junho a julho no Pampa uruguaio, agosto e novembro no Cerrado, agosto a outubro no Pantanal e setembro a novembro na região sul do país. Em algumas localidades são relatados nascimentos fora dos períodos citados (Gonzalez *et al*., 2010). A proporção entre macho e fêmea pode variar de 1:1 até a 1:2 no Uruguai, sugerindo uma taxa de mortalidade diferente (Ungefeld *et al*., 2008).

O chifre é utilizado para a demarcação de território e disputa com outros machos, e seu desenvolvimento está relacionado ao período reprodutivo (Ungefeld *et al*., 2008). O aumento da testosterona induz o crescimento do chifre, culminando o pico hormonal com a perda do velame (Pereira *et al*., 2005). Apesar das quantidades altas de testosterona estarem conduzindo o período reprodutivo, os padrões de qualidade do sêmen se encontram estáveis mesmo quando não há chifre. Sendo assim, a presença do chifre e a testosterona atuam no comportamento reprodutivo e não, necessariamente, na qualidade do sêmen (Ungefeld *et al*., 2008). A produção desse hormônio em veados de climas temperados está relacionada ao fotoperíodo, no entanto, não é o que encontramos para os cervídeo neotropicais, com exceção do Veado-campeiro,

que mesmo em lugares com pouca variação de fotoperíodo, como o PARNA Emas que possui variação anual de menos de duas horas, apresenta periodicidade na troca dos chifres que ocorre anualmente (Gonzalez *et al*., 2010; Duarte *et al* 2012).

2.7. Conservação

No presente momento, o Veado-campeiro é classificado pela IUCN (International Union for Conservation of Nature) (Gonzalez *et al*., 2016) como quase ameaçado (NT). Na lista vermelha das espécies brasileiras ameaçadas de extinção (Brasil, 2018), a classificação ocorre separadamente para as duas subespécies. *Ozotoceros b. bezoarticus*, descrita como sendo distribuída no Cerrado, é classificada como vulnerável (VU, critério A4cde; C1). Sua justificativa está relacionada à perda e degradação de habitats no Cerrado, uma vez que a espécie é sensível à qualidade do ambiente. Foi estimado uma redução no número populacional da subespécie em mais de 30%, além da mesma apresentar susceptibilidade a intoxicações, doenças e a caça (Weber:Gonzalez, 2003; Gonzalez *et al*., 2016). No entanto, se faz necessária estimativas populacionais das demais populações do Cerrado, uma vez que a única estimativa feita é para a população do PARNA de Emas. Essa população foi estimada em 1000 indivíduos maduros, o que a coloca dentro do critério C de ameaça (Gonzalez *et al.*, 2016).

No Pantanal, a subespécie *O. b. leucogaster* também é classificado como vulnerável (VU, critério A3ce) (Brasil., 2018). É estimado um declínio populacional futuro para a subespécie em mais de 30% nos próximos 15 anos. Isso se deve a substituição das gramíneas nativas por exóticas, diminuindo a disponibilidade de alimento para a espécie, e a introdução de orbiviroses que chegam a matar mais de 90% de animais em populações cativas (Brasil, 2018). Em outros estados a espécie é avaliada como *Ozotoceros bezoarticus*, sem distinção de subespécies. No Rio Grande do Sul (Rio Grande do Sul, 2014) e Paraná (Paraná, 2010), ela é classificada como criticamente ameaçada (CR) e em Santa Catariana (Santa Catarina, 2011) ela é considerada vulnerável. Neste último Estado mencionado, Mazolli e Benedet (2009) relatam uma diminuição nos avistamentos de veados na população da região conhecida como Coxilha Rica, a maior do Estado. Em Minas Gerais (Minas gerais, 2010) e São Paulo

(São Paulo, 2014), a espécie é considerada como ameaçada. Para o estado de São Paulo, a última população relatada da espécie deveria residir na Estação Ecológica de Santa Bárbara (Percequillo; Kierulff, 2009). No entanto, Peres (2010), ao estabelecer uma metodologia para encontrar algum sinal desta população, não obteve êxito, sugerindo que esta esteja extinta. Com isso, São Paulo não mais possui populações conhecidas de Veado-campeiro, sendo a espécie considerada extinta localmente.

Algumas das causas do declínio populacional da espécie em ambientes naturais são a caça predatória e de subsistência, e a perda de habitat (Weber; Gonzalez, 2003). Estima-se que mais de 2 milhões de couros de veados neotropicais tenham sido exportados para a Europa entre 1860 e 1870 (Thornback; Jenkins, 1982). Além disso, a carne de veado tem sido uma das principais fontes de proteína para algumas comunidades rurais (Robinson; Bennett, 1999; Peres, 2000), o que, junto à prática da caça esportiva e às questões culturais associadas a cada região, também geram impactos negativos às populações de veados (Weber; Gonzalez, 2003). Esses fatos ajudam a explicar o porquê a caça ainda atua como um fator tão significativo para a redução do número de indivíduos nas populações.

A perda de habitat foi um dos fatores que mais contribuíram para que este cervídeo se tornasse uma espécie ameaçada, visto que, de 1900 até o momento, sua área de distribuição foi reduzida a apenas 1% de seu tamanho original (Weber; Gonzalez, 2003; Gonzalez *et al*., 2010). Ademais, os atropelamentos em rodovias e dentro das lavouras, a prática de reflorestamento com a utilização de espécies exóticas – como ocorreu no sul do Brasil, onde houve a substituição de campos por plantações de *Pinnus spp*. – e a transmissão de enfermidades por outros ungulados domésticos são fatores agravantes para a conservação da espécie (Weber;Gonzalez, 2003; Duarte *et al*., 2012; Gonzalez *et al*., 2016).
Uma vez entendidas as possíveis ameaças para a espécie, é necessário que ações sejam tomadas para que ocorra a conservação das populações que ainda restam pelo Brasil. O Plano Nacional para a Conservação de Cervídeos Ameaçados de Extinção (PNCCAE) (Duarte *et al*., 2012) possui como um de seus objetivos a manutenção da viabilidade populacional genética e demográfica dos cervídeos encontrados em território nacional. Esse documento propôs, dentre seus objetivos específicos, aumentar o conhecimento científico do grupo

para que estes sirvam de subsídio para elaboração de ações para a conservação em um período de cinco anos, contados a partir de sua publicação.

Para a espécie *O. bezoarticus*, as ações previstas no plano de manejo do PNCCAE são: (i) Elaborar e executar projeto para investigar a ocorrência de novas populações da subespécie *Ozotoceros bezoarticus bezoarticus* ao longo de sua área de distribuição original, especialmente na Estação Ecológica de Santa Bárbara, SP; Serra do Ibitipoca, MG; Água Doce, SC; Vilhena, RO; e Banhado do Taim, RS; (ii) Elaborar e executar projetos para se conhecer a atual situação da estrutura genética das populações naturais de *Ozotoceros bezoarticus*; e (iii) Confirmar e estudar a população disjunta de *Ozotoceros bezoarticus* da Ilha de Marajó (Duarte *et al*., 2012).

3. Referências bibliográficas

Abreu UGP, McManus C, Santos SA (2010). Cattle ranching, conservation and transhumance in the Brazilian Pantanal. **Pastoralism,** 1(1), 99-114.

Araújo JPJr., Nogueira MF, Duarte JMB (2003) Survey for Foot-and-mouth Disease in the Endangered Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Marshlands of the Parana´ River Basin, **Brazil.Journal of Wildlife Diseases**, 46 (3): 939–943. 2003.

Arctander P, Pieter WK, Rashid AA, Siegismund HR (1996) Extreme genetic differences among populations of *Gazella granti*, Grant's gazelle, in Kenya. **Heredity**, 76:465–475.

Bernegossi AM, Borges, CHDS, Sandoval EDP, Cartes, JL, Cernohorska H, Kubickova S, ... Duarte, JMB. (2022). Resurrection of the genus Subulo Smith, 1827 for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy**.

Braga FG, González S, Maldonado JE (2005) Characterization of the genetic variability of Pampas deer in the state of Paraná. **Deer specialist group News**, n. 20.

Brasil (2018) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção:Volume II–Mamíferos /-1.ed.-Brasília,DF:ICMBio/MMA,2018.

BrokeV (1879) The classification of the (Cervidae) with a synopsis of the existing

Cabrera A (1943) Sobre la sistemática del venado y su variación individual y geográfica. **Revista del Museo de la Plata (NS)**, 18:5-41.

Cosse M (2010) Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*. Pautas para su conservación. Universidade de La República.

Cosse, M.; González, S.; Maldonado, J. E. (2007) Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Genetics and Molecular Research**. 6(4):1118-1122.
do Paraná No 8.233, p83.

Duarte JMB, Giannoni ML, (1995). Cytogenetic analysis of the pampas deer, *Ozotoceros bezoarticus* (mammalia, Cervidae). **Revista Brasileira de Genética**, 485-488.

Duarte JMB, Vogliotti A, Zanetti ES, Oliveira ML, Tiepolo LM, Rodrigues LF, Almeida LB, Braga FG (2012). Avaliação do Risco de Extinção do Veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Bras**. 2:20–32

Duarte, J. M. B.; Talarico, Â.; Vogliotti, A.; Garcia, J.; Oliveira, M.; Maldonado, J.; González, S. (2017) Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer Mazama bororo. **Oryx**, 51(4): 656-664.

Duarte, JMB, Gonzalez S, Maldonado J (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49:17-22.

Estado de Minas Gerais. 2010. Deliberação Normativa Copam No 147, de 30 de abril de 2010: Aprova a Lista de Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna do Estado de Minas Gerais. **Diário do Executivo do Estado de Minas Gerais**, Belo Horizonte.

Estado de Santa Catarina. 2011. Resolução Consema No 002, de 06 de Dezembro de 2011: **Lista Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção do Estado de Santa Catarina**. Secretaria de Estado do Desenvolvimento Econômico Sustentável – SDS DOE-SC. 02–08.

Estado de São Paulo. 2014. **Decreto No 60.133 de 7 de fevereiro de 2014**. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção, as quase ameaçadas e as deficientes de dados para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. http://www.al.sp.gov.br/repositorio/ legislacao/decreto/2014/decreto-60133-07.02.2014.html.

Estado do Paraná. 2010. Decreto No 7.264 de 01 de junho de 2010: Reconhece e atualiza Lista de Espécies de Mamíferos pertencentes à Fauna Silvestre Ameaçadas de Extinção no Estado do Paraná e dá outras providências, atendendo o Decreto Nº 3.148, de 2004. **Diário Oficial do Estado**

Estado do Rio Grande do Sul. 2014. **Decreto no 51.797, de 8 de setembro de 2014:** Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas de extinção no Estado do Rio Grande do Sul. Diário Oficial do Estado do Rio Grande do Sul. Seção 173: 2.

Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (2012) Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus. Biologies**, 335:32–50.

Gonzalez S (1997). Estudio de la variabilidad morfolgica, genetica y molecular de poblaciones relictuales de venado de campo (*Ozotoceros bezoarticus* L. 1758) y sus consecuencias para la conservaci6n.Ph.D. dissertation, Universidad de la Reptiblica Oriental del Uruguay.

Gonzalez S (2004) **Biología y conservación de Cérvidos Neotropicales del Uruguay**. P. 57.

Gonzalez S, Álvarez-valin F, Maldonado JE (2002) Morphometric differentiation of endangered pampas deer (Ozotoceros bezoarticus), with description of new subspecies from Uruguay. **Journal of mammalogy**, 83(4):1127-1140.

Gonzalez S, Gravier A, Brum-Zorrilla, N (1992) A systematic sub specifical approach on *Ozotoceros bezoarticus* L. 1758 (pampas deer) from South America. Pp. 129-132 in **Ongules/Ungulates, proceedings of the international symposium** (E Spitz, G. Janeau, G. Gonzalez, and S. Aulagnier, eds.). Toulouse, France 91:129-132.

González S, Jackson III JJ, Merino ML (2016) *Ozotoceros bezoarticus*. **The IUCN Red List of Threatened Species 2016**: e.T15803A22160030. https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T15803A22160030.en. Accessed on 19 June 2023.

González S, Maldonado JE, Leonard, JA, Vilà C, Duarte JMB, Merino M, Brum-Zorrilla N, Wayne, RK (1998) Conservation genetics of the endangered Pampas deer (Ozotoceros bezoarticus). **Molecular Ecology**, 7:47–56.

González S, Maldonado JE, Ortega J, Talarico AC, Bidegaraybatista L, Garcia JE, Duarte JMB (2009) Identification of the emdangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, 9: 754-758.

González, S, Cosse M, Braga FG, Vila AR, Merino ML, Dellafiore C, Cartes L, Maffei L, Dixon MG (2010) Pampas Deer *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus 1758). Pp. 119–132 in Duarte JMB, González S (eds.). **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. FUNEP, Jaboticabal.

Gutiérrez EE, Helgen KM, Mcdonough MM, Bauer F, Hawkins MTR, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, MaldonadO JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: The importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** 697:87–131.

Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Van Vuuren BJ, Matthee C, Ruiz-Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rössner GE (2016) Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ** 4:e2307.

Jackson JE, Giulietti JD (1988) The food habits of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus celer* in relation to its conservation in a relict natural grassland in Argentina. **Biol. Conserv**. 45: 1–10.

Jackson, J.E.; Langguth, A. (1987). Ecology and Status of Pampas Deer in the Argentinian Pampas and Uruguay. In: C.M. Wemmer Ed. **Biology and Management of Cervidae. Washington**: Smithsonian Inst. Press.

Kawanami AE, Oliveira JP, Arenales A, Crossley B, Woods LW, Duarte JMB (2018) Werther. Detection of bluetongue virus in Brazilian cervids in São Paulo state. **Pesq. Vet. Bras**. 38 (1):137-142.

Lacerda ACR (2008) **Ecologia e Estrutura Social do Veado-Campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) no Pantanal**. Tese de Doutorado - Universidade de Brasília.

Leandro SFS, Carnelossi EAG, Peres PHF, Ribeiro RC, Duarte JMB (2022) Definition of mtDNA Markers for Studies in Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) based On Fecal Samples. **Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences** 9 (5) 01-08, October.

Leeuwenberg FJ, Lara Resende S, Rodrigues, FHG, Bizerril MX (1997) Home range, activity and habitat use of the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* L. 1758 (Artiodactyla, Cervidae) in the Brazilian Cerrado. **Mammalia.** 61:487–495. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção:Volume II–Mamíferos-2018 1.ed.Brasília,DF:ICMBio/MMA.

Mantellatto AMB, Caparroz R, Christofoletti MD, Piovezan U, Duarte JMB (2017) Genetic diversity of the pampas deer (Ozotoceros bezoarticus) population in the Brazilian Pantanal assessed by combining fresh fecal DNA analysis and a set of heterologous microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, 40(4):774-780.

Mazzolli M, Benedet, RC (2009) Recent records, range loss, and current threats to the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Mammalia, Cervidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Biotemas** 22 (2):137-142.

Mcartur RH, Pianka, PE (1966) On optimal use of patchy environment. **The American Naturalist**, 100:603-609.

Merino ML, Rossi, RV (2010) Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: Duarte JMB e Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, 2-11.Merino, ML, Milne N.; Vizcaíno SF (2005) A cranial morphometric study of deer (Mammalia, Cervidae) from Argentina using three-dimensional land marks. **Acta Theriologica** 50 (1): 91–108, 2005.

Neitzel H (1979) Chromossome evolution in deer Familie der Hissche (Cervidae), **Bango** 3:27-38.

Oliveira ML, Norris D, Ramírez JFM, Peres PHF, Galetti M, Duarte JMB (2012) Dogs can detect scat samples more efficiently than humans: na experiment in a continuous Atlantic Forest remnant. **Zoologia**, 29 (2): 183–186.

Percequillo, AR.; Kierulff, MCM. Mamíferos (2009) In: Fauna Ameaçada de Extinção no Estado de São Paulo: Vertebrados / coordenação geral: Paulo Magalhães Bressan, Maria Cecília Martins Kierulff, Angélica Midori Sugieda. -- **São Paulo: Fundação Parque Zoológico de São Paulo**: Secretaria do Meio Ambiente.

Pereira RJG, Duarte JMB, Negrão JA (2005) Seasonal changes in fecal testosterone concentrations and their relationship to the reproductive behavior, antler cycle and grouping patterns in free-ranging male Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus bezoarticus*). **Theriogenology**, 63(8): 2113–2125. https://doi.org/10.1016/J.

Raimondi VB, Maruyama MG, Piedrabuena MR, Wolfenson L, Mirol P (2012) Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci from the endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Cervidae). **Conservation Genet Resour**. 4:1089-1092.

Rocha D, Vogliotti A, Gräbin D, Assunção W, Cambraia B, D'amico A, Sollmann, R. (2019) New populations of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* discovered in threatened Amazonian savannah enclaves. **Oryx**, 53 (4) 748-751.

Rodrigues FHG, Monteiro-Filho ELA (2000) Home range and activity patterns of pampas deer in Emas National Park, Brazil. **Journal of Mammalogy** 81:1136–1142.

Rodrigues FP, Garcia JF, Ramos PRR, Bortolozzi J, Duarte JMB (2007). Genetic diversity of two Brazilian populations of the Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758). **Brazilian Journal of Biology**, v. 67, p. 805-811.

Ruder MG, Lysyk TJ, Stallknecht DE, Foil LD, Johnson DJ, Chase CC, David Dargatz, A, Paul E, Gibbs J (2015) Transmission and Epidemiology of Bluetongueand Epizootic Hemorrhagic Disease in North America:Current Perspectives, Research Gaps and Future Directions. **Vector-borne and zoonotic diseases**, 15 (6).

Scheifler NA, Merino ML, Vitale P, Kaufmann CA, Messineo PG, Álvarez MC, Bocherens H (2023) Isotopic Ecology in Modern and Holocene Populations of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) from Eastern Central Argentina. Implications for Conservation Biology and Ecological Models of Hunter-gatherer Subsistence, **Environmental Archaeology**, 28 (2):45-61.

Scheifler NA, Merino ML, Vitale P, Kaufmann CA, Messineo PG, Álvarez MC, 0Bocherens, H (2023) Isotopic Ecology in Modern and Holocene Populations of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) from Eastern Central Argentina. Implications for Conservation Biology and Ecological Models of Hunter-gatherer Subsistence, **Environmental Archaeology**, 28(2): 45-61.

Semeñiuk MB, Merino ML (2015) “Pampas Deer (Ozotoceros bezoarticus) Social Organization in Semiarid Grasslands of San Luis, Argentina.” **Mammalia** 79: 131–138. doi:10.1515/mammalia-2014-0054.
species, en **Proc. Zool. Soco London**, 883-928.

Thomas, O (1911) The mammals of the tenth edition of Linnaeus: an attempt to fix the types of the genera and the exact bases and localities of the species. **Proc. Zool. Soc.** London, 1:120-158.

Uhart, MM, Vila AR, Beade MS, Balcarce A, Karesh WB (2003) Health Evaluation of Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus celer*) at Campos del Tuyú Wildlife Reserve, **Argentina. Journal of Wildlife Diseases**, 39(4):887–893. https://doi.org/10.7589/0090-3558-39.4.887.

Ungerfeld R, González-Pensado S, Bielli A, Villagrán M, Olazabal D, Pérez W (2008) Reproductive biology of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*): a review. **Acta Veterinaria Scandinavica**, 50 (1):16. https://doi.org/10.1186/1751-0147-50-16

Versiani NF (2011) **Área de vida e uso de habitat por fêmeas de Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) nos diferentes períodos reprodutivos, no Pantanal Sul-Matogrossense**. Tese de doutorado - Escola Superior de Agricultural ‘Luiz de Queiroz’ - Universidade de São Paulo.

Viana JGA, Vendruscolo R, Silveira VCP, de Quadros FLF, Mezzomo MP, Tourrand JF (2021) Sustainability of Livestock Systems in the Pampa Biome of Brazil: An Analysis Highlighting the Rangeland Dilemma. **Sustainability**, 13: 13781. https://doi.org/10.3390/su132413781

Vila AR, Beade MS, Barrios Lamunière, D (2008) Home range and habitat selection of pampas deer. **Journal of Zoology,** 276:95–102.

Vozdova M, Kubickova S, Martínková N, Galindo DJ, Bernegossi, AM, Cernohorska H, ... Rubes J. (2021). Satellite DNA in neotropical deer species. **Genes**, 12(1): 123.

Weber M, González S (2003) Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience** 10 (4): 443-454.

Zucco, CA (2015) **Pampas deer on the move: spatial ecology and activity of *Ozotoceros bezoarticus* in the Central Pantanal of Brazil**. 207 f. Tese de Doutorado – UFRJ, Rio de Janeiro.

CAPÍTULO 2 - Padrões filogeográficos e definição de unidades evolutivas significativas e unidades de Manejo de Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*, LINNAEU 1758)

Resumo

O Veado-campeiro é uma espécie em que seus táxons, filogeneticamente, são exclusivos de um grupo monofilético, dentre os cervídeos neotropicais. Taxonomicamente é subdividida em cinco subespécies distribuída entre o Brasil (*O. b. bezoarticus* e *O. b. Leucogaster*), Argentina (*O. b. Celer*) e Uruguai (*O. b. arerunguaensis* e *O. b. uruguayensis*). Esse fato sugere a possibilidade de uma estruturação populacional, porém, a amostragem para definição dessas subespécies é limitada a localidades geograficamente distantes umas das outras. O objetivo deste estudo foi testar a estruturação genética da espécie e investigar os padrões filogeográficos, por meio de uma ampla amostragem não invasiva, a fim de definir Unidades Evolutivas Significativas (ESUs) e Unidade de Manejo (MUs). A análise da matriz composta pelos fragmentos dos genes mitocondriais [CytB, 513; ND5, 222; Dloop 158 (pb)] foi realizada para avaliações de cunho populacional e filogeográfico. Os resultados indicaram que apesar da estruturação genética em algumas populações não há correlação geográfica para tal e o padrão genético populacional da espécie se comporta como uma clina. Sendo assim, não foi possível a definição estrita de ESUs a partir da monofilia das populações amostradas. Assim, o manejo da espécie deve ser baseado na menor distância geográfica entre as populações que apresentem menor distância genética entre si.

Palavras chaves: *Ozotoceros bezoarticus*, filogeografia, Clina genética, Unidade de Manejo, amostragem não invasiva.

Abstract

The pampas deer is a monophyletic species inside the neotropical cervids group. The species is composed by five subspecies distributed along Brazil (*O. b. bezoarticus* e *O. b. leucogaster*), Argentina (*O. b. celer*), and Uruguay (*O. b. arerunguaensis* e *O. b. uruguayensis*), which suggest a possibility of population structure. However, the sampling used for the definition of these subspecies was limited to localities geographically distant each other. This research aimed to test the population structure of the pampas deer populations, prospect the phylogeographical patterns of the species and define ESUs and MUs. For this purpose, we used a non-invasive method to sampling population along the current distribution of the species and used mitochondrial markers as molecular tools. Based on the matrix of mitochondrial fragments [CytB, 513; ND5, 222; Dloop 158 (pb)], we performed population and phylogeographical analyses. The results showed that there is no genetic structure for the analyzed samples and indicate that the genetic pattern of the species occurs as a cline. Therefore, it is not possible to define ESUs considering the monophyly of the sampled populations, which indicate a species management based on the smaller geographic distance between populations with smaller genetic distance.

Key-words: *Ozotoceros bezoarticus*, phylogeography, genetic cline, management unit, non-invasive sampling.

1. Introdução

O Veado-campeiro é uma espécie que possui distribuição histórica atrelada às formações de áreas abertas da América do Sul, que compreendem desde o sul da Amazônia até o norte da Argentina (Gonzalez *et al*., 1998;2002), com exceção da caatinga, as populações relictuais do Veado-campeiro são encontradas em áreas abertas ao longo de todo o Cerrado, Pantanal, Chaco e áreas de Pampa. A taxonomia da espécie é bem resolvida dentro do grupo dos cervídeos neotropicais. Dados morfológicos e dados moleculares (Cabrera, 1943; Duarte *et al*.; 2008; Gonzalez *et al*., 1998; 2002; Hassanin *et al.,* 2012; Heckeberg *et al*., 2016; Gutierrez *et al*., 2017) recuperam a monofilia do grupo em relação a outras espécies de cervídeos. No entanto, desde 1943, é conhecido que a espécie possui variações morfológicas associadas à sua distribuição.

No princípio dos anos de 1940, com base em dados morfológicos foram descritas três subespécies para o grupo: *O. b. bezoarticus*, distribuída no Cerrado, *O. b. leucogaster*, presentes na região do Pantanal e do Chaco, e *O. b. celer*, presente no norte da Argentina (Cabrera, 1943). Mais de 50 anos depois o trabalho de Cabrera, Gonzalez (1998) encontrou uma estruturação genética baseada em dados moleculares gerados a partir da região controle do DNA mitocondrial (Dloop, 453 pb), que evidenciaram a separação das três subespécies, corroborando Cabrera (1943) (Figura 1), e ainda uma forte estruturação para as subpopulações do Uruguai, indicando que estas poderiam compor novas subespécies.

Figura 1. Distribuição histórica e atual de Veado-campeiro (Gonzalez *et al*., 1998). A provável distribuição histórica das subespécies é representada pelas linhas sólidas pretas. As localidades são representadas pelos quadrados. Brasil: Emas (B1) e Pantanal (B2), Argentina: Bahía de Samborombón (A3) e San Luís (A4), Uruguay: El Tapado (U5) e Los Ajos (U6). Outras populações não amostradas no respectivo trabalho são apresentadas pelos círculos preenchidos.

A alta variabilidade genética da espécie é atribuída a uma história recente de ocupação de áreas abertas, remontando ao Pleistoceno, há aproximadamente dois milhões de anos, semelhante a história dos bovídeos no continente africano (Gonzalez *et al*., 1998). Essa ocupação, acompanhada por uma intensa expansão populacional, resultou em um número efetivo de fêmeas superior a 3,5 milhões. No entanto, o atual número de indivíduos está abaixo dos 80.000, sendo aproximadamente metade deles encontrada no Pantanal (Pinder, 1994). O grande tamanho populacional do passado reflete a alta variabilidade encontrada para a região Dloop das populações relictuais de hoje (Gonzalez *et al*., 1998).

Gonzalez (2002), a partir das evidências prévias para os dados moleculares, utilizando dados morfológicos de craniometria encontrou um padrão geográfico de variação da espécie e um acentuado dimorfismo sexual. Esse estudo corrobora os dados moleculares apresentados e culmina na descrição de duas

novas subespécies para o território uruguaio: *O. b. uruguayensis* e *O. b. arerunguaensis*.

Os estudos mencionados anteriormente focalizaram poucas regiões amostradas, se restringindo ao Parque Nacional de Emas em Goiás, ao sul do Pantanal, na região da Nhecolândia no Mato Grosso do Sul; à Bahia de Samborobón e San Luís na Argentina; e às localidades uruguaias de Arerunguá, Eltapado e Sierra de los Ajos (Figura 1)(Gonzalez *et al*., 1998;2002). Após esses estudos, existiram alguns avanços no entendimento da estrutura genética da espécie (Braga *et al*., 2005; Cosse *et al*., 2007; Mantelato *et al*., 2017; Raimondi *et al*., 2012).

Novos haplótipos em relação aos encontrados para o conjunto amostral utilizado por Gonzalez (1998), considerando os fragmentos mitocondriais de CytB (486 pb) e Dloop (601pb), foram descritos para o norte do Paraná (Braga *et al*., 2005) o que levou os autores a sugerirem um manejo populacional diferenciado em relação as outras populações de Veados-campeiros.

Estudos com primes heterólogos de microssatélites bovinos (Cosse *et al*., 2007) possibilitaram a utilização desses marcadores nucleares para o entendimento das relações de parentesco dentro de uma população, estrutura de grupo e de acasalamento. Com isso utilizando amostragem não invasiva, foi possível detectar uma alta diversidade genética nuclear para o Veado-campeiro na região do pantanal (Nhecolândia) (Mantelato *et al*, 2017). Porém um dos problemas encontrados no uso de microssatélites heterólogos é a não especificidade dos primers, levando Raimondi *et al*., (2012) desenvolveram 15 microssatélites específicos para a espécie, sendo três loci monomórficos e 12 polimórficos. Para gerar os parâmetros de variabilidade genética os autores utilizaram quatro populações argentinas. Foram encontrados erros pontuais em todos os loci devido ao *stuttering* e a presença de alelos nulos, bem como três destes apresentaram desvio em relação ao equilíbrio de Hardy-Weinberg. Este trabalho trouxe uma base para estudos a posteriori, utilizando microssatélites específicos para a espécie, o que não havia sido realizado até aquele momento (Raimondi *et al*., 2012).

A utilização de pequenos fragmentos de DNA é de grande valia para estudos forenses e de material obtido a partir de amostragem não invasiva, como as fezes por exemplo (Oliveira *et al*., 2012; Peres, 2015; Oliveira, 2015; Duarte *et al*., 2017), as quais podem ser encontradas com o auxílio de um cão farejador. Este tipo de metodologia vem sendo utilizada com grande sucesso, frente a seu caráter não invasivo, alta acurácia na detecção e redução do tempo destinado para encontrar as fezes, devido à eficiência do cão (Oliveira *et al*., 2012; Peres, 2015; Oliveira, 2015; Duarte *et al*., 2017).

Com o intuito de aumentar o escopo de pequenos fragmentos a serem utilizados em estudos populacionais, Leandro *et al*., (2022) descreveram novos fragmentos de até 300 pares de bases (pb) de DNA mitocondrial (CytB, 301pb; Dloop, 159pb; ND5 224pb; COI, 300pb). Estes fragmentos apresentaram sinais filogenéticos suficientes para estudos populacionais, no entanto, é ressaltado pelos autores que o Dloop possui uma saturação de sinal que pode afetar a acurácia dos estudos filogenéticos. No mesmo trabalho é possível verificar a existência de árvores filogenéticas com a utilização de fragmentos concatenados grandes (2000 pb) e pequenos (741 pb) para os genes propostos, que reconstroem a história filogenética das populações do Pantanal e do PARNA Emas mas que não apresentam monofilia para as regiões, diferente do proposto por Gonzalez (1998).

A compreensão e conhecimento da estrutura genética de mais populações de Veado-campeiro é de grande importância para a definição de locais prioritários para a conservação da espécie, uma vez que esta é susceptível a diversas ameaças como a perda de habitat, caça, enfermidades e atropelamentos (Thornback; Jenkins, 1982; Weber; Gonzalez, 2003; Gonzalez *et al*., 2010). Por sua vez, informações sobre estrutura genética das populações são cruciais a definição de unidades de manejo para as populações relictuais.

As unidade evolutivas significativas (ESUs - Evolutive Significant Unit) são definidas como sendo grupos de haplótipos com representação monofilética recíproca ou grupos alélicos sem fluxo gênico com outras populações (Moritz, 1994). No entanto, esse conceito é restritivo para populações que não possuem monofilia. Visto que é de grande importância a definição de áreas prioritárias para a conservação de populações de uma espécie, podemos utilizar a definição

de unidades de manejo (MU), que apresenta um conceito menos restritivo que o de uma ESU, pois abordam a estrutura populacional atual, frequências alélicas e questões de gestão populacional de curto prazo (Moritz, 1994).

Desta forma, o presente trabalho testa a hipótese de que as populações de Veado-campeiro possuem estruturação genética devido ao isolamento por distância geográfica, uma vez que a distribuição da espécie é muito ampla e, atualmente, disjunta. Assim, espera-se caracterizar a diversidade genética das populações amostradas ao longo de sua distribuição geográfica, utilizando marcadores mitocondriais e realizar a reconstrução filogenética das populações amostradas para determinar possíveis ESUs ou Mus. Essa informação servirá como base na elaboração de planos de manejo e ações para a conservação da espécie;

2. Material e Métodos

2.1. Obtenção de amostras

Foram obtidas 293 amostras de fezes (Anexo I) em campanhas de coleta e banco de amostras, totalizando 25 localidades (Tabela1, Figura 1). Após o processo de triagem, descrito nos itens 2.2, 2.3 e 2.4, o conjunto amostral utilizados para as análises foi de 43 amostras. O restante do material biológico não utilizado se encontra armazenado em álcool absoluto no Banco de amostras fecais do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos a (NUPECCE). As amostras referentes as localidades do Pantanal, Região da Nhecolândia (9) e PARNA de EMAS (10) fazem parte do banco de amostras do NUPECCE. As amostras provenientes do Uruguai foram gentilmente cedidas pela Professora Dra. Suzana González do Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Profesora Titular de Investigación Departamento Biodiversidad y Genética, IIBCE-MEC, Montevidéo, Uruguai.

Para encontrar as fezes foi utilizada uma cachorra farejadora, treinada para identificar amostras de cervídeos. Após a localização das amostras, elas foram avaliadas visualmente. Aquelas que não pareciam secas ou com fungos, foram colocadas em tubos de polipropileno (50 mL) com álcool absoluto. A partir da coleta destas amostras, foi realizado o processo de identificação enzimática para

confirmação da espécie. Após isso, uma nova seleção foi feita com base na na distância geográfica entre as amostras (Figura 2) para determinar quais seriam as melhores amostras a serem sequenciadas para os demais fragmentos.

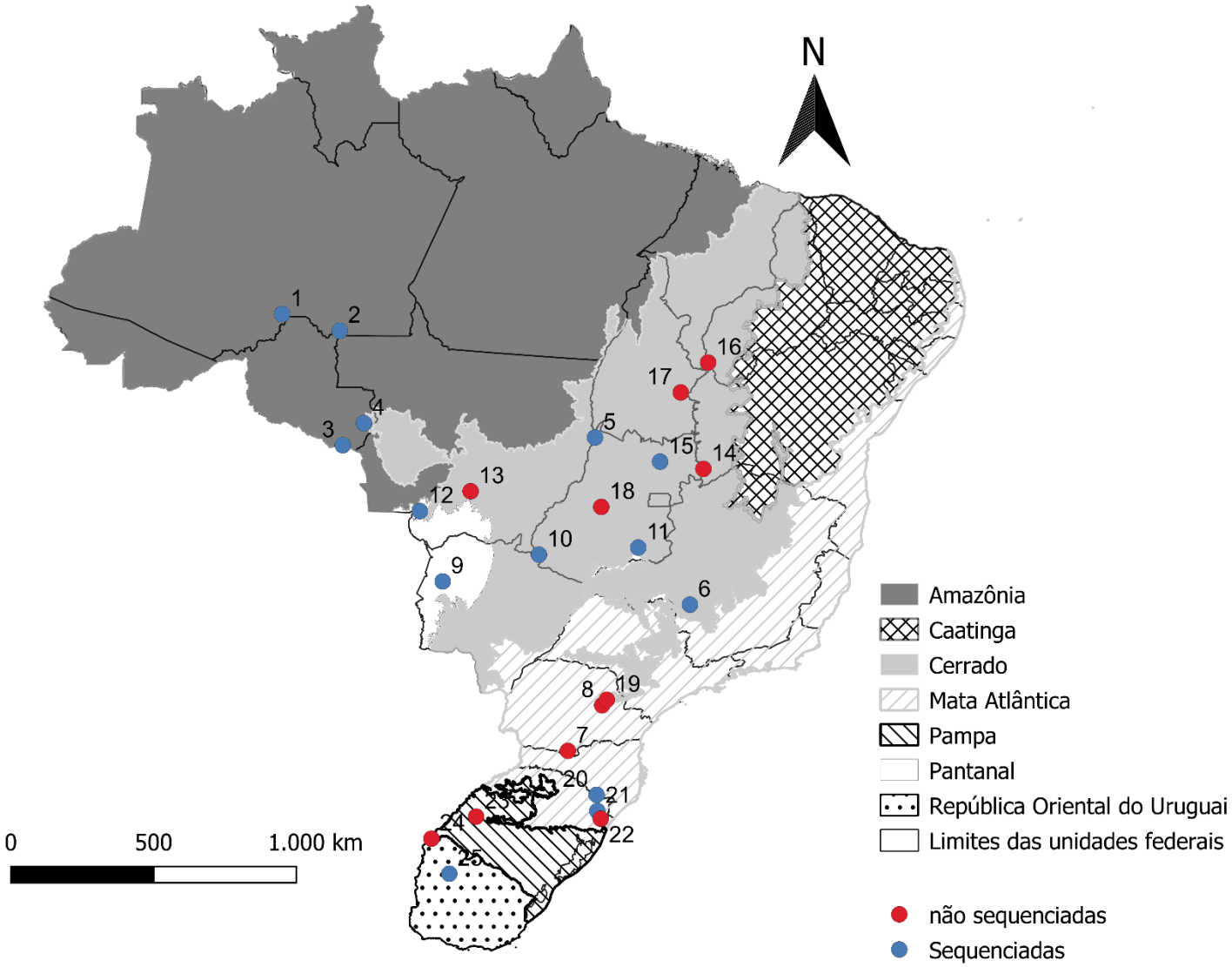


Figura 1.Distribuição dos locais amostrados na coleta de fezes. Os círculos azuis representam as amostras sequenciadas, enquanto os círculos vermelhos representam as amostras coletadas, mas que não foi possível o sequenciamento. Os números indicados ao lado dos círculos correspondem a numeração de identificação da Tabela 1.

Tabela 1. Localidades de coleta utilizadas no presente estudo com a identificação (ID) sequencial referente a Figura 1; Identificação (Id); Localidades da coleta; Abreviações utilizadas nas representações das análises; Unidade federal (UF); coordenadas geográficas de longitude e Latitude e tipo de amostra obtida. Abreviações das localidades: PARNA – Parque Nacional; REVIS – Reserva de Vida Selvagem; RPPN – Reserva do Patrimônio Particular Natural; P. E. Parque Estadual.

Id	Localidade	Abreviação	UF	Longitude	Latitude	Tipo de amostra
1	PARNA Mapinguari	MAP	AM	-63.861789	-7.870682	Fezes
2	PARNA dos Campos Amazônicos	CAP	AM	-61.40753	-8.576555	Fezes
3	Região do Rio Guaporé	GUA	RO	-61.276887	-13.449885	Fezes
4	Região de Vilhena	VIL	RO	-60.375034	-12.511389	Fezes
5	Parque Estadual do Araguaia	PEA	GO	-50.53969	-13.12347	Fezes
6	PARNA da Serra da Canastra	SDC	MG	-46.499739	-20.236527	Fezes
7	REVIS dos Campos de Palmas	CDP	PR	-51.695576	-26.461328	Fezes
8	RPPN Yta-Y-Tiba	IYT	PR	-50.23654	-24.520494	Fezes
9	Pantanal da Nhecolândia	PAT	MS	-57.02607	-19.247632	Sangue
10	PARNA de Emas	EMA	GO	-52.928094	-18.106644	Sangue
11	P. E. de Caldas Novas	PCN	GO	-48.70258	-17.805725	Fezes
12	Região de Cáceres	CAC	MT	-57.997704	-16.254496	Fezes
13	PARNA da Chapada dos Guimarães	CDG	MT	-55.836853	-15.411405	Fezes
14	PARNA das Veredas do Oeste Baiano	VOB	GO/BA	-45.924635	-14.457084	Fezes
15	PARNA da Chapada dos Veadeiros	CDV	GO	-47.771359	-14.148979	Fezes
16	PARNA das Nascentes do Rio Parnaíba	NRP	PI	-45.725677	-9.93018	Fezes
17	PARNA da Serra Geral do Tocantins	SGT	TO	-46.890885	-11.203439	Fezes
18	P. E. de Serra Dourada	SDA	GO	-50.274488	-16.0755	Fezes
19	Região de Piraí do Sul	PIR	PR	-50.038531	-24.284535	Fezes
20	Região da Coxilha Rica	CXR	SC	-50.47281	-28.330637	Fezes
21	P.E. de Tainhas	TIS	RS	-50.441599	-29.020305	Fezes
22	FLONA de São Francisco de Paula	FSF	RS	-50.298772	-29.350726	Fezes

23	Região de Manoel Viana	MVA	RS	-55.602335	-29.259748	Fezes
24	Parque Estadual do Espinilho	ESP	RS	-57.50414	-30.198293	Fezes
25	Região de El Tapado	URU	Uruguai	-56.745506	-31.688159	Fezes

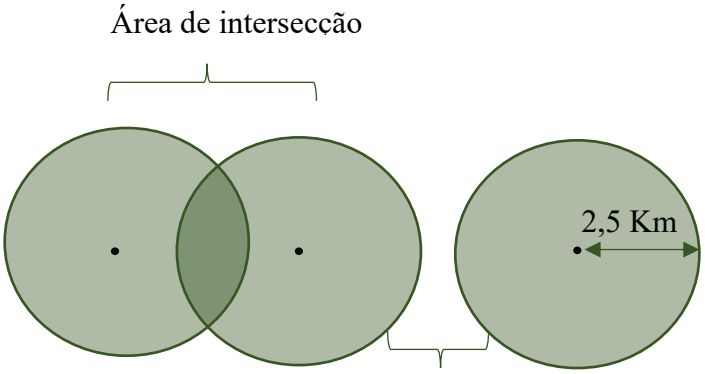
2.2. Extração, amplificação e identificação enzimática

A extração do DNA total foi realizada com a utilização do protocolo de sílica (Glenn *et al*., 1998) otimizado, e posterior amplificação do fragmento de 224 pares de bases (pb) do gene mitocondrial Citocromo B (CytB) por meio de PCR (Mullins; Faloona, 1987). Para a amplificação desta região, foram utilizados os *primers* IDMAZ224 e IDMAZ H (Gonzalez *et al*., 2009) padronizados para um volume final de 30 µL (25µL de reagentes e 5 µL de DNA total extraído com concentração de aproximadamente 20 ng/ µL) contendo 1x buffer e 1,5U de DNA polymerase (ambos Platinum™, Thermo Fisher Scientific), 2 mM $MgCl^2$, 0,6 mM dNTP, 1,3 mg/ml BSA e 0.5 pM de cada *primer*. As reações foram realizadas no termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler sob as seguintes condições: temperatura inicial de 94°C por 2 minutos (min.) seguidos por 45 ciclos de (1) 94°C por 1 min., (2) 94ºC por 50 segundos (seg.), (3) 58ºC por 50 seg., (4) 72ºC por 50 seg., (5) repetir a partir do passo (2) cinco vezes, (6) 94ºC por 50 seg., (7) 57ºC por 50 seg., (8) 72ºC por 50 seg., (9) repetir a partir do passo (6) seis vezes, (10) 94ºC por 50seg., (11) 56ºC por 40 seg., (12) 72ºC por 50 seg., (13) repetir a partir do passo (10) oito vezes, (14) 94ºC por 50 seg., (15) 55ºC por 30 seg., (16) 72ºC por 50 seg., (17) repetir a partir do passo (14) 13 vezes, (18) 94ºC por 50 seg., (19) 54ºC por 30 seg., (20) 72ºC por 50 seg., (21) repetir a partir do passo (18) 13 vezes, (22) 72º por 10min para extensão final e (23) 4ºC para armazenamento.

Após a amplificação desta região foi realizada a digestão enzimática com a enzima SspI (NewEnglandlab®) cujo padrão de visualização em gel de agarose, na concentração de 2% (Gonzalez *et al*., 2009; Souza *et al*., 2013), juntamente com o local de coleta, possibilitou diferenciar a espécie *Ozotoceros bezoarticus* das demais espécies de cervídeos brasileiros.

2.3. Individualização das amostras

Para a individualização das amostras de fezes foi utilizado o programa QGis v. 3.28 para traçar um buffer de 2,5 Km^2, representando a área de vida da espécie (Rodrigues; Monteiro-Filho, 2000; Tomas *et al*., 2001; Vilá *et al*., 2008) ao redor



de cada amostra coletada com o auxílio do cão. Após essa etapa, foram excluídas aquelas que apresentaram sobreposição de área, como indicado na Figura 2.

Figura 2. Representação esquemática da forma que amostras de fezes foram consideradas independentes.

2.4. Sequenciamento

Ao todo foram utilizados quatro fragmentos gênicos (Tabela 2) para a realização das análises genéticas. Além do fragmento CytB (224 pb), foi utilizado outro fragmento do mesmo gene com 306 pb desenvolvidos no NUPECCE (Leandro *et al*., 2022). Ainda, também foram amplificadas as regiões D-Loop (159 pb) (Moreno*et al.*, 2016), que foi descrita como a mais polimórfica para a espécie (Gonzalez *et al.*, 1998), e NADH Dehigrogenase subunit 5 (ND5, 224 pb) (Leandro*et al*., 2022).

Após a identificação da espécie, o produto de PCR restante passou pelo processo de purificação com a utilização do kit de purificação Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System, seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras purificadas foram sequenciadas para a fita senso e anti-senso, por meio do conjunto de reagentes Big Dye (Perkin-Elmer ®) no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems, Foster City, California, CA) no Instituto de Biotecnologia, UNESP, Botucatu - SP.

O protocolo utilizado no termociclador foi o mesmo, seguindo o item 2.2, para os fragmentos CytB (224 pb), CytB (306 pb) e ND5 (224 pb). Para o fragmento Dloop (129 pb) foram utilizadas as seguintes condições: (1) 94ºC por 2:00 min., (2) 94ºC por 50 seg., (3) 63ºC por 35 seg., (4) 72ºC por 50 seg., (5) repetir a partir do passo (2) 45 vezes, (6) 72ºC por 10 min e (7) 4ºC para armazenamento.

Tabela 2. Fragmentos mitocondriais e sequências iniciadoras (*primers*), juntamente com o tamanho do fragmento (pb) a ser amplificado e a respectiva temperatura de anelamento (Ta).

Genes	Iniciadores (*Primers*)	Sequência (*Foward*/*Reverse*)	pb	Ta (ºC)	Referência
CytB	IDMAZ224 IDMAZ H	5'CATCCGACACAATAACAGCA3' 5'TCCTACGAATGCTGTGGCTA3'	224	55	Gonzalez, 2009
CytB	F R	5'CCATCAGACGCAGACAAA3' 5'GCGTTGTTTAGATGTGTGAAG3'	306	55	Leandro *et al.*, 2022
D-loop	F R	5'GCGGCATGGTAATTAAGCTC3' 5'GCTAGATTGCCAGCTAAAGGG3'	159	63	Moreno *et al.*, 2016
ND5	F R	5'TGTCACATGGTCCATCATAG3' 5'GCAGAGCTGCTGTGTTT3'	224	58	Leandro *et al*, 2022

2.5. Análises

2.5.1. Diversidade genética e teste de neutralidade.

Com o auxílio do *software* DnaSP v.6 (Rozas, 2017), foram calculados os índices de diversidade genética e teste de neutralidade, utilizando a matriz total de amostras concatenadas (895pb, sem gaps e com as extremidades limpas), e para os fragmentos individuais.

Foram gerados os seguintes índices: (N) número total de sítios excluindo *gaps* e dados faltantes, (h) número de haplótipos, (S) número de sítios polimórficos segregantes, (Eta) número total de mutações, (Hd) diversidade haplotípica, (Var Hd) variância da diversidade haplotípica, (π) diversidade nucleotídica e (k) número médio de diferenças nucleotídicas. Para os testes de neutralidade foram utilizados os parâmetros Fs de Fu e D de Tajima. Esses testes avaliarão se os polimorfismos observados nas sequências seguem o modelo de variação neutra.

2.5.2.*Mismatch distribution* e distância genética

No programa DnaSP v.6 (Rozas, 2017) foi realizada a análise de Mismatch distribution, que infere a história demográfica das populações estudadas a partir da frequência modal da distribuição par-a-par.

Foi utilizado o programa MEGA11 (Tamura *et al*., 2021) para calcular a distância genética entre o conjunto amostral amplo, descrito a seguir no item 2.5.3. A análise foi conduzida usando o modelo Tamura 3-Parametros estimado pelo mesmo programa e escolhido a partir do critério de AICc. A variação entre o site modeladas pela distribuição gamma (0,7) e todas as posições com menos de 75% de cobertura foram deletadas (deleção parcial). Ao final foram analizadas 825 posições.

2.5.3.Comparação entre conjuntos amostrais

Para a discussão dos dados a serem apresentados, foram consideradas populações independentes, o conjunto amostral pertencente a cada localidade sequenciada.

Para a construção da rede haplotípica, da estruturação genética, da história evolutiva e o teste de mantel, foi realizada a comparação entre o conjunto amostral amplo, representado por todas as sequencias obtidas (n = 43), o qual abrange todas as localidades sequenciadas após a triagem das amostras fecais, e apenas as localidades correspondentes a descrição restrita das sub espécies, de acordo com Gonzalez e colaboradores (1998) (n = 17). Essa descrição corresponde as subespécies *O.b. leucogaster* (PAT), *O. b. bezoarticus* (EMA) e *O.b.arerunguaiensis* (URU), que para fins práticos serão referidas ao longo do trabalho como amostras restritas.

2.5.3.1.Rede haplotípica

A rede haplotípica foi construída utilizando a abordagem TCS Network (Clemente *et al*.,2002) implementado pelo software PopArt (University of Otago, 2023, https://popart.maths.otago.ac.nz/download/), onde as sequências de DNA foram analisadas par-a-par utilizando o critério da parcimônia, considerando *gaps* como dados faltantes.

2.5.3.2.Estruturação genética

No programa Arlequim 3.5 (Excoffier; Lischer, 2010) foi feito o teste de variância molecular (AMOVA) para elucidar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações amostradas de acordo com sua localidade de origem. O teste é considerado significativo com $p < 0,05$.

Para avaliar a hipótese de isolamento por distância, foi realizado o teste de Mantel,com a utilização do pacote vegan (OKSANEN *et al*., 2020), implementado no R v. 4.0.1 (R Core Team, 2020), utilizando o método a correlação de Pearson (onde r é o coeficiente de correlação), com número de permutações igual a 10000. Para a realização da análise foram consideradas as sequências concatenadas juntamente com as coordenadas geográficas de cada uma das amostras.

Foram testados diferentes agrupamentos de amostras: Todas as amostras; apenas as amostras restritas (PAT, EMA e URU); Uruguai e Pantanal; Uruguai e PARNA Emas; PARNA Emas e Pantanal; Uruguai e região do Guaporé.

O teste de agrupamento implementado no R versão 4.2.3, com o pacote rhierBAPS (R Core Team, 2020), que identifica agrupamentos genéticos baseados na distância genética entre as amostras. Ambas as análises foram realizadas com a matriz gerada a partir dos fragmentos concatenados.

Além do teste de agrupamento foi realizado o teste SAMOVA 2.0 (DUPALUP *et al*., 2002), que relaciona as populações geograficamente homogêneas com a máxima diferenciação genética que pode ocorrer entre elas. A quantidade de grupos a serem formados é definido a priori. Para este trabalho foi utilizado dois e três grupos.

2.5.3.3. História Evolutiva

A reconstrução das relações evolutivas foi inferida pelo método de Neighbor-Joining com o auxílio do programa MEGA 1. Como *outgroup*, foram extraídas as mesmas regiões amplificadas neste trabalho e construída uma matriz concatenada com as seguintes sequências: *Blastoceros dichotomus* (PP224) e *Subulo guazoubira* (Mgb386 e Mgb389), pertencentes ao banco de dados NUPECCE.

A porcentagem de árvores replicadas nas quais os táxons foram agrupados no teste *bootstrap* (10.000 réplicas) são mostradas ao lado dos ramos [2]. A

árvore foi desenhada em escala, com os comprimentos dos ramos nas mesmas unidades das distâncias evolutivas usadas para inferir a árvore filogenética. As distâncias evolutivas foram calculadas usando o método Tamura 3 parâmetros. A taxa de variação entre os sítios foi modelada com uma distribuição gama de 0,73 para a amostragem ampla e de 0,3 para as localidades restritas. Esta análise envolveu 46 sequências de nucleotídeos para a amostragem ampla e 17 sequencias para a amostragem restrita. Todas as posições com menos de 75% de cobertura do local foram eliminadas, dados ausentes e bases ambíguas foram permitidas em qualquer posição (exclusão parcial). Ao final foram utilizadas um total de 756 posições no conjunto de dados ampla e 701 posições para as amostragens restritas.

3. Resultados

3.1. Diversidade genética e teste de neutralidade

Dentre as 43 sequencias analisadas com os fragmentos concatenados foram encontrados 61 sítios segregantes, com um total de 29 haplótipos, gerando uma diversidade haplotípica de 0,968 e diversidade nucleotídica de 0,02537. O fragmento mais variável foi o CytB (524 pb) com uma diversidade haplotípica de 0.885. O fragmento com a maior diversidade haplotípica foi o ND5 (223 pb) com um valor de 0,03111.

Tabela 2. Índices de diversidade genética calculados para o conjunto amostral ampla e os subgrupos divididos por província, concatenadas por fragmento. (n) número total de amostras, (N) número total de sítios excluindo gaps e dados faltantes, (h) número de haplótipos, (S) número de sítios polimórficos segregantes, (Eta) número total de mutações, (Hd) diversidade haplotípica, (Var Hd) variância da diversidade haplotípica, (π)diversidade nucleotídica e (k) número médio de diferenças nucleotídicas.

Fragmentos (pb)	N	h	S	Eta	Hd	Var Hd	π	K
Concatenada (895)	275	29	61	67	0,968	0.0002	0.02537	6,976
Dloop (158)	37	7	5	5	0,627	0,0061	0,02278	0,843
ND5 (223)	68	10	17	19	0.827	0.0012	0.03111	2,115

CytB (514)	207	22	44	48	0.885	0.0017	0.02348	4,860

O teste de Neutralidade de D de Tajima's apresentou o valor -1,96436, no entanto não houve significância para p<0,05. O teste de Fu and Li's D apresentou o valor de -2,52907 com p< 0.05.

3.2. Distribuição par-a-par

O gráfico gerado a partir da distribuição par-a-par realizado com a matriz concatenada dos fragmentos (Figura 4), para o conjunto amostral ampla apresentou um padrão de distribuição multimodal, indicando uma população em equilíbrio demográfico há um longo e contínuo período.

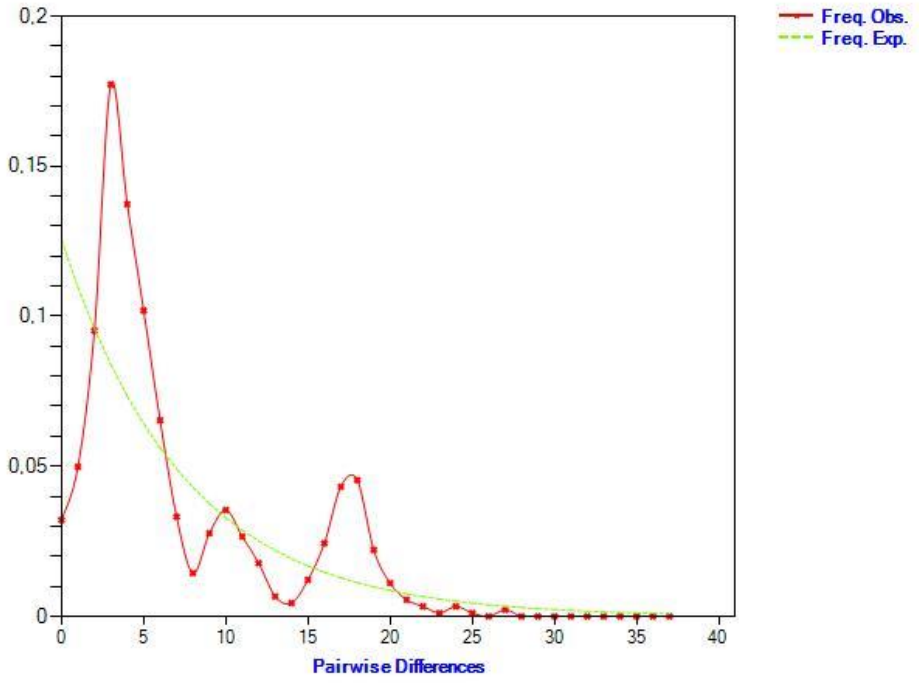


Figura 4. Gráfico de distribuição par-a-par construído para a população ampla (n=43). A frequência observada é representada pela linha vermelha. A frequência esperada é representada pela linha verde.

3.3. Rede de haplótipos

Foram construídas duas redes haplotípicas seguindo a definição de amostragem ampla e restrita do item 2.5.3. (Figura 5). Quando todas as localidades são inseridas na análise, amostragem ampla, não há um padrão claro de agrupamentos para a regionalização das populações por biomas.

Mesmo dentro da mesma localidade. As populações do Pantanal região de Cáceres (CAC), Região do Guaporé (GUA), Serra da Canastra (SDC) e Chapada dos veadeiros (CDV) apresentam congruência entre os haplogrupos formados na rede haplotípica, pois cada um destes possui apenas sequencias das localidades indicadas, sem que outras localidades componham o haplogrupo.

Na rede haplotípica composta apenas com a amostragem restrita é possível notar a formação de haplogrupos que refletem a separação entre as subespécies descritas (Gonzalez *et al*. 1998) para as localidades amostradas. Há um haplogrupo formado apenas pelas amostras do Uruguai. Entre as sequencias representantes do Pantanal da Nhecolândia (PAT) e do PARNA Emas (EMA), existe apenas uma amostra do Pantanal que se mistura com as amostras do PARNA de Emas.

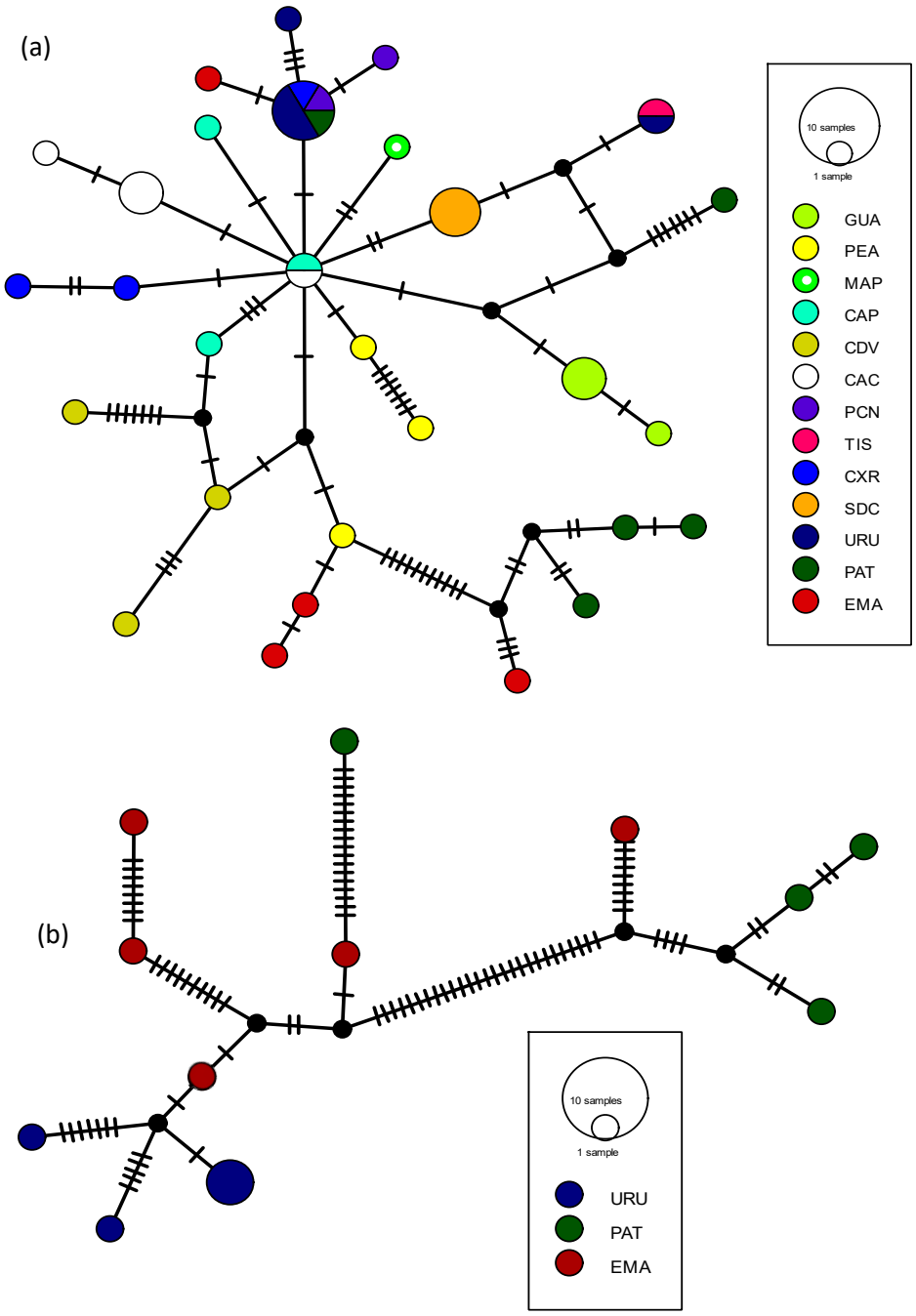


Figura 5. Rede haplotípica construída a partir das sequências concatenas [DLoop (153pb) + ND5 (243pb) + CytB (514 pb)] gerada pelo programa POPART com 43 sequencias (a) distribuídas em 13 localidades e com 17 sequencias (b) distribuídas em 3 localidades. Os tamanhos dos círculos indicam a frequência relativa dos haplótipos. Os traços ao longo dos braços indicam os passos mutacionais entre haplótipos. (GUA) Região do Guaporé – RO; (PEA) Parque Estadual do Araguaia – GO; (CAP) PARNA dos Campos Amazônicos; (MAP) PARNA do Mapinguari; (CDV) PARNA da Chapada dos Veadeiros - GO; (CAC) Região de Cáceres - MT; (PCN) PARNA de Caldas Novas - GO; (TIS) P.E. de Tainhas - RS; (CXR) Região da Coxilha Rica – SC; (SDC) PARNA da Serra da Canastra – MG; (Uru) El tapado – Uruguai; (PAT) Pantanal sul – MS; (EMA) PARNA de Emas – GO.

3.4. Estruturação genética

Os valores de estruturação genética (Tabela 4) obtidos para o conjunto amplo de sequências e para as populações URU, PAT e EMA, com p significativo abaixo de 0.05, mostram que para ambos os conjuntos amostrais existem estruturação entre as populações. O índice de fixação das localidades indica que há uma alta estruturação genética, segundo a interpretação de Wright (1978), que propõe que valores acima de 0,25 como forte diferenciação genética, 0,15 a 0,25 como grande, 0,05 e 0,15 como moderada e 0,0 a 0,05 como pequena.

Tabela 4. Análise de variância molecular entre as (a) localidades e entre as (a) províncias (p = 0.05)

Tipo da variação	Componentes da variação	Percentagem da variação	Índice de fixação (FST)
(a) Estruturação genética entre localidades totais			
Entre populações	3,27	33,28	0.33
Dentro das populações	6,57	66,72	p = 0.00 +/- 0,00000
(b) Estruturação genética entre URU, PAT e EMA			
Entre populações	4,45	31,81	0,31
Dentro das populações	9,54	68,19	p = 0,02 +/- 0,00377

A partir das distâncias genéticas foram computadas comparações par-a-par para determinar a estruturação entre as populações definidas (Tabela 5). Pode-se destacar a não estruturação entre as populações do PARNA Emas (EMA) e Pantanal da Nhecolândia (PAT) que são descritas na literatura como subespécies diferentes. A população da região do Guaporé não apresentou valores significativos quando comparada com as demais regiões. No entanto, existe valor significativo para a estruturação entre as populações de CDV e PCNA. A população da Serra da Canastra apresentou valores de forte estruturação em relação a todas as outras populações.

Tabela 5. Comparação par-a-par entre as populações para os índices FST (parte inferior) e os valore de p < 0,05, parte superior. **AMA = CAP + MAP; *SUL = TIS + CXR

	GUA	EMA	PAT	URU	SDC	SUL	PCN	CAC	CDV	AMA	PEA
GUA	*	0.009+-0.009	0.000+-0.00	0.009+-0.009	0.027+-0.013	0.018+-0.012	0.225+-0.043	0.009+-0.009	0.063+-0.036	0.018+-0.012	0.045+-0.020

EMA	0.407	*	0.090+-0.023	0.000+-0.000	0.018+-0.018	0.027+-0.013	0.234+-0.020	0.000+-0.000	0.027+-0.013	0.045+-0.020	0.126+-0.030
PAT	0.483	0.218	*	0.027+-0.013	0.018+-0.012	0.072+-0.037	0.261+-0.034	0.009+-0.009	0.072+-0.032	0.027+-0.013	0.027+-0.013
URU	0.493	0.357	0.451	*	0.009+-0.009	0.324+-0.045	0.757+-0.038	0.018+-0.018	0.009+-0.009	0.081+-0.021	0.054+-0.014
SDC	0.570	0.432	0.417	0.394	*	0.027+-0.013	0.027+-0.013	0.000+-0.000	0.045+-0.020	0.000+-0.000	0.027+-0.013
SUL	0.409	0.293	0.374	0.090	0.330	*	0.423+-0.041	0.018+-0.018	0.045+-0.015	0.108+-0.032	0.090+-0.023
PCN	0.661	0.191	0.332	0.134	0.516	0.079	*	0.072+-0.018	0.342+-0.040	0.162+-0.018	0.171+-0.025
CAC	0.329	0.350	0.460	0.266	0.373	0.173	0.222	*	0.036+-0.014	0.099+-0.021	0.009+-0.009
CDV	0.387	0.240	0.393	0.301	0.356	0.249	0.123	0.305	*	0.045+-0.020	0.117+-0.030
AMA	0.353	0.306	0.427	0.209	0.358	0.130	0.252	0.069	0.183	*	0.018+-0.012
PEA	0.340	0.175	0.351	0.273	0.344	0.180	0.106	0.195	0.167	0.148	*

3.5. Análise de agrupamentos

O teste SAMOVA gerou dois tipos de agrupamentos a serem testados para a estruturação (Tabela 6; Figura 6). Esses agrupamentos foram informados ao programa de maneira a obter no máximo três grupos distintos, o que poderia condizer com as três subespécies descritas. Quando informado para o programa gerar 2 grupos (Tabela 6b), ele formou um grupo formado pelas amostras do PARNA Campos amazônicos (CAP) e PARNA do Mapinguari (MAP) e outro com o restante das amostras, o qual não apresentou valor significante de estruturação entre os grupos (p = 0,815+/- 0,012). Quando informado para o programa gerar três grupos ele formou um grupo com a população do Parque Estadual de Caldas Novas (PCN), outro que compreendia Uruguai (URU), PARNA da Chapada dos Veadeiros (CDP) e as amostras do SUL (CXR + TIS), também com um valor não significativo para a estruturação populacional entre grupos (p = 0,699+-0,011).

A distribuição das amostras de acordo com os grupos propostos pela análise de agrupamento realizada pelo pacote rhierBAPS, mostram 2 grupos formados (Figura 7) de acordo com a distância genética e geográfica. Observa-se uma distribuição homogênea das amostras, estando a maioria contemplada no grupo 1, o qual é composto por quatro subgrupos. As amostras pertencentes ao PARNA Serra da Canastra (SDC) formam um único subgrupo (1.3). O cluster 2 é formado pelas amostras pertencentes a região sul do pantanal (PAT), no entanto, há amostras do grupo 2 que são observadas no PARNA Emas (2.2). A localidade de

EMA apresenta amostras dos dois grupos formados (1 e 2), e também diferentes subgrupos dentro desse conjunto amostral.

Tabela 6. Análise de variância molecular realizada de acordo com os grupamentos gerados pelo teste SAMOVA. (a) 2 grupos de populações (GUA; EMA; PAT; URU; SDC; SUL; PCN; CAC; CDV; PEA) e (AMA); (b) 3 grupos de populações (PCN), (AMA; PAT; SDC; CAC; GUA; PEA; EMA) e (URU; CDV; SUL"). AMA = CAP + MAP; SUL = CXR + TIS. São apresentados os valores dos índices de fixação. O valor de p é significativo quando p<0,05.

Tipo da variação	Componentes da variação	Percentagem da variação	Índice de fixação (FST)
(a) Estruturação genética para 3 grupos gerados			
Entre grupos	-0.47868	-4.98	FCT = -0,04981 p = 0.699 +/- 0.011
Entre populações dentro de grupos	3.52169	36.65	FSC = 0,349 p = 0.000 +/- 0.000
Entre populações	6.56667	68.33	FST = 0,316 p = 0.000 +/- 0,000
(b) Estruturação genética para 2 grupos gerados			
Entre grupos	-1.88746	-22.72	FCT = -0,023 p = 0.815 +/- 0.012
Entre populações dentro de grupos	3.62768	43.67	FSC = 0,355 p = 0.000 +/- 0.000
Entre populações	6.56667	79.05	FST = 0,209 p = 0.000 +/- 0,000

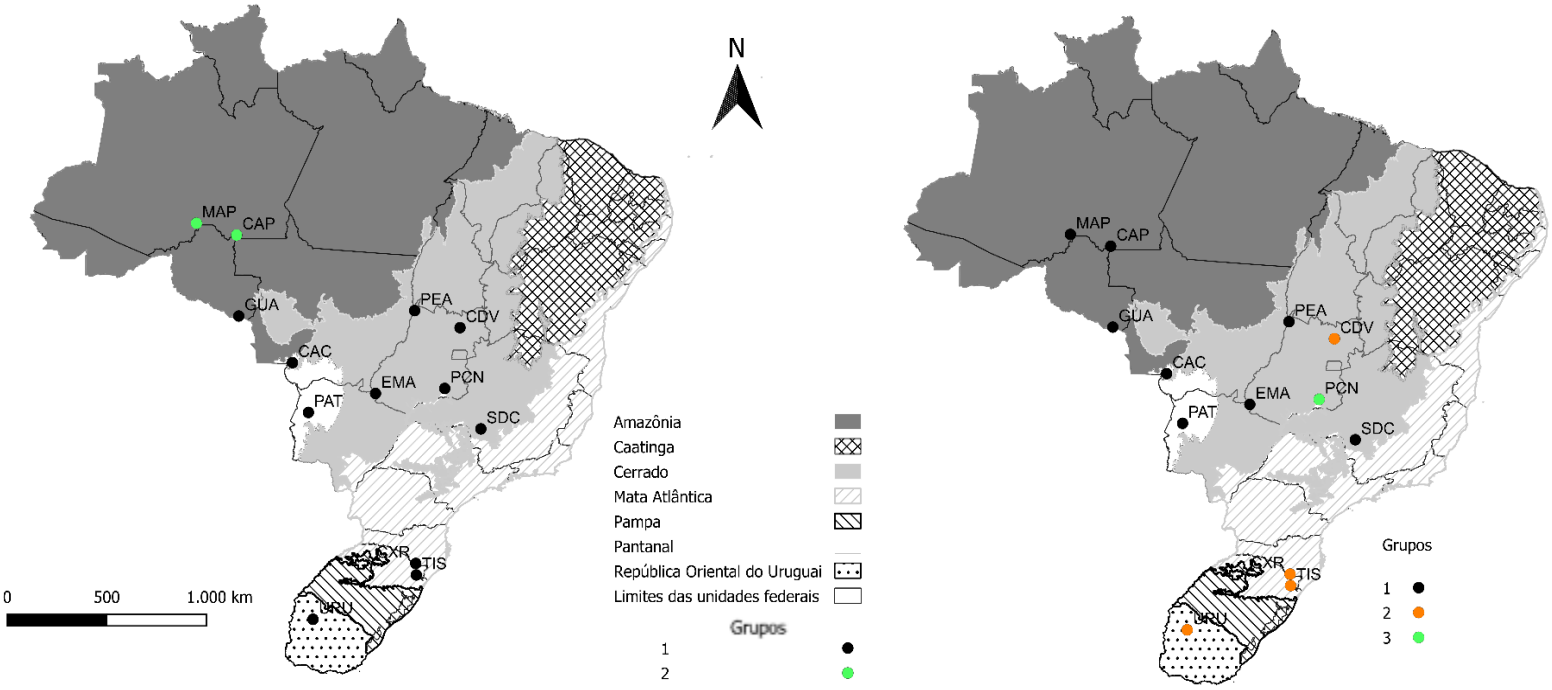


Figura 6. Representação geográfica dos agrupamentos gerados pela análise SAMOVA; a. 2 grupos de populações 1 = (GUA; EMA; PAT; URU; SDC; SUL; PCN; CAC; CDV; PEA) e 2 = (AMA); (b) 3 grupos de populações, 1 = (AMA; PAT; SDC; CAC; GUA; PEA; EMA); 2 = (URU; CDV; SUL"); 3 = (PCN), AMA = CAP + MAP; SUL = CXR + TIS

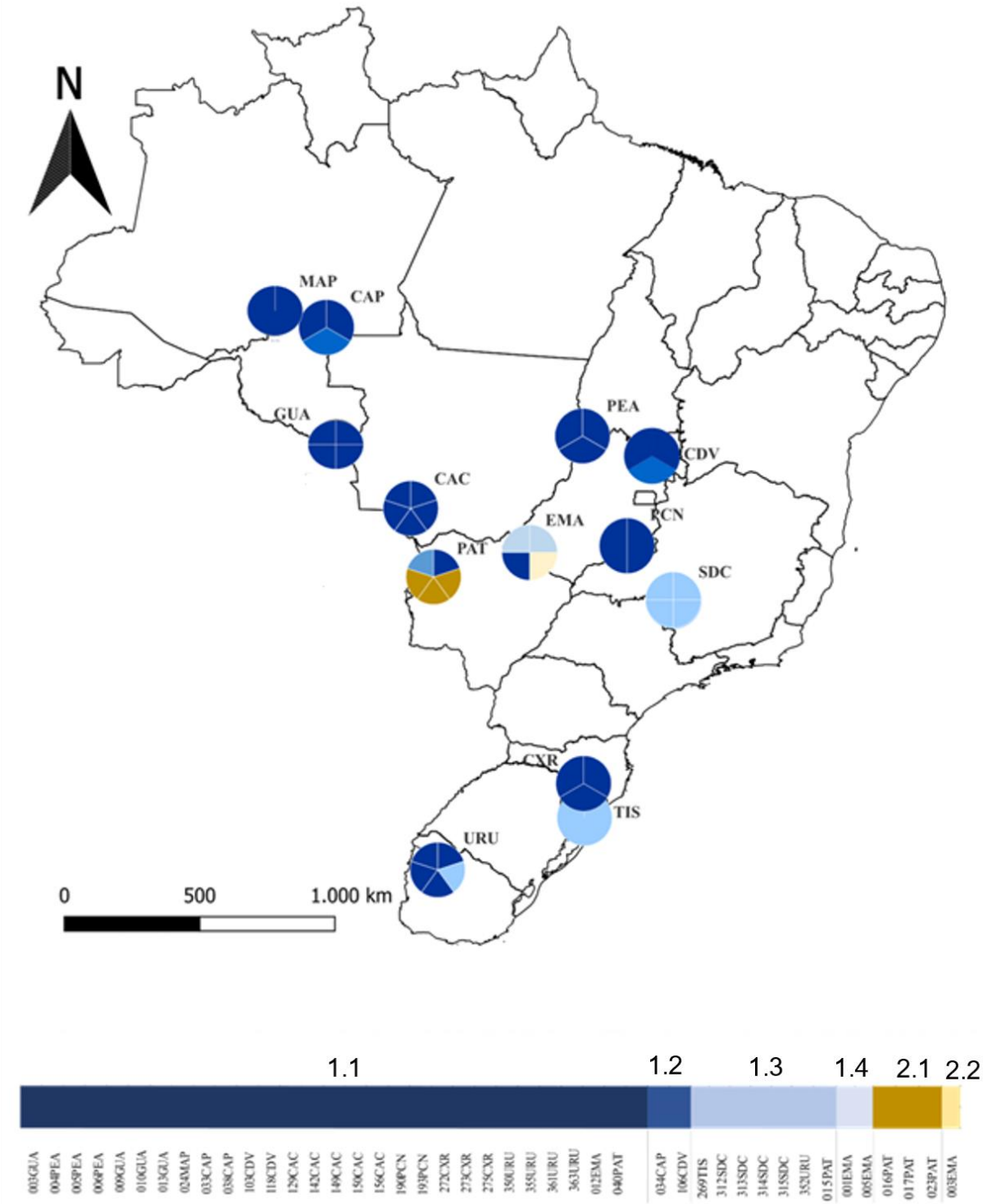


Figura 7. Distribuição geográficas dos grupos e subgrupos formados pela análise rhierBAPS. Os números 1 e 2 representam os grupos e subgrupos formados. As partições nos discos mostram o número de sequencias pertencentes a cada localidade e a qual grupo e subgrupo elas pertencem.

3.6. História evolutiva

As relações filogenéticas apresentadas para o conjunto amostral (Figura 8.a) amplo não evidenciam uma relação geográfica clara. Agrupamentos formados entre amostras com localidades próximas como é o caso de PAT e CAC que pertencem ao bioma pantanal, se apresentam distantes na árvore. Apenas o grupo formado pelas amostras pertencentes ao PARNA da Serra da Canastra possui monofilia, no entanto há um baixo valor de *bootstrap* (0,55) no ramo formado, o que fragiliza a composição do grupo.

Para a árvore construída apenas com as sequencias referentes as subespécies (PAT, EMA e URU) (Figura 8.b) os valores de *bootstraps* se mostram acima de 0,7 para a maioria dos ramos, indicando uma maior coesão da árvore. Ainda é possível identificar grupos formados pela regionalização das amostras de acordo com a localidade de origem. As sequências do Uruguai (URU), relacionadas a *O. b. arerunguaensis* são posicionadas mais distantes em relação a sequência de *O. B. Leucogaster* (PAT).

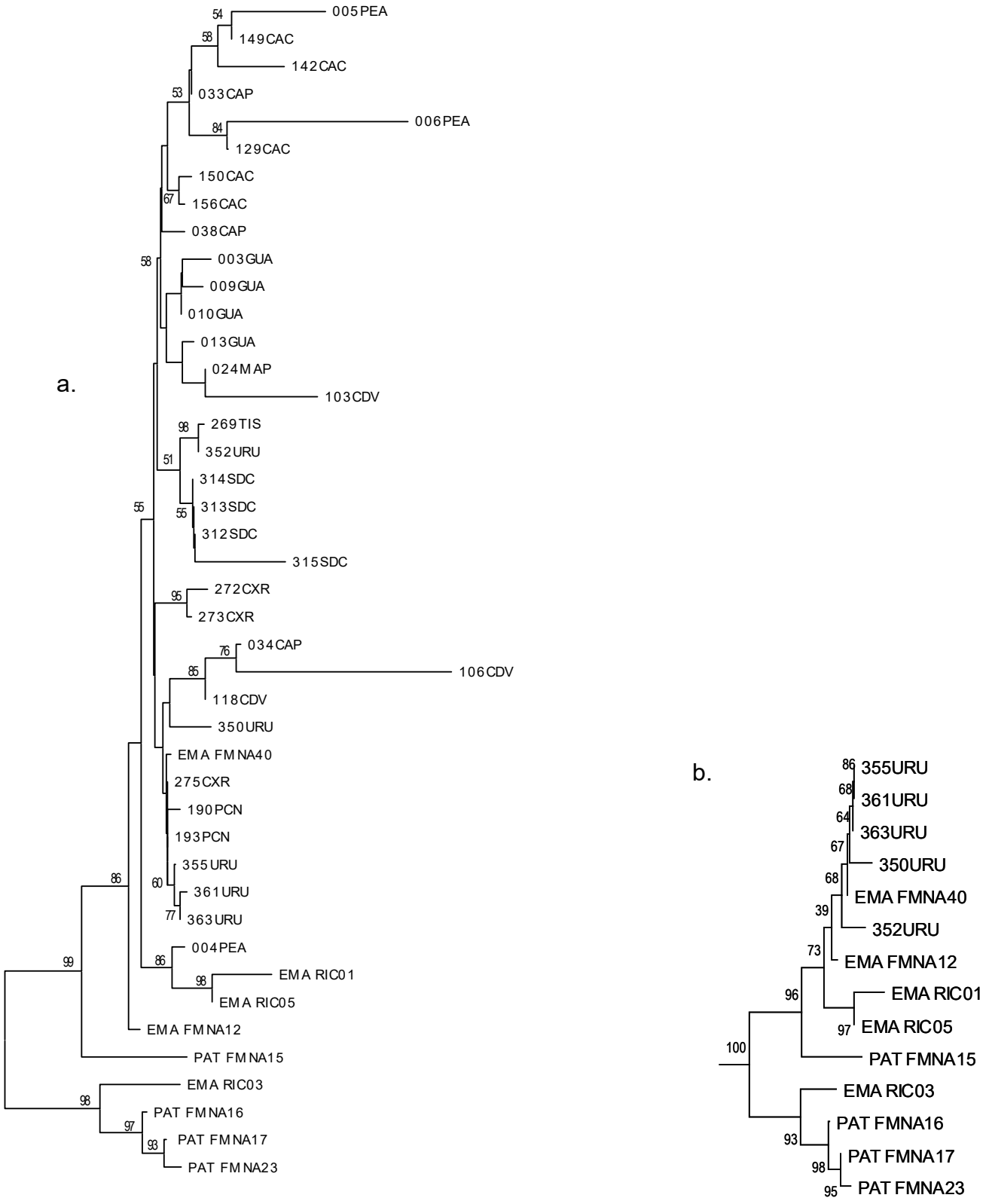


Figura 8. Árvore filogenética construída a partir do método de Neighbor-Joining para as sequencias totais (a) (n = 43) e para as sequencias do Pantanal (PAT), PARNA Ema (EMA) e Uruguai (URU) (b) (n = 14). A numeração na frente das amostras indica o número voucher referente ao anexo I. A porcentagem de réplicas é apresentada nos ramos das árvores a partir de um valor de bootstrap de 10 000. A árvore é apresentada em escala com o tamanho dos ramos correspondente as distâncias evolutivas entre as sequencias; (a) As distâncias foram modeladas com a utilização do modelo Tamura 3-parameter. A taxa de variação entre os sites foi modelada pela distribuição gamma (0,73). A análise envolveu 46 sequencias de nucleotídeos, sendo três destas (Mgb 386 e 389; Bdp 224) utilizadas para o enraizamento e não estão mostradas na figura final. Todas as posições com menos de 75% de cobertura foram excluídas (deleção parcial) perfazendo um total de 756 sitios utilizados na análise final desenvolvida pelo software MEGA11.

3.7. Teste de Mantel

A hipótese de isolamento por distância aferida pelo teste de Mantel mostra que quando colocamos em um mesmo cenário todo o conjunto amostral (Tabela 7) (r = 0,172 e p = 0.987), ou apenas as amostras restritas (r = 0,112 e p = 0.125), o teste não mostra um valor significativo (Tabela 7) para a correlação entre distância genética e distância geográfica. No entanto, quando colocamos a população do Uruguai em comparação com as populações do Pantanal, PARNA de Emas e Guaporé é mostrada uma correlação significativa e positiva. Sendo a maior correlação entre Pantanal e Uruguai (r = 0,785 e p = 0,007). As populações do Pantanal e PARNA Emas também não apresentam valores significativos para o teste.

Tabela 7. Teste de correlação entre distância genética e distância geográfica com o coeficiente de correlação de Pearson (r) e o valor de significância (p).

População	r	p
Total	-0.172	0.987
URU, PAT e EMA	0.112	0.125
URU e PAT	0.785	0.007
URU e EMA	0.153	0.012
PAT e EMA	0.259	0.077
URU e GUA	0.489	0.014

4. Discussão

O Veado-campeiro é uma espécie que possui ampla distribuição por áreas abertas sul-americanas. Apesar da continuidade e conectividade dessas áreas, sua história filogeográfica mostra indícios de expansão demográfica recente devido a sua alta variabilidade genética. Sob isolamento por distancia o alelo derivado deve ser localizado geograficamente onde o alelo ancestral será menos frequente. Isto porque, com fluxo gênico restrito, novos alelos não têm tempo para se espalhar. Esse padrão não é esperado em condição de expansão (Templeton, 1998). Algumas localidades apresentam indícios de estruturação e devem ter atenção no que diz respeito ao manejo conservacionista, como é o caso da Serra da Canastra, regiões do Pantanal sul e norte, e Uruguai.

4.1. Diversidade genética

O Veado-campeiro possui altos índices de diversidade genética tanto para as sequências analisadas de maneira concatenada quanto para os fragmentos individuais (Tabela 1). Essa alta diversidade já foi observada para a região controle (Gonzalez, 1998) onde em 53 amostras distribuídas em seis localidades distantes geograficamente (Brasil, Argentina e Uruguai) apresentaram um número total de 43 haplótipos e diversidade nucleotídica que variou de 0,011 a 0,025, similar ao valor de 0,023 encontrado para o presente estudo. O Dloop se apresenta como a região mais variável para o Veado-campeiro quando comparamos as populações do Pantanal e PARNA Emas, no entanto sua utilização para estudos filogenéticos deve ser considerada com cautela, uma vez que seus valores de saturação para transições resultam em uma homoplasia filogenética o que pode enviesar as análises (Leandro *et al*, 2022).

Braga (2005) também encontrou novos haplótipos para os fragmentos de CytB e Dloop para a maior população existente no estado do Paraná. Para outros marcadores moleculares como os microssatélites, foi possível identificar uma alta diversidade genética para a população do Pantanal pertencente a região da Nhecolândia (Mantellato, 2017).

A alta variabilidade pode estar associada a um passado onde existiam mais de 3 milhões de Veados-campeiros, um número mais de dez vezes maior se comparado com as estimativas existentes (González *et al*., 1998;1994). Com isso, os índices de diversidade genética observados atualmente são reflexo de uma expansão demográfica recente e rápida das populações derivadas do ancestral comum mais recente da espécie, a qual está fortemente associada as formações de áreas de campos abertos que remontam do pleistoceno há mais de 2 milhões de anos (Gonzalez 1998;2020).

4.2. Padrão demográfico e teste de neutralidade

De modo geral, é possível compreender que as populações de Veado-campeiro não se encontram em expansão demográfica, uma vez que o padrão para a análise de distribuição par-a-par é apresentado em um gráfico multimodal (Figura 4). Esse resultado também pode ser observado pelo fato da rede haplotípica não apresentar haplogrupos definidos por regionalizações, como foi

observado em outros trabalhos que possuem estruturação genética bem definida (Hajji., *et al*., 1998; Wiehler; Tiedemann, 1998; Mahmut *et al*, 2002; Moscarella *et al*., 2003; Márquez *et al*., 2006; Zachos *et al*., 2006; Skog *et al*., 2009; Doan *et al*., 2017; Frank *et al*., 2021; Mackiewicz *et al*., 2022). O teste D de Tajima não apresentou valor significativo para p<0,05 enquanto Fs de Fu apresentaram valores significativos e negativos, -2,529 ($p < 0.05$), o que pode ser indicativo de seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional (Tajima,1989; Fu, 1997). Nesse caso, como outros dados mostram uma tendência de estabilização demográfica da população, a hipótese de seleção purificadora parece ser mais adequada aos resultados observados, ao passo em que atua eliminando haplótipos menos frequentes na população do longo do tempo.

4.3. Padrões filogeográficos

A espécie *Ozotoceros bezoarticus* possui uma divisão em cinco subespécies definidas pela sua localização, dados morfológicos (Cabrera, 943; Gonzalez *et al*., 2002) e moleculares (Gonzalez, 1998), sendo estes baseados em um fragmento da região controle de 423 pb. Esta descrição se limita a seis localidades distantes, PARNA Emas, Pantanal região da Nhecolândia, El tapado e Sierra de Los Ajos, Uruguai, e Bahía de Samborobón e San Luís, argentina. Não há até o presente trabalho um estudo que utilizou diferentes marcadores e novas localidades para o entendimento da distribuição da espécie. Para tal, algumas análises presentes neste trabalho foram conduzidas de maneira a comparar os padrões já estabelecidos com as novas localidades amostradas.

Para o teste AMOVA (Tabela 4), existe estruturação tanto para a população ampla quanto para apenas as populações restritas, ambos os cenários apresentam um alto índice de FST (0,33 e 0,31 respectivamente) mostrando forte estruturação (Hartl;Clark, 2010).

A rede haplotípica construída apenas com as amostras restritas (URU, PAT e EMA) remonta uma estrutura muito semelhante a apresentada por Gonzalez (1998), com um haplogrupo formado apenas pelas amostras de *O. b. Arerunguaensis* e outros dois haplogrupos bem definidos formados pelas

amostras do PARNA Emas, consideradas como *O. b. bezoarticus*, e Pantanal região da Nhecolândia, *O. b. Leucogaster* (Figura 5b.). Contudo, quando inserimos todo o conjunto amostral (Figura 5a.) não é possível definir um padrão claro que dívida as três subespécies juntamente com as outras amostras.

A população de EMA apresenta uma de suas sequencias junto com um haplogrupo formado por URU, PCN, PAT e CXR, o que não possui sentido geográfico uma vez que são localidades distantes entre si. O mesmo acontece com a população PAT e URU que não aparecem formando haplogrupos coesos geograficamente.

Outro fato a ser notado é que existem duas populações pertencentes a região do Pantanal que não ficam conectadas na rede e não aparecem juntas na árvore de filogenética, ficando em clados opostos (Figura 7). De uma forma geral, a rede haplotípica conecta populações que não possuem proximidade geográfica, o que impossibilita encontrar algum padrão para o conjunto amostral amplo. Algumas populações se apresentam coesas entre si, como é o caso da SDC, GUA, CDV e CAC. Essa coesão pode estar estar associado a grande população e troca genômica no passado, visto que isso é diferente para as amostras que estão nos extremos das redes de haplótipos e aquelas que se agrupam em fortes boostraps.

A árvore filogenética com a amostragem ampla e amostragem restrita (Figura 8a e 8b) não recuperam a monofilia para as populações EMA, PAT e URU. Esse fato poderia estar relacionado a utilização de marcadores mitocondriais construídos a partir de pequenos fragmentos, e que, portanto, não possuem sinal filogenético suficiente para suportar os clados formados, gerando ruídos na análise e agrupando sequencias com correlações geográficas espúrias. Mas mesmo quando são utilizados outros marcadores, como o ND5 e o COII, com fragmentos maiores, chegando até 1973 pb (Leandro *et al*, 2022) as relações filogenéticas apresentadas não recuperam a monofilia sugerida para Pantanal e PARNA Emas.

Foram realizados alguns testes sem definição de grupos *a priori* para averiguar se havia algum indício de estruturação para as sequencias

baseando-se em distâncias genéticas. A análise de rhierBaps (Figura 7) recuperou um grupo homogêneo com quase todas as localidades à exceção de SDC, a única população a formar um grupo diferente dos outros, indicando assim uma unicidade para o fragmento.

Outro teste que confirma o resultado da análise de rhierBaps é o SAMOVA, que utiliza a localização geográfica e a distância genética para sugerir possíveis agrupamentos de acordo com o número de grupos que inserimos nos parâmetros da análise. A tabela 6 mostra os agrupamentos sugeridos e seu teste de estruturação. Tanto para dois grupos, quanto para três grupos existe significância do teste para a estruturação entre populações dentro de grupos e entre populações apenas, porém os valores dos índices de fixação também são baixos, variando de 0,209 até 0,349. Não houve significância para os testes entre grupos apenas. É Importante ressaltar que os grupos são formados pelas populações, então, o grupo de populações que poderia formar determinada subespécie não apresentou valor significativo.

Os grupos sugeridos pelo teste também não apresentam coerência geográfica com o que conhecemos da espécie até o momento. Quando o teste é realizado para dois grupos (Figura 6 a), um grupo é formado apenas pelas amostras definidas como AMA (CAP + MAP) e o outro grupo pelo restante das amostras. Com três grupos (Figura 6b.) é colocado junto a populações da região Sul (TIS + CXR + URU) a população da Chapada dos Veadeiros (CDV), e formando um grupo isolado a população do Parque estadual de Caldas Novas (PCN).

De acordo com o proposto pela literatura até o momento (Cabrera 1943; Gonzalez *et al*., 1998; 2002) deveríamos observar uma estruturação entre a região do Pantanal, o Cerrado e a região sul, abrangendo a área do Pampa, e desta maneira, as novas localidades amostradas poderiam estar inseridas em alguns desses grupos. No entanto isso não é mostrado em nosso conjunto de dados amplos, indicando que quando observamos regiões mais conservadas do DNA mitocondrial a estruturação genética da espécie é fragilizada.

A hipótese de que a estruturação da espécie poderia ter ocorrido por isolamento por distância não é corroborada quando analisamos o conjunto amostral ampla (Tabela 7) onde não há significância para a correlação entre distância genética e distância geográfica. Quando as amostras restritas são analisadas também não há significância para a correlação, porém neste caso, as populações de EMAS e Pantanal podem estar enviesando a análise. Quando analisamos isoladamente a correlação separada entre PAT e URU; EMA e URU, em ambos os casos temos uma correlação positiva com $p<0,05$ (Tabela 7). Também é positiva e significativa quando analisamos a correlação entre URU e GUA, No entanto essa mesma relação não é observada entre PAT e EMA, mesmo sendo classificadas como subespécies diferentes. Rodrigues *et al*. (2007), utilizando a técnica de RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) não encontrou estruturação entre as populações do Pantanal e do PARNA Emas corroborando nossos dados.

Os dados apresentados neste trabalho tendem a se comportar como uma clina genética. O tamanho da escala de variação genética ao longo da distribuição da espécie implica em um equilíbrio das frequências haplotípicas, impedindo a determinação de um padrão geográfico para este conjunto de dados. As populações não respondem às variações ambientais locais, a não ser que estas exerçam uma forte pressão seletiva. Quando possuímos uma escala de variação no ambiente muito grande as populações podem apresentar variações locais, porém há a formação de uma clina genética entre as diferentes populações. Dessa forma o resultado da variação genética é consequência da distância geográfica média entre duas populações e não das pressões de cada ambiente (Slatikin, 1973).

Para outras espécies de ampla ocorrência, como o Tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) por exemplo, também não é observado uma estruturação entre populações do Cerrado e do Pantanal, uma vez que a estrutura para esta espécie ocorre entre Cerrado/Pantanal em relação a Amazônia (Clozato, 2017).

Portanto, é esperado que ao analisar apenas populações com relativa distância genética, sem as populações conectivas entre elas, ocorra uma estruturação entre populações, no entanto, quando são adicionadas mais

populações o padrão geral da espécie tende a se apresentar de forma a não estruturação em decorrência de um contínuo de dispersão geográfica.

4.4. Unidades evolutivas significativas e áreas prioritárias para a conservação

Com base na definição trazida por Moritz (1994), que leva em consideração a monofilia recíproca dentro de um grupo definido *a priori*, podemos considerar o PARNA Serra da Canastra-MG como uma ESU, no entanto mesmo esse grupo possui um baixo valor de bootstrap (55) que suporta sua monofilia.

Para fins de manejo, populações distantes geograficamente como URU e GUA, ou URU e PAT, por exemplo, devem ser evitadas de ser colocadas em contato, uma vez que isoladamente elas possuem diferenças genéticas devido à distância geográfica. Dessa maneira, é indicado para possíveis trabalhos que envolvam reintrodução de populações que seja priorizada aquelas com a menor distância geográfica e que possuam uma grande variabilidade genética.

5. Conclusão

Este é o primeiro estudo que utiliza uma ampla amostragem de populações de Veado-campeiro ao longo de sua distribuição atual, e propõe um entendimento de como o padrão filogeográfico da espécie é expresso em outras regiões do DNA mitocondrial que não a região controle.

Nossos dados mostram uma população em equilíbrio demográfico que possui alta variabilidade genética. Esta variabilidade está distribuída pelas suas populações relictuais em forma de clina genética. O que torna uma população homogênea geneticamente, mas com diferenças devido a distância genética

Para que a compreensão da espécie seja aprimorada se faz necessária uma amostragem ainda maior, abrangendo Paraguai, Bolívia, Argentina e a população disjunta da Ilha do Marajó, Brasil. Junto a isso, a utilização de

mitogenomas para futuras análises pode eliminar vieses devido a utilização de pequenos fragmentos.

A utilização de informações vindas de DNA nuclear, como a utilização de SNPs, ou mesmo um conjunto robusto de marcadores microssatélites indica o próximo passo para a composição de dados que possam entender a história genética recente da espécie e como as ações antrópicas podem moldar o futuro da conservação do Veado-campeiro.

6. Referências bibliográficas

Bouckaert R, Vaughan TG, Barido-Sottani J, Duchêne S, Fourment M, Gavryushkina A, Heled J, Jones G, Kühnert D, Maio N, Matschiner M, Mendes FK, Müller NF, Ogilvie HA, Plessis L, Popinga A, Rambaut A, Rasmussen D, Siveroni I, Suchard MA, Wu C-H, Xie D, Zhang C, Stadler T, Drummond AJ (2019) BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. **PLoS computational biology**. 15: 4.

Braga FG, González S, Maldonado JE (2005) Characterization of the genetic variability of Pampas deer in the state of Paraná. **Deer specialist group News**, 20.

Cabrera, A. (1943) Sobre la sistemática del venado y su variación individual y geográfica**. Revista del Museo de la Plata (NS)**, 18: 5-41.

Clement M, Posada D, Crandall, KA (2000) TCS: a computer program to estimate gene genealogies. **Mollecular Ecology**, Oxford, 9 (10): 1657-1660.

Cosse M, González S, Maldonado JE (2007) Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Genetics and Molecular Research**. 6 (4): 1118-1122.

Darriba D, Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nat Methods**. 9:772.

Doan K, Zachos FE, Wilkens B, Vigne JD, Piotrowska N, Stanković A, Niedziałkowska, M (2017) Phylogeography of the Tyrrhenian red deer (*Cervus elaphus corsicanus*) resolved using ancient DNA of radiocarbon-dated subfossils. **Scientific Reports**, 7:1. doi:10.1038/s41598-017-02359-y

Duarte JMB, Gonzalez S, Maldonado J (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 49: 17-22.

Excoffier L, Lischer, HEL (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology** Resources, Oxford, 10: 564-567.

Frank K, Szepesi K, Bleier N, Sugár L, Kusza S, Barta E, Horn P, Orosz P, Stéger V (2022) Genetic traces of dispersal and admixture in red deer (*Cervus elaphus*) populations from the Carpathian Basin. **European Journal of Wildlife Research**, 68-55.

Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. **Genetics**, Austin, 147:915–925.

Gernhard T, Hartmann K, Steel M (2008) Stochastic properties of generalised Yule models,with biodiversity applications. **Journal of Mathematical Biology**. 57(5) 713-35.

Gonzalez S, Álvarez-Valin F, Maldonado JE (2002) Morphometric differentiation of endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with description of new subspecies from Uruguay. **Journal of mammalogy**, 83(4): 1127-1140.

González S, Maldonado JE, Leonard JA, Vilà C, Duarte JMB, Merino M, Brum-Zorrilla, N, Wayne RK (1998) Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Molecular Ecology**, 7:47–56.

González S, Maldonado JE, Ortega J, Talarico AC, Bidegaraybatista L, Garcia JE, Duarte JMB (2009) Identification of the emdangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, 9: 754-758.

Gutiérrez EE, Helgen KM, Mcdonough MM, Bauer F, Hawkins MTR, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, Maldonado JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: The importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** 697:87–131.

Hajji GM, Charfi-Cheikrouha F, LorenzinI R *et al*. (2008) Phylogeography and founder effect of the endangered Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*). ***Biodivers Conserv*** 17:659–673.

Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Van Vuuren BJ, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (2012). Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus. Biologies**, 335:32–50.

Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rössner GE (2016) Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ** 4:e2307.

Hmwe SS, Zachos FE, Eckert I, Lorenzini R, Fico R, Hartl GB (2006) Conservation genetics of the endangered red deer from Sardinia and Mesola with further remarks on the phylogeography of Cervus elaphus corsicanus. **Biological Journal of the Linnean Society,** 88: 691–701.

Leandro SFS, Carnelossi EAG, Peres PHF, Ribeiro RC, Duarte JMB (2022) Definition of mtDNA Markers for Studies in Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) based On Fecal Samples. **Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences** 9 (5) 01-08, October.

Lorenzini R, José CS, Braza F, Aragón S (2003) Genetic differentiation and phylogeography of roe deer in Spain, as suggested by mitochondrial DNA and microsatellite analysis. **Italian Journal of Zoology**. 70:89-99.

Ludt CJ, Schroeder W, Rottmanm O, Kuehn R (2004) Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 31: 1064–1083.

Mackiewicz P, Matosiuk M, Świsłocka M, Zachos FE, Hajji, GM, Saveljev AP, Seryodkin IV, Farahvash T, Rezaei HR, Torshizi RV, Mattioli S, Ratkiewicz M (2022) Phylogeny and evolution of the genus Cervus (Cervidae, Mammalia) as revealed by complete mitochondrial genomes. **Scientific Reports,** 12: 16381.

Mantellatto AMB, Caparroz R, Christofoletti MD, Piovezan U, Duarte JMB (2017). Genetic diversity of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) population in the Brazilian Pantanal assessed by combining fresh fecal DNA analysis and a set of heterologous microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, 40(4): 774-780.

Mahmut H, Masuda R, Onuma M, Takahashi M, Nagata J, Suzuki M, Ohtaishi N (2002) Molecular Phylogeography of the Red Deer (*Cervus elaphus*) Populations in Xinjiang of China: Comparison with other Asian, European, and North American Populations. **Zoological Science**, 19 (4): 485–495 doi:10.2108/zsj.19.485

Marquez A, Maldonado JE, Gonzalez S, Beccaceci MD, Garcia JE, Duarte JMB (2006) Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered Marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. **conservation Genetics**, 7:563–575.

Moscarella RA, Aguilera M, Escalante AA (2003) Phylogeography, population structure, and Implications for conservation of white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*) in Venezuela. **Journal of Mammalogy**, 84 (4): 1300–1315.

Moreno F, Figueiro G, Mannise N, Iriarte A, González S, Duarte JMB, Cosse M (2016) Use of next-generation molecular tools in archaeological neotropical deer sample analysis. **Journal of Archaeological Science: Reports**. 10: 403-410.

Moritz C (1994) Defining 'Evolutionary Significant Units' for consrvation. **Trends in Ecology & Evolution**, 9: (10) 373-375.

Morrone, J. (2014) Regionalisation of the neotropics. **Zootaxa,** 1: 001–110.

Mullins KB, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chaptalized chain reaction**. Methods of enzymology**, Maryland Heights, 155: 335-348.

Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population. **Genetics**, Austin, 129: 555-562.

Souza JN, Oliveira ML, Duarte JMB (2013) A PCR/RFLP methodology to identify non-Amazonian Brazilian deer species. **Conservation Genetics Resources**, 5 (3): 639-641.

R Core Team. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Austria, 2020. URL **https://www.R-project.org/**

Randi E, Alves PC, Carranza J, Miloševic-Zlatanovic´ S, Sfougaris A, Mucci N (2004) Phylogeography of roe deer (*Capreolus capreolus*) populations: the effects of historical genetic subdivisions and recent nonequilibrium dynamics. **Molecular Ecology,** 13: 3071–3083.

Raimondi VB, Maruyama Mori G, Piedrabuena MR, Wolfenson L, Mirol P (2012). Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci from the endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Cervidae). **Conservation Genet Resour.** 4:1089-1092.

Rambaut A, Drummond AJ, Xie D, Baele G, Suchard MA (2018) Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7. **Systematic Biology**.

Rodrigues FHG, Monteiro-Filho ELA (2000) Home range and activity patterns of pampas deer in emas national park, Brazil. **Journal of Mammalogy**, 81 (4) 1136-1142.

Rozas J, Ferrer-Mata A, Sánchez-Delbarrio JC, Guirao-Rico S, Librado P, Ramos-Onsins SE, Sánchez-Gracia A. (2017) DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Datasets. **Mol. Biol. Evol**. 34:3299-3302. DOI: 10.1093/molbev/msx248

Skog A, Zachos FE, Rueness EK, Feulner PGD, Mysterud, A, Langvatn R, Lorenzini R, Hmwe SS, Lehoczky I, Hartl GBNC, Stenseth NC, Jakobsen KS (2009) Phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*) in Europe. **Journal of Biogeography**, 36:66–77.

Rodrigues FHG, Monteiro-Filho ELA (2000) Home range and activity patterns of pampas deer in emas national park, Brazil. **Journal of Mammalogy**, 81 (4): 1136-1142, 2000.

Tajima F (1989) Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, Austin, 123:585–595.

Tamura K, Stecher G, Kumar S (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution** 38:3022-3027.

Tomás WM, Mcshea W, Miranda GHB., Moreira JR, Mourão G, Lima Borges, PAA (2001) Survey of a pampas deer, *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* (Arctiodactyla, Cervidae), population in the Pantanal wetland, Brazil, using the distance sampling technique. **Animal Biodiversity and Conservation**, 24(1): 101–106.

Vila AR, Beade MS, Lamunière DB (2008) Home range and habitat selection of pampas deer. **Journal of Zoology**, 276:95–102.

Weber, M.; Gonzalez, S. (2003) Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. **Écoscience**, 10 (4) 443-454.

Wiehler J, Tiedemann R (1998) Phylogeography of the European roe deer *Capreolus capreolus* as revealed by sequence analysis of the mitochondrial Control Region. **Acta Theriologica**, Suppl. 5:187-197.

QGIS.org, v.3.28. QGIS Geographic Information System. QGIS Association. http://www.qgis.org

Wright, S. (1978) Evolution and the Genetics of Populations. Vol. 4. **Variability within and among Natural Populations.** University of Chicago Press, Chicago.

CAPÍTULO 3 - Distribuição e influência das transformações de campos naturais na conservação do Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* LINNAEU, 1758)

Resumo

O Veado campeiro é uma espécie que possui ampla distribuição pela região sul-americana, estando presente desde o sul amazônico até o norte da Argentina ocupando regiões de formações de vegetações abertas. É uma espécie gregária e de hábitos diurnos, sendo de fácil visualização onde ocorre. O presente trabalho se propôs a realizar a modelagem de nicho ecológico da espécie, prospectando áreas com a maior probabilidade de ocorrência da espécie baseando-se em variáveis climáticas. Após esse procedimento foram investigadas através de um conjunto de dados publicados na colação 7 do instituto MapBiomas, a alteração do uso do solo nas áreas adequadas para a espécie entre o período de 1985 e 2021. As áreas com a maior probabilidade de ocorrência da espécie foram o Leste do Tocantins, Pantanal e Pampa. O bioma Pampa foi a área que sofreu a maior perda proporcional de campos naturais nesse período. Mais de 90% da substituição das áreas naturais de campo ocorreu pelo avanço agropecuário, sendo, 50% desse avanço atribuído ao plantio de Soja. Não é claro na literatura como a espécie se adapta a essas modificações, o que deixa cenário abertos para futuras pesquisas que envolvam o uso de habitat da espécie em escala local.

Palavras chaves: *Ozotoceros bezoarticus*; soja; Pantanal; Pampa; Cerrado; Agropecuária.

Abstract

The pampas deer is a species that present a wide distribution along the South America, occurring from the southern Amazon to the north of Argentina, and occupying open vegetation areas. It is a gregarious species with diurnal habits, being easy to see where it occurs. This work aimed to perform the ecological niche modeling, prospecting areas with higher probabilities of occurrence, based on climatic variables and on the intersection of the model with areas of natural grasslands. After this, we investigate how the changes in the land use occurred between 1985 and 2021, based on data published by MapBiomas institute. The areas with the highest probabilities of species occurrence were eastern Tocantins, Pantanal, and Pampa. The Pampa biome is the area that suffered the highest proportional loss of natural open grassland in the period. More than 90% of the replacement of natural field areas was due to agricultural advances, with 50% of this advance attributed to the planting of Soy. It is not clear in the literature how the species adapts to these modifications, which leaves the scenario open for future research involving the use of the species' habitat on a local scale.

Key words*: Ozotoceros bezoarticus*; soybean; Pantanal; Pampa; Brazilian savana agriculture and livestock.

1. Introdução

Áreas de campos naturais e savanas cobrem aproximadamente 40% do território mundial e, no Brasil, pouco mais de 1,5 milhões de Km² são compostos por formações desses tipos, o que representa aproximadamente 18% do território nacional (Gibson *et al*. 2009). Essas áreas são consideradas um importante tipo de *habitat* para ungulados de todo o mundo (Janis *et al*, 2000). As espécies desse grupo atuam como importantes modificadores de ecossistemas, diminuindo a incidência de grandes queimadas. Em relação a outras espécies, os ungulados contribuem no aumento de nitrogênio disponível no solo através da amônia e ureia solubilizada presente na urina e nas fezes. A urina e as fezes servem de substrato para atuação de decompositores que transformarão a ureia em amônia e posteriormente nitrato, disponibilizando o nitrogênio para os vegetais criando assim uma heterogeneidade espacial e modulando o processo de sucessão ecológica (Hobbs, 1996).

Os veados e os cervos, como são conhecidos popularmente, são ungulados e fazem parte da família Cervidae (Gray, 1872), uma das mais diversas famílias dentro do grupo dos mamíferos, possuindo cerca de 60 espécies dispersas pelo mundo (Wilson; Reeder, 2005). Dentro da região neotropical, foram descritos, até o momento, seis gêneros e 17 espécies de cervídeos (Weber; Gonzalez, 2003; Gutierrez *et al*., 2015; Ludovério, 2018).

O Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*, LINNAEUS, 1758) é um cervídeo neotropical encontrado exclusivamente em fitofisionomias de formações abertas, compreendidas entre as latitudes 4º e 41ºS, como o Cerrado (exceto Cerradões), o Pampa e o Pantanal no Brasil (Cabrera, 1943; Gonzalez *et al*., 2010; Zucco, 2015). Seu período de atividade é diurno, podendo ser avistado com certa facilidade nos ambientes em que habita, uma vez que mesmo com altas temperaturas a espécie fica nas áreas abertas e não onde há cobertura arbórea (Zucco, 2015). Possui tamanho médio, variando de 1,20 a 1,50 metro de comprimento e 0,7 a 0,75 metro de altura, com peso entre 30 e 40 Kg (Gimenez-Dixon, 1986; Gonzalez *et al*., 2010).

A espécie é seletiva em relação a sua alimentação, preferindo brotos, folhas e flores mais tenras, que sejam de fácil digestão e alto valor energético, sendo considerado um animal podador-pastador que procura ativamente e

continuamente seu alimento (Mcarthur; Pianka, 1966; Rodrigues, 1996; Duarte *et al*., 2012). Apesar de ser seletivo em relação ao seu alimento, o Veado-campeiro possui plasticidade para se adaptar às condições do meio onde está inserido, podendo variar sua dieta escolhendo plantas que, geralmente, não são suas preferências em condições de ampla variedade de alimento (Cosse, 2001).

Atualmente, estão descritas cinco subespécies de Veado-campeiro: (I) *O. b. arerunguaensis* e (II) *O. b. uruguayensis*, ambas identificadas no Uruguai (Gonzalez *et al*., 1998; 2002); (III) *O. b. celler*, que vive na região do pampa argentino, pé das cordilheiras dos Andes e Sul do Rio Negro; (IV) *O. b. leucogaster*, encontrado no sudoeste brasileiro, sudeste boliviano, norte da Argentina e Paraguai; e (V) *O. b. bezoarticus*, que vive desde o sul amazônico até a região do pantanal mato-grossense. Essas três últimas subespécies foram descritas por Cabrera (1943), baseando-se em dados morfológicos.

As maiores populações da espécie, no Brasil, são encontradas na região do Pantanal (Gonzalez *et al*., 2016) variando entre 20.000 e 40.000 indivíduos estimados, no entanto é projetado que para os próximos 15 anos essa população sofra uma redução de aproximadamente 30%. Essa redução pode estar relacionada a introdução de orbiviroses e a invasão de gramíneas exóticas, o que influenciaria na disponibilidade de alimentos com a qualidade exigida pela espécie.

Os eventos de incêndios devido as mudanças climáticas, expansão de áreas cultiváveis e pastagens tem aumentado nos últimos anos (Schmidt; Eloy, 2020; Silva *et al*., 2021; Filho *et al*., 2021). No Brasil estima-se que nas queimadas ocorridas no Pantanal entre 2019 e 2020, cerca de 16 952 000 de vertebrados de pequeno e médio porte tenham sidos mortos em decorrência dos incêndios (Tomas *et al*., preprint). Ainda não se sabe qual o comportamento dos veados em relação a grandes queimadas como essa pois não há uma contagem sistematizada específica para cervídeos, no entanto, a degradação de seu habitat pode demorar anos até que ocorra sua regeneração deixando estes animais em condições muito vulneráveis.

A perda de habitat foi um dos fatores que mais contribuíram para que este cervídeo se tornasse uma espécie ameaçada, visto que, de 1900 até o momento, essa área foi reduzida a apenas 1% de seu tamanho original (Weber; Gonzalez, 2003; Gonzalez *et al*., 2010). Com a perda de habitat, ocorre a fragmentação dos

remanescentes de áreas adequadas para a espécie, o que pode levar a problemas como a manutenção da viabilidade das populações relictuais devido a perda de conectividade e consequente interrupção de fluxo gênico.

O cerrado é um dos principais ambientes onde é encontrado o Veado-campeiro, sendo, mas também é um bioma dominado pela agricultura e pastagem, o que tornou este ambiente altamente fragmentado. Atualmente estima-se que restam apenas 48% da sua cobertura original, cujo 3,1% são encontrada dentro de unidade de proteção integral (Ganem, 2013). Esses altos índices de fragmentação são associados ao agrobuisness que vem aumentando suas áreas de cultivo de maneira desenfreada e ilegal nos últimos anos (Rajão *et al*. 2020). As culturas de soja no estado de Goiás têm contribuído para o maior aumento da fragmentação do Cerrado, pois as áreas cultiváveis são menores e mais fragmentadas em relação àquelas onde ocorrem as pastagens (Carvalho *et al*., 2009).

Para o Cerrado o modelo climático de distribuição da espécie sugerido por Lima (2020) prevê que a maioria dos habitats abertos com adequabilidade ocorre dentro de Terras indígenas, seguido de unidades de conservação de uso sustentável. No entanto, isso pode ser um problema para a conservação da espécie uma vez que conflitos políticos e a dificuldade no monitoramento das áreas de uso sustentável podem atrapalhar a execução de ações para a conservação da espécie.

Na região sul do Brasil, vem ocorrendo a conversão dos campos naturais, que historicamente possuem um sistema de criação de gado adaptado as pastagens naturais típicas do pampa, em plantações de soja, a qual ocupa 1,526,267 ha do Bioma, e outras culturas (Lima *et al*., 2019; Hazards; Waquil, 2020). Essa conversão de áreas naturais em agricultura tem fragilizado a conservação do bioma (Roesch, 2009). Ainda no sul do Brasil, tem ocorrido a invasão progressiva pela espécie *Axis axis*, conhecida como Chital, (Sponchiado *et al*., 2009; Preus *et al*., 2020; Foster *et al*., 2021), um cervídeo de grande porte de origem asiática, e que ainda não possuímos dados para entender como sua interação com as populações de cervídeos neotropicais pode afetar as espécies nativas.

Outras causas podem ser apontadas para o declínio populacional do Veado-Campeiro espécie em ambientes naturais, como a caça predatória e de

subsistência (Gonzalez *et al*., 2016). Estima-se que mais de 2 milhões de couros de veados neotropicais tenham sido exportados para a Europa entre 1860 e 1870 (Thornback; Jenkins, 1982). Além disso, a carne de veado tem sido uma das principais fontes de proteína para algumas comunidades rurais (Robinson; Bennett, 1999; Peres, 2000), o que, junto à prática da caça esportiva e às questões culturais associadas a cada região, também gera impactos negativos às populações de veados (Weber; Gonzalez, 2003).

Junto a isto, os atropelamentos em rodovias e dentro das lavouras e a transmissão de enfermidades por outros ungulados domésticos são fatores agravantes para a conservação da espécie (Weber; Gonzalez, 2003; Duarte *et al*., 2012; Morini *et al*, 2023).

Visto o avanço da agropecuária nos principais ambientes de ocorrência do Veado-campeiro é levantada a hipótese de que as conversões de campo natural em áreas de cultivo e pastagem estejam causando grande impacto dentro das áreas mais adequadas para a ocorrência da espécie no Brasil. Este trabalho possui o objetivo de avaliar os impactos que as mudanças na paisagem das últimas décadas tiveram na manutenção das populações de Veado-campeiro no Brasil, através da modelagem da distribuição passada e atual da espécie e a identificação do atual uso do solo nas áreas perdidas de potencial distribuição.

2. Material e métodos

2.1. Área de estudo

As áreas amostradas especificamente neste trabalho, através de coleta de amostras fecais em campo (n= 16), foram determinadas de acordo com ocorrência atual e passada do Veado-campeiro no Brasil. Elas estão associadas a formações vegetacionais abertas, compreendendo as fitofisionomias de Cerrado, Pampa, Pantanal e Campos do paraná. Foram obtidos 181 pontos de ocorrência da espécie distribuídos por cinco diferentes biomas (Figura 1).

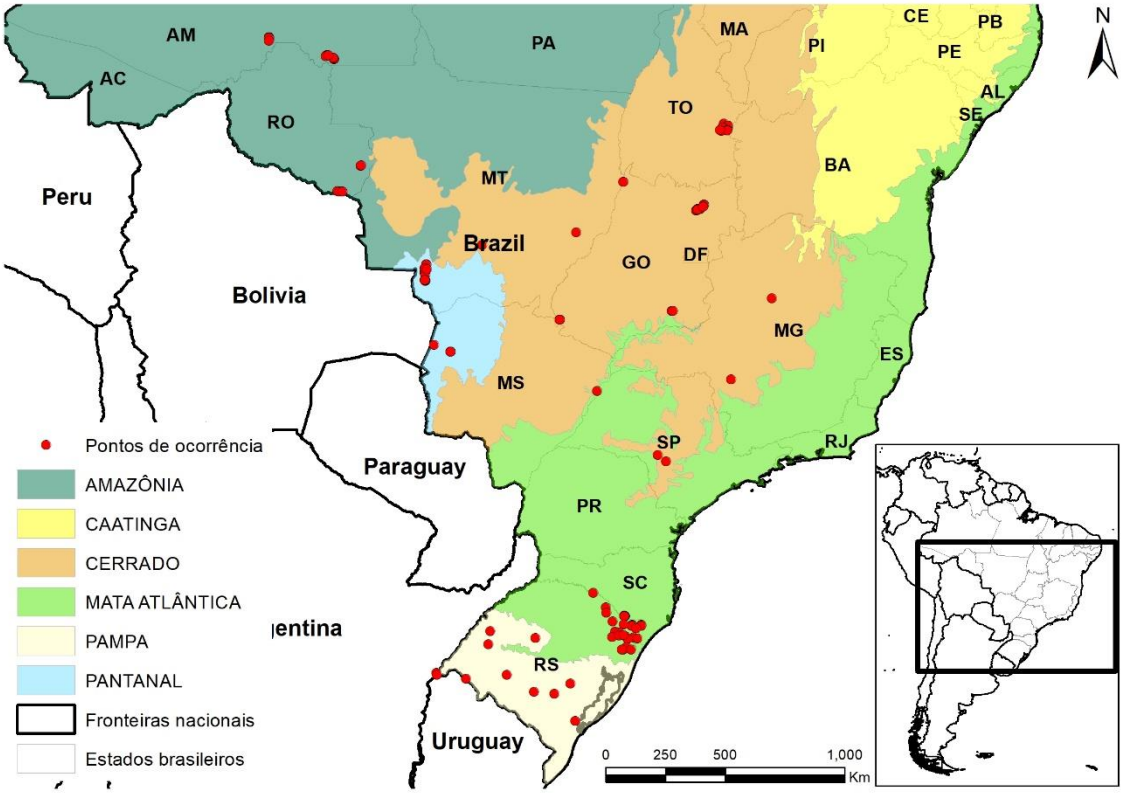


Figura 1. Distribuição dos pontos de ocorrência de veado-campeiro obtidos para o procedimento de modelagem e adequabilidade bioclimática com a divisão política do Brasil e as áreas de biomas.

Apesar da espécie ocorrer em outros países, o recorte amostral limitado ao Brasil foi necessário devido ao fato de que a base de dados do "Projeto MapBiomas – Coleção 7 da Série Anual de Mapas de Uso e Cobertura da Terra do Brasil" (http://mapbiomas.org, mapbio7, acesso em 04 de janeiro de 2023) (Souza *et al*., 2020) não apresentar dados de uso do solo de outros países.

2.2. Obtenção dos pontos amostrais

Os pontos utilizados para a modelagem de distribuição da espécie (Anexo I) são provenientes das campanhas de coleta de amostras fecais, obtidas com o auxílio de cão farejador, realizadas entre 2019 e 2022 pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), da coleta de fragmentos de ossos realizada no Museu de Zoologia da USP (MZUSP), São Paulo-SP, e no museu de História Natural do Capão da Imbuia (MHNCI), Curitiba-PR, dos dados fornecidos pela bióloga Dra. Fernana Góss Braga, Diretoria de Políticas Ambientais (DIPAM) de Curitiba-PR e provenientes do banco de amostras do NUPECCE, Jaboticabal-SP.

2.3. Extração, amplificação e identificação enzimática

Para a confirmação espécie-especifica das amostras fecais coletadas foi realizada a análise de fragmentos de restrição do gene mitocondrial Citocromo B (CytB). A extração do DNA total com a utilização do protocolo de sílica (Glenn *et al*., 1998) otimizado, e posterior amplificação do fragmento de 224 pares de bases (pb) do gene mitocondrial Citocromo B (CytB) por meio de PCR (Mullins; Faloona, 1987), com a utilização dos primers IDMAZ224 e IDMAZ H (Gonzalez *et al*., 2009). A padronização foi feita para um volume final de 30 µL (25µL de reagentes e 5 µL de DNA total extraído com concentração de aproximadamente 10 ng/ µL) contendo 1x buffer e 1,5U de DNA polymerase (Platinum™, Thermo Fisher Scientific), 2 mM $MgCl^2$, 0,6 mM dNTP, 1,3 mg/ml BSA e 0.5 pM de cada *primer*.

As reações de amplificação foram realizadas no termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler sob as seguintes condições: temperatura inicial de 94°C por 2 minutos (min.) seguidos por 45 ciclos de (1) 94°C por 1 min., (2) 94ºC por 50 segundos (seg.), (3) 58ºC por 50 seg., (4) 72ºC por 50 seg., (5) repetir a partir do passo (2) cinco vezes, (6) 94ºC por 50 segundos (seg.), (7) 57ºC por 50 seg., (8) 72ºC por 50 seg., (9) repetir a partir do passo (6) seis vezes, (10) 94ºC por 50 segundos (seg.), (11) 56ºC por 40 seg., (12) 72ºC por 50 seg., (13) repetir a partir do passo (10) oito vezes, (14) 94ºC por 50 segundos (seg.), (15) 55ºC por 30 seg., (16) 72ºC por 50 seg., (17) repetir a partir do passo (14) 13 vezes, (18) 94ºC por 50 segundos (seg.), (19) 54ºC por 30 seg., (20) 72ºC por 50 seg., (21) repetir a partir do passo (18) 13 vezes, (22) 72º por 10min para extensão final e (23) 4ºC para armazenamento.

Após a amplificação desta região, foi realizada a digestão enzimática com a enzima SspI (NewEnglandlab®), cujo padrão de visualização em gel de agarose na concentração de 2% (Gonzalez *et al*., 2009; Souza *et al*., 2013),

2.4. Individualização dos indivíduos

Após a identificação específica, as amostras foram individualizadas por um critério de espacialização levando em consideração a área de vida da espécie (Rodrigues; Monteiro-Filho, 2000; Tomas *et al*., 2001; Vilá *et al*., 2008). Para isso, foi utilizado um *buffer* com um raio de 2,5km no entorno de cada amostra com o

auxílio do programa QGis 3.28. Aquelas amostras que não obtiveram intersecção entre seus *buffers* foram consideradas como sendo amostras pertencentes a indivíduos diferentes.

2.5. Modelagem de nicho ecológico

Para a realização da modelagem de nicho ecológico foram utilizados 181 registros georreferenciados da espécie. Os registros foram implementados na análise através do software MaxEnt v.3.4.1 (Phillips *et al*. 2004, 2006), considerando apenas a presença da espécie e a probabilidade de ocorrência com máxima entropia. Para o treino do modelo foi utilizado 70% dos pontos e 30% para testá-lo (Pearson, 2007) com a amostragem realizada através do método de *bootstrap*, com dez partições aleatórias com substituições.

As variáveis climáticas utilizadas foram: Temperatura média anual (bio1); Precipitação anual (bio 12); precipitação do mês mais chuvoso (bio 13); precipitação do trimestre mais seco (bio 17); precipitação do trimestre mais quente (bio 18); precipitação do trimestre mais frio (bio 19) (Hijmans, 2005). Essa variáveis possuem 1 km^2 de resolução e correspondem às variáveis utilizadas em outros trabalhos com cervídeos neotropicias (Duarte *et al*., 2016; Oliveira *et al*., 2019;2022; Peres *et al*., 2021) e foram testas quanto às suas autocorrelações em um teste de correlação de Pearson, sendo retiras uma das variáveis com correlação (valor de R) acima de 0,8 (Anexo II). A avaliação do modelo foi feito pelo AUC (*Area Under the Curve*), cálculo do erro de omissão e teste binomial de duas proporções (Fielding; Bell, 1997; Elith *et al*., 2006; Pearson, 2007; Phillips; Dudik, 2008). O "*Minimum training presence logistic threshold*" foi utilizado para determinar o limite de corte para a predição da ocorrência da espécie.

2.6. Distribuição geográfica histórica e atual

A distribuição histórica e atual da espécie foi determinada através da intersecção dos resultados da modelagem de nicho ecológico (assumida como inalterada no tempo) com o as áreas históricos e atuais de de uso do solo adequadas para a espécie (vegetações de fitofisionomia aberta). Para a obtençao da classificação dessas áreas de uso do solo, histórica e atual, foi utilizada a base de dados disponibilizada pelo MapBio7 (Souza *et al*., 2020) entre

os anos de 1985 e 2021. Foram assumidas como adequadas as classes de uso do solo das categorias 11 (campo alagado e área pantanosa) e 12 (formação campestre), pertencentes as formações naturais não florestais estabelecidas pelo maobio7. Com base nessas categorias foram inferidas as áreas de potencial ocorrência para a época passada e atual do Veado-campeiro. Após esse procedimento foi realizada a comparação entre as áreas de campo de 1985 e 2021 estabelecendo uma comparação de áreas perdidas e áreas ganhas.

Para testar a significância das eventuais perdas e ganhos de área, foi criada uma grade de quadriculas de 50 por 50 quilômetros (2500 pixels de 1 km^2), sobre a área de intersecção do modelos de nicho e as classes de uso do solo selecionadas (Figura 2) . Em cada quadrícula foram computados os números de pixels ganhos e perdidos entre 1985 e 2021 e realizado um teste de comparação de médias não paramétrico (Wilcoxon) onde cada quadrícula constou como uma observação . Após esse procedimento as áreas foram sobrepostas e foi possível inferir áreas de distribuição geográfica perdidas e áreas. Para as áreas perdidas, foram analisadas o que estas áreas se tornaram no ano de 2021 de acordo com a base de dados MapBio7 Souza *et al*., 2020

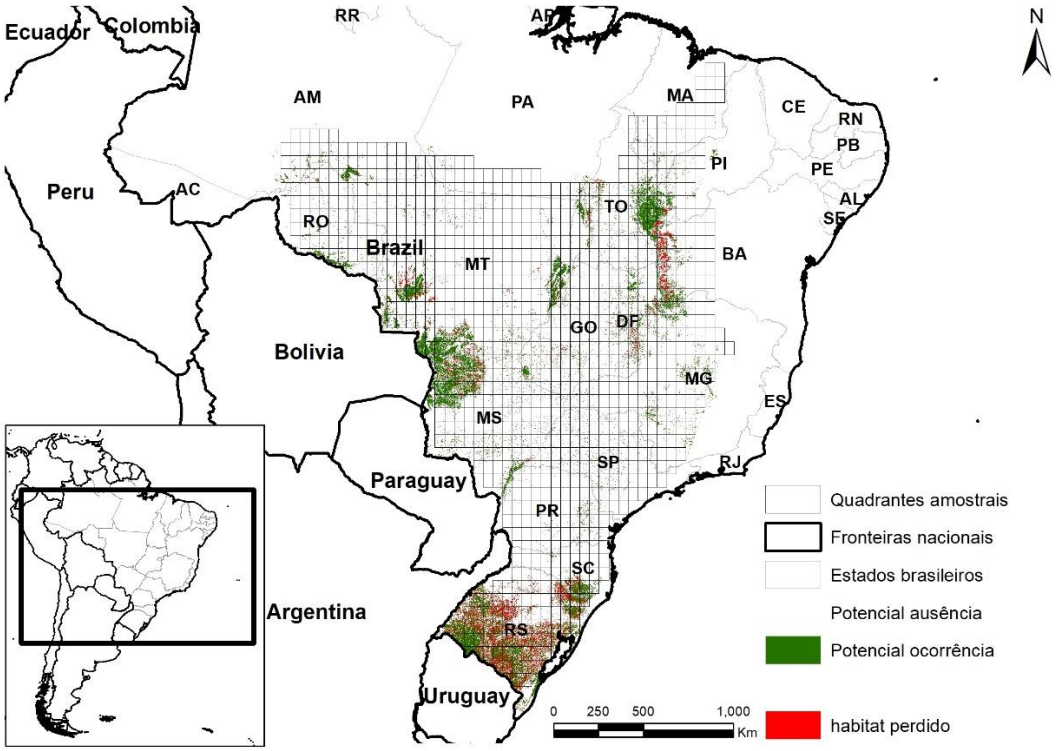


Figura 2. Mapa com os limites dos estados brasileiros e grade de quadriculas de 50 por 50 quilômetros (2500 pixels de 1 km2), sobre a área de intersecção do modelo de nicho.

3. Resultados

3.1. Modelagem de nicho ecológico

A partir da modelagem de nicho ecológico realizada com os 188 pontos de ocorrência para a geração do modelo de máxima entropia, foi gerado o mapa de distribuição de Veado-campeiro para o Brasil (Figura 2). O valor de AUC foi de 0.883 +/- 0.017, teste bionomial bicaudal com $p<0.05$ e erro de omissão de 1,47%. As variáveis Bio 1 (45,6%), Bio 17 (16,6%) e Bio 18 (16,0%) são as que mais explicam o modelo.

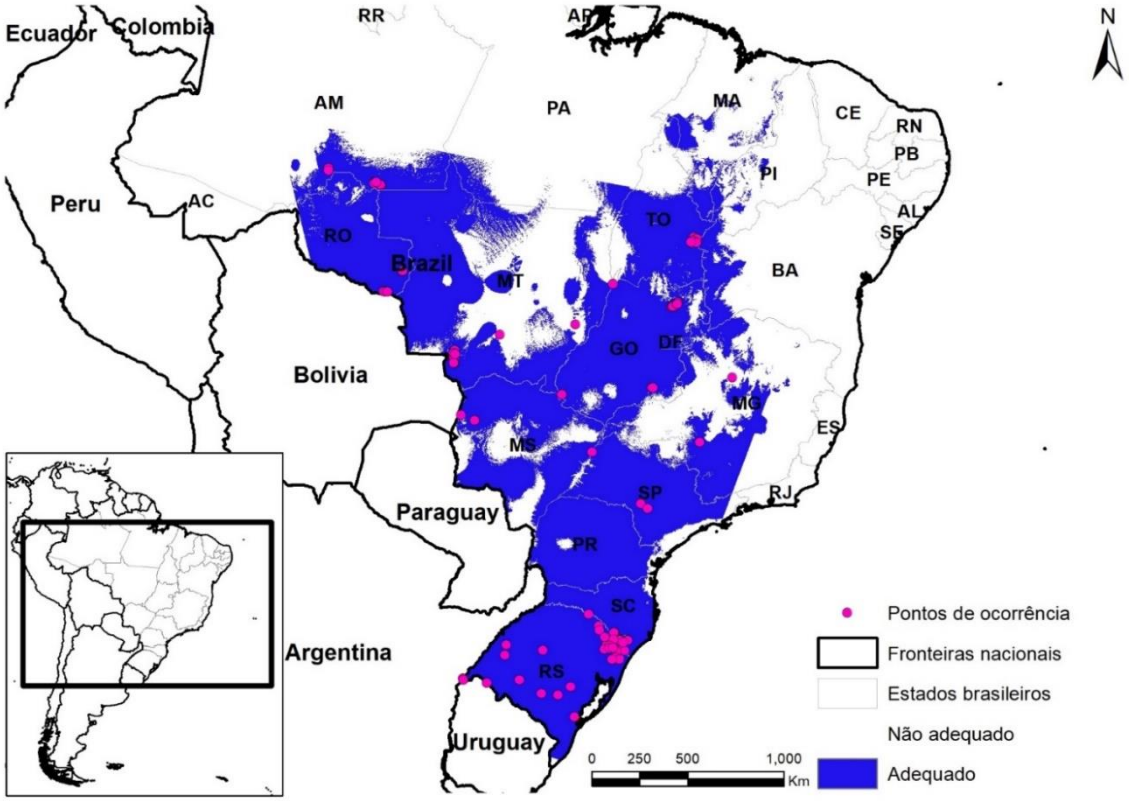


Figura 2. Modelo de nicho ecológico de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) mostrando os pontos de ocorrência utilizados para alimentar o modelo de máxima entropia.

3.2. Distribuição histórica e atual

A intersecção entre as áreas de campo existentes em 1985 e 2021 com a modelagem de nicho ecológico, indica a potencial ocorrência da espécie nessas duas épocas. Assim, foi possível indicar as áreas onde a distribuição histórica da espécie diminuiu (Fig. 3) e onde ela aumentou (Fig. 4)

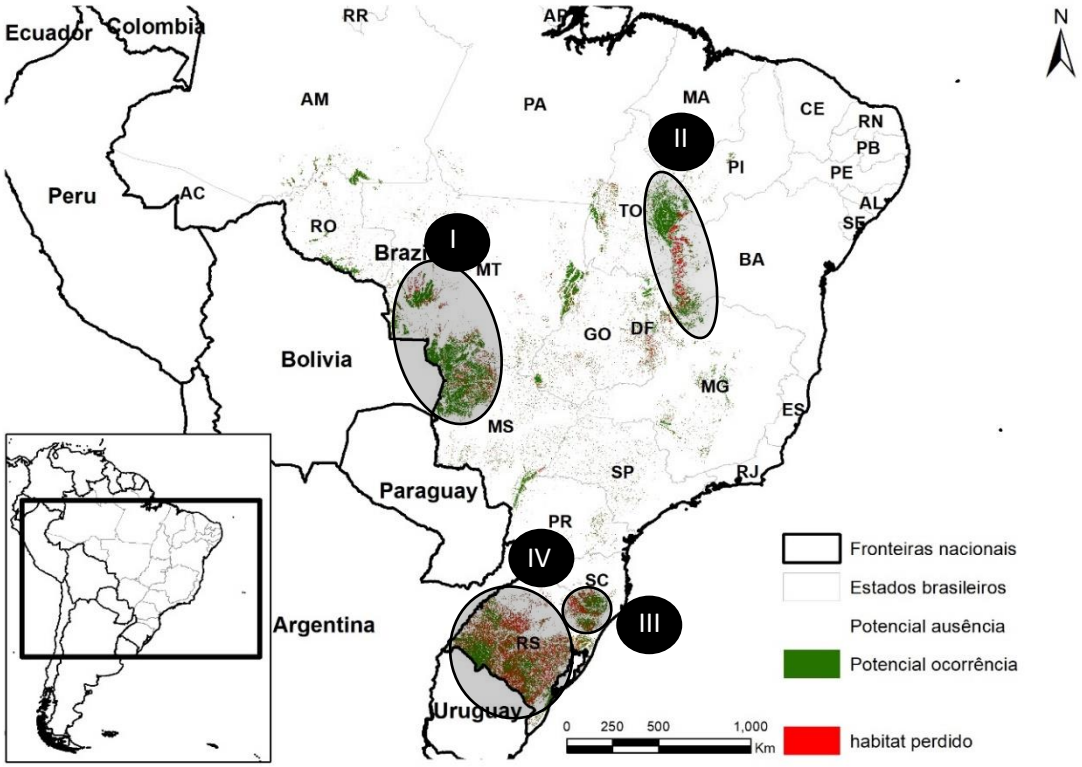


Figura 3. Mapa da área de distribuição de veado-campeiro evidenciando em vermelho as áreas de campo aberto perdidas entre 1985 e 2021 e em verde a potencial ocorrência da espécie. A área I abrange a região do Pantanal; a II abrange a região do leste de Tocantins e Oeste da Bahia; III a região da Coxilha Rica localizada em Santa Catarina; e IV a região do Pampa.

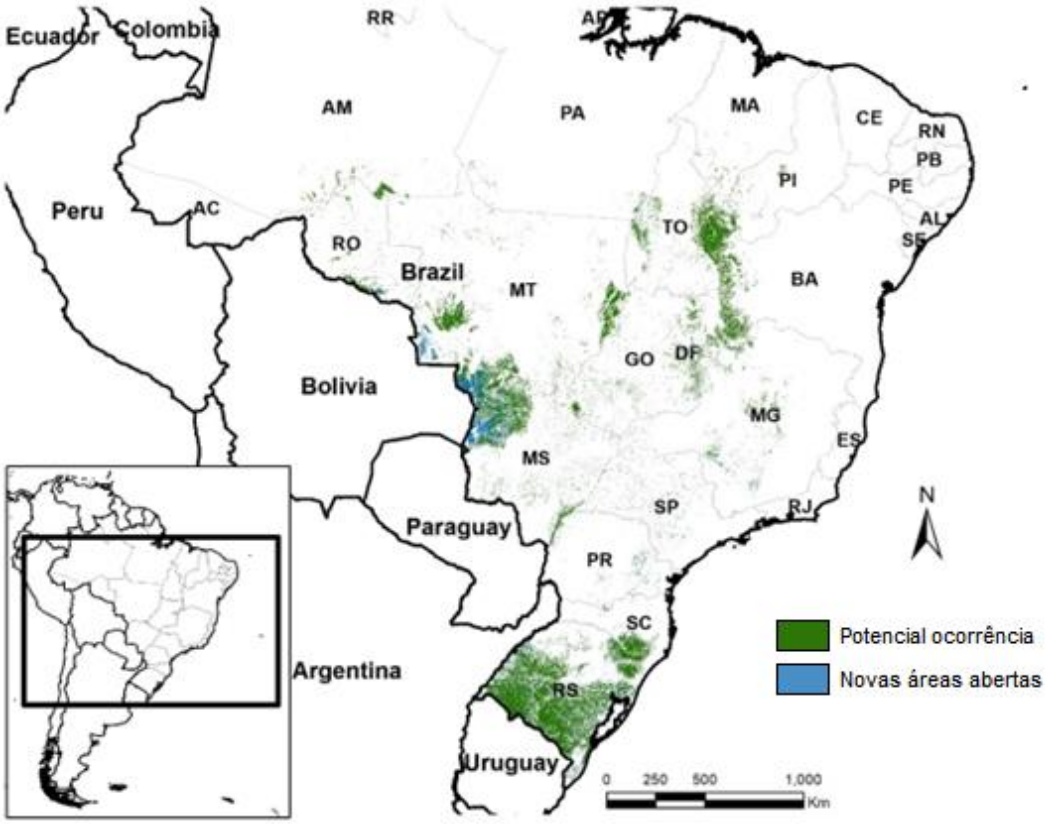


Figura 4. Mapa da área de distribuição de Veado-campeiro evidenciando em azul as áreas de habitat adequado ampliadas entre 1985 e 2021.

Em 1985, a área disponível para campeiro segundo distribuição histórica determinada era de 356.463 Km². Em 2021, essa área passou para 286.334 Km², totalizando uma área perdida de 70.129 Km², o que representa aproximadamente 19% da área histórica de distribuição da espécie ($p = 1{,}506 * 10^{-47}$).

Ao todo, foram sobrepostos 126.019 *pixels* para as categorias do MapBio7 para a determinação das áreas naturais que foram modificadas entre 1985 e 2021. O cultivo soja foi o principal substituto dos campos naturais (Figura 5.) representando aproximadamente 48% das áreas convertidas, seguido pela conversão em pasto (17%), mosaico agrícola (8%), formação de florestas 7%, silvicultura 7%, rio ou lagos (2,5%), arroz (2%) e outras áreas que possuem menos de 2% de conversão cada. As áreas de agropecuária juntas representam 86% da conversão das áreas naturais, seguidas de 9% de outras formações naturais, 2,5% de inundações e solo exposto, área urbana e mineração que possuem menos de 1% cada.

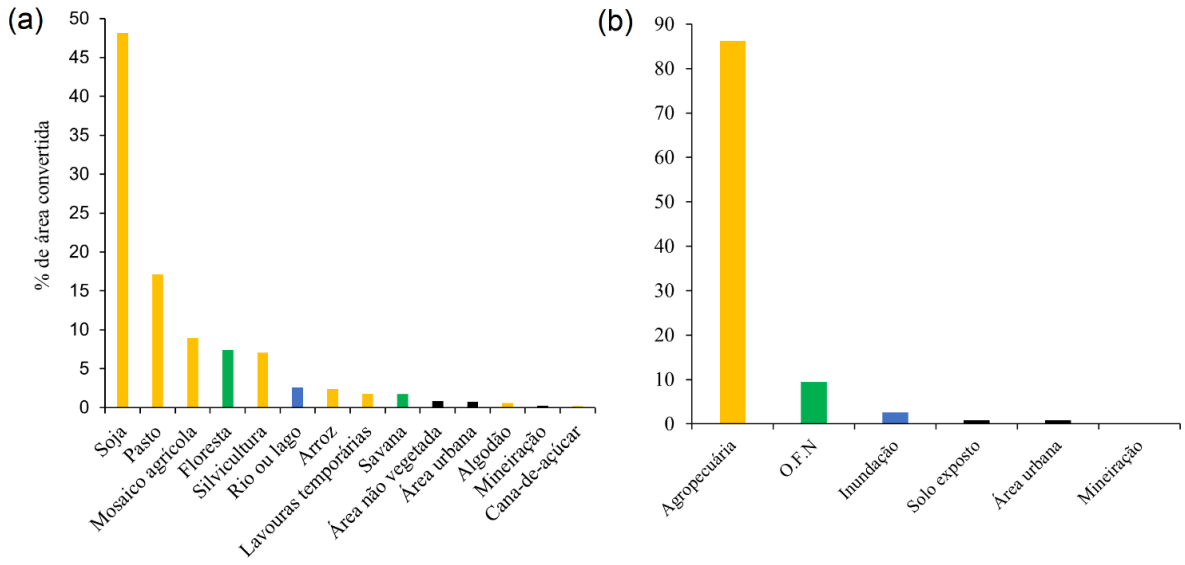


Figura 5. Destino das áreas de distribuição geográfica histórica de *Ozotoceros bezoarticus* perdidas entre 1985 e 2021. (a) conversão por categoria isolada de acordo com a classificação MapBio7; (b) agrupamento de categorias. * Outras formações naturais (O.F.N).

4. Discussão

Os resultados gerados a partir do modelo de nicho ecológico de máxima entropia condizem com o descrito na literatura para a espécie (Cabrera, 1943; Gonzalez *et al* 1998; 2002; Weber; Gonzalez, 2003; Lima, 2020). Esta possui uma distribuição ampla, associada a áreas de formações abertas do Brasil. Essas áreas vão desde o limite norte do Cerrado, recobrindo o estado do Tocantins, passando por formações abertas no sul da Amazônia, e chegam até o extremo sul do Brasil na região de Pampa, no Rio Grande do Sul (Figura 2).

No entanto, o cenário que é observado no Brasil é o de áreas fragmentadas, principalmente na região de Cerrado, onde o avanço agropecuário dominou as áreas naturais (Carvalho *et al*.,2009; Bernett *et al*., 2006). Entre 1990 e 2010, o Cerrado perdeu cerca de 89 mil Km² de vegetação natural. As áreas remanescentes mais preservadas ocorrem em relevos acidentados, os quais são impróprios para agricultura (Beuchle *et al*., 2015).

Alguns estudos com espécies diversas mostram que a existência de áreas de cultivo pode trazer benefícios a populações já fragmentadas, uma vez que essas áreas atuariam como pontos de conectividade entre as populações separadas, permitindo a manutenção do fluxo gênico entre elas e a manutenção da variabilidade genética da população matriz (Fahrig *et al*., 2003;2017;2019).

No entanto, esse conceito apresenta diversos problemas conceituais, enviesando e enfraquecendo ações conservacionistas (Fletcher *et al*., 2018) que visam a manutenção de populações pequenas e isoladas de espécies como o Veado-campeiro.

A fragmentação do habitat pode prejudicar a manutenção das populações relictuais uma vez que o efeito de borda e o isolamento dessas populações trazem efeitos negativos para a manutenção da viabilidade populacional devido a invasão de espécies exóticas, como o capim africano (Augusto;Mendonça *et al*., 2015), desfavorecendo espécies especialistas (Pfeifer *et al*., 2017).

O Pantanal é uma área que possui uma história de modificação de mais de 200 anos devido a introdução do gado pelos europeus e, até duas décadas atrás, era detentora da maior densidade de Veado-campeiro no Brasil (Merino *et al*. 1997, Mourão *et al*., 2000). No entanto, as áreas abertas no pantanal vem aumentando devido a conversão da vegetação natural em pastagens e novas culturas que substituem a criação de gado (Seidl *et al*., 2001). A perda de área nativa do pantanal para a agricultura foi de 16% para as áreas apenas de pantanal e de 61% para as áreas que incluem as regiões de intersecções (plateau) entre Cerrado, Amazônia e Pantanal, para 2050 as projeções apontam uma perda 17% para o Pantalnal e de 65% para a área de plateau formando um arco de desmatamento semelhante ao que ocorre na Amazônia (Guerra *et al*., 2020), o que condiz com o aumento de áreas abertas no para o modelo de nicho do Veado-campeiro (Figura 3, destaque I).

Em relação as áreas que apresentaram redução acentuada, o Pampa foi a que apresentou a maior taxa de redução (Figura 3, destaque IV). Essa região tem passado por uma mudança no uso de sua área nos últimos anos, afetando não só a composição das áreas naturais de campo, mas também a própria dinâmica de produção de gado tradicional da região (Matte; Waquil, 2020). Durante as campanhas de coleta realizadas para a obtenção de amostras para a composição desse trabalho pela região do sul do Brasil, os relatos dos moradores locais indicaram que é perceptível a mudança no avistamento do Veado-campeiro na região nos últimos anos, condizendo com a mudança na paisagem devido, principalmente, ao avanço do cultivo de soja, descaracterizando a paisagem natural da região (Oliveira *et al*., 2017, Lima *et al*., 2019; Hazards; Waquil, 2020; Roesch, 2009).

A região da Coxilha Rica (Figura 3, destaque III) é conhecida como um reduto da espécie no estado de Santa Catarina (Tortato;Althoff, 2011). No entanto, Mazzolli e Benedet (2009) relatam uma diminuição no tamanho populacional do Veado-campeiro na região. São necessários outros estudos para verificação efetiva dos níveis dessa redução populacional que ocorreu na região.

Os avanços agropecuários no Brasil fizeram com que vastas áreas naturais fossem substituídas por diversos tipos de culturas (Figura 5.b). (Weber; Gonzalez, 2003; Bernett *et al*., 2006; Carvalho *et al*.,2009; Duarte *et al*., 2012; Oliveira *et al*., 2017; Morini *et al*, 2023) o que indica que Mais de 50% dessas áreas são de plantio de soja, seguido de pasto, mosaico agrícola e silvicultura (Figura 5a). Juntando as categorias de uso de solo classificada pelo MapBio7, a agropecuária soma aproximadamente 90% da conversão de área natural em áreas de plantio e de gado. Essa conversão promove a perda de habitat do Veado-campeiro e exerce sobre a espécie a necessidade de uma rápida adaptação ao uso de áreas antropizadas, e a mudança de dieta devido a conversão das áreas naturais exercendo assim uma intensa pressão seletiva nas populações.

Não está claro na literatura se a conversão de campos naturais em áreas de plantio afugenta os espécimes. Há duas hipóteses a serem investigadas em futuros estudos: (i) a espécie se adapta as áreas convertidas, estabelecendo um uso harmônico com a ocupação antrópica; ou (ii) apesar da conversão de áreas naturais, a espécie usa a área convertida, mas não possui preferência por ela.

Além da perda de habitat por transformação das áreas naturais, a competição com espécies exóticas pode ser um fator de grande relevância para a continuidade de uma espécie em seu ambiente de distribuição histórica (Webb *et al*., 2006). Além das áreas de campo convertidas no sul do país, temos alguns registros de invasão pela espécie *Axis axis*, que vão desde o Parque Estadual do Espinilho até o entorno do Parque Nacional de Foz do Iguaçu – PR (Sponchiado *et al*., 2009 ; Preus *et al*., 2020; Foster *et al*., 2021). Ainda, são deficientes estudos que busquem a compreensão do impacto causado por essa espécie para os cervídeos brasileiros. Embora a presença de espécies exóticas traga uma série de problemas para as áreas onde são encontradas, a sua remoção é complexa por uma série de fatores. Entre eles, as comunidades locais

se adaptam ao convívio com a espécie, fazendo com que a eliminação da mesma se torne socialmente inviável (Sharp *et al*., 2011).

É de grande importância que estudos de densidade populacional também sejam realizados em outras áreas além do Pantanal, pois a realidade da distribuição da espécie pode variar de acordo com o ambiente e com as pressões existentes em cada local.

5. Conclusão

- A modelagem de nicho ecológico de Veado-campeiro realizada no trabalho condiz com a distribuição histórica da espécie;
- A região do Pampa e oeste da Bahia foram as que mais perderam áreas de habitat entre o período do estudo;
- A principal fonte de perda de habitat entre 1985 e 2021 foi o avanço da agropecuária;
- O avanço dos campos de soja foram responsáveis por mais de 50% da conversão dos campos;
- Se faz a necessidade de estudos que busquem entender a interação da espécie com a mudança no seu habitat;
- Estudos de densidade populacional em diferentes áreas de ocorrência da espécie contribuiriam para avaliar o real *status* de conservação do Veado-campeiro.

6. Referências bibliográficas

Araújo, JPJr, Noguei, MF, Duarte, JMB (2003) Survey for Foot-and-mouth Disease in the Endangered Marsh Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Marshlands of the Parana´ River Basin, Brazil. **Journal of Wildlife Diseases**, 46 (3): 939–943.

Augusto H, Mendonça CR, Melo ACG, Durigan G (2015) Edge effects in savanna fragments: a case study in the cerrado, **Plant Ecology Diversity**, 8:4, 493-503, DOI: 10.1080/17550874.2015.1014068

Bennett AF, Radford JQ, Haslem A (2006) Properties of land mosaics: implications for nature conservation in agricultural environments **Biological Conservation** 133: 250–264.

Beuchle R, Grecchi RC, Shimabukuro YE, Seliger R, Eva HD, Sano E, Achard F (2015) Land cover changes in the Brazilian Cerrado and Caatinga biomes from 1990 to 2010 based on a systematic remote sensing sampling approach, **Applied Geography**, 58: 116-127.

Braga FG, González S, Maldonado JE (2005) Characterization of the genetic variability of Pampas deer in the state of Paraná. **Deer specialist group News**, 20.

Braga FG, Moura-Britto M, Margarido TCC (2000). Estudo de uma população relictual de Veado-campeiro, *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus) (Artiodactyla: Cervidae) no município da Lapa, Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Zoologia**, 17 (1): 175-181.

Cabrera, A. (1943) Sobre la sistemática del venado y su variación individual y geográfica. **Revista del Museo de la Plata (NS)**, 18: 5-41.

Carvalho FMV, Marco Júnior P, Ferreira LG (2009) The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. **Biological Conservation**, 142: 1392–1403.

Carvalho FMV, Marco P, Ferreira LG (2009) The Cerrado into-pieces: Habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil, **Biological Conservation**, 142 (7): 1392-1403, ISSN 0006-3207, https://doi.org/10.1016/j.biocon.2009.01.031.

Cosse M (2001) Dieta y solapamiento de la población de venado de campo De Los AjosL, (L. 1758) (ARTIODACTYLA: CERVIDAE). Montevideo. **Dissertação. Maestria en Zoologia**, Faculdad de Ciencias, Montevideo Uruguay.

Duarte JMB, Piovezan U, Zanetti ES, Ramos HGC (2012) Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção. **Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade**. 128 páginas.

Duarte JMB, Vogliotti A, Zanetti ES, Oliveira ML, Tiepolo LM, Rodrigues LF, Almeida LB, Braga FG (2012) Avaliação do Risco de Extinção do Veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus, 1758, no Brasil. **Biodiversidade Bras**. 2: 20–32.

Elith J, Graham CH, Anderson RP, *et al.* (2006) Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. **Ecography,** 29: 129–151.

Fahrig L (2003) Effects of habitat fragmentation on biodiversity Annu. **Rev. Ecol. Evol. Syst.** 34: 487-515.

Fahrig L, Arroyo-Rodríguez V; Bennett JR, Boucher-Lalonde V, Cazetta E, Currie DJ Eigenbrod F, Ford AT, Harrison SP, Jaeger JAG, Koper N, Martin AE, Martin JL, Metzger JP, Morrison P, Rhodes JR, Saunders DA, Simberloff D, Smith AC, Tischendorf L, Vellend M, Watling JI (2019) Is habitat fragmentation bad for biodiversity?, **Biological Conservation**, 230: 179-186.

Fahrig, L (2017) Ecological responses to habitat fragmentation per se. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst**., 8: 1-23.

Fielding, AH, Bell JF (1997) A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. **Environ Conserv** 24: 38–49.

Fletcher RJ, Didham RK, Banks-Leite C, Barlow J, Ewers RM, Rosindell J, Holt RD, Gonzalez A, Pardini R, Damschen DI, Melo FPL, Ries L, Prevedello JÁ, Tscharntke, T, Laurance WF, Lovejoy T, Haddad NM (2018) Is habitat fragmentation good for biodiversity? **Biol. Conserv**. 226: 9-15.

Foster VC, Reginato T, Kotz A, Dias J, Barros Y (2021) First record of axis deer (*Axis axis* - Erxleben, 1777) in the State of Paraná, southern Brazil. **Amazing deer**, v.72. 2021.

Fraser DJ, Bernatchez L (2001) Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. **Molecular Ecology**, 10: 2741-2752.

Gibson DJ (2009) Grasses and Grassland Ecology. **Oxford Univ. Press**, 2009.

Gimenez Dixon, M (1986) *Ozotoceros bezoarticus*. **Red Data Book**, IUCN: Switzerland.

Glenn, T.; Bavis, R.; Bollback, J. [1998?] DNA extraction protocols using silica. **Laboratory of molecular systematics** MRC 534. Washington: Smithsonian Institution. Disponível em: <http://www.uga.edu/srel/DNA_Lab/protocols.htm>. Acesso em: 29 mar. 2004.

González S, 2016. *Ozotoceros bezoarticus*, 8235. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016.RLTS.T15803A22160030.en

González S, Cosse M, Braga FG, Vila AR, Merino ML, Dellafiore C, Cartes JL, Maffei L, Dixon MG (2010) Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus 1758). In: DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S. (eds) **Neotropical Cervidology: biology and medicine of Latin American deer**. Funep/IUCN, Jaboticabal, 119–132.

González S, Jackson JJ, Merino ML (2016) *Ozotoceros bezoarticus*. **The IUCN Red List of Threatened Species** e.T15803A22160030. http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T15803A22160030.en. Downloaded on 02 September 2018.

González S, Maldonado JE, Leonard JA, Vilà C, Duarte JMB, Merino M, Brum-Zorrilla N, Wayne RK (1998) Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Molecular Ecology**, 7: 47–56.

González S, Maldonado JE, Ortega J, Talarico AC, Bidegaraybatista L, Garcia JE, Duarte JMB (2009) Identification of the emdangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, 9:754-758.

Gonzalez, S.; Álvarez-Valin, F.; Maldonado, J. E. (2002) Morphometric differentiation of endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with description of new subspecies from Uruguay. **Journal of mammalogy**, 83 (4): 1127-1140.

Guerra A, Roque FO, Garcia LC, Ochoa-Quintero JM, Oliveira PTS, Guariento RD, Rosa IMD (2020) Drivers and projections of vegetation loss in the Pantanal and surrounding ecosystems, **Land Use Policy**, 91: 104388, ISSN 0264-8377,

Gutiérrez EE, Helgen KM, Mcdonough MM, Bauer F, Hawkins MTR, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, Maldonado JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: The importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** 697:87–131.

Gutiérrez EE, Maldonado JE, Radosavljevic A, Molinari J, Patterson BD, Martínez-C JM, Rutter AR, Hawking MTR, García, FJ, Helgen, KM (2015) The taxonomic status of Mazama bricenii and the significance of the Tíchira depression for mammalian endemism in the Cordillera de Mérida Venezuela. **PLoS One** 10(6): e0129113.

Hajji GM, Charfi-Cheikrouha F, Lorenzini, R. *et al*. (2008) Phylogeography and founder effect of the endangered Corsican red deer (*Cervus elaphus corsicanus*). **Biodivers Conserv,** 17: 659–673

Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Van Vuuren BJ, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (2012) Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus. Biologies**, 335: 32–50.

Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rössner GE (2016) Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ** 4: 2307,2016.

Hijmans RJ, Cameron SE, Parra JL, Jones PG, Jarvis A (2005) Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, 25(15): 1965–1978.

Hobbs, N. T. (1996) Modification of ecosystems by ungulates. **The Journal of Wildlife Management**, 60 (4): 695-713.
https://doi.org/10.1016/j.landusepol.2019.104388.

Janis CM, Damuth J, Theodor, JM (2000) Miocene ungulates and terrestrial primary productivity: Where have all the browsers gone? **PNAS**. 97:14.

Kawanami, A. E.; Oliveira, J. P. Arenales, A.; Crossley, B.; Woods, L. W, Duarte, J. M. B. Werther (2018) Detection of bluetongue virus in Brazilian cervids in São Paulo state. **Pesq. Vet. Bras**. 38 (1) 137-142.

Leandro, SFS, Carnelossi, EAG, Peres PHF, Ribeiro RC, Duarte JMB (2022) Definition of mtDNA Markers for Studies in Pampas Deer (*Ozotoceros bezoarticus*) based On Fecal Samples. **Int. J. Sci. Res. in Biological Sciences,** 9 (5): 01-08, October.

Lima FG, (2020) Avaliação de habitats abertos protegidos e dispersão do Veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus* Linnaeus 1758 no Cerrado brasileiro. 80f. **Dissertação de mestrado**. Universidade Estadual de Goiás, Anápolis-GO.

Luduvério DJ (2018) Status taxonômico de *Cervus rufus* Illiger, 1811 e sua caracterização genética e morfológica. 83 f **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)** Unesp, Jaboticabal.

Mantellatto AMB, Caparroz R, Christofoletti MD, Piovezan U, Duarte JMB (2017) Genetic diversity of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) population in the Brazilian Pantanal assessed by combining fresh fecal DNA analysis and a set of heterologous microsatellite loci. **Genetics and Molecular Biology**, 40 (4): 774-780.

Margarido TCC, Braga FG (2004) Mamíferos. In: Mikich SB, Bernils, RS (Eds). **Livro vermelho da fauna ameaçada no estado do Paraná**. Governo do Estado do Paraná (IAP, SEMA), Curitiba, Brasil, 27-137.

Matte, A., Waquil, P.D. (2020) Productive changes in Brazilian Pampa: impacts, vulnerabilities and coping strategies. **Nat Hazards**. 102: 469–488.

Mazzolli M, Benedet RC (2009) Recent records, range loss, and current threats to the pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Mammalia, Cervidae) in the state of Santa Catarina, **Brazil. Biotemas**, 22 (2): 137-142.

Mcartur RH, Pianka PE (1966) On optimal use of patchy environment. **The American Naturalist**, 100: 603-609.

Merino ML, Gonzales S, Leeuwenberg F, Rodrigues FHG, Pinder L, Tomas WM (1997) Veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*). In: Duarte, J.M.B. (Ed.). **Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, 42-58.

Morini RFS, Ribeiro RC, Trentini IP, Sandoval EDP, Silva AR, Oliveira ML (2023) Do media reports reflect the real threats to wildlife? **Biological Conservation**, 277.

Moritz C (1994) Defining 'Evolutionary Significant Units' for consrvation. **Trends in Ecology & Evolution**, 9 (10): 373-375.

Mourão GM, Coutinho M, Mauro R, Campos Z, Tomas WM, Magnusson W (2000) Aerial surveys of caiman, marsh deer and pampas deer in the Pantanal Wetland of Brazil. **Biological Conservation**, 92: 175-183.

Mullins KB, Faloona F (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chaptalized chain reaction. **Methods of enzymology**, Maryland Heights, 155: 335-348.

Nogueira, CC *et al*. (2011) Vertebrados da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins: faunística, biodiversidade e conservação no Cerrado brasileiro. **Biota Neotropica**, 11 (1): 229-338.

Oliveira ML, Norris D, Ramírez JFM, Peres PHF, Galetti M, Duarte JMB (2012) Dogs can detect scat samples more efficiently than humans: na experiment in a continuous Atlantic Forest remnant. **ZOOLOGIA**, 29 (2): 183–186.

Oliveira TE *et al*. (2017) Agricultural land use change in the Brazilian Pampa Biome: The reduction of natural grasslands, **Land Use Policy**, 63: 394-400.

Pearson RG (2007) Species' distribution modeling for conservation educators and practitioners: synthesis. **American Museum of Natural History**.

Peres CA (2000) Effects of subsistance hunting on vertebrate community structure in Amazonian forests. **Conservation Biology**, 14: 240-253.

Pfeifer M, Lefebvre V, Peres, C *et al*. (2017) Creation of forest edges has a global impact on forest vertebrates. **Nature** (551): 187–191 https://doi.org/10.1038/nature24457

Phillips SJ, Anderson RP, Schapired RE (2006) Maximum entropy modeling of species geographic distribution. **Ecologival Modelling**, 190: 231-259.

Phillips SJ, Dudík M (2008) Modeling of species distributions with MaxEnt: new extensions and a comprehensive evaluation. **Ecography** 31: 161–175.

Phillips SJ, Dudik M, Schapired RE (2004) Maximum entropy aproach to species distribution modeling. **In: International conference on machine learning**, 21, 2004, New York. Procedings... New York: ACM Press, 655-662.

Preuss JF, Posser E, Albrecht LB, Silva VPR, Bandiera FC (2020) First record of the exotic species *Axis axis* (Erxleben, 1777) (Artiodactyla, Cervidae) in the state of Santa Catarina, southern Brazil. **Check List**. 16 (5):1139–1142.

Rajão R, Soares-Filho B, Nunes F, Börner J, Machado L, Assis D, … Figueira, D. (2020). The rotten apples of Brazil's agribusiness. **Science**, 369(6501), 246–248. doi:10.1126/science.aba6646

Robinson JG, Bennett EL (1999) Hunting for Sustainability in Neotropical Forests. Columbia University Press, New York.

Rocha D, Vogliotti A, Gräbin D, Assunção W, Cambraia B, D'amico A, Sollmann R. (2019) New populations of pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* discovered in threatened Amazonian savannah enclaves. **Oryx**, 53 (4): 748-751.

Rodrigues FHG, Monteiro-Filho ELA (2000) Home range and activity patterns of pampas deer in emas national park, Brazil. **Journal of Mammalogy**, 81: (4)1136-1142.

Rodrigues FP, Garcia JF, Ramos PRR, Bortolozzi J, Duarte JMB (2007) Genetic diversity of two Brazilian populations of the Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758). **Brazilian Journal of Biology**, 67:805-811.

Rodrigues, FH. G.; Monteiro-Filho, E. L. A. Home range and activity patterns of pampas deer in Emas national park, Brazil. **Journal of Mammalogy**, 81: (4) 1136-1142.

Rodrigues, FHG (1996) História natural e biologia comportamental do Veado-campeiro no Parque Nacional das Emas. **In: XIV Encontro Anual de Etologia**, 223-231.

Ruder MG, Lysyk TJ, Stallknecht DE, Foil LD, Johnson DJ, Chase CC, David Dargatz A, Paul E, Gibbs J (2015) Transmission and Epidemiology of Bluetongue and Epizootic Hemorrhagic Disease in North America: Current Perspectives, Research Gaps, and Future Directions. **Vector-borne and zoonotic diseases**, 15:6.

Schmidt IB, Eloy L (2020) Fire regime in the Brazilian Savanna: Recent changes, policy and management, **Flora**, 268, 151613, ISSN 0367-2530,

Seidl AF, Silva JSV, Moraes AS (2001) Cattle ranching and deforestation in the Brazilian Pantanal, **Ecological Economics**, 36(3): 413-425, ISSN 0921-8009, https://doi.org/10.1016/S0921-8009(00)00238-X.

Sharp RL, Larson LR, Gary T (2011). Factors influencing public preferences for invasive alien species management. **Green Biological Conservation,** 144:2097–2104.

Silva CA, Santilli G, Sano EE, Laneve G (2021) Fire Occurrences and Greenhouse Gas Emissions from Deforestation in the Brazilian Amazon. **Remote Sensing**. 13(3):376. https://doi.org/10.3390/rs13030376

Souza at. al. (2020) Reconstructing Three Decades of Land Use and Land Cover Changes in Brazilian Biomes with Landsat Archive and Earth Engine. **Remote Sensing**, 12:17, 10.3390/rs12172735.

Souza JN, Oliveira ML, Duarte JMB (2013) A PCR/RFLP methodology to identify non-Amazonian Brazilian deer species**. Conservation Genetics Resources**, Dordrecht, 5(3):639-641.

Sponchiado J, Melo GL, Cáceres NC (2009) First record of the invasive alien species *Axis axis* (Erxleben, 1777) (Artiodactyla: Cervidae) in Brazil. **Biota Neotropica**, 11:(3).

Thornback, J.; Jenkins, M. (1982) **The IUCN Mammal Red Data Book Part II**. IUCN, Gland.

Tomas VM, Berlinck CN, Chiaravalloti RM *et al*. Counting the Dead: 17 Million Vertebrates Directly Killed by the 2020's Wildfires in the Pantanal Wetland, Brazil, 07 September 2021, PREPRINT (Version 1) **available at Research Square** [https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-859794/v1]

Tomás WM, Mcshea W, Miranda GHB, Moreira JR, Mourão G, Lima Borges, PAA (2001) survey of a pampas deer, *Ozotoceros bezoarticus* leucogaster (Arctiodactyla, Cervidae), population in the Pantanal wetland, Brazil, using the distance sampling technique. **Animal Biodiversity and Conservation**, 24:(1)101–106.

Tortato F, Althoff S (2011). Mammalia, Myrmecophagidae, *Myrmecophaga tridactyla* (Linnaeus, 1758) and Cervidae, *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus, 1758): Contribution to the knowledge of the historical distribution in Santa Catarina, southern Brazil. **Check List**, 7(2): 146-148.

Vila AR, Beade MS, Lamunière, DB (2008) Home range and habitat selection of pampas deer. **Journal of Zoology**, 276:95–102.

Walter Leal Filho, Ulisses M. Azeiteiro, Amanda Lange Salvia, Barbara Fritzen, Renata Libonati (2021) Fire in Paradise: Why the Pantanal is burning, **Environmental Science & Policy**, (123):31-34, ISSN 1462-9011, https://doi.org/10.1016/j.envsci.2021.05.005.

Webb CO, Gilbert GS, Donoghue, MJ (2006) Phylodiversity-dependent seedling mortality, size structure, and disease in a bornean rain forest. **Ecology** 87:123–131.

Weber M, González S (2003) Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience**,10:(4)443-454.

Wilson DE, Reeder, DAM (2005) **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference**. Johns Hopkins University Press.

Zucco CA (2015) Pampas deer on the move: spatial ecology and activity of *Ozotoceros bezoarticus* in the central pantanal of Brazil. 230f. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro.

Anexo I

Localidades utilizadas para a confecção da análise de modelagem e prospecção de áreas com a maior probabilidade de ocorrências de Veado-campeiro.

Localidade representativa	Tipo de amostra	Lat	Long
Vilhena	Fecal	-12.529737	-60.403012
PE Araguaia	Fecal	-13.123470	-50.539690
Guaporé	Fecal	-13.449885	-61.276887
PARNA Mapim Guari	Fecal	-7.870682	-63.861789
PARNA Campos Amazônicos	Fecal	-8.576555	-61.407530
PARNA Emas	Fecal	-18.106644	-52.928094
Pantanal sul	NUPECCE	-18.106644	-52.928094
PARNA Chapada dos Veadeiros	Fecal	-47.771359°	-14.148979°
PE Caldas Novas	Fecal	-48.708407	-17.795418
Maurílio Viana	Fecal	-55.603855	-29.260763
PE Tainhas	Fecal	-50.439929	-29.013847
Coxilha Rica	Fecal	-50.47281	-28.330637
Serra Geral do Tocantins	Fecal	-46.843551	-11.250285
Barra do Quaraí	Fecal	-30.20722222	-57.55472222
Distrito de Capão do Tigre	FGB	-28.61937	-50.19566
Distrito de Capão do Tigre - Propriedade 8	FGB	-28.6465191	-50.1833048
Localidade Postinho - Propriedade 9	FGB	-28.65869	-50.22481
Propriedade 10	FGB	-28.613003	-50.5208034
Cambará do Sul	FGB	-29.05	-50.15
Cambará do Sul	FGB	-29.0823	-49.9932
Parque Estadual de Tainhas	FGB	-29.09402778	-50.36668056
Distrito de Criúva - Propriedade 14	FGB	-28.84534	-50.84209
Distrito de Vila Seca - Propriedade 5	FGB	-29.0218893	-50.9508317
Encruzilhada do Sul	FGB	-30.54388889	-52.52194444

Esmeralda	FGB	-28.05361111	-51.19027778
Lavras do Sul	FGB	-30.81305556	-53.895
Machadinho	FGB	-27.56694444	-51.66777778
Estação Ecológica de Aracuri	FGB	-28.233333	-51.166667
Pelotas	FGB	-31.75	-52.333333
Quaraí	FGB	-30.3875	-56.45138889
Rosário do Sul	FGB	-30.25833333	-54.91416667
Santana da Boa Vista	FGB	-30.87194444	-53.11527778
RPPN Fazenda Sta. Izabel	FGB	-29	-55.683333
São Borja	FGB	-28.83666667	-55.53194444
Distrito de Cazuza Ferreira - Propriedade 2	FGB	-28.87785	-50.68917
Distrito de Cazuza Ferreira - Propriedade 3	FGB	-28.97422	-50.689444
Distrito de Cazuza Ferreira - Propriedade 4	FGB	-28.963201	-50.5346969
Distrito de Silveira	FGB	-28.634083	-49.853121
Localidade de Capão Alto - Propriedade 6	FGB	-29.4360788	-50.5250611
Morrinhos	FGB	-29.366667	-50.416667
Potreiro Velho	FGB	-29.43738889	-50.24416667
São Francisco de Paula	FGB	-29.44138889	-50.57916667
Distrito de Silveira - Propriedade 12	FGB	-28.6616213	-49.8546289
São José dos Ausentes	FGB	-28.733333	-50.05
Batú	FGB	-29.066667	-53.833333
Passo do Leão	FGB	-30.26611111	-57.54158333
Vacaria	FGB	-28.51222222	-50.93388889
Pantanal norte	Fecal	-16254496	-57997704
PARNA Chapada dos Guimarães	Fecal	-15411405	-55836853
PARNA Serra da canastra	Fecal	-20,222,343	-46,476,849
ESEC águas de Santa Bárbara	MZUSP	-22.881211°	-49.239775°