

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

**PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA, RELAÇÕES
FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS DE VEADO-
MATEIRO-PEQUENO, *Mazama bororo* DUARTE, 1996
(Mammalia: Cervidae)**

**Aline Meira Bonfim Mantellatto
Bióloga**

2016

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

**PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA, RELAÇÕES
FILOGENÉTICAS E FILOGEOGRÁFICAS DE VEADO-
MATEIRO-PEQUENO, *Mazama bororo* DUARTE, 1996
(Mammalia: Cervidae)**

Aline Meira Bonfim Mantellatto

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Coorientador: Profa. Dra. Susana González

**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.**

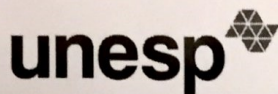
M292p Mantellatto, Aline Meira Bonfim
Padrões de distribuição histórica, relações filogenéticas e
filogeográficas de veado-mateiro-pequeno, *Mazama bororo* DUARTE,
1996 (Mammalia: Cervidae) / Aline Meira Bonfim Mantellatto. – –
Jaboticabal, 2016
iv, 95 p. : il. ; 29 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Coorientador: Susana González
Banca examinadora: Renata Alonso Miotto, Alexandre Reis
Percequillo, Eduardo Andrade Botelho de Almeida, Jesus Aparecido
Ferro
Bibliografia

1. Conservação. 2. DNA de coleções de museus. 3. Citocromo b.
I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:599.735.3

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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



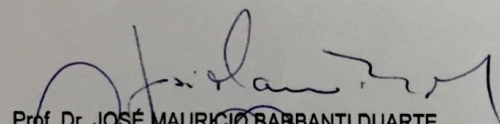
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

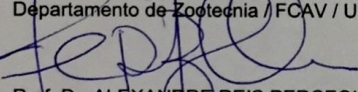
TÍTULO: PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E
FILOGEOGRÁFICAS DE VEADO-MATEIRO-PEQUENO, *Mazama bororo* DUARTE,
1996 (Mammalia: Cervidae)

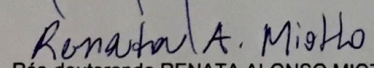
AUTORA: ALINE MEIRA BONFIM MANTELLATTO

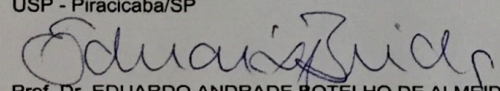
ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

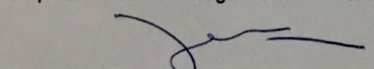
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em GENÉTICA E
MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:


Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


Prof. Dr. ALEXANDRE REIS PERCEQUILLO
ESALQ - USP - Piracicaba/SP


Pós-doutoranda RENATA ALONSO MIOTTO
USP - Piracicaba/SP


Prof. Dr. EDUARDO ANDRADE BOTELHO DE ALMEIDA
Departamento de Biologia / USP - Ribeirão Preto/SP


Prof. Dr. JESUS APARECIDO FERRO
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 03 de outubro de 2016.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

ALINE MEIRA BONFIM MANTELLATTO – solteira, nascida em 18 de setembro de 1984, na cidade de Santos - SP, filha de Edmir Mantellatto e de Maria Angélica Meira Bonfim Mantellatto. Iniciou em fevereiro de 2005 o curso de graduação em Ciências Biológicas na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, campus de Jaboticabal obtendo o título de Bacharel em Ciências Biológicas em janeiro de 2009 e o de Licenciada em Ciências Biológicas em janeiro de 2011. Durante a graduação, foi bolsista de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo por um ano e meio sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte. Em março de 2009, ingressou no Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na mesma instituição de ensino superior, como bolsista da mesma instituição de fomento, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, obtendo o título de Mestre em 04 de julho de 2011. Em março de 2013, ingressou no curso de doutorado no mesmo programa de Pós-graduação, bolsista da mesma instituição de fomento e sob mesma orientação. No ano de 2014, fez estágio de pesquisa no Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, no Uruguai, sob orientação da Profa. Dra. Susana González.

Dedicatória

Dedico minha tese aos coletores, funcionários e curadores dos museus por mim visitados ao longo do desenvolvimento deste trabalho. Todos esses encontros despertaram minha curiosidade e respeito imenso pelas coleções científicas.

“O saber a gente aprende com os mestres e os livros. A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes” Cora Coralina.

Agradecimentos

Agradeço...

Ao meu orientador José Maurício Barbanti Duarte, por todos esses intensos anos de ensino, discussões e muita paciência.

À Susana González, minha co-orientadora, por ter me recebido em seu país e laboratório, sempre disposta a me ouvir e ensinar.

Aos meus pais e irmãos pelo apoio e admiração em todas as etapas de minha formação científica e pessoal.

A todos os integrantes e ex-integrantes do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, minha “casa” e “família” em Jaboticabal, sempre cheio de pessoas especiais que ficarão marcadas para a vida inteira.

Aos funcionários e curadores dos museus por onde percorri: Sérgio Maia Vaz e João Alves de Oliveira (Museu Nacional do Rio de Janeiro), Mário de Vivo (Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo), Juliana Paulo da Silva e Hélio de Queiroz Boudet Fernandes (Museu de Biologia Professor Mello Leitão, Espírito Santo), Pedro Cordeiro Estrela (Museu de Zoologia da Universidade Federal da Paraíba), Diego Astúa de Moraes (Museu de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco), Karina Rebelo (Museu de História Natural Professor Adão José Cardoso, Campinas), Márcia Jardim e Lilian Sander Hoffmann (Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul), Carla Suertegaray Fontana (Museu de Zoologia da Universidade Pontifícia Católica, Rio Grande do Sul), Silvia Roberta Cramer e Fernando Rodrigues Meyer (Museu Colégio Anchieta, Rio Grande do Sul), Sebastião Carlos Pereira, Antenor Junior e Vinicius Abilhoa (Museu Capão da Imbuia, Curitiba), Roberto Portela Miguez (Museu de História Natural de Londres), sem vocês esse trabalho (e tantos outros) não seria viável.

À Louise e Lara, minhas amigas e companheiras de laboratório, congressos, risadas, confissões, desabafos e cuidados com a Chica.

Aos amigos da faculdade sempre presentes: Saidinha, Valita, Ba-Rosa, Ana Nievas, Clara.

Aos amigos que fiz no laboratório do Instituto Clemente Estable e que me ajudaram tanto nas questões científicas quanto na adaptação à nova rotina: Maria Pía, Mariana Cossé, Adriana Mimbacas, Gonzalo Figueiro, Florência, Sabrina, Nádia, Carol, Jorge, Antonella, Natália e ao técnico do laboratório Ricardo.

Aos amigos que conheci no Uruguai e que foram essenciais para minha estadia, bem estar e momentos de descontração: Patrícia, Elisa, Stephi, Nacho, Carlos, Nicolás, Renata, Ángel, Lucía.

Aos professores e funcionários da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, principalmente ao João Boer, técnico do laboratório do NUPECCE, por toda ajuda e amizade desde 2005, e aos professores Jesus Aparecido Ferro e Manoel Victor Lemos, pela oportunidade em realizar o estágio docência nas disciplinas que são responsáveis na graduação.

Aos professores que tive a sorte de conhecer durante as disciplinas cursadas como aluna especial (Eduardo Almeida, Pedro Cordeiro Estrela, Max Cardoso Langer, Annie Schmaltz Hsiou e Jesus Maldonado), além dos companheiros de profissão que conheci na UFPB: Anderson Feijó, Alêny Lopes e Nichole.

Ao professor e amigo Renato Caparroz, pela parceria, apoio e conversas.

Às funcionárias do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), na UNESP, FCAV, Agda Paula Fancincani e Renata Dozzi Tezza pelo acompanhamento e interesse constantes nos resultados que eu obtive com a tese e por todo o serviço prestado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos de 1 mês concedida e à Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelos 3 anos e 3 meses de bolsas concedidas, incluindo o financiamento de 4 meses e meio no Uruguai.

Ao meu maior incentivador, companheiro acadêmico e de vida, Thiago Ferreira Rodrigues e a nossa filha de quatro patas, Chica.

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1- Considerações gerais.....	1
Resumo	1
Introdução.....	2
Revisão de literatura	3
O gênero <i>Mazama</i>	3
<i>Mazama bororo</i> e <i>descrição taxonômica da espécie</i>	4
<i>Distribuição atual e histórica da espécie</i>	6
<i>DNA de coleções de museus</i>	9
<i>Análises filogenéticas e filogeográficas</i>	10
Objetivos.....	12
Referências Bibliográficas	12
CAPÍTULO 2 – Marcadores mitocondriais como ferramenta para a identificação de espécimes do gênero <i>Mazama</i> em coleções de museus brasileiros	18
Resumo	18
Introdução.....	18
Material e métodos	20
<i>Coleta de fragmentos de ossos</i>	21
<i>Extração e amplificação do DNA</i>	22
<i>Análise dos dados</i>	23
Resultados e Discussão	25
<i>Amostras</i>	25
<i>Quantificação e amplificação</i>	27
<i>Análises filogenéticas</i>	28
<i>Identificação morfológica x identificação molecular</i>	30
Referências Bibliográficas	32
CAPÍTULO 3 – Novo nome para <i>Mazama bororo</i> (<i>Mazama jucunda</i> Thomas, 1913; Mammalia: Cervidae) a partir do DNA obtido em coleções de museus. ..	37
Resumo	37
Introdução.....	37
Material e Métodos	40
<i>Amostras de DNA</i>	40
<i>Extração do DNA, amplificação e sequenciamento</i>	40
<i>Análise dos dados</i>	42
Resultados e Discussão	44
Referências Bibliográficas	46

CAPÍTULO 4 – Distribuição histórica de <i>Mazama bororo</i> (Mammalia, Cervidae): Implicações para a conservação na Mata Atlântica.	50
Resumo	50
Introdução.....	50
Material e Métodos	53
Amostras	53
Coleta de fragmentos de ossos.....	55
Extração e amplificação do DNA.....	56
Análise dos dados	57
Resultados e Discussão	59
Quantificação, amplificação e identificação.....	59
Distribuição histórica de <i>Mazama bororo</i>	61
Referências Bibliográficas	64
CAPÍTULO 5 – Filogeografia e caracterização genética de <i>Mazama bororo</i>.....	69
Resumo	69
Introdução.....	69
Material e Métodos	71
Amostras de DNA	71
Extração do DNA, amplificação e sequenciamento	71
Marcadores mitocondriais	72
Marcadores microssatélites.....	73
Análise dos dados	73
Resultados e Discussão	75
Análises filogeográficas.....	75
Análises de caracterização e diversidade genética.....	79
Referências Bibliográficas	82
Considerações finais	87
APÊNDICES	88
A. Identificação molecular das amostras de DNA de coleções de museus a partir de um fragmento de 224 pb do gene mitocondrial citocromo b.	89
B. Amostras provenientes de crânios depositados em coleções de museus identificadas como pertencentes à espécie <i>M.bororo</i> , a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b	91
C. Relação das 46 amostras de <i>Mazama bororo</i> utilizadas para o estudo de filogeografia da espécie a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b.....	92
D. Relação das 22 amostras de <i>Mazama bororo</i> utilizadas nas análises de caracterização e diversidade genética a partir de 13 marcadores nucleares do tipo microssatélites.	95

**PADRÕES DE DISTRIBUIÇÃO HISTÓRICA, RELAÇÕES FILOGENÉTICAS E
FILOGEOGRÁFICAS DE VEADO-MATEIRO-PEQUENO, *Mazama bororo*
DUARTE, 1996 (Mammalia: Cervidae)**

RESUMO – Considerada a espécie de cervídeo brasileira mais ameaçada de extinção, *Mazama bororo*, foi recentemente descrita em 1996. Devido a isso, aspectos básicos de sua biologia ainda são desconhecidos. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo utilizar DNA extraído de espécimes recentes e de museus para descrever a sua distribuição histórica, investigar a existência de padrões filogeográficos, avaliar a taxonomia da espécie e os erros de identificação no material analisado pertencente aos acervos científicos de museus. Para tanto, foi realizada a extração de DNA de 200 amostras de ossos turbinais obtidos em museus de história natural e 78 destes espécimes foram identificados a partir de iniciadores do gene citocromo b (224bp). O total de 22 espécimes identificados como pertencentes à espécie *Mazama bororo* permitiu conhecer áreas inéditas da distribuição histórica e, possivelmente atuais, da espécie, como os estados de Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo e Bahia. Além disso, a comparação entre o DNA dos holótipos de *Mazama bororo* e de *Mazama americana jucunda* indica que a espécie *M. bororo* corresponde à subespécie *M. americana jucunda*, descrita em 1913, demonstrando a necessidade de elevar essa subespécie à categoria de espécie. Análises filogeográficas da espécie demonstram que *M. bororo* não apresenta uma estruturação populacional histórica e que diversidade genética é baixa quando comparada a outras espécies, um indicativo de que políticas de manutenção e conservação dessa espécie são essenciais a sua permanência. Comparando-se as identificações morfológicas presentes nos museus com as identificações obtidas a partir do marcador molecular utilizado observa-se que a taxa de erro decorrente da classificação baseada em caracteres morfológicos foi de 26%. Entretanto, espera-se que, com o auxílio do DNA de coleções científicas, a seleção de caracteres morfológicos não convergentes para este grupo seja possível, permitindo assim a realização de identificações morfológicas corretamente.

Palavras-chaves: *Mazama americana jucunda*, DNA de coleções de museus, citocromo b, diversidade genética, conservação

**HISTORICAL DISTRIBUTION PATTERNS, PHYLOGENETICS AND
PHYLOGEOGRAPHICS RELATIONS OF SMALL RED BROCKET DEER, *Mazama
bororo* DUARTE, 1996 (Mammalia: Cervidae)**

ABSTRACT – *Mazama bororo* was recently described in 1996 and is considered the most threatened species of Brazilian deer. Due to this, basic aspects of its biology are still unknown. Thus, this research project aims to use DNA extracted from recent specimens and from natural history collections to review the taxonomy, to describe historical distribution and to investigate the existence of phylogeographic patterns on *M. bororo*. For this purpose, we extracted DNA from 200 samples of turbinate bones obtained from natural history collections and 78 of these were identified from cytochrome b initiator (224bp). We obtained a total of 22 specimens identified as *M. bororo*. This result allowed identify unpublished areas on historical and perhaps current distribution of *M. bororo* in states such as Rio Grande do Sul, Minas Gerais, Goiás, Espírito Santo and Bahia. Moreover, the comparison among the DNA from holotype of *M. bororo* and *Mazama americana jucunda* indicates that *M. bororo* corresponds to the subspecies *M. americana jucunda*, described in 1913, highlighting the need to raise this subspecies to full species status. Our results also demonstrates that *M. bororo* did not show a genetic structuration of their populations and that their genetic diversity is lower than other species, highlighting the need to increase conservation and environment policy efforts to maintenance of this species. Finally, when we compare the morphological identification available on natural history collections with the identification obtained from molecular markers we found that the error rate resulting from the classification based on morphological characters was 26%. Nevertheless, we expect with the help of DNA from natural history collections will be possible to select non-convergent morphological characters for this group, allowing thus correct morphological identifications.

Keywords: *Mazama americana jucunda*, DNA from natural history collections, cytochrome b, genetic diversity, conservation

CAPÍTULO 1- Considerações gerais

Resumo

A espécie *Mazama bororo*, popularmente conhecida como veado-mateiro-pequeno, foi recentemente descrita em 1996. A espécie está aparentemente restrita à Mata Atlântica, ambiente que sofre intensa ação antrópica, e, possivelmente é a espécie de veado mais ameaçada no Brasil. O uso de DNA de amostras de coleções de museus, uma ferramenta relativamente recente, tem mostrado potencial para aplicação em estudos de conservação, possibilitando, neste caso, a elucidação da realidade taxonômica de *M. bororo*, descrição de sua área de distribuição histórica, bem como a análise dos possíveis erros de identificação presentes nessas coleções. Além disso, estudos filogeográficos e de diversidade genética são responsáveis por indicar medidas corretas de medidas conservacionistas para a espécie.

Palavras-chave: DNA de coleções de museus, Mata Atlântica, taxonomia, veado-mateiro-pequeno, citocromo b

Abstract

Mazama bororo, popularly known as small red brocket deer, was recently described in 1996. This species is apparently restricted to the Atlantic Forest which has been suffered intense anthropogenic pressures and due to this possibly it is the most threatened deer in Brazil. The use of DNA from natural history collections, a relatively new tool, has shown potential on conservation studies, allowing, in this case, the elucidation of the taxonomic reality as well as the description of historical distribution and the analysis of potential identification errors on *M. bororo*. Furthermore, phylogeographic and genetic diversity studies are responsible for indicate correct measures toward conservation of species.

Keywords: DNA from natural history collections, Atlantic Forest, taxonomy, small red brocket deer, cytochrome b

Introdução

O conhecimento científico a respeito da biologia básica das espécies é um dos pilares para que projetos de conservação sejam bem sucedidos. Para tanto, estudos que busquem solucionar questões controversas e ainda desconhecidas de *Mazama bororo* (DUARTE, 1996) como o *status* genético de suas populações, aspectos ecológicos e realidade taxonômica, são fundamentais para a sua efetiva conservação.

Mazama bororo é considerada a espécie de cervídeo brasileira mais ameaçada atualmente (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012). Isso se deve, principalmente, a sua distribuição restrita a regiões de Mata Atlântica nos estados de São Paulo e Paraná (GONZÁLEZ et al., 2009). Sabe-se que a Mata Atlântica é o bioma brasileiro que apresenta a maior perda de cobertura vegetal, restando apenas cerca de 12% a 16% de sua área original (RIBEIRO, 2009), sendo que essa grande redução do bioma provavelmente causou forte redução populacional de *M. bororo*.

Estudos de citogenética demonstraram que o cariótipo de *M. bororo* apresenta diferenças significativas em relação ao cariótipo de *M. americana*, indicando um inequívoco isolamento reprodutivo entre as duas espécies (DUARTE, 1992; DUARTE, 1996; DUARTE; JORGE, 2003). Dessa forma, outros estudos para a caracterização de *M. bororo* foram desenvolvidos, diferenciando-o das demais espécies a partir de dados da citogenética, morfologia corporal, biologia molecular e da ecologia (DUARTE, 1992; DUARTE, 1996a; DUARTE e JORGE, 2003; DUARTE et al., 2005; GONZÁLEZ et al., 2009). Porém, recentemente, revisando-se a descrição de *Mazama americana jucunda* (THOMAS, 1913), sugere-se que esta subespécie corresponda à espécie *M. bororo*, devido, principalmente, a mesma área de ocorrência e à semelhança de medidas morfológicas entre ambas as unidades taxonômicas.

A recente descrição da espécie *M. bororo* traz, além de incertezas taxonômicas, lacunas no conhecimento da biologia básica da espécie, como, por exemplo, sua área de distribuição histórica (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012). Têm-se como hipótese que a espécie ocupava, no melhor dos cenários, a ecorregião das Florestas Costeiras da Serra do Mar (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010), restringindo sua

área de distribuição atual como consequência da fragmentação e perda desse ambiente.

Como tentativa de elucidar a distribuição histórica e realidade taxonômica de *M. bororo*, tem-se a utilização de DNA de coleções de museus como uma tecnologia viável e com grande potencial de aplicação (LEONARD, 2008). Dessa forma, torna-se possível revisar o acervo de coleções científicas de cervídeos, com o objetivo de identificar, através do DNA de amostras de museus, a espécie pertencente de cada espécime analisado, uma vez que a identificação específica baseada em caracteres e medidas morfológicas ainda não é capaz de identificar corretamente o material das coleções de crânios pertencentes ao gênero *Mazama*. Consequentemente, a partir das identificações e informações de localidade geográfica de cada material, torna-se possível construir o mapa de distribuição histórica de *M. bororo*, informação até então impossível de ser obtida por outros métodos de estudo. Além disso, a comparação do DNA do holótipo de *M. a. jucunda* com o DNA do holótipo de *M. bororo* possibilita confirmar se *M. a. jucunda* corresponde à espécie *M. bororo* molecularmente.

Assim, dados a respeito da distribuição histórica de *M. bororo*, além do conhecimento acerca de padrões filogeográficos e a confirmação de sua classificação taxonômica, a partir da combinação do uso do DNA de coleções de museus com o DNA de espécimes recentes podem ser obtidos, informações relevantes para o delineamento de programas de conservação para a espécie.

Revisão de literatura

O gênero *Mazama*

O gênero *Mazama* é o nome dado a um extenso grupo de cervídeos de tamanho médio a pequeno e chifres curtos, simples e pontiagudos nos machos, que se distribui ao longo da América tropical e subtropical desde o estado de Veracruz no México até a Argentina central. Ocupa uma ampla variedade de habitats, incluindo florestas montanhosas, florestas tropicais chuvosas, florestas tropicais secas e savanas arbóreas, em margens altitudinais entre o nível do mar até acima dos 4000 metros sobre o nível do mar (EISENBERG, 1989; ALLEN, 1915).

Atualmente, o gênero é subdividido em dois grupos, de acordo com a cor da pelagem: veados vermelhos (*Mazama americana*, *M. temama*, *M. nana* e *M. bororo*) e veados marrons ou cinzas (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) (DUARTE et al., 2008). O primeiro grupo, ao qual pertence *Mazama bororo*, inclui animais com uma distribuição mais ampla e generalizada, havendo espécies em florestas fechadas altas e baixas desde a Argentina, a Bolívia e o Paraguai, passando pelos Andes, até o México tropical. Em análise filogenética realizada com o intuito de esclarecer a sistemática e a história evolutiva dos cervídeos sul-americanos, Duarte et al. (2008) obtiveram resultados indicando que o grupo de veados vermelhos se diferenciou rapidamente durante o Pleistoceno no refúgio glacial, sendo que *M. bororo* é a espécie mais recente, com menos de 1 milhão de anos de divergência (MYA) de *M. americana* (DUARTE et al., 2008).

Mazama bororo e descrição taxonômica da espécie

Assim como as demais espécies do gênero, *Mazama bororo* apresenta a porção anterior do corpo ligeiramente mais baixa que a posterior e a presença de chifres pequenos e não ramificados nos machos (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012). Segundo Bourlière (1973) tais características morfológicas constituem-se em adaptações à vida em ambientes de vegetação densa.

A espécie apresenta um peso médio de 25 kg e altura de cerca de 50 cm. Sua coloração geral é avermelhada, com a lateral do pescoço cinza claro e mais escura na porção dorsal. Possui manchas brancas características na base da orelha, na ponta da maxila, da ponta da mandíbula até o terço anterior ventral do pescoço. Apresenta uma coloração enegrecida na região do calcâneo, que se estende até os cascos através de um filete na porção posterior do metatarso quando comparado com *M. americana* (DUARTE, 1996b) (Figura 1.1).



Figura 1.1. Espécime adulto de veado-mateiro-pequeno (Foto: DUARTE, J.M.B., 2013).

Em comparação com outras espécies do gênero, as médias das medidas corporais de *Mazama bororo* apresentam valores intermediários entre *M. americana* (peso médio de 30 kg e altura de cerca de 58 a 80 cm, VARELA et al., 2010) e *M. nana* (peso médio de 15 kg e altura de cerca de 45 cm, ABRIL et al., 2010) e bastante próximas das de híbridos entre estas duas últimas espécies (peso médio 22kg e altura de cerca de 56 cm) (DUARTE; JORGE, 2003), sendo que alguns caracteres morfológicos são potencialmente discriminantes da espécie como: peso, altura, comprimento do corpo, circunferência do tórax e comprimento de metacarpo e metatarso, e, além disso, apresentam conjuntos cromossômicos facilmente distinguíveis por meio da análise citogenética (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012).

A espécie *Mazama bororo*, ou veado-mateiro-pequeno, foi proposta pela primeira vez por Duarte em 1996a, durante um estudo para a caracterização citogenética dos cervídeos brasileiros. Apesar do padrão cromossômico consistente de quatro animais analisados (DUARTE; JORGE, 2003), a validade da nova espécie foi acompanhada de alguma controvérsia (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012).

Rossi (2000), em sua dissertação de mestrado, fez uma revisão do gênero *Mazama* no Brasil, através da análise de alguns caracteres morfológicos externos e internos. A identificação morfológica de peles e esqueletos depositados em museus revelou algumas diferenças de coloração, tamanho e pelagem entre os espécimes classificados como *M. americana*, provenientes da região de ocorrência de *M. bororo* e as amostras de *M. americana* de outras regiões brasileiras. No entanto, esses

dados não foram estatisticamente significativos para assegurar a diferenciação dessas amostras em nível específico (ROSSI, 2000), sugerindo um papel secundário das características morfológicas para a identificação de *M. bororo*. Porém, a possível ocorrência de duas espécies na região (VOGLIOTTI, 2003) e, conseqüentemente, nas coleções analisadas por Rossi (2000), pode ter gerado a sobreposição de valores que dificultaram a sua discriminação, visto que os valores de determinados caracteres apresentados por Duarte e Jorge (2003) na caracterização de *M. bororo* indicam que o peso, a altura, o comprimento do corpo, circunferência do tórax e comprimento do metacarpo e metatarso, podem ser discriminadores potenciais das espécies, pelo menos em animais vivos ou em corpos intactos (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010).

A análise de DNA desses espécimes estudados por Rossi, além de outros pertencentes a diferentes coleções científicas, permite a identificação molecular da espécie de cada material, solucionando incertezas taxonômicas que abarcam o gênero *Mazama*, identificando como *M. bororo* espécimes que, possivelmente estão identificados como *M. americana*. Além disso, o uso de DNA de coleções de museus também torna possível a comparação molecular entre o holótipo de *M. bororo* e o holótipo de *Mazama americana jucunda* (THOMAS, 1913), com o objetivo de comprovar se a espécie *M. bororo* é uma entidade biológica distinta ou não desta subespécie. O nome *Mazama americana jucunda* é o mais antigo publicado dentro do gênero *Mazama* no Brasil, tendo sido coletada em 1901, na região de Roça Nova, na Serra do Mar, no estado do Paraná, Brasil, a 1000 metros de altitude, região de provável ocorrência de *M. bororo*. Além disso, o animal utilizado para a descrição da subespécie apresentava padrões morfológicos semelhantes a *M. bororo*.

Distribuição atual e histórica da espécie

Estudos realizados em 2006, por meio da coleta de amostras de fezes em áreas com potencial ocorrência de *Mazama bororo*, foram responsáveis pela construção do atual mapa de distribuição geográfica da espécie (Figura 1.2).

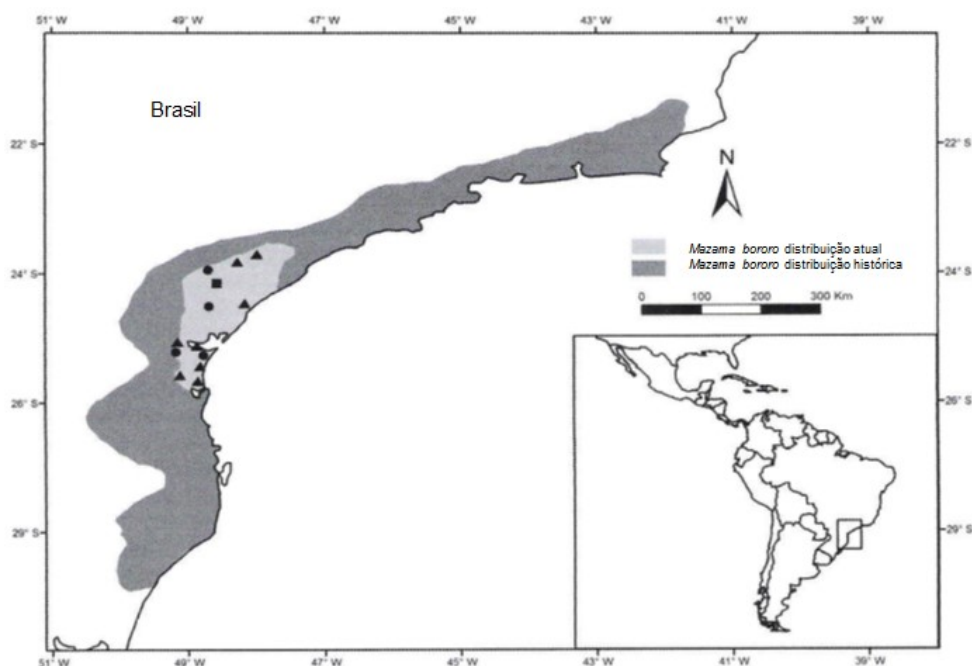


Figura 1.2. Distribuição atual e distribuição histórica hipotética de *Mazama bororo*. Origem de espécimes de cativeiro analisados (círculos), detecção recente de ocorrência (triângulos) e população do Parque Estadual de Intervalos (quadrado). (Fonte: VOGLIOTTI et al., 2012).

A partir da extração do DNA deste material, a espécie de cada amostra foi identificada através de método desenvolvido por González et al., (2009), que consiste na amplificação de um fragmento de 224pb do gene citocromo b (citb), a partir de iniciadores capazes de amplificar amostras de todas as espécies do gênero *Mazama*, seguidos de digestão com enzima de restrição *BstnI*, responsável pelo corte de fragmento de tamanho específico, que resulta na identificação da espécie em questão.

A utilização de amostragem não invasiva foi o método que possibilitou a identificação de *M. bororo* na região estudada, visto que a simpatria entre *M. bororo*, *M. americana*, *M. nana* e *M. gouazoubira* na Mata Atlântica dificulta o processo de identificação por outras técnicas devido à similaridade morfológica das espécies (GONZÁLEZ et al., 2009).

A partir da obtenção desses dados, Duarte et al. (In Press) demonstraram que a espécie encontra-se atualmente restrita entre os paralelos 23° e 28° Sul e os meridianos 47° e 49° Oeste. Dessa maneira, o mapa de distribuição da espécie evidencia uma distribuição restrita à ecorregião das Florestas Costeiras da Serra do Mar do sudeste paulista e leste paranaense e catarinense, como já havia sido

sugerido por Rossi (2000). Essa distribuição é umas das menores do mundo dentre toda a família dos cervídeos (WEBER; GONZÁLEZ, 2003), sugerindo o *status* relictual de sua população selvagem e, conseqüentemente, sua potencial vulnerabilidade aos riscos inerentes às pequenas populações. Além disso, esses resultados acrescentam um mamífero de grande porte à vasta lista de endemismos da Mata Atlântica, elevando o veado-mateiro-pequeno à categoria de maior animal endêmico do Brasil (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012).

Parte dos remanescentes florestais disponíveis dentro da provável área de distribuição histórica de *M. bororo* encontra-se protegido, seja na forma de Áreas de Proteção Ambiental (APA), Reservas Particulares de Patrimônio Natural (RPPN) e Parques Nacionais e Estaduais (DUARTE et al., 2012). Embora possível, a ocorrência de *M. bororo* em todas essas áreas ainda precisa ser confirmada em levantamentos futuros para que se tenha um panorama realista de sua distribuição atual. Até o presente, a espécie foi confirmada em apenas sete unidades de conservação (Parque Estadual Intervales – São Paulo, SP, Parque Estadual Carlos Botelho – SP, APA Estadual de Guaratuba – Paraná, PR (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012), Parque Estadual Serra do Tabuleiro, Santa Catarina, SC, Parque Estadual de Jacupiranga, SP, Fazenda João XXIII, SP e Parque Nacional Serra do Itajaí, SC (DUARTE et al., In Press). Apesar de pequena, a distribuição de *M. bororo* tem mais de 3600 km² de áreas oficialmente protegidas e muitas delas estão conectadas entre si, formando um dos maiores blocos da Mata Atlântica no Brasil. Duarte et al. (2005) estimaram que o tamanho total da população dessa espécie é de 5500 indivíduos.

Por outro lado, a principal ameaça para a população é a fragmentação do habitat, neste caso, a Mata Atlântica, que está sendo reduzida a fragmentos isolados, além do pequeno tamanho da população e declínio contínuo devido à caça (DUARTE; GIANNONI, 1996). Atualmente a espécie é categorizada como vulnerável (VU) na lista mundial da União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN (VOGLIOTTI et al., 2016), na Lista de espécies ameaçadas do estado de São Paulo (São Paulo, 2010), na Lista do estado do Paraná (IAP, 2010), assim como na Lista Nacional (Biodiversidade Brasileira) (DUARTE et al., 2012). Com base na atual destruição desse ambiente, sugere-se que *M. bororo* seja a espécie de veado mais

ameaçada atualmente no Brasil (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012), sendo necessário unir forças para proteger e conservar a espécie (DUARTE; JORGE, 2003).

Em relação à distribuição histórica da espécie, não há informações que permitam avaliar os efeitos do processo de colonização humana em sua distribuição. Porém, as evidências geográficas sugerem que a espécie sempre ocupou uma área de distribuição restrita que, no melhor dos cenários, corresponderia à ecorregião das Florestas Costeiras da Serra do Mar (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010). A evidência mais razoável da distribuição histórica de *M. bororo* até agora é o exame das peles e crânios realizado por Rossi (2000) em coleções científicas brasileiras que revelou uma população parcialmente diferenciada de *M. americana* (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010). Assim, uma solução para confirmar se os espécimes estudados pelo autor correspondem à *M. bororo* é analisar o DNA desses materiais, pois, além de comprovar a espécie pertencente a cada espécime, será possível descrever a distribuição histórica de *M. bororo* (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010).

DNA de coleções de museus

Estudos a partir de DNA de coleções de museus representam um grande potencial para pesquisa nas áreas de antropologia, arqueologia, ciência forense, biologia e ciências evolutivas (HERMANN; HUMMEL, 1994), sendo que a capacidade de analisar geneticamente as populações do passado é uma grande promessa, especialmente, para a genética da conservação (LEONARD, 2008).

Análises realizadas com o uso dessa ferramenta envolvem um ou poucos indivíduos isolados, permitindo a caracterização precisa do tamanho de uma população histórica, os níveis de fluxo gênico, as relações com outras populações do passado, e o grau de parentesco entre populações antes das fortes perturbações causadas pelo homem nos últimos séculos (RAMAKRISHNAN et al., 2005). Além disso, o DNA de coleções de museus tem sido utilizado para validar espécies, a partir da combinação da análise de DNA antigo do holótipo e dados de animais de vida livre (AMATO et al., 1999; BENSCHKE; PEARSON, 2002), como também identificar indivíduos de cativeiro que representam linhagens extintas na natureza (RUSELLO et al., 2010), visando o planejamento de reintrodução de espécies, sendo estes aspectos fundamentais para o desenvolvimento de planos de gestão

para a efetiva conservação e gestão da vida selvagem (LEONARD, 2008; PAPLINSKA et al., 2011).

Apesar de sua ampla utilização e sucesso de trabalho com esse tipo de material, têm-se a ressalva de que o DNA obtido de espécimes de museus apresenta problemas de baixa quantidade e má qualidade presente na maior parte dos espécimes (BESNARD et al., 2016). A amplificação por PCR de segmentos curtos de DNA (<200 pb) requer uma grande quantidade de trabalho, é oneroso e o sucesso é imprevisível (BESNARD et al., 2016; WANDELER et al., 2007). Além disso, a análise de tais amostras é propensa a erros (devido a contaminações por DNA moderno ou artefatos de PCR) enquanto que a amplificação por PCR de regiões de genes de cópia única continua a ser um desafio (PÄÄBO et al., 2004).

Análises filogenéticas e filogeográficas

Os genes mitocondriais são importantes ferramentas para uma variedade de estudos na área de evolução animal, como filogeografia (AVISE, 2000), genética populacional (BALLARD, 2000) e filogenia (ARNASON et al., 2000). As vantagens do uso desse tipo de marcadores são a transmissão materna, a alta taxa de mutação (comparada com o DNA nuclear) (ROKAS et al., 2003) e a facilidade de amplificação, uma vez que cada célula somática apresenta cerca de 500 a 1000 mitocôndrias (SATO; KUROIWA, 1991). Outra vantagem importante e comumente aceita é a ausência de recombinação (ROKAS et al., 2003). Porém, a recombinação é regra na maioria das espécies de plantas, fungos e protistas (GILLHAM, 1994) e, recentemente tem sido relatada no reino animal (HOARAU et al., 2002; MA; O'FARRELL, 2015). Com o objetivo de identificar espécies distintas a partir do uso de DNA, neste caso DNA de coleções de museus, genes mitocondriais apresentam variabilidade útil na investigação de espécies que divergiram em tempos geológicos mais recentes, portanto, ideais para estudos das variações intra e interespecíficas (AVISE et al., 1987). Entre os genes mitocondriais amplamente utilizados, estão o citocromo *b* e a região controladora mitocondrial (Dloop).

Recentemente, Duarte et al. (2008) realizaram um estudo utilizando o gene citocromo *b* para analisar as espécies de todos os gêneros de cervídeos sul-

americanos, com o intuito de esclarecer a sistemática e a história evolutiva dos mesmos. Já Taberlet (1996) revela que em estudos baseados entre espécies relacionadas ou populações coespecíficas, a sequência da região Dloop pode prover melhor resolução utilizando-se pouco esforço experimental, gerando filogenias ou análises filogeográficas. Estudos e análises comparativas em Cervídeos indicam que a sequência Dloop é altamente estruturada, com uma região central conservada e flanqueada por dois domínios periféricos altamente divergentes (GONZÁLEZ et al., 1998). Em estudo envolvendo o veado-campeiro, *Ozotoceros bezoarticus*, amostrados da Argentina à região central do Brasil e analisados a partir da região Dloop, verificaram-se efeitos de isolamento por distância entre as populações analisadas, sem registros de vicariância histórica (GONZÁLEZ et al., 1998). Para Avise (1989), a compreensão dos padrões de distribuição da variabilidade genética atual elucida os processos que devem ser mantidos para assegurar a preservação dessa variabilidade, assim como das populações e das espécies. Além disso, a delimitação de populações é uma questão fundamental no caso de espécies ameaçadas.

Porém, estudos mais recentes apontam que a disparidade entre árvores de genes e de populações diminuem quando análises filogeográficas são baseadas em vários locos, resultando em dados mais confiáveis (CUNHA; SOLE-CAVA, 2012), pois cada loco funciona como uma réplica independente do processo de coalescência (EDWARDS; BEERLI, 2000; ARBOGAST et al., 2002). Além disso, a utilização de marcadores nucleares auxilia na análise de estruturação genética observada a partir do uso de marcadores mitocondriais, uma vez que a filopatria, observada em mamíferos, desempenha papel fundamental sobre a estruturação genética de uma população (SHIELDS, 1987), alimentando a hipótese clássica que prevê uma baixa variabilidade genética no interior das unidades de população, com uma divergência genética entre essas diferentes unidades (CHESSER 1991). Assim, os microsatélites mostram-se vantajosos, pois constituem um marcador codominante altamente variável, multialélico, de grande conteúdo informativo, permitindo uma discriminação precisa mesmo de indivíduos proximalmente relacionados (PEREZ-SWEENEY et al., 2003).

Dessa forma, o uso de marcadores moleculares a partir de amostras de DNA recentes e de amostras de DNA provenientes de coleções de museus permite o estudo de lacunas da biologia básica das espécies, neste caso, do *M. bororo*, contribuindo assim para o conhecimento do táxon em questão.

Tendo em vista as lacunas no conhecimento a respeito de *M. bororo*, o presente trabalho amplia o conhecimento científico, trazendo novos dados a respeito da taxonomia, evolução e ecologia, gerando subsídios para a elaboração de políticas públicas que implicam na conservação da espécie.

Objetivos

Os objetivos e as respectivas hipóteses deste trabalho foram as seguintes:

- 1 - Avaliar os erros de identificação no material analisado nos museus (Hipótese: existem erros de identificação em espécimes do gênero *Mazama* nos acervos de coleções científicas);
- 2 - Descrever a distribuição histórica de *M. bororo* (Hipótese: distribuição histórica da espécie abrange os estados de RS, SC, PR, SP, RJ, ES, BA, SE, AL, PE, RN, CE, PI, MS, MG, GO);
- 3 - Confirmar a descrição taxonômica de *M. bororo* como uma espécie distinta da subespécie *M. americana jucunda* (Hipótese: o espécime utilizado para a descrição da subespécie *M. americana jucunda* corresponde à espécie *M. bororo*);
- 4 - Verificar as relações filogeográficas e a diversidade genética da espécie (Hipótese: não existe estruturação genética dentro da espécie).

Referências Bibliográficas

ABRIL, V. V.; VOGLIOTTI, A.; VARELA, D. M.; DUARTE, J. M. B.; CARTES, J. L. Brazilian dwarf brocket deer *Mazama nana* (Hensel 1872). In: **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. DUARTE, J. M. B; GONZÁLEZ, S. (eds.). Jaboticabal: Funep/ IUCN, p. 160-165. 2010.

ALLEN, J. A. Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 34, p. 521-553, 1915.

AMATO, G.; EGAN, M. E.; SCHALLER, G.; BAKER, R. H.; ROSEMBAUM, H. C.; DESALLE, R. Rediscovery of Roosevelt's barking deer (*Muntiacus rooseveltorum*). **Journal of Mammary**, v. 80, p. 639–643, 1999.

ARBOGAST, B.; EDWARDS, S. V.; WAKELEY, J.; BEERLI, P.; SLOWINSKI, J. B. Estimating divergence times from molecular data on phylogenetic and population genetic time-scales. **Annual review of Ecology and Systematics**, v. 33, p. 707–740, 2002.

ARNASON, U.; GULBERG, A.; GRETARSDOTTIR, S.; URSING, B.; JANKE, A. The mitochondrial genome of the sperm whale and a new molecular reference for estimating eutherian divergence dates. **Journal Molecular Evolution**, v. 50, n.6, p. 569–578, 2000.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v.18, p. 489–522, 1987.

AVISE, J. C. Gene Trees and Organismal Histories - a Phylogenetic Approach to Population Biology. **Evolution**, v. 43, n. 6, p. 1192–1208, 1989.

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

BALLARD, J.W. Comparative genomics of mitochondrial DNA in *Drosophila simulans*. **Journal Molecular Evolution**, v. 51, n. 3, p. 64–75, 2000.

BENSCH, S.; PEARSON, D. The large-billed reed warbler *Acrocephalus orinus* revisited. **Ibis**, v. 144, p. 259–267, 2002.

BESNARD, G.; BERTRAND, J.A.M.; DELAHAIE, B.; BOURGEOIS, Y.X.C.; LHUILLIER, E.; THÉBAUD, C. Valuing museum specimens: high-throughput DNA sequencing on historical collections of New Guinea crowned pigeons (*Goura*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.117, p.71–82, 2016.

BOURLIÈRE, F. The comparative ecology of rain forest mammals in Africa and tropical America: some introductory remarks. In: MEGGERS, B. J., E. S. AYENSU; W. D. DUCKWORTH (Eds.). **Comparative ecology of rain forest mammals**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, p. 279–292, 1973.

CHESSER, R. K., Gene diversity and female philopatry. **Genetics**, v.127, p.437-447, 1991.

CUNHA, H. A.; SOLÉ-CAVA, A. M. Análise filogeográfica. Em: MATIOLI S.R.; FERNANDES, F. M. C. (Orgs.) **Biologia molecular e evolução**. 2ª Ed. Ribeirão Preto: Holos editora, v. 1, p. 250, 2012.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 153p, 1992.

DUARTE, J. M. B.; GIANNONI, M. L. A new species of deer in Brazil (*Mazama bororo*). **Deer Specialist Group Newsletter**, v.13, n.3, 1996a.

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

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 49, p. 17-22, 2008.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, v. 67, p. 403-410, 2003.

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

DUARTE, J.M.B.; VOGLIOTTI, A.; ZANETTI, E.S.; OLIVEIRA, M.L.; TIEPOLO, L.M.; RODRIGUES, F.L.; ALMEIDA, L.B. **Biodiversidade Brasileira**- Avaliação do Estado de Conservação dos Ungulados, ano II, n.3, p.42-49, 2012.

DUARTE, J.M.B.; TALARICO, A.C.; VOGLIOTTI, A.; GARCIA, J.E.; OLIVEIRA, M.L.; MALDONADO, J.E.; GONZALEZ, S. Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx** (In Press).

EDWARDS S. V., BEERLI P. Perspective: Gene divergence, population divergence, and the variance in coalescence time in phylogeographic studies. **Evolution**, v. 54, p. 1839-1859, 2000.

EISENBERG, J. F. **Mammals of the Neotropics. The Northern Neotropics. Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana.** University of Chicago Press, v. 1, p. 449, 1989.

GILLHAM, N.W. **Organelle Genes and Genomes**, Oxford University Press, 1994.

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E.; LEONARD, J. A.; VILÀ, C.; DUARTE, J. M. B.; MERINO, M.; BRUM-ZORRILLA, N.; WAINE, R. K. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Molecular Ecology**, v.7, p. 47-56, 1998.

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO J. E.; ORTEGA J.; TALARICO A. C.; BIDEGARAY-BATISTA L.; GARCIA J. E.; DUARTE, J. M. B. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 754-758, 2009.

HERMANN, R. G.; HUMMEL, S. **Ancient DNA: Recovery and Analysis of Genetic Material from Paleontological, Archeological, Museum, Medical and Forensic Specimens.** New York, NY: Springer Verlag, 1994.

HOARAU, G.; HOLLA, S.; LESCASSE, R.; STAN, W.T.; OLSEN, J.L. Heteroplasmy and evidence for recombination in the mitochondrial control region of the flatfish *Platichthys flesus*. **Molecular Biology and Evolution**, v.19, p. 2261–2264, 2002.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Mamíferos ameaçados do Paraná.** SEMA/IAP. 93p., 2010.

LEONARD, J. A. Ancient DNA applications for wildlife conservation. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4186-4196, 2008.

MA, H.; O'FARRELL, P.H. Selections that isolate recombinant mitochondrial genomes in animals. **eLIFE TOOLS AND RESOURCES**, p. 1-16, 2015.

PÄÄBO, S.; POINAR, H.; SERRE, D.; JAENICKE-DESPRES, V.; HEBLER, J.; ROHLAND, N.; KUCH, M.; KRAUSE, J.; VIGILANT, L.; HOFREITER M. Genetic analyses from ancient DNA. **Annual Review of Genetics**, v.38, p. 645–679, 2004.

PAPLINSKA, J. Z.; TAGGART, D. A.; CORRIGAN, T.; ELDRIDGE, M. D. B.; AUSTIN, J. J. Using DNA from museum specimens to preserve the integrity of evolutionarily significant unit boundaries in threatened species. **Biological Conservation**, v. 144, p. 290–297, 2011.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. *In*: CULLEN JR, L.; RUDRAN, R. & VALLADARES-PADUA, C. **Métodos de estudos em biologia da conservação & manejo da vida silvestre**. Curitiba: Ed. da Universidade Federal do Paraná, p.343-380, 2003.

RAMAKRISHNAN, U.; HADLY, E.A; MOUNTAIN, J. L. Detecting past population bottlenecks using temporal genetic data. **Molecular Ecology**, v. 14, p. 2915–2922, 2005.

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

ROKAS, A.; LADOUKAKIS, E.; ZOUROS, E. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. **Trends in Ecology and Evolution**, v.18, n.8, p. 411-417, 2003.

ROSSI, R.V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo. 2000. 174p.

RUSELLO, M. A.; POULAKAKIS, N.; GIBBS, J. P.; TAPIA, W.; BENAVIDES, E.; POWELL, J. R.; CACCONI, A. DNA from the past informs ex situ conservation for the future: an “extinct” species of Galapagos tortoise identified in captivity. **PLoS ONE**, v. 5, n. 1, p. 1-11, 2010.

SÃO PAULO. Decreto Estadual nº 56.031, de 20 de julho de 2010. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas, as quase ameaçadas, as colapsadas, sobreexplotadas, ameaçadas de sobreexplotação e com dados insuficientes para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Seção 1, nº 136, 21/07/2010:3, 2010.

SATOH, M.; KUROIWA, T. Organization of multiple nucleoids and DNA molecules in mitochondria of a human cell. **Experimental Cell Research**, v, 196, p. 137–140, 1991.

SHIELDS W.M., Dispersal and Mating Systems: Investigating Their Causal Connections. In: B.D. CHEPKO-SADE AND E.T. HALPIN (Editors), **Mammalian Dispersal Patterns. The effects of Social Structure on Populations Genetics**, Univ. Chicago Press, Chicago, p. 3-24, 1987.

TABERLET, P. The use of mitochondrial DNA control region sequencing in Conservation Genetics. in: **Molecular Approaches in Conservation** (T. K. SMITH e R. K. WAYNE, eds.). Oxford University Press, p. 125-142, 1996.

THOMAS, O. On certain of the smaller S. American Cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, ser. 8, n. 11, p. 585-589, 1913.

VARELA, D. M.; TROVATI, R. G.; GUZMÁN, K. R.; ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. Red Brocket Deer (Erxleben 1777). In: **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. DUARTE, J. M. B; GONZÁLEZ, S. (eds.). Jaboticabal: Funep/ IUCN, p 151-159, 2010.

VOGLIOTTI, A. **História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada). Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". 99p. 2003.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Small brocket deer *Mazama bororo* (Duarte 1996). In: **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. DUARTE, J.M.B; GONZÁLEZ, S. (eds.). Jaboticabal: Funep/ IUCN, p 172-176, 2010.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Veado-mateiro-pequeno (*Mazama bororo*). In: **Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção**; DUARTE, J.M.B.; REIS, M.L. (orgs.) – Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2012, p.70-79, 2012.

VOGLIOTTI, A.; OLIVEIRA, M.L.; DUARTE, J.M.B. *Mazama bororo*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2016. Acesso em 01/09/2016.

WANDELER, P.; HOECK, P.E.A.; KELLER, L.F. Back to the future: museum specimens in population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.12, 2007.

WEBER, M.; GONZÁLEZ S. Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. **Écoscience**, v. 10, p. 443-454, 2003.

CAPÍTULO 2 – Marcadores mitocondriais como ferramenta para a identificação de espécimes do gênero *Mazama* em coleções de museus brasileiros

Resumo

As coleções de história natural constituem um acervo que propicia o desenvolvimento de uma série de estudos capazes de elucidar aspectos básicos e complexos da diversidade biológica. Porém, erros de identificação taxonômica deste tipo de material geram resultados baseados em dados incorretos e propagam aspectos irreais da natureza das espécies. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo revisar a identificação de crânios do gênero *Mazama* pertencentes a acervos de museus por meio de marcadores moleculares, diante da dificuldade em distinguir esse material a partir de características morfológicas. Um total de 199 amostras de ossos turbinais foram obtidas para a extração do DNA, e a identificação da espécie foi atingida para 77 espécimes a partir de um fragmento de 224pb do gene mitocondrial citocromo b. Constatamos que 26% dos crânios estavam identificados erroneamente em nível de espécie, e, além disso, 57% das amostras identificadas molecularmente estavam identificadas como *Mazama* sp nos museus visitados. Esses dados corroboram a dificuldade que há na classificação de cervídeos pertencentes a este gênero e indicam a necessidade de obtenção de caracteres não convergentes para a correta classificação morfológica das espécies em questão.

Palavras-chave: Morfologia, convergência morfológica, erros de identificação, coleções biológicas, DNA, citocromo b

Introdução

Coleções biológicas de museus armazenam milhões de espécimes em todo o mundo (WANDELER et al., 2007), sendo que a diversidade de plantas e animais preservados nesses ambientes são a principal fonte para a consulta e desenvolvimento de estudos que envolvam a distribuição geográfica e temporal dos organismos, descrições morfológicas e morfométricas, análises filogenéticas e

filogeográficas, dentre outros (GOODWIN et al., 2015, WANDELER et al., 2007, ROSSI, 2000). As informações contidas nas etiquetas de cada espécime são sempre assumidas como corretas, porém erros de identificação taxonômica dos espécimes são observados (GOODWIN et al., 2015). A delimitação correta dos limites entre espécies é crucial para o conhecimento da diversidade da vida, uma vez que eles determinam se os organismos em questão são membros ou não de uma mesma entidade (DAYRAT, 2005).

Poucos são os estudos que foram delineados para a verificação de erros de identificação em coleções de museus. GOODWIN et al. (2015) avaliaram a precisão dos nomes associados a uma espécie de planta, a partir de 40 herbários em 21 países. Os resultados mostram que pelo menos 58% dos espécimes apresentava identificação errada, sendo que um padrão semelhante também foi obtido para outras duas famílias de plantas. Um dos possíveis motivos para essa alta taxa de erros de identificação apontados pelos autores é a diminuição da formação específica de novos taxonomistas frente ao aumento do número de espécimes nas coleções.

A difusão destes erros de identificação em trabalhos que associam características ecológicas aos nomes presentes nas classificações dos museus origina problemas taxonômicos triviais que afetam hipóteses e ideias, além de um profundo problema prático que atinge nosso conhecimento sobre a natureza (BORTOLUS, 2008).

Com objetivo de revisar a taxonomia do gênero *Mazama* (Mammalia: Cervidae), análises morfológicas e morfométricas foram realizadas em coleções de museus e indicaram um alto polimorfismo individual, dificultando a discriminação das espécies (ROSSI, 2000). Isso se deve ao fato da escassez de registros fósseis e ao alto nível de homoplasia nos caracteres morfológicos do gênero (DUARTE; MERINO, 1997; WEBB, 2000; PITRA et al., 2004; GILBERT et al., 2006; DUARTE et al., 2008; GONZÁLEZ et al., 2010). Desta forma, o gênero *Mazama* é considerado um dos casos mais impressionantes (GILBERT et al., 2006) e surpreendentes de convergência morfológica entre os mamíferos (DUARTE et al., 2008), permanecendo muitas dúvidas acerca das relações evolutivas entre as espécies descritas até o presente momento. A polifilia desse gênero indicada em análises morfológicas

também foi observada a partir de análises moleculares utilizando isoenzimas (SMITH et al., 1986) e marcadores mitocondriais e nucleares (GILBERT et al., 2006; DUARTE et al., 2008; HASSANIN et al., 2012).

Com o advento das abordagens na área de genética molecular, as coleções de museus têm se tornado fonte de muitos estudos (WANDELER et al., 2007). Dentro desse contexto, o presente trabalho teve como objetivo revisar o gênero *Mazama* em museus de zoologia brasileiros por meio de técnicas moleculares, buscando verificar a possível existência de erros de identificação, visto a dificuldade de distinção das espécies deste gênero por meio de dados morfológicos.

Material e métodos

Um total de 199 amostras foram obtidas em 10 museus brasileiros. As entidades visitadas, localização e a quantidade de material obtido em cada uma delas estão descritas na Tabela 2.1.

Tabela 2.1 – Museus visitados com sua respectiva sigla, localização e quantidade de amostras de ossos turbinais obtidas

Museu	Localização	Quantidade de amostras obtidas
Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP)	São Paulo, São Paulo	49
Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ)	Rio de Janeiro, Rio de Janeiro	23
Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI)	Curitiba, Paraná	75
Museu de História Natural Professor Adão José Cardoso (ZUEC)	Campinas, São Paulo	6
Museu de Biologia Professor Mello Leitão (MBML)	Santa Teresa, Espírito Santo	12
Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB)	Porto Alegre, Rio Grande do Sul	14
Colégio Anchieta (MAMM)	Porto Alegre, Rio Grande do Sul	3
Museu de Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)	Porto Alegre, Rio Grande do Sul	4
Museu de Zoologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)	João Pessoa, Paraíba	7
Museu de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)	Recife, Pernambuco	6

Para a seleção dos crânios a serem amostrados, coletaram-se fragmentos de ossos turbinais de espécimes do gênero *Mazama* (independente da identificação de

espécie presente em cada material) que apresentavam origem geográfica em algum dos estados que atualmente apresenta ou que já apresentou cobertura da Mata Atlântica (RS, SC, PR, SP, RJ, ES, MG, MS, GO, BA, SE, AL, PE, PB, RN, CE, PI). O estado do Maranhão, embora não apresente cobertura de Mata Atlântica atual e historicamente, foi amostrado devido à disponibilidade de amostras desse estado próximas a fragmentos da Mata Atlântica no estado do Piauí. A Figura 2.1 representa a distribuição geográfica das 199 amostras coletadas e georreferenciadas no Google Earth v.7.1.2.2041, e plotadas no mapa a partir do programa ArcGIS v.10.1. (ESRI, 2011).

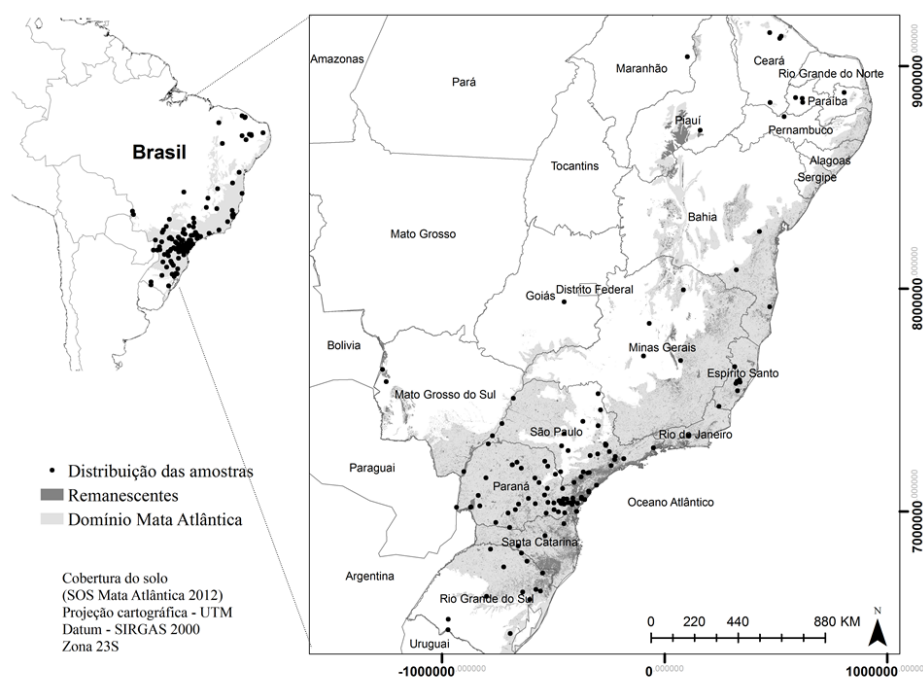


Figura 2.1. Localização geográfica das 199 amostras de ossos obtidas nas coleções científicas dos museus.

Coleta de fragmentos de ossos

Para a coleta de material como fonte de DNA de coleções de história natural optou-se pela obtenção de fragmentos de ossos turbinais, por prejudicarem minimamente os crânios amostrados (WISELEY, 2004), sendo obtido, aproximadamente, 180 mg deste material de cada crânio selecionado. Dessa maneira, utilizou-se uma pinça de cabo longo para a retirada de um pedaço do osso, sendo esta higienizada com água sanitária após o uso em cada espécime. Os fragmentos de ossos foram armazenados em tubos do tipo falcon, e identificados

com a sigla do museu e número de tombo do respectivo crânio. A Figura 2.2 representa o procedimento de coleta de ossos turbinais.

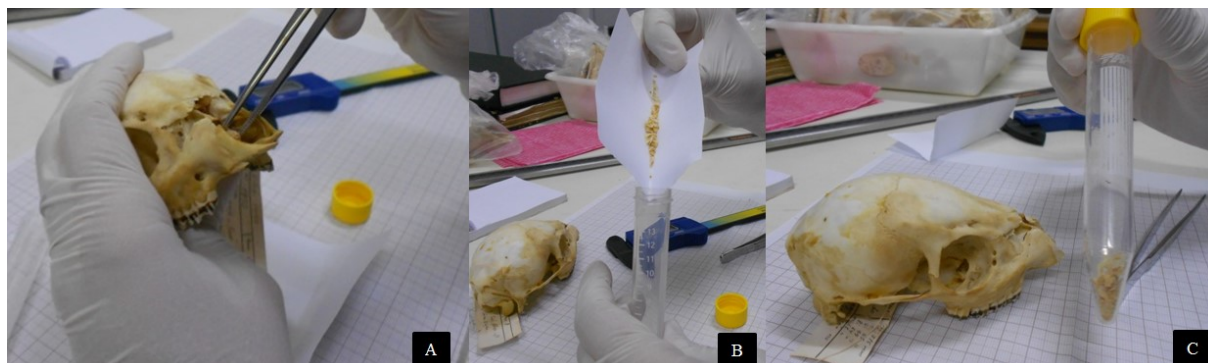


Figura 2.2. Procedimento de coleta de fragmentos dos ossos turbinais. A – com o auxílio de uma pinça de cabo longo retira-se um pedaço do osso. B – os fragmentos são colocados, com auxílio de uma folha de papel, dentro do tubo. C- cada tubo contém, aproximadamente, 180 mg de ossos turbinais, e estes são identificados com a sigla do museu da coleta e número de tombo do espécime.

Extração e amplificação do DNA

A extração do DNA proveniente das amostras de coleções de museus foi realizada utilizando o protocolo Medrano et al. (1990). A fim de minimizar os riscos de contaminação e garantir a confiabilidade dos resultados controles negativos foram utilizados em todas as extrações de DNA e quantificados em NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”), além de ponteiras com filtro e luvas descartáveis em todas as etapas. A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi realizada em fluxo laminar, equipado com luz ultravioleta, sempre acompanhada de controles negativos que foram submetidos a etapa de amplificação para a confirmação de ausência de contaminação nas reações.

Foram utilizados iniciadores para amplificar uma região do gene mitocondrial citocromo b, de 224 pares de bases (pb), (IDMAZ224 L e IDMAZ H) (sequência “forward”: 5’ CATCCGACACAATAACAGCA 3’, sequência “reverse” 5’ TCCTACGAATGCTGTGGCTA 3’) (GONZÁLEZ et al., 2009).

A amplificação foi realizada no termociclador do tipo tempo real, Rotor Gene (Qiagen), com alíquotas de amostras que apresentavam 10 ng/μL, 30 ng/μL, 50 ng/μL e 100 ng/μL. A eleição desse valor de concentração das soluções foi devido a uma revisão bibliográfica para concentração de DNA de coleções de museus utilizada nos protocolos, sendo que este valor variava de 10 ng/μL a 100 ng/μL

(ALLENTOFT et al., 2011; ANDERSEN et al., 2011; LOZIER; CAMERON, 2009; TEX et al., 2010; PAPLINSKA et al., 2011; WOIDE et al., 2010). Verificamos que as alíquotas com concentração de 10 ng/μL foram as que apresentaram os melhores resultados e, por esse motivo, essa foi a concentração de DNA eleita para a amplificação das 199 amostras deste trabalho.

As reações de amplificação apresentaram 20,0 μL de volume final, contendo: 1X do kit SensiFAST™HRM, 0,8 μM de cada iniciador, 0,3 μL de BSA, 10 ng/μL de DNA e 6,9 μL de água.

A programação do termociclador foi a seguinte: 95°C por 2 minutos/ 95°C por 5 segundos/ 55°C por 10 segundos (10 ciclos) / 54°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 53°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 72°C por 20 segundos.

Após a purificação das amostras, seguindo o protocolo Dorado-Pérez (2012), foi realizado o sequenciamento de ambas as fitas (“forward” e “reverse”) das amostras amplificadas, através do sequenciador automático 3730XL “Applied Biosystems”.

Análise dos dados

A qualidade das sequências obtidas foi analisada visualmente e também a partir do programa PHRED, contido nos pacotes do programa Codon Code Aligner v. 6.0.2. Os valores de PHRED indicam a qualidade de cada base a partir da probabilidade de erro na definição da mesma. Dessa forma é realizada a análise de qualidade de cada sequência e a remoção das bases das extremidades das sequências onde valores de PHRED são inferiores a 20. Consequentemente, sequências com número inferior a 50 bases com PHRED 20 são excluídas.

O alinhamento das sequências foi realizado a partir do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994), contido no Bioedit v. 7.2.5, (HALL, 1998). Para identificação da espécie de cada amostra, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências referentes ao gene citocromo b de 985 bp depositadas no “Genbank”, um banco de sequências do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), a partir da ferramenta “blast” (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Posteriormente as sequências foram analisadas no CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010) a partir do programa jModelTest v.2 (DARRIBA et al., 2012),

com o objetivo de inferir qual o modelo evolutivo que melhor se adequa para o gene analisado. O critério utilizado para a seleção do melhor modelo foi o Bayes Information Criterion (BIC), sendo o modelo Hasegawa Kishino e Yano (HKY) + modelo G selecionado como o mais indicado.

O programa Beast v.1.8.1 (DRUMMOND et al., 2012), foi utilizado para a inferência da árvore baseada em análise bayesiana, a partir de 10.000.000 gerações, que agrupou as sequências das amostras provenientes das coleções de museus com as sequências de espécies do gênero *Mazama* com a finalidade de que a identificação de espécie de cada amostra fosse mais robusta. Para enraizamento da árvore foi utilizada uma sequência pertencente à espécie *Ozotoceros bezoarticus*. Foi adotado um descarte por “burn-in” de 25%. A convergência entre as corridas foi verificada utilizando o programa Tracer v.1.6 e apenas resultados do “Effective Sample Size” (ESS) maior que 200 foram aceitos. As árvores resultantes foram condensadas no programa Tree Anotator e a visualização destas foi realizada através do programa FigTree v.1.3.1 (RAMBAUT, 2010).

As amostras pertencentes às espécies *Mazama americana*, *Mazama nana*, *Mazama bororo*, *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga* e *Ozotoceros bezoarticus* utilizadas para a inferência da árvore filogenética estavam presentes no Genbank ou no banco de sequências do NUPECCE (Tabela 2.2). Todas as amostras provenientes do Genbank e utilizadas nas análises filogenéticas foram depositadas pelo NUPECCE ou pela co-orientadora Susana González, indicando a credibilidade da qualidade e procedência do material.

Tabela 2.2 – Sequências utilizadas para a inferência da árvore filogenética, relacionando as amostras provenientes das coleções de museus com sequências que apresentam identificação conhecida. O símbolo (-----) indica localidade de coleta desconhecida e sequências que ainda não foram depositadas no Genbank e estão disponíveis apenas no banco de sequências do NUPECCE.

Espécie	Identificação da amostra	Acesso GenBank	Localidade de coleta
<i>Mazama americana</i>	T40	DQ789224.2	Pará
	T43	-----	Pará
	T110	DQ789201.2	Paraná
	T205	DQ789215.2	Paraná
<i>Mazama bororo</i>	T71	DQ789231.2	São Paulo
	T72	-----	São Paulo
	T338	-----	Paraná (cativeiro)
	Msg54	DQ789187.2	-----
<i>Mazama nana</i>	T2	DQ789214.2	Paraguai
	T53	DQ789227.2	Paraná (cativeiro)
	T185	DQ789210.2	Paraná
<i>Mazama gouazoubira</i>	T112	DQ789202.2	São Paulo
<i>Mazama nemorivaga</i>	T19	DQ789213.2	Rondônia
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	-----	L48404.1	-----

Resultados e Discussão

Amostras

De acordo com a informação presente na etiqueta de cada crânio analisado foram obtidas 39 amostras pertencentes à espécie *M. americana*, uma pertencente à *Mazama rufa* (sinônimo de *M. americana*), 58 pertencentes à *M. gouazoubira*, 11 pertencentes à *Mazama simplicicornis* (sinônimo de *M. gouazoubira*), duas pertencente à *M. nana*, seis pertencentes à *Mazama rufina* (sinônimo de *M. nana*) e 82 identificadas como *Mazama* sp., totalizando 199 amostras.

O ano de coleta, presente em 172 das 199 amostras obtidas é um dado significativo para relacionar a taxa de sucesso de amplificação e idade das amostras. Um total de 42,5% das amostras apresenta até 19 anos de idade. As amostras mais antigas (de 100 a 114 anos de idade) correspondem a 5% do material obtido. A Figura 2.3 ilustra a porcentagem das amostras correspondentes aos intervalos de idade dos fragmentos de ossos adquiridos para extração de DNA de coleções de museus e seu correspondente sucesso de amplificação.

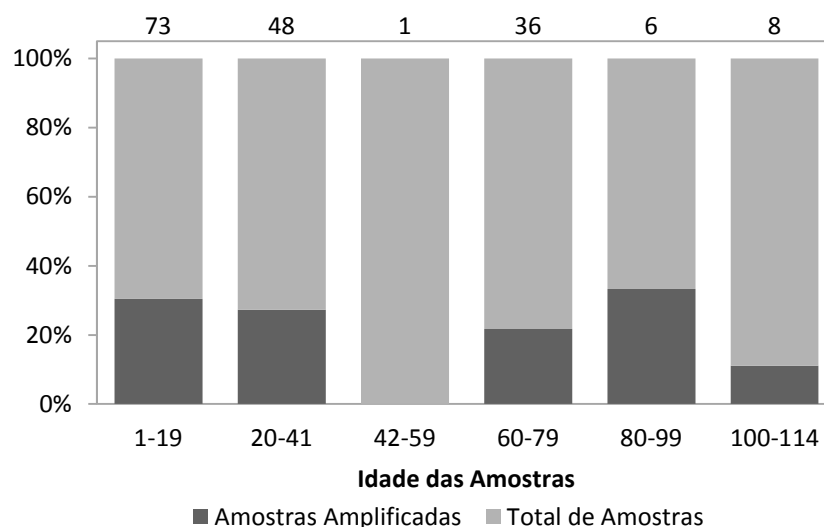


Figura 2.3. Taxa de sucesso de amplificação do DNA (cinza escuro) de acordo com a idade de 172 amostras obtidas em coleções de museus. Os números acima das barras indicam o número absoluto de amostras presentes em cada intervalo de idade.

Assim, podemos observar que os resultados obtidos não indicam relação entre idade da amostra e sucesso de amplificação do DNA, uma vez amostras com entre 80 a 99 anos de idade apresentaram sucesso de amplificação maior do que amostras mais recentes. Diferentes métodos de preservação podem afetar negativamente a extração, amplificação e o sequenciamento do DNA (HALL et al., 1997; TANG, 2006). Como os métodos de preservação podem variar consideravelmente, a variância esperada na qualidade do DNA entre amostras de idade similar pode ser grande e o risco de contaminação é considerável. Consequentemente, a idade da amostra não é o único fator importante que afeta a qualidade do DNA (ROHLAND et al., 2004). Dessa forma, sugere-se que outros fatores, como por exemplo, condições de armazenamento apresentem maior influência na obtenção do DNA.

Além disso, é importante destacar que existe uma flutuação na quantidade de crânios disponíveis nos acervos visitados ao longo dos anos, com uma maior quantidade de material a partir do ano de 1975 até o ano atual. Historicamente, as coletas de espécies da fauna e flora encontradas no Brasil eram realizadas pelos historiadores naturais (GIULIETTI et al. 2005), sendo que, nas últimas décadas, o aumento de empreendimentos na área da construção civil, como rodovias e

hidrelétricas, propiciaram a coleta e depósito de espécimes de cervídeos, neste caso, em coleções científicas.

As coletas de espécimes realizadas em áreas de construção de hidrelétricas tiveram início na década de 1970 como uma das formas de mitigação do impacto gerado (ELETROBRAS, 1999). Para Rodrigues (1999), apesar dos impactos provocados ao meio ambiente, as hidrelétricas fornecem a melhor oportunidade de conhecer localmente a diversidade de fauna terrestre das áreas onde são implantadas, sendo que nenhum método de coleta permite conhecer tão precisamente a composição local de espécies quanto a coleta propiciada pelo enchimento dos reservatórios.

Já o aumento da infraestrutura viária no Brasil aponta crescimento desde o governo Juscelino Kubitschek (1956 –1961), sendo que o conhecimento científico a respeito de atropelamentos decorrentes das construções de rodovias, estradas e ferrovias foi avaliado por Dornas et al. (2012), que verificaram que dos 66 trabalhos consultados, 8% foram realizados antes do ano 2000, 31% entre 2000 e 2005 e 61% entre 2006 e 2009, demonstrando um evidente crescimento dos estudos na última década, e, conseqüentemente o aumento da coleta e depósito deste tipo de espécimes.

Quantificação e amplificação

Após a extração de DNA, todas as 199 amostras foram quantificadas em Nanodrop. A média de DNA quantificado no total de amostras foi de 443 ng/μL, porém, sabe-se que os valores obtidos são superestimados, visto que como produto final de extração obteve-se, além do DNA alvo, o DNA proveniente de insetos e micro-organismos que contaminaram os crânios com seu material genético a partir de algum tipo de contato.

O sucesso de amplificação e identificação das amostras foi de 39%. Numerosos fatores biológicos, físicos e químicos afetam a qualidade do DNA de espécimes de museu. Muitos desses fatores revelam a atividade das endonucleases e de enzimas hidrolíticas (WANDELER et al., 2007). Como consequência, é esperado que o DNA extraído de material histórico seja altamente degradado e altamente diluído, semelhante ao DNA proveniente de amostras não invasivas

(TABERLET et al., 1999). Besnard et al. (2016) afirma que os problemas decorrentes do uso de DNA de museus devido à baixa quantidade e qualidade são facilmente observados para a maioria dos espécimes, sugerindo a utilização de sequenciamento de nova geração para a obtenção de informações genéticas em grande escala a partir de estudos que envolvem espécimes de coleções de museus.

Análises filogenéticas

Após as comparações entre as sequências obtidas e as sequências de referência pertencentes ao gênero *Mazama*, foram inferidas árvores filogenéticas relacionando-as com o objetivo de identificar a espécie pertencente às amostras provenientes dos museus. Dessa maneira, foram identificados três crânios pertencentes à *M. americana*, 41 pertencentes à *M. gouazoubira*, 12 pertencentes à *M. nana* e 21 pertencentes à *M. bororo*.

A Figura 2.4 representa a árvore que relaciona as amostras dos museus às amostras referência do gênero *Mazama*, sendo que as diferentes cores indicam as quatro espécies identificadas (azul – *M. americana*; rosa – *M. nana*; amarelo – *M. bororo*; verde – *M. gouazoubira*). Além disso, as amostras provenientes dos museus estão representadas por seu respectivo número tombo, sigla do museu de origem e localidade geográfica entre parênteses e as amostras de referência estão indicadas com o nome da espécie e sigla de identificação presente do Genbank e/ou banco de sequências do NUPECCE (Tabela 2.2). Informações detalhadas de cada uma dessas amostras pertencentes aos museus estão no Apêndice A.

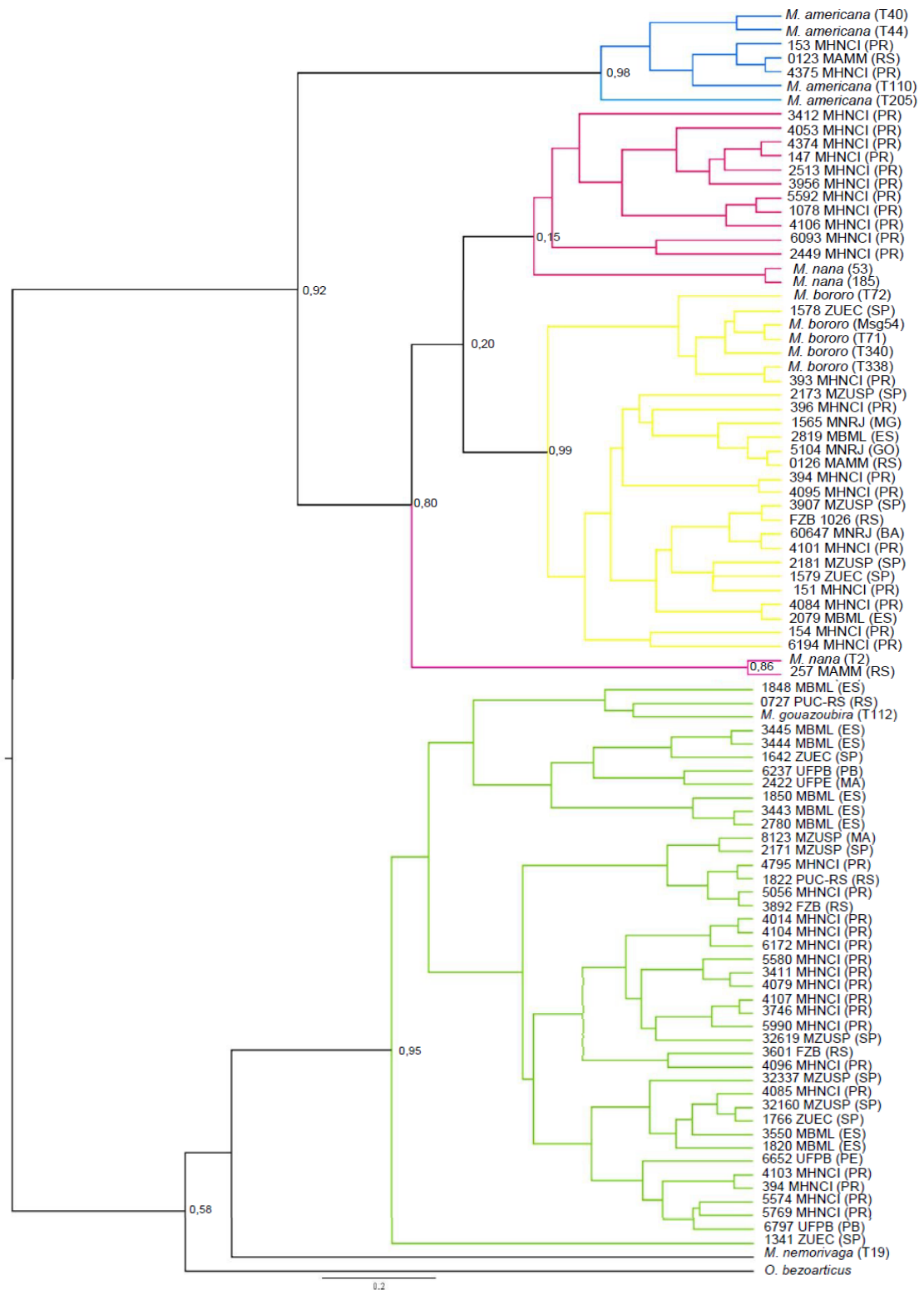


Figura 2.4. Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana, demonstrando as relações entre amostras de DNA recente e de coleções de museu dentro do gênero *Mazama*, a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo *b*. As amostras referências estão representadas pelo nome da espécie e sigla de identificação. As amostras de museus estão representadas pelo número tomo, sigla do museu de origem e localidade entre parênteses. As cores indicam as quatro espécies identificadas nos museus (azul – *M. americana*; rosa – *M. nana*; amarelo – *M. bororo*; verde – *M. gouazoubira*).

Identificação morfológica x identificação molecular

Comparando-se a identificação obtida para cada museu com a espécie identificada molecularmente observam-se os resultados apresentados na Tabela 2.3.

Tabela 2.3 – Comparação entre a identificação morfológica de 77 espécimes pertencentes a coleções de museus brasileiros com a identificação obtida a partir de análise molecular

Identificação Museu		Identificação Molecular			
		<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. americana</i>	<i>M. nana</i>	<i>M. bororo</i>
<i>M. gouazoubira</i>	21	11	1	2	7
<i>M. americana</i>	7	3	0	1	3
<i>M. nana</i>	5	0	0	4	2
<i>Mazama</i> sp.	44	27	2	5	9
Total	77	41	3	12	21

Os crânios pertencentes à *M. gouazoubira* e *M. nana* foram os que apresentaram menor taxa de erro, comparando-se os resultados de identificação morfológica e molecular para estas espécies (Figuras 2.5 e 2.6).

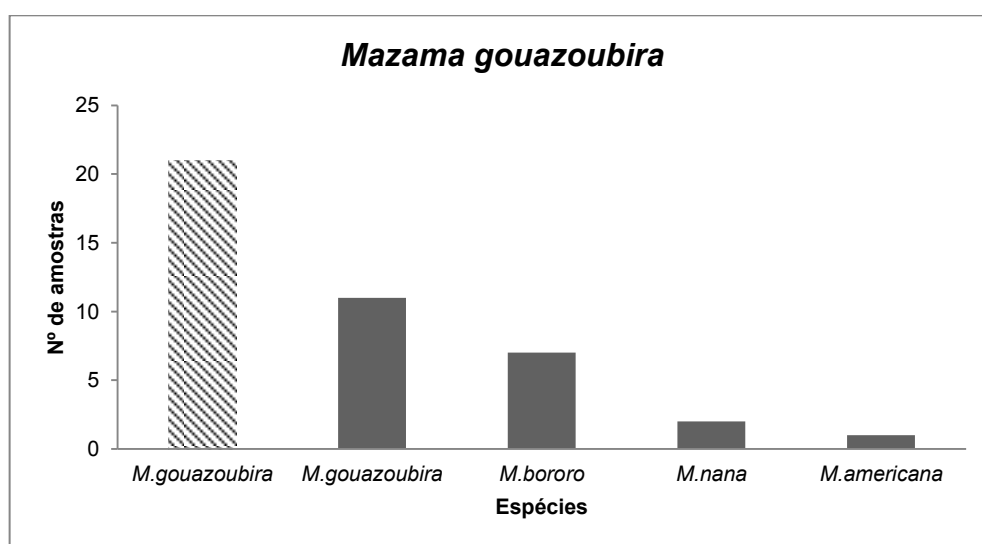


Figura 2.5. Comparação entre a identificação morfológica de crânios pertencentes à espécie *M. gouazoubira* (1ª coluna) com a identificação molecular dos mesmos crânios (colunas de coloração escura).

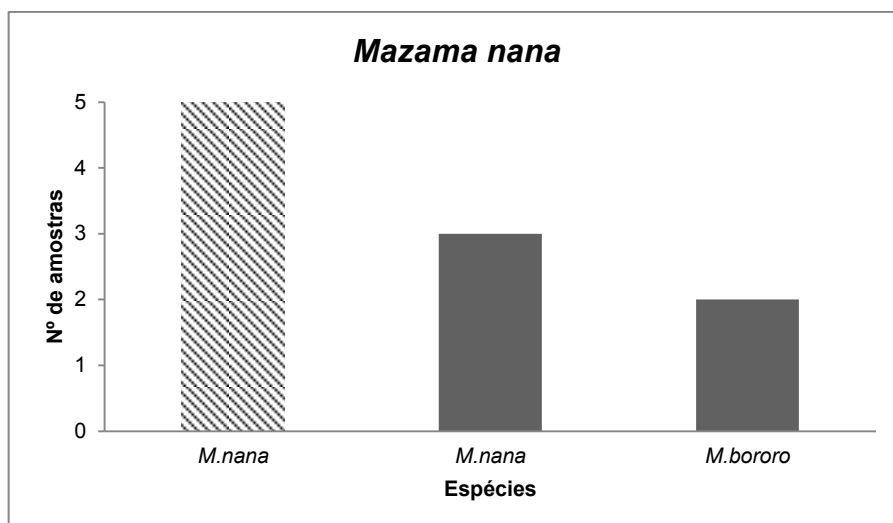


Figura 2.6. Comparação entre a identificação morfológica de crânios pertencentes à espécie *M. nana* (1ª coluna) com a identificação molecular dos mesmos crânios (colunas de coloração escura).

Em contrapartida, os crânios identificados morfológicamente como pertencentes à *M. americana* apresentaram 100% de taxa de erro (Figura 2.7), visto que a revisão deste material, a partir do DNA de coleções de museus, indicou que nenhum dos crânios identificados como *M. americana* pertencia a esta espécie.

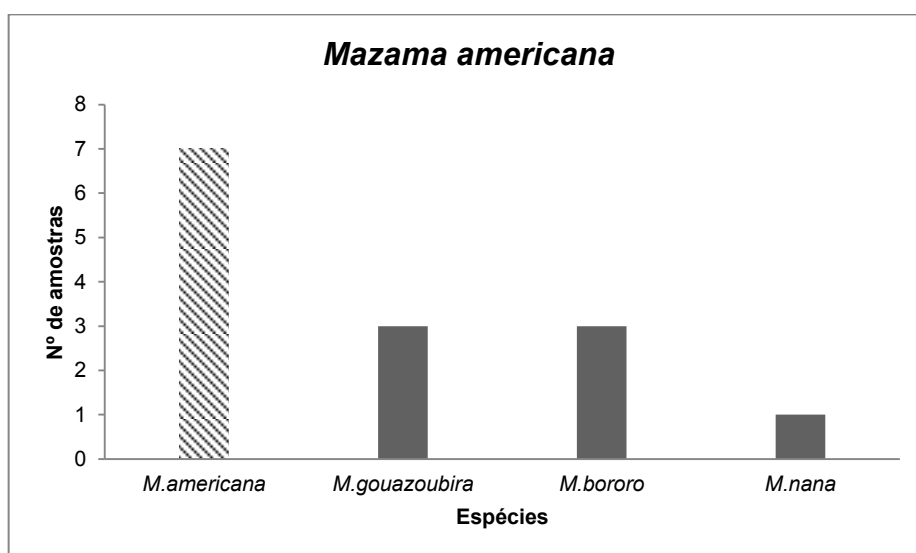


Figura 2.7. Comparação entre a identificação morfológica de crânios pertencentes à espécie *M. americana* (1ª coluna) com a identificação molecular dos mesmos crânios (colunas de coloração escura).

Já os 21 crânios pertencentes à espécie *M. bororo* foram identificados molecularmente, porém não estavam presentes em nenhuma identificação morfológica do material analisado, fato que pode ser explicado devido a recente descrição da espécie, por Duarte em 1996, além da ausência de diferenças morfométricas estatisticamente significativas entre os crânios desta espécie e de *M. americana*, como afirma Rossi em 2000.

Esses resultados demonstram que a taxa de erro decorrente da identificação baseada em caracteres morfológicos foi de 26%, mesmo resultado obtido por Moraes-Barros et al. (2011), que a partir de dados morfológicos e moleculares revisou coleções de museus de duas espécies de preguiças e observou 26% de erros de identificação, atribuídos à semelhança de coloração na pelagem dessas duas espécies.

Os erros aqui observados indicam a dificuldade de identificação correta das espécies de cervídeos do gênero *Mazama* a partir de caracteres morfológicos, como também a existência de muitos espécimes sem identificação em nível de espécie, visto que 57% do total dos crânios identificados molecularmente estavam classificados como *Mazama* sp. (APÊNDICE A).

Dessa forma, espera-se que com o auxílio do uso do DNA de coleções de museus possa ser realizada a seleção de caracteres morfológicos não convergentes para este grupo, permitindo assim, a realização de identificações morfológicas corretamente, visto que altas taxas de erros de identificação têm implicações graves para o uso indiscriminado dos dados de espécimes de coleções de história natural (GOODWIN et al., 2015), pois além de propagar erros de classificação biológica (BORTOLUS, 2008), torna inconsistente os resultados de estudos que utilizam esse tipo de material, de acordo com a classificação taxonômica presente no museu.

Referências Bibliográficas

ALLENTOFT, M. E.; OSKAM, C.; HOUSTON, J.; HALE, M. L.; GILBERT, M. T. P.; RASMUSSEN, M.; SPENCER, P.; JACOMB, C.; WILLERSLEV, E.; HOLDAWAY, R. N.; BUNCE, M. Profiling the Dead: Generating Microsatellite Data from Fossil Bones of Extinct Megafauna—Protocols, Problems, and Prospects. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2011.

ANDERSEN, K.; BIRD, K. L.; RASMUSSEN, M.; HAILE, J.; BREUNING-MADSEN, H.; KJAER, K. H.; ORLANDO, L.; GILBERT, T. P.; WILLERSLEV, E. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. **Molecular Ecology**, v.21, n. 8, p. 1966-1979, 2011.

BESNARD, G.; BERTRAND, J.A.M.; DELAHAIE, B.; BOURGEOIS, Y.X.C.; LHUILLIER, E.; THÉBAUD, C. Valuing museum specimens: high-throughput DNA sequencing on historical collections of New Guinea crowned pigeons (*Goura*). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.117, p.71–82, 2016.

BORTOLUS, A. Error Cascades in the Biological Sciences: The Unwanted Consequences of Using Bad Taxonomy in Ecology. **AMBIO: A Journal of the Human Environment**, v.37, n.2, p.114-118, 2008.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v.9, n.8, p.772, 2012.

DORADO-PÉREZ, G. **Prácticas generales de bioquímica y biología molecular**. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba, España. Disponível em: www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/47%20SECUENCIACI%C3%93N%20DNA.pdf. Acesso: 21/05/2016.

DORNAS, R.A.P.; KINDEL, A.; FREITAS, S.R.; BAGER, A. Avaliação da mortalidade de vertebrados em rodovias no Brasil. In: Bager, A. (Ed. UFLA). **Ecologia de estradas**, 2002, p. 139-152.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology And Evolution**, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

DUARTE, J. M. B.; GIANNONI, M. L. A new species of deer in Brazil (*Mazama bororo*). **Deer Specialist Group Newsletter**, v. 13, n. 3, p. 5, 1996.

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

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

ELETROBRAS. **O tratamento do impacto das hidrelétricas sobre a fauna terrestre/ Centrais Elétricas Brasileiras Área de Meio Ambiente**, p.5-8, 1999.

ESRI. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: **Environmental Systems Research Institute**, 2011.

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

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

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO J.E.; ORTEGA J.; TALARICO A.C.; BIDEGARAY BATISTA, L.; GARCIA, J.E.; DUARTE, J.M.B. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources** v.9, p. 754-758, 2009.

GOODWIN, Z.A.; HARRIS, D.J.; FILER, D.; WOOD, J.R.I.; SCOTLAND, R.W. Widespread mistaken identity in tropical plant collections. **Current Biology**, v. 25, p. 1057–1069, 2015.

GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; QUEIROZ, L.P. DE; WANDERLEY, M.G.L.; VAN DEN BERG, C. Biodiversity and conservation of plants in Brazil. **Conservation Biology**, v.19, n.3, p. 632-639, 2005.

HALL, L.M., WILLCOX, M.S.; JONES, D.S. Association of enzyme inhibition with methods of museum skin preparation. **Biotechniques** v.22, p. 928–934, 1997.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95-98, 1999.

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

LOZIER, J. D.; CAMERON, S. A. Comparative genetic analyses of historical and contemporary collections highlight contrasting demographic histories for the bumble bees *Bombuspen sylvanicus* and *B. impatiens* in Illinois. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 1875–1886, 2009.

MEDRANO, J.F.; AASEN, E.; SHARROW, L. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v.8, n.43, 1990.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees".In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, p. 1-8, 2010.

MORAES-BARROS, N.; SILVA, J.A.B.; MORGANTE, J.S. Morphology, molecular phylogeny, and taxonomic inconsistencies in the study of *Bradypus* sloths (Pilosa: Bradypodidae). **Journal of Mammalogy**, v. 92, n. 1, p. 86–100, 2011.

PAPLINSKA, J. Z.; TAGGART, D. A.; CORRIGAN, T.; ELDRIDGE, M. D. B.; AUSTIN, J. J. Using DNA from museum specimens to preserve the integrity of evolutionarily significant unit boundaries in threatened species. **Biological Conservation**, v. 144, p. 290–297, 2011.

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

RODRIGUES, M.T. Construção de hidroelétricas, resgate de fauna e coleções zoológicas: uma proposta visando assegurar a preservação da biodiversidade e a formação de recursos humanos qualificados (*In: O tratamento do impacto das hidrelétricas sobre a fauna terrestre/ Centrais Elétricas Brasileiras Área de Meio Ambiente*), p.15-23, 1999.

ROHLAND, N.; SIEDEL, H.; HOFREITER, M. Nondestructive DNA extraction method for mitochondrial DNA analyses of museum specimens. **Biotechniques**, v.36, p. 814–821, 2004.

ROSSI, R.V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil** (Artiodactyla, Cervidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo. 174p., 2000.

RAMBAUT, A: FigTree 1.3.1. 2010 [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]

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

TABERLET, P.; WAITS, L.P.; LUIKART, G. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. **Trends Ecology Evolution**, v. 14, p. 323–327, 1999.

TANG, E.P.Y. Path to Effective Recovering of DNA from Formalin- Fixed Biological Samples in Natural History Collections Workshop Summary, **The National Academies Press**, 2006.

TEX, R.; MALDONADO, J. E.; THORINGTON, R.; LEONARD, J. A. Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. **Genetica**, v. 138, n. 9-10, p. 979-984, 2010.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p. 4673–4680, 1994.

WANDELER, P.; HOECK, P.E.A.; KELLER, L.F. Back to the future: museum specimens in population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.12, 2007.

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

WISELEY, S.M.; MALDONADO, J.E.; FLEISCHE, S.C.A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens. **Conservation Genetics**, v.5, p. 105–107, 2004.

WOIDE, D.; ZINK, A.; THALHAMMER, S. Technical Note: PCR Analysis of Minimum Target Amount of Ancient DNA. **American Journal Of Physical Anthropology**, v. 142, p. 321–327, 2010.

CAPÍTULO 3 – Novo nome para *Mazama bororo* (*Mazama jucunda* Thomas, 1913; Mammalia: Cervidae) a partir do DNA obtido em coleções de museus.

Resumo

A taxonomia integrativa constitui-se da utilização de um conjunto de ferramentas de diferentes áreas para o conhecimento e caracterização de unidades taxonômicas. A espécie *Mazama bororo* foi reconhecida, inicialmente, através de um padrão cariotípico e morfológico distinto dos demais existentes para o gênero *Mazama*, constituindo a base para a descrição da espécie, em 1996. Porém, recentemente, revisando-se a descrição de *Mazama americana jucunda*, sugere-se que esta subespécie corresponda à espécie *Mazama bororo*, devido, principalmente, a mesma área de ocorrência e a semelhança de medidas morfológicas entre ambas as unidades taxonômicas. Com o objetivo de resolver essa questão, comparou-se o DNA proveniente do holótipo de *Mazama americana jucunda* com o DNA do holótipo de *M. bororo*. Através da amplificação de um fragmento do gene mitocondrial citocromo *b* foi construída uma árvore filogenética, a partir da análise bayesiana. Desta forma confirmou-se que *M. a. jucunda* e *M. bororo* constituem a mesma entidade biológica, demonstrando-se a necessidade de elevação de *M. a. jucunda* à categoria de espécie, permanecendo *Mazama bororo* como seu sinônimo.

Palavras-chave: análise filogenética, espécies crípticas, *Mazama americana jucunda*, citocromo b, taxonomia

Introdução

A espécie *Mazama bororo*, ou veado-mateiro-pequeno, foi proposta pela primeira vez por Duarte em 1992, durante um estudo para a caracterização citogenética dos cervídeos brasileiros. Esta classificação foi predominantemente baseada em diferenças cariotípicas dessa espécie em relação às demais do gênero *Mazama*. O espécime utilizado para esta análise, um macho adulto proveniente do município de Capão Bonito, região sul do Estado de São Paulo, até então

caracterizado como *Mazama americana*, apresentou um padrão cromossômico completamente distinto das demais espécies conhecidas de *Mazama*, sugerindo seu provável isolamento reprodutivo (VOGLIOTTI et al., 2012).

Uma descrição mais detalhada do animal foi feita por Duarte (1996), Duarte e Merino (1997), e Duarte e Jorge (2003), que caracterizaram e descreveram *M. bororo* com número diplóide ($2N$)=32-34 e número fundamental (FN)=46, reconhecendo esta espécie como uma forma cariotipicamente intermediária entre *Mazama nana* ($2n$ =36-38 e FN =56,59 ou 60) e *Mazama americana americana* ($2n$ =50-53 e FN = 54, 56 ou 57) (DUARTE; JORGE, 1996). Comparando-se os aspectos morfológicos, as médias das medidas corporais de *M. bororo* também apresentam valores intermediários entre *M. americana* e *M. nana*, e são muito próximas das de híbridos entre estas duas últimas espécies (DUARTE; JORGE, 2003). Os híbridos entre *M. nana* e *M. americana*, apesar de bastante semelhantes aos *M. bororo* no aspecto morfológico, apresentam o conjunto cromossômico de ambos os parentais e, portanto, são facilmente distinguíveis através da análise citogenética (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012). O holótipo de *M. bororo*, proveniente do estado de São Paulo, foi depositado no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP), com o número de testemunho MZUSP 33471 (VOGLIOTTI; DUARTE, 2009).

Estudos morfométricos e morfológicos realizados por Rossi (2000) baseados em esqueletos e peles de diferentes coleções brasileiras falharam em diferenciar *M. bororo* de *M. americana*. Entretanto, os dados indicam a presença de uma população parcialmente diferenciada de *M. americana* distribuída ao longo da costa sul do Brasil (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010). Porém, sabe-se que alguns caracteres são potencialmente discriminantes da espécie como: peso, altura, comprimento do corpo, circunferência do tórax e comprimento do metacarpo e metatarso (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010), dados, na maioria das vezes, inacessíveis em coleções científicas.

Recentemente, a partir de uma revisão das descrições de espécimes pertencentes ao gênero *Mazama*, constatou-se que o nome *Mazama americana jucunda* (THOMAS, 1913), é o mais antigo publicado dentro do gênero no Brasil, tendo sido coletada em 1901, na região de Roça Nova, na Serra do Mar, no estado

do Paraná, Brasil, a 1000 metros de altitude, região de provável ocorrência de *M. bororo*. Além disso, o animal utilizado para a descrição da subespécie apresentava padrões morfológicos semelhantes a *M. bororo*. Dessa forma, considerou-se como hipótese que esta subespécie corresponda à espécie *M. bororo*, devido, principalmente, a mesma área de ocorrência e à semelhança de medidas morfológicas entre ambas as unidades taxonômicas. Esses dados conferem uma evidência de que *M. bororo* e *M. americana jucunda* podem constituir a mesma entidade biológica.

Atualmente, apesar da espécie *M. bororo* não estar listada na CITES (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010), a espécie foi classificada como “Vulnerável” (Vulnerable – VU) no estado de São Paulo (São Paulo, 2010), VU no Paraná (IAP, 2010) e VU na avaliação global da IUCN (VOGLIOTTI et al., 2016). Para Weber e González (2003), o veado-mateiro-pequeno pode ser considerado uma das espécies de cervídeos mais ameaçadas do mundo, provavelmente devido ao seu endemismo na Mata Atlântica e à intensa história de destruição desse bioma. A degradação ambiental da Mata Atlântica, causada também por explorações clandestinas de recursos naturais representam uma importante ameaça às populações de *M. bororo*. Isso porque a caça e a predação por cachorros, decorrentes dessas explorações clandestinas, representam uma importante ameaça à espécie, além de *M. bororo* apresentar a menor distribuição geográfica das espécies de cervídeos descritas atualmente (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010; DUARTE et al. 2012; DUARTE et al., In Press).

Registros atuais sugerem que a área de ocorrência da espécie inserida neste bioma é restrita aos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, com paisagem que varia entre planície costeira, ao nível do mar, terreno abrupto e montanhas com altitude de até 1200 m (VOGLIOTTI; DUARTE, 2010; DUARTE et al. In Press).

Tendo em vista que a subespécie *M. a. jucunda* pode corresponder à espécie *M. bororo*, realizou-se a comparação do DNA do holótipo de *M. americana jucunda* com o DNA do holótipo de *M. bororo*. Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi o de avaliar a hipótese de que *M. bororo* corresponde à subespécie *M. a. jucunda*, através de análises filogenéticas.

Material e Métodos

Amostras de DNA

Foram utilizadas amostras de pelo para a extração do DNA de *M. bororo*, provenientes do estado do Paraná e São Paulo, incluindo a amostra do holótipo da espécie (T71), que estavam armazenadas no banco de células do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), localizado em Jaboticabal, São Paulo, Brasil.

Em relação à extração do DNA do holótipo de *Mazama americana jucunda*, utilizou-se um pequeno fragmento de osso cedido pelo Museu de História Natural de Londres (BMNH 3.7.1.103).

Extração do DNA, amplificação e sequenciamento

A extração do DNA proveniente das amostras de *M. bororo* foi realizada a partir do protocolo de Sambrook et al. (1989), sendo que um fragmento de 224 pares de bases (pb) foi amplificado a partir de um par de iniciadores para a região mitocondrial do citocromo *b* (IDMAZ224 L e IDMAZ H) (sequência “forward”: 5’ CATCCGACACAATAACAGCA 3’, sequência “reverse” 5’ TCCTACGAATGCTGTGGCTA 3’) (GONZÁLEZ et al., 2009).

As amostras de DNA de pelo de *M. bororo* foram amplificadas em um termociclador convencional, da marca “Biometra T1 Thermocycler”, e a reação de amplificação apresentou 25,0 µL de volume final, contendo: 1X de ImmoMix™, Bioline, 0,3 µM de cada iniciador, 0,3 µM de BSA, 15 ng/µL de DNA e 7,6 µL de água.

As condições da reação de amplificação da polimerase em cadeia (PCR) foram: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% para avaliar a amplificação e verificar o tamanho dos fragmentos baseados no marcador de 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

A extração do DNA proveniente da amostra do Museu de História Natural de Londres foi realizada utilizando o protocolo de Medrano et al. (1990). A fim de minimizar os riscos de contaminação e garantir a confiabilidade dos resultados,

controles negativos foram utilizados em todas as extrações de DNA e estes foram quantificados em NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”), além da utilização de ponteiros com filtro e luvas descartáveis em todas as etapas. A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi realizada três vezes, de maneira distinta e em dois laboratórios diferentes, em fluxo laminar equipado com luz ultravioleta, sempre acompanhada de controles negativos que foram submetidos à etapa de amplificação para a confirmação de ausência de contaminação nas reações.

A reação de amplificação da polimerase em cadeia para a amostra de DNA proveniente de coleção de museu apresentou 20,0 µL de volume final, contendo: 1X do kit SensiFAST™HRM, 0,8 µM de cada iniciador, 0,3 µL de BSA, 10 ng/µL de DNA e 6,9 µL de água.

A programação do termociclador em tempo real (Rotor Gene, Qiagen) foi: 95°C por 2 minutos/ 95°C por 5 segundos/ 54°C por 10 segundos (10 ciclos) / 54°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 53°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 72°C por 20 segundos.

Após a purificação das amostras, seguindo o protocolo de Dorado-Pérez (2012), foi realizado o sequenciamento de ambas as fitas (“forward” e “reverse”) das amostras amplificadas, por meio do sequenciador automático 3730XL “Applied Biosystems”.

Morfometria linear

Foram registradas 25 medidas cranianas para o holótipo de *M. americana jucunda* (BMNH) e para crânios de *M. americana*, *M. bororo*, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, provenientes do Museu no NUPECCE. Para tanto, utilizou-se um paquímetro digital (precisão 0,01 mm), a partir dos critérios de Von Den Driesch (1976).

As medidas obtidas foram as seguintes: menor comprimento do crânio, eixo base-cranial, comprimento frontal mediano, lambda – nasal, lambda – região mais distal do osso nasal, acrocânio, maior comprimento dos nasais, distância dos dentes, comprimento da linha do molar, comprimento da linha pré-molar, maior comprimento interno da órbita, maior altura interna da órbita, maior largura do mastóide, maior largura dos côndilos occipitais, maior largura das bases do processo

para-occipital, maior largura do forame magno, altura do forame magno, maior largura neuro-craniana, largura frontal menor, maior largura entre as órbitas, largura mínima entre as órbitas, largura do zigomático, maior largura entre os nasais, maior largura entre o pré-maxilar, maior largura do palatal, ponto mais alto da crista da nuca superior.

Análise dos dados

A qualidade das sequências obtidas foi analisada visualmente e também a partir do programa PHRED, contido nos pacotes do programa Codon Code Aligner v. 6.0.2. Os valores de PHRED indicam a qualidade de cada base a partir da probabilidade de erro na definição da mesma. Dessa forma é realizada a análise de qualidade de cada sequência e a remoção das bases das extremidades das sequências onde valores de PHRED são inferiores a 20. Consequentemente, sequências com número inferior a 50 bases com PHRED 20 são excluídas.

O alinhamento das sequências foi realizado a partir do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994), contido no Bioedit v. 7.2.5, (HALL, 1998). Para identificação da espécie de cada amostra, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências referentes ao gene citocromo b de 985 bp depositadas no “Genbank”, um banco de sequências do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), a partir da ferramenta “blast” (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Posteriormente as sequências foram analisadas no CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010) a partir do programa jModelTest v.2 (DARRIBA et al., 2012), com o objetivo de inferir qual o modelo evolutivo que melhor se adequa para o gene analisado. O critério utilizado para a seleção do melhor modelo foi o Bayes Information Criterion (BIC), sendo o modelo Hasegawa Kishino e Yano (HKY) + modelo G, selecionado como o mais indicado.

O programa Beast v.1.8.1 (DRUMMOND et al., 2012), foi utilizado para a inferência da árvore baseada em análise bayesiana, a partir de 10.000.000 gerações, que agrupou a sequência da amostra de *M. americana jucunda* com as sequências de *M. bororo* e demais espécies do gênero *Mazama* com a finalidade de que a identificação de espécie de cada amostra fosse mais robusta. Para enraizamento da árvore foi utilizada uma sequência pertencente à espécie *Ozotoceros bezoarticus*. Foi adotado um descarte por “burn-in” de 25%. A

convergência entre as corridas foi verificada utilizando o programa Tracer v.1.6 e apenas resultados do “Effective Sample Size” (ESS) maior que 200 foram aceitos. As árvores resultantes foram condensadas no programa Tree Anotator e a visualização destas foi realizada através do programa FigTree v.1.3.1 (RAMBAUT, 2010).

As amostras pertencentes às espécies *Mazama americana*, *Mazama nana*, *Mazama bororo*, *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga* e *Ozotoceros bezoarticus* utilizadas para a inferência da árvore filogenética estavam presentes no Genbank ou no banco de sequências do NUPECCE (Tabela 3.1). Todas as amostras provenientes do Genbank e utilizadas nas análises filogenéticas foram depositadas pelo NUPECCE ou pela co-orientadora Susana González, indicando a credibilidade da qualidade e procedência do material.

Tabela 3.1 – Sequências utilizadas para a inferência da árvore filogenética, relacionando as amostras provenientes das coleções de museus com sequências que apresentam identificação conhecida. O símbolo (-----) indica localidade de coleta desconhecida e sequências que ainda não foram depositadas no Genbank e estão disponíveis apenas no banco de sequências do NUPECCE.

Espécie	Identificação da amostra	Acesso GenBank	Localidade de coleta
<i>Mazama americana</i>	T21	DQ789216.2	-----
	T43	-----	Pará
	T110	DQ789201.2	Paraná
	T205	DQ789215.2	Paraná
<i>Mazama bororo</i>	T71	DQ789231.2	São Paulo
<i>Mazama nana</i>	T338	-----	Paraná (cativeiro)
	T53	DQ789227.2	Paraná (cativeiro)
	T185	DQ789210.2	Paraná
<i>Mazama gouazoubira</i>	Msg001	DQ789179.2	-----
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	Sg1623	-----	-----

Por fim, a partir do programa BioEstat v. 5.0 (AYRES et al., 2007), realizou-se a análise de “clusters” entre as medidas cranianas adquiridas descritas acima.

Resultados e Discussão

A sequência da região do gene citocromo b obtida para a amostra de *M. americana jucunda* foi comparada com as demais sequências presentes no “Genbank”, a partir da ferramenta “blast”, e, como resultado, obteve-se uma similaridade de 99% com a sequência desta mesma região para a amostra do holótipo de *M. bororo* (T71). Essa alta congruência entre as sequências dos holótipos de *M. a. jucunda* e *M. bororo* demonstra a correspondência entre as duas unidades taxonômicas, uma vez que *M. americana jucunda* não apresentou a mesma similaridade com as sequências de *Mazama americana*, também presentes no banco de dados. Além disso, a árvore gerada a partir da análise bayesiana (Figura 3.1) apresenta a amostra do holótipo de *M. americana jucunda* agrupada, com 0,9999 de probabilidade com as demais amostras de *M. bororo*, suportando a correspondência de *M. americana jucunda* com a espécie *M. bororo*. Além disso, a árvore apresentada relaciona a amostra de *M. a. jucunda* às amostras de DNA de referência do gênero *Mazama*, sendo que o ramo de cor vermelha indica o holótipo de *M. americana jucunda*. As amostras de referência estão indicadas com o nome da espécie e sigla de identificação presente do Genbank e/ou banco de sequências do NUPECCE (Tabela 3.1).

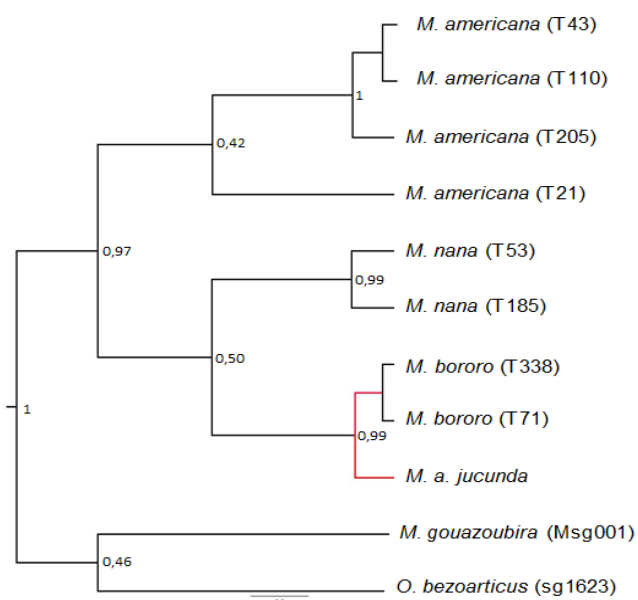


Figura 3.1. Árvore filogenética inferida a partir da análise bayesiana a partir de um fragmento de 224 pb do gene mitocondrial citocromo b, demonstrando a proximidade filogenética entre *Mazama bororo* e *Mazama americana jucunda* (ramo de cor vermelha).

A árvore obtida a partir da análise de distância Euclidiana, também indicou maior similaridade entre *M. americana jucunda* e *M. bororo* (Figura 3.2).

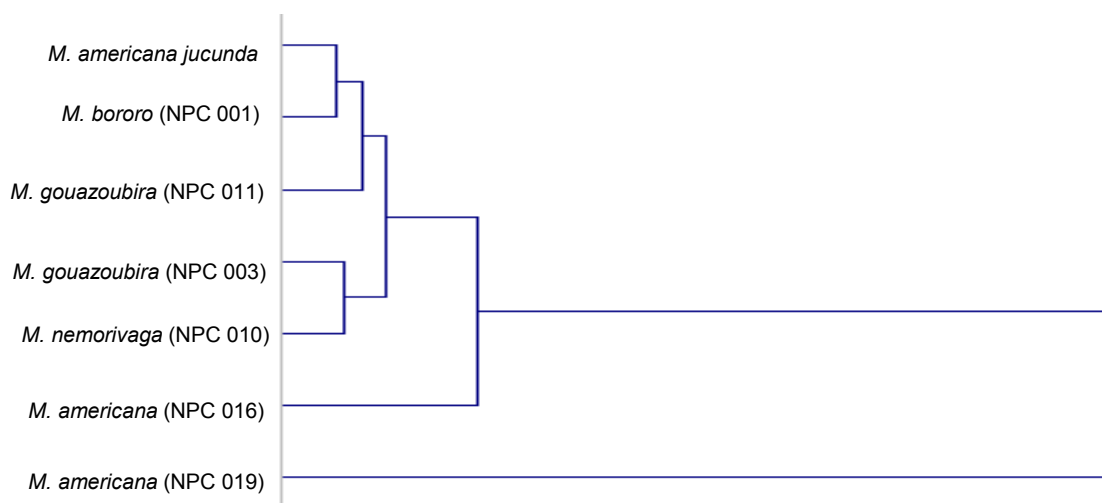


Figura 3.2. Árvore de distância obtida a partir de medidas cranianas do holótipo de *M. americana jucunda* e *M. bororo*, *M. americana*, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.

Avise e Walker (1999) e Johns e Avise (1998) concluem que o gene citocromo *b* mostra um alto nível de congruência dentro dos limites de espécie baseados em estudos taxonômicos clássicos. Dessa forma, observa-se que o gene utilizado para resolução desta questão taxonômica foi informativo e responsável por elucidar que *M. americana jucunda* não se trata de uma subespécie de *M. americana*, mas sim de uma espécie distinta, hoje denominada de *M. bororo* e com caracteres morfológicos, citogenéticos, ecológicos e moleculares já descritos (DUARTE; GIANNONI, 1996; DUARTE; JORGE, 2003; DUARTE et al., 2008; VOGLIOTTI, 2003; VOGLIOTTI; DUARTE, 2009).

A utilização do DNA proveniente de museu foi essencial para elucidar essa questão taxonômica, objetivo difícil de ser alcançado através de outras ferramentas atualmente disponíveis, uma vez que o único exemplar conhecido da subespécie *M. a. jucunda* foi coletado em 1901 e depositado no BMNH em 1913. Dentro desse mesmo contexto, Bensch e Pearson (2002) desenvolveram um estudo de comparação de DNA proveniente de uma espécie conhecida apenas pelo tipo depositado em museu (*Acrocephalus orinus*) com outras duas espécies de aves recentes (*A. stentoreus* e *A. dumetorum*), com o objetivo de confirmar se *A. orinus* correspondia a uma das espécies atuais. Dessa forma, evidencia-se que o

sequenciamento de material de museu permite preencher lacunas de amostragem e gerar conhecimento inédito que estão armazenados nas coleções (MITCHELL, 2015).

Assim, os resultados deste trabalho, suportados por evidências moleculares e morfométricas, indicam a necessidade de elevar a subespécie *M. americana jucunda* (THOMAS, 1913) à categoria de espécie, de acordo com o princípio da prioridade (Artigo 23, do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica) (ICZN, 1999). Consequentemente, o nome *M. bororo*, Duarte, 1996, deve ser considerado uma sinonímia de *Mazama jucunda* (Thomas, 1913).

Referências Bibliográficas

AVISE, J. C.; WALKER, D. Species realities and numbers in sexual vertebrates: perspectives from an asexually transmitted genome. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.96, p.992–995, 1999.

AYRES, M.; AYRES-JUNIOR, M.; AYRES, D.L.; SANTOS, A.A.S. **BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. 2007.

BENSCH, S.; PEARSON, D. The large-billed reed warbler *Acrocephalus orinus* revisited. **Ibis**, v. 144, p. 259–267, 2002.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v.9, n.8, p.772, 2012.

DORADO-PÉREZ, G. **Prácticas generales de bioquímica y biología molecular**. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba, España. Disponível em: www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/47%20SECUENCIACI%C3%93N%20DNA.pdf. Acesso: 21/05/2016.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUTY and the BEAST 1.7. **Molecular Biology And Evolution**, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 153p, 1992.

DUARTE, J. M. B.; GIANNONI, M. L. A new species of deer in Brazil (*Mazama bororo*). **Deer Specialist Group Newsletter**, v. 13, n. 3, p.5, 1996.

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

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, v. 67, p. 403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 49, p. 17-22, 2008.

DUARTE, J.M.B.; VOGLIOTTI, A.; ZANETTI, E.S.; OLIVEIRA, M.L.; TIEPOLO, L.M.; RODRIGUES, F.L.; ALMEIDA, L.B. **Biodiversidade Brasileira**- Avaliação do Estado de Conservação dos Ungulados, ano II, n.3, p.42-49, 2012.

DUARTE, J.M.B.; TALARICO, A.C.; VOGLIOTTI, A.; GARCIA, J.E.; OLIVEIRA, M.L.; MALDONADO, J.E.; GONZALEZ, S. Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx** (In Press).

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO J. E.; ORTEGA J.; TALARICO A. C.; BIDEGARAY-BATISTA L.; GARCIA J. E.; DUARTE, J. M. B. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 754-758, 2009.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95-98, 1999.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Mamíferos ameaçados do Paraná**. SEMA/IAP.93p, 2010.

JOHNS, G. C.; AVISE, J. C. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. **Molecular Biology and Evolution** v.15, p.1481–1490, 1998.

MEDRANO J. F.; AASEN E.; SHARROW L.; DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v. 8, n. 1, p. 43, 1990.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees".In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, p. 1-8, 2010.

MITCHELL, A. Collecting in collections: a PCR strategy and primer set for DNA barcoding of decades-old dried museum specimens. **Molecular Ecology Resources**, v.15, n.5, p.1102-1111, 2015.

RAMBAUT, A: **FigTree 1.3.1**. 2010, [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]

ICZN. RIDE, W. D. L.; COGGER, H. G.; DUPUIS, C.; KRAUS, O.; MINELLI, A. (Eds). **Internacional Code of Zoological Nomenclature**. Fourth Edition, cap. 6, art. 23, 1999.

ROSSI, R.V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo. 174p. 2000.

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

SÃO PAULO. Decreto Estadual nº 56.031, de 20 de julho de 2010. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas, as quase ameaçadas, as colapsadas, sobreexplotadas, ameaçadas de sobreexploração e com dados insuficientes para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Seção 1, nº 136, 21/07/2010:3, 2010.

THOMAS, O. On certain of the smaller S. American Cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, ser. 8, n. 11, p. 585-589, 1913.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p. 4673–4680, 1994.

VOGLIOTTI, A. **História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria.** Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada). Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 99p. 2003.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Discovery of the first wild population of the small red brocket deer *Mazama Bororo* (Artiodactyla: Cervidae). **Mastozoología Neotropical**, v.16, n.2, p.499-503, 2009.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Small brocket deer *Mazama bororo* (Duarte 1996). *In: Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer.* DUARTE, J.M.B; GONZALEZ, S. (eds.). Jaboticabal: Funep/ IUCN, p. 172-176, 2010.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Veado-mateiro-pequeno (*Mazama bororo*). *In: Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção.* DUARTE, J.M.B.; REIS, M.L. (orgs.) – Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2012, p.70-79, 2012.

VOGLIOTTI, A.; OLIVEIRA, M.L.; DUARTE, J.M.B. *Mazama bororo*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2016. Acesso em 01/09/2016.

VON DEN DRIESCH, A. A guide to the measurement of animal bones from archeological sites, as developed by the Institut für Palaeoanatomie, Domestikationsforschung und Geschichte der Tiermedizin of the University of Munich. **Peabody Museum Bulletin**, Cambridge, Massachusetts, v. 1, p. 35–37, 1976.

WEBER, M.; GONZÁLEZ S. Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. **Écoscience**, v. 10, p. 443-454, 2003

CAPÍTULO 4 – Distribuição histórica de *Mazama bororo* (Mammalia, Cervidae): Implicações para a conservação na Mata Atlântica.

Resumo

O conhecimento da distribuição histórica das espécies é uma ferramenta significativa para direcionar esforços conservacionistas e promover o manejo adequado das populações. Dados a respeito da história natural do gênero *Mazama* ainda são obscuros, sendo que a espécie *Mazama bororo*, descrita em 1996, é a que apresenta menor área de distribuição atual e, por este motivo, considerada a espécie mais ameaçada do gênero. Evidências ecológicas e morfométricas sugerem que a espécie ocupava uma área de distribuição restrita à ecorregião das Florestas Costeiras da Serra do Mar do sudeste paulista e leste catarinense. Dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo descrever a distribuição histórica da espécie através da análise de DNA de coleções de museus. De um total de 200 amostras obtidas, 78 foram identificadas molecularmente e dentre estas 22 como pertencentes à espécie *M. bororo*, indicando a presença da espécie em localidades inéditas, ampliando assim sua área de distribuição histórica. Esse resultado indica que a espécie sofreu uma redução populacional maior do que a descrita até o momento, demonstrando a necessidade de intensos esforços conservacionistas para sua manutenção.

Palavras-chave: distribuição atual, DNA de coleções de museus, redução populacional, citocromo b

Introdução

Os animais do gênero *Mazama* (Mammalia: Cervidae) são de pequeno e médio porte (15 a 40 kg), com a porção anterior do corpo ligeiramente mais baixa que a posterior, e que apresentam chifres pequenos e não ramificados (VOGLIOTTI, 2003). Segundo Bourlière (1973), tais características morfológicas constituem-se em adaptações à vida em ambientes de vegetação densa.

Os representantes do gênero habitam preferencialmente regiões de clima quente e úmido, em ambientes de mata densa ou Cerrado (DUARTE, 1996), distribuindo-se desde o sul do México ao centro da Argentina, ocupando vários tipos de habitat, como as florestas montanas, florestas pluviais de planície e savanas arbóreas (VOGLIOTTI, 2003). No Brasil, ocorre praticamente em todo território nacional (EISENBERG; REDFORD, 1999), sendo o mais rico em espécies dentre os cervídeos silvestres (DUARTE; MERINO, 1997). As relações ecológicas dos cervídeos do gênero *Mazama* são ainda pouco conhecidas da comunidade científica (VOGLIOTTI, 2003), e, segundo Barrette (1987), o conhecimento da história natural dessas espécies é, na verdade, uma generalização nem sempre fundamentada em fatos e observações sistemáticas de seu comportamento e ecologia. Neste contexto, a definição taxonômica do gênero com base em sua morfologia externa sempre gerou muita controvérsia quanto ao número de espécies e sua nomenclatura (GILBERT et al., 2006; DUARTE et al., 2008). Atualmente são reconhecidas cinco espécies de *Mazama* no Brasil, a partir de evidências citogenéticas (DUARTE; MERINO, 1997) e morfológicas (ROSSI, 2000): *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. bororo*, sendo que a história natural de *M. bororo* é praticamente desconhecida, com raras informações na literatura (VOGLIOTTI, 2003), devido, principalmente, a sua recente descrição (DUARTE, 1996).

Estudos recentes indicam que a área de distribuição atual de *M. bororo* é restrita às Florestas Costeiras da Serra do Mar nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, confirmada em sete unidades de conservação (Parque Estadual Intervales – São Paulo, SP, Parque Estadual Carlos Botelho – SP, APA Estadual de Guaratuba – Paraná, PR (VOGLIOTTI et al., 2012), Parque Estadual Serra do Tabuleiro, Santa Catarina, SC, Parque Estadual de Jacupiranga, SP, Fazenda João XXIII, SP e Parque Nacional Serra do Itajaí, SC (DUARTE et al., In Press). Estas áreas estão inseridas nos domínios da Mata Atlântica, constituída, principalmente, pela Floresta Ombrófila Densa e seus ecótonos com as Florestas Úmidas de Araucária e as Florestas Úmidas do Interior do Paraná-Paraíba (VOGLIOTTI et al., 2010), com uma estimativa de 37,517 km² de área de distribuição total. O relevo da região compreende desde as planícies costeiras ao nível do mar até os terrenos acidentados das serras, com até 1200 m de altitude (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012),

sendo caracterizado como subtropical úmido, com transição para o subtropical úmido de altitude (BRASIL, 1969). Suas florestas apresentam um dossel alto e denso, com diferentes estratos arbóreos e caracterizam-se por uma vegetação exuberante, rica em espécies epífitas (MONTEIRO, 2003).

A distribuição atual de *M. bororo* é descrita como a menor das distribuições de cervídeos do mundo atualmente e essa distribuição diminuiu significativamente nos últimos dois séculos (DUARTE et al., In Press), além de estar inserida neste bioma com alta redução e fragmentação de habitat (WEBER; GONZÁLEZ, 2003). Dessa forma, sugere-se que *M. bororo* seja a espécie de cervídeo brasileiro mais ameaçado (DUARTE; JORGE, 2003), sendo considerado como vulnerável (VU) na lista mundial da União Internacional para a Conservação da Natureza - IUCN (VOGLIOTTI et al., 2016) e Vulnerável (VU) segundo os critérios A4cde, B1ab (ii, iii, v), C2a (ii) de acordo com a categorização da Lista Nacional (Biodiversidade Brasileira), ou seja, ameaçado, de acordo com informações sobre declínio populacional passado, projeção de declínio populacional futuro, extensão de ocorrência restrita e em declínio e baixo número de indivíduos adultos (DUARTE et al., 2012). A situação de ameaça da espécie exige a implementação de medidas urgentes de conservação que não podem ser definidas sem um conhecimento básico da biologia e ecologia das espécies (VOGLIOTTI, 2003).

Atualmente, a evidência mais razoável da distribuição histórica de *M. bororo* refere-se ao exame das peles e crânios realizado por Rossi (2000) em coleções científicas brasileiras que revelou uma população parcialmente diferenciada de *M. americana*, com algumas diferenças de coloração, tamanho e pelagem (VOGLIOTTI et al., 2010). Tais evidências geográficas e morfométricas (ROSSI, 2000) sugerem que a área de distribuição da espécie era restrita à ecorregião das Florestas Costeiras da Serra do Mar do sudeste paulista e leste catarinense (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012). Porém, Hendricks et al. (2016) sugerem que os dados históricos de espécies de interesse, não devem ser definidos unicamente em observações passadas ou características fenotípicas de espécimes, os quais estão sujeitos a viés de amostragem e erros de identificação do grupo em questão (RUTLEGED et al., 2010; BARNETT et al., 2007), tendendo a subestimar a distribuição histórica das espécies. A subestimação da distribuição histórica pode ser um fator limitante ao

sucesso de programas de restabelecimento de espécies, prolongando o comprometimento das espécies, além de aumentar o custo de recuperá-las (HENDRICKS et al., 2016).

Dessa forma, estudos de escala histórica também devem incluir espécimes que não estão atribuídos taxonomicamente ao grupo estudado, além de ampliar a hipotética área de distribuição geográfica histórica da espécie alvo, a partir de habitats apropriados (HENDRICKS et al., 2016). Definir a distribuição histórica de um táxon é fundamental para estimar os fatores biológicos que podem subsidiar esforços de conservação, tais como probabilidades de extinção, requisitos ecológicos e interações entre espécies (HENDRICKS et al., 2016), bem como estabelecer a região de origem de espécimes de museus com localidade desconhecida (BARNETT et al., 2007). Ainda, resolver a taxonomia e distribuição histórica de espécies é essencial também para desenvolver planos de recuperação para espécies em risco e programas de conservação com o objetivo de restaurar populações extintas (RUTLEDGE et al., 2010). Nesse sentido, análises genéticas a partir do uso de DNA de coleções de museus tem se tornado uma ferramenta proeminente para resolução de questões na conservação da vida silvestre, incluindo a distribuição histórica (LEONARD, 2008). Portanto, dentro deste contexto, o presente trabalho teve como objetivo descrever a distribuição histórica de *M. bororo* a partir da utilização de DNA de coleções de museus.

Material e Métodos

Amostras

Um total de 200 amostras foram obtidas em museus de história natural com o objetivo de descrever a distribuição histórica de *M. bororo*. As entidades visitadas, localização e a quantidade de material obtido em cada uma delas estão descritas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Museus visitados com sua respectiva sigla, localização e quantidade de amostras de ossos turbinais obtidas

Museu	Localização	Quantidade de amostras obtidas
Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP)	São Paulo, Brasil	49
Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ)	Rio de Janeiro, Brasil	23
Museu de História Natural Capão da Imbuia (MHNCI)	Curitiba, Brasil	75
Museu de História Natural Professor Adão José Cardoso (ZUEC)	Campinas, Brasil	6
Museu de Biologia Professor Mello Leitão (MBML)	Santa Teresa, Brasil	12
Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul (FZB)	Porto Alegre, Brasil	14
Colégio Anchieta (MAMM)	Porto Alegre, Brasil	3
Museu de Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)	Porto Alegre, Brasil	4
Museu de Zoologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB)	João Pessoa, Brasil	7
Museu de Zoologia da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE)	Recife, Brasil	6
Museu de História Natural de Londres (BMNH)	Londres, Inglaterra	1

Para a seleção dos crânios a serem amostrados, coletou-se fragmentos de ossos turbinais de espécimes do gênero *Mazama* (independente da identificação de espécie presente em cada material) que apresentavam origem geográfica em algum dos estados que atualmente apresenta ou que já apresentou cobertura da Mata Atlântica (AL, BA, CE, ES, GO, MG, MS, PB, PE, PI, PR, RJ, RN, RS, SE, SC, SP). O estado do Maranhão, embora não apresente cobertura de Mata Atlântica atual e historicamente, foi amostrado devido à disponibilidade de amostras desse estado próximas a fragmentos da Mata Atlântica no estado do Piauí. A Figura 4.1 representa a distribuição geográfica das 200 amostradas coletadas e georreferenciadas no Google Earth v.7.1.2.2041, e plotadas no mapa a partir do programa ArcGIS v.10.1. (ESRI, 2011).

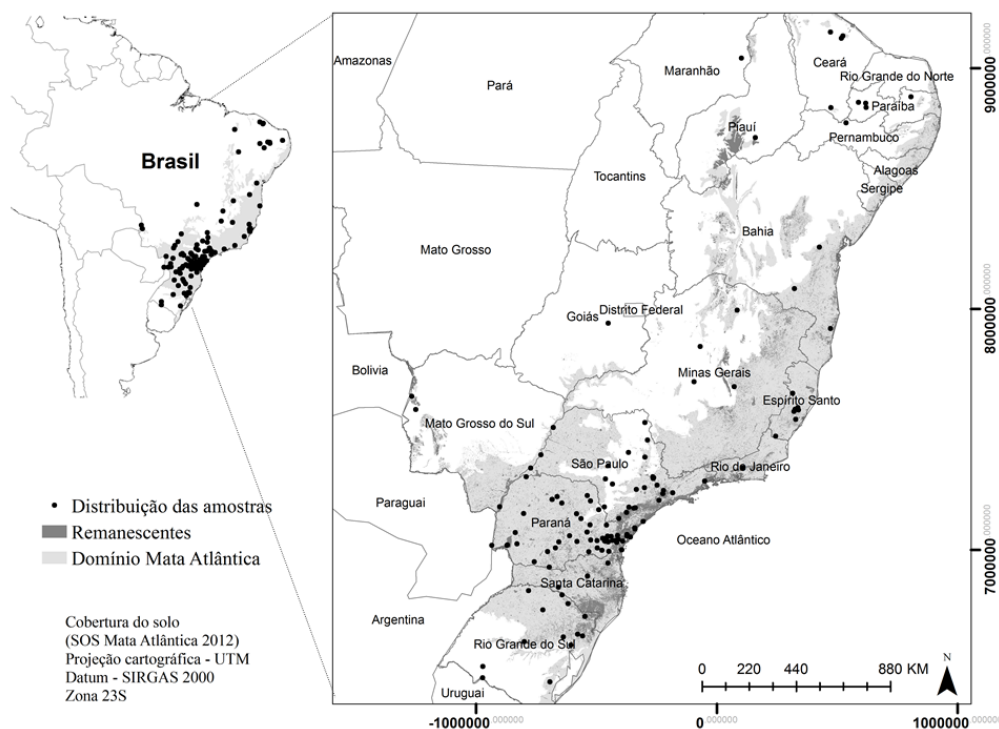


Figura 4.1. Localização geográfica das 200 amostras de ossos obtidas nas coleções científicas dos museus.

Coleta de fragmentos de ossos

Para a coleta de material como fonte de DNA de coleções zoológicas de museus optou-se pela obtenção de fragmentos de ossos turbinais, por prejudicarem minimamente os crânios amostrados (WISELEY, 2004), sendo obtido, aproximadamente, 180 mg deste material de cada crânio selecionado. Dessa maneira, utilizou-se uma pinça de cabo longo para a retirada de um pedaço do osso, sendo esta higienizada com água sanitária pura após o uso em cada espécime. Os fragmentos de ossos foram armazenados em tubos do tipo falcon, e identificados com a sigla do museu e número de tombo do respectivo crânio. A Figura 4.2 representa o procedimento de coleta de ossos turbinais.

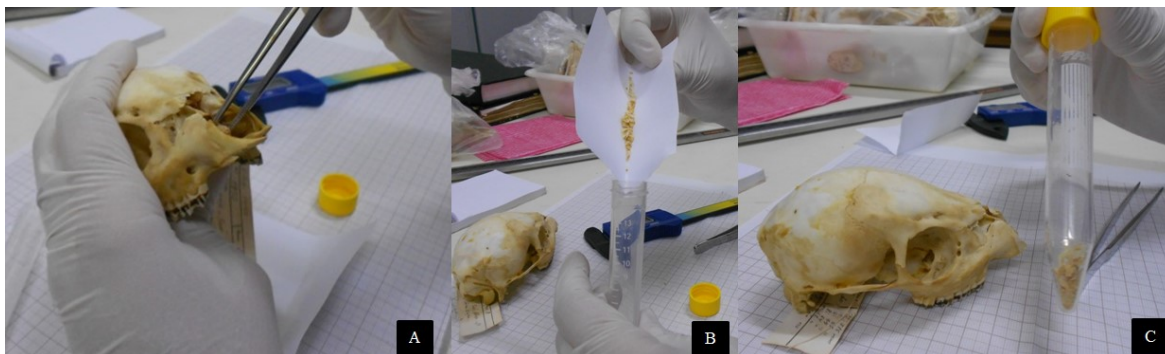


Figura 4.2. Procedimento de coleta de fragmentos dos ossos turbinais. A – com o auxílio de uma pinça de cabo longo retira-se um pedaço do osso. B – os fragmentos foram armazenados, com auxílio de uma folha de papel, dentro do tubo. C- cada tubo contém, aproximadamente, 180 mg de ossos turbinais, e estes foram identificados com a sigla do museu da coleta e número de tombo do espécime.

Extração e amplificação do DNA

A extração do DNA proveniente das amostras de coleções de museus foi realizada utilizando o protocolo de Medrano et al. (1990). A fim de minimizar os riscos de contaminação e garantir a confiabilidade dos resultados, controles negativos foram utilizados em todas as extrações de DNA e quantificados em NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”), além do uso de ponteiras com filtro e luvas descartáveis em todas as etapas. A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi realizada em fluxo laminar, equipado com luz ultravioleta, sempre acompanhada de controles negativos que foram submetidos à etapa de amplificação para a confirmação de ausência de contaminação nas reações.

Foram utilizados iniciadores para amplificar uma região do gene mitocondrial citocromo b, de 224 pares de bases (pb), (IDMAZ224 L e IDMAZ H) (sequência “forward”: 5’ CATCCGACACAATAACAGCA 3’, sequência “reverse” 5’ TCCTACGAATGCTGTGGCTA 3’) (GONZÁLEZ et al., 2009).

A amplificação foi realizada no termociclador em tempo real, Rotor Gene (Qiagen), com alíquotas de amostras que apresentavam 10 ng/μL, 30 ng/μL, 50 ng/μL e 100 ng/μL. A eleição desse valor de concentração das soluções foi devido a uma revisão bibliográfica para concentração de DNA de coleções de museus utilizada nos protocolos, sendo que este valor variava de 10 ng/μL a 100 ng/μL (ALLENTOFT et al., 2011; ANDERSEN et al., 2011; LOZIER; CAMERON, 2009; TEX et al., 2010; PAPLINSKA et al., 2011; WOIDE et al., 2010). Verificamos que as alíquotas com concentração de 10 ng/μL foram as que apresentaram os melhores

resultados e, por esse motivo, essa foi a concentração de DNA eleita para a amplificação das 200 amostras deste trabalho.

A reação de amplificação da polimerase em cadeia para a amostra de DNA proveniente de coleção de museu apresentou 20,0 µL de volume final, contendo: 1X do kit SensiFASTTMHRM, 0,8 µM de cada iniciador, 0,3 µL de BSA, 10 ng/µL de DNA e 6,9 µL de água.

A programação do termociclador envolveu a seguinte programação: 95°C por 2 minutos/ 95°C por 5 segundos/ 55°C por 10 segundos (10 ciclos) / 54°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 53°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 72°C por 20 segundos.

Após a purificação das amostras, seguindo o protocolo de Dorado-Pérez (2012), foi realizado o sequenciamento de ambas as fitas (“forward” e “reverse”) das amostras amplificadas em sequenciador automático 3730XL “Applied Biosystems”.

Análise dos dados

A qualidade das sequências obtidas foi analisada visualmente e também a partir do programa PHRED, contido nos pacotes do programa Codon Code Aligner v. 6.0.2. Os valores de PHRED indicam a qualidade de cada base a partir da probabilidade de erro na definição da mesma. Dessa forma é realizada a análise de qualidade de cada sequência e a remoção das bases das extremidades das sequências onde valores de PHRED são inferiores a 20. Consequentemente, sequências com número inferior a 50 bases com PHRED 20 são excluídas.

O alinhamento das sequências foi realizado a partir do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994), contido no Bioedit v. 7.2.5, (HALL, 1998). Para identificação da espécie de cada amostra, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências referentes ao gene citocromo b de 985 bp depositadas no “Genbank”, um banco de sequências do “National Center for Biotechnology Information”(NCBI), a partir da ferramenta “blast” (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

Posteriormente as sequências foram analisadas no CIPRES Science Gateway (MILLER et al., 2010) a partir do programa j Model Test v.2 (DARRIBA et al., 2012), com o objetivo de inferir qual o modelo evolutivo que melhor se adequa para o gene analisado. O critério utilizado para a seleção do melhor modelo foi o Bayes

Information Criterion (BIC), sendo o modelo Hasegawa Kishino e Yano (HKY) + modelo I selecionado como o mais indicado.

O programa Beast v.1.8.1 (DRUMMOND et al., 2012) foi utilizado para a inferência da árvore baseada em análise bayesiana, a partir de 10.000.000 gerações, que agrupou as sequências das amostras provenientes das coleções de museus com as sequências das demais espécies do gênero *Mazama*, com a finalidade de que a identificação de espécie de cada amostra fosse mais robusta. Para enraizamento da árvore foi utilizada uma sequência pertencente à espécie *Ozotoceros bezoarticus*. Foi adotado um descarte por “burn-in” de 25%. A convergência entre as corridas foi verificada utilizando o programa Tracer v.1.6 e apenas resultados do “Effective Sample Size” (ESS) maior que 200 foram aceitos. As árvores resultantes foram condensadas no programa Tree Anotator e a visualização destas foi realizada através do programa FigTree v.1.3.1 (RAMBAUT, 2010).

As amostras pertencentes às espécies *Mazama americana*, *Mazama nana*, *Mazama bororo*, *Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga* e *Ozotoceros bezoarticus* utilizadas para a inferência da árvore filogenética estavam presentes no Genbank ou no banco de sequências do NUPECCE (Tabela 4.2).

Tabela 4.2 – Sequências utilizadas para a inferência da árvore filogenética, relacionando as amostras provenientes das coleções de museus com sequências que apresentam identificação conhecida. O símbolo (-----) indica localidade de coleta desconhecida e sequências que ainda não foram depositadas no Genbank e estão disponíveis apenas no banco de sequências do NUPECCE.

Espécie	Identificação da amostra	Acesso GenBank	Localidade de coleta
<i>Mazama americana</i>	T40	DQ789224.2	Pará
	T43	-----	Pará
	T110	DQ789201.2	Paraná
	T205	DQ789215.2	Paraná
<i>Mazama bororo</i>	T71	DQ789231.2	São Paulo
	T72	-----	São Paulo
	T338	-----	Paraná (cativeiro)
	Msg54	DQ789187.2	-----
<i>Mazama nana</i>	T53	DQ789227.2	Paraná (cativeiro)
	T185	DQ789210.2	Paraná
<i>Mazama gouazoubira</i>	T112	DQ789202.2	São Paulo
<i>Mazama nemorivaga</i>	T19	DQ789213.2	Rondônia
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	-----	L48404.1	-----

Todas as amostras provenientes do Genbank e utilizadas nas análises filogenéticas foram depositadas pelo NUPECCE ou pela co-orientadora Susana González, indicando a credibilidade da qualidade e procedência do material.

Resultados e Discussão

Quantificação, amplificação e identificação

Após a extração, todas as 200 amostras provenientes das coleções de museus foram quantificadas em Nanodrop. A média de DNA quantificado no total de amostras foi de 443 ng/ μ L, entretanto, sabe-se que os valores obtidos são superestimados, visto que como produto final de extração pode ter-se obtido, além do DNA alvo, o DNA proveniente de insetos e micro-organismos, possivelmente presentes nos crânios.

O sucesso de amplificação e identificação das amostras foi de 39%. Wandeler et al., (2007), afirmam que marcadores com menos de 200 pb são indicados para trabalhos que utilizam DNA proveniente de coleções de museus, devido a obtenção de amostras degradadas. Embora este e demais cuidados em relação a não contaminação com DNA moderno e erros de análises devam ser considerados (PAABO et al., 2004), os problemas decorrentes do uso de DNA de museus devido à baixa quantidade e qualidade são facilmente observados para a maioria dos espécimes (BESNARD et al., 2016). Porém, a possibilidade de identificação de espécimes pertencentes à *M. bororo* entre as amostras que apresentaram sucesso de amplificação e identificação demonstram que é possível alcançar resultados significativos a partir deste tipo de amostragem.

A partir das identificações observadas no Genbank e comparações através dos alinhamentos das sequências obtidas com sequências já identificadas, pertencentes ao gênero *Mazama*, foram construídas árvores filogenéticas relacionando as amostras de DNA de coleções de museus com amostras de DNA recente. Dessa maneira, foram identificados 22 crânios pertencentes à *Mazama bororo*.

A Figura 4.3 representa a árvore que relaciona as amostras identificadas como pertencentes à *M. bororo*, às amostras de DNA de referência do gênero *Mazama*, sendo que os ramos de cor vermelha indicam os espécimes identificados

como pertencentes à espécie *M. bororo*. As amostras provenientes dos museus estão representadas por seu respectivo número tombo, sigla do museu de origem e localidade geográfica entre parênteses e as amostras de referência estão indicadas com o nome da espécie e sigla de identificação presente do Genbank e/ou banco de sequências do NUPECCE (Tabela 4.2). Informações detalhadas de cada uma dessas amostras pertencentes aos museus estão no Apêndice B.

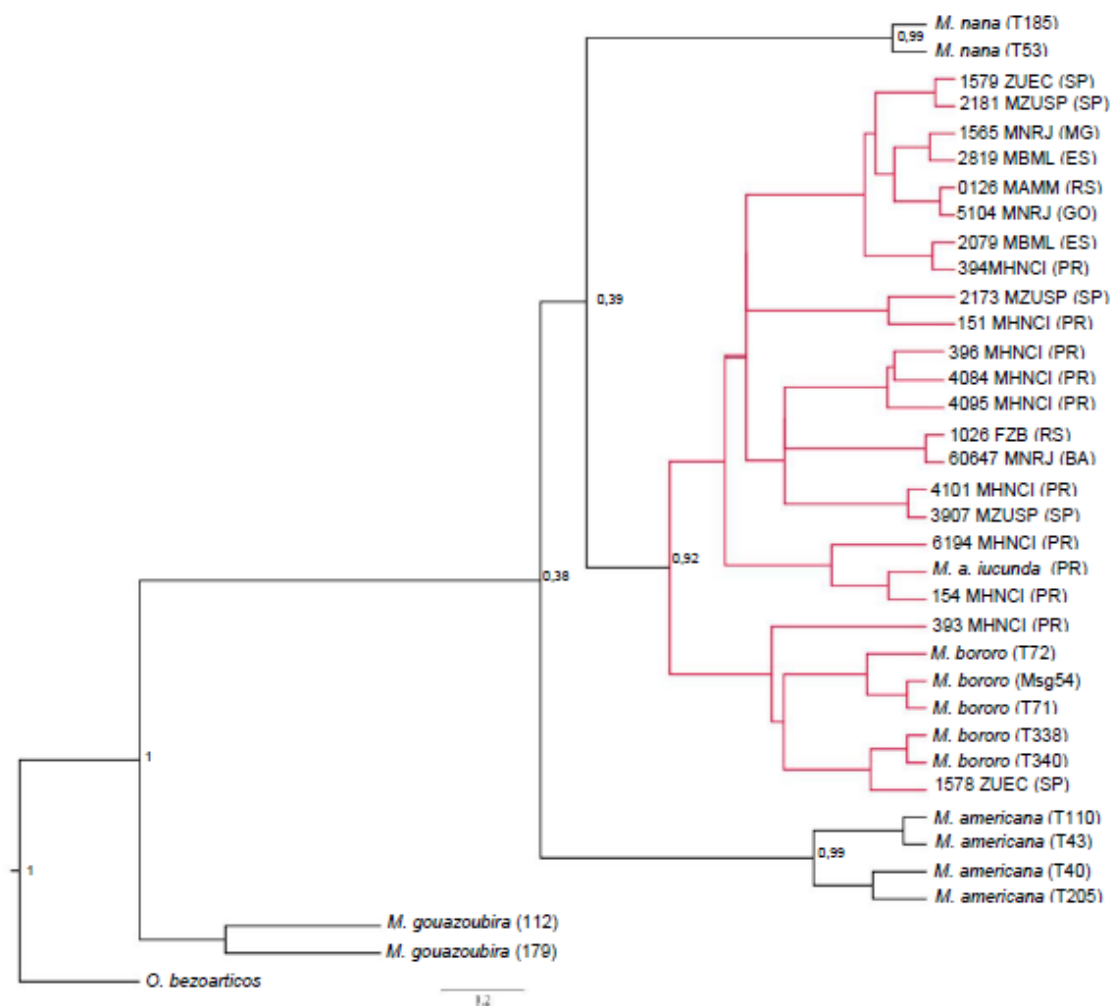


Figura 4.3. Árvore filogenética inferida a partir de análise bayesiana, demonstrando as relações entre amostras de DNA recente e de coleções de museu dentro do gênero *Mazama*, a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b. As amostras referências estão representadas pelo nome da espécie e sigla de identificação. As amostras de museus estão representadas pelo número tombo, sigla do museu de origem e localidade geográfica entre parênteses. A cor vermelha nos ramos da árvore indica os espécimes identificados como pertencentes à espécie *M. bororo*.

Embora as 22 amostras de *M. bororo* tenham se agrupado em quatro diferentes clados principais não há relação entre a localidade geográfica dos

espécimes e suas relações filogenéticas. Esses diferentes agrupamentos podem ser devido ao polimorfismo genético apresentado pelos espécimes amostrados além do efeito do pequeno fragmento de sequência utilizado (224 pb) para a inferência da árvore.

Distribuição histórica de Mazama bororo

As 22 amostras identificadas molecularmente como pertencentes à espécie *M. bororo* permitiram confirmar que existem registros de *M. bororo* nos estados do Paraná (nove espécimes), São Paulo (cinco espécimes), Rio Grande do Sul (dois espécimes), Espírito Santo (dois espécimes), Minas Gerais, Goiás e Bahia (um espécime) (Apêndice B).

O georreferenciamento de 19 amostras identificadas como *M. bororo* e com localidade geográfica detalhada demonstram que todos os espécimes foram coletados em regiões com presença do bioma Mata Atlântica (Figura 4.4).

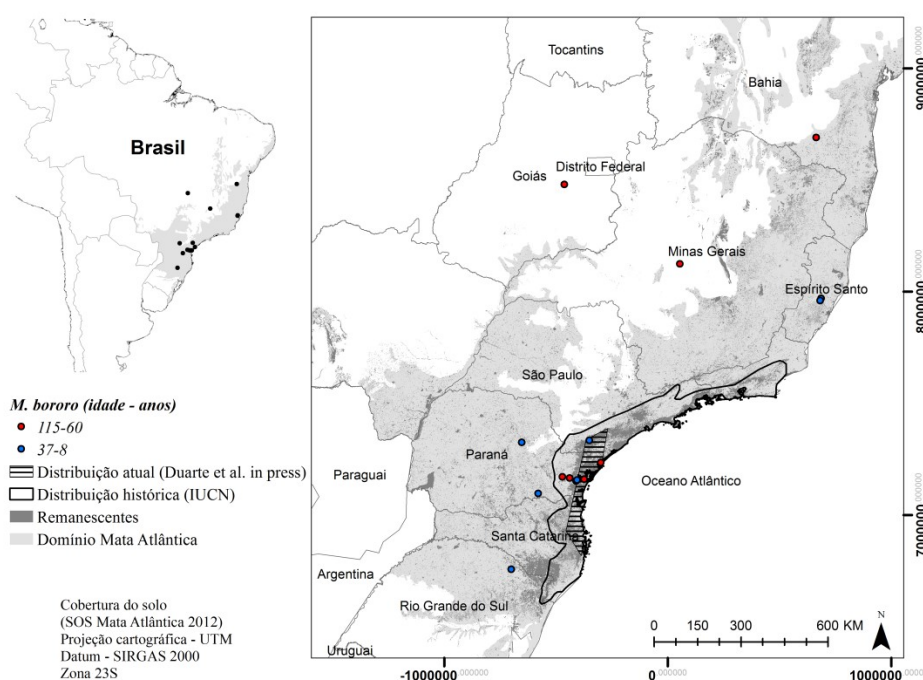


Figura 4.4. Georreferenciamento das 19 amostras obtidas em coleções de museus identificadas como pertencentes à espécie *M. bororo*, a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b. A cor vermelha indica amostras com idade entre 60 e 115 anos e a cor amarela indica as amostras mais recentes, com idade entre 8 e 37 anos.

A presença histórica da espécie em regiões com predomínio de formações do tipo Floresta Ombrófila Densa, Mista e Decidual, demonstra uma distribuição mais diversificada em relação aos tipos vegetais, uma vez que registros atuais da espécie se restringem à Floresta Ombrófila Densa (VOGLIOTTI; DUARTE, 2012), abrangendo a formação da Mata Atlântica próxima à região costeira entre os paralelos 28 e 29°S e os meridianos 47° e 49° Oeste, compreendendo a Serra do Mar e Serra de Parapiacaba dos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (DUARTE et al., In Press). A ausência de indivíduos da espécie nestas diferentes áreas de cobertura vegetal pode ser devido à retração da Mata Atlântica, que apresenta apenas de 12% a 16% de sua área original (RIBEIRO, 2009). Dessa forma, a grande redução do bioma provavelmente causou forte redução populacional de *M. bororo*, restringindo a detecção da espécie em parques e unidades de conservação, com predominância de Floresta Ombrófila Densa. Além disso, fatores como baixa densidade populacional e poucos esforços em trabalhos de campo também podem ter influenciado nesse resultado.

Nove amostras identificadas como *M. bororo* são provenientes do estado do Paraná, onde existe uma compartimentação geomorfológica, destacando-se planaltos escalonados com caimento para oeste-noroeste, separados por escarpas que formam verdadeiros degraus topográficos verticalizados, com a presença da espécie em todas essas formações. De leste para oeste tem-se a Planície Costeira, a Serra do Mar, o Primeiro Planalto Paranaense (ou Planalto de Curitiba), a Escarpa Devoniana, o Segundo Planalto Paranaense (ou Planalto de Ponta Grossa), a Serra Geral e, finalmente, o Terceiro Planalto Paranaense (ou Planalto de Guarapuava), o qual se estende às margens do Rio Paraná (MAACK, 1948). O fato da maioria das amostras de *M. bororo* pertencerem ao estado do Paraná pode ser devido a dois motivos: viés na obtenção de amostras de DNA de coleções de museus, visto que o MHNCI é o que detém a maior quantidade de amostras analisadas e que pertencem a esta localidade, ou por ser a região brasileira que apresente a maior população de *M. bororo*. Dessa maneira, coletas sistemáticas nas demais regiões brasileiras com predomínio de Mata Atlântica devem ser realizadas para que se obtenha o verdadeiro panorama da densidade desta espécie.

A identificação de espécimes de *M. bororo* nos estados do Espírito Santo, Goiás, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Bahia indicam registros inéditos da espécie nessas localidades, evidenciando-se a necessidade de coletas atuais, a partir da identificação da espécie via DNA fecal (GONZÁLEZ et al., 2009), por exemplo, que permitirá verificar se a espécie continua presente nestas regiões, visto que o domínio Mata Atlântica ainda é presente nestes estados.

A partir dos resultados obtidos, observa-se que a distribuição histórica de *M. bororo* é maior do que a distribuição histórica proposta nas publicações até o presente (IUCN, 2004; VOGLIOTTI; DUARTE, 2012; DUARTE et al., In Press), uma vez que a extensão de ocorrência do veado-mateiro-pequeno obtida (a partir da ligação dos pontos de ocorrência) é de 641.000 km² e a área de distribuição histórica proposta por Duarte et al. (In Press) é de 114.120 km². Embora o valor da extensão de ocorrência histórica do veado-mateiro-pequeno obtido neste trabalho possa apresentar viés amostral, uma vez que a quantidade de registros de presença da espécie é frágil, os resultados aqui obtidos confirmam a hipótese de que a espécie estava presente ao longo do bioma Mata Atlântica. Caso a distribuição atual da espécie, a partir de novos estudos, permaneça restrita a regiões costeiras da Mata Atlântica, nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina (DUARTE et al., In Press), poderemos considerar que a espécie sofreu uma redução populacional de 94%, evidenciando assim a importância de intensos esforços para a sua conservação. Dessa forma, o desenvolvimento de estudos que tenham como objetivo a avaliação de fatores impactantes (condição sanitária, caça, espécies domésticas e exóticas, dentre outros), além de refinar as informações sobre as áreas de distribuição atual da espécie, especialmente em Unidades de Conservação, medidas apontadas pelo Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção (PAN) (DUARTE et al., 2012), são essenciais para a implantação de políticas públicas que estabeleçam medidas para o controle e mitigação de condições adversas em seu habitat. Além disso, os resultados apresentados neste trabalho podem sugerir áreas para futuros projetos de reintrodução da espécie.

Referências Bibliográficas

ALLENTOFT, M. E.; OSKAM, C.; HOUSTON, J.; HALE, M. L.; GILBERT, M. T. P.; RASMUSSEN, M.; SPENCER, P.; JACOMB, C.; WILLERSLEV, E.; HOLDAWAY, R. N.; BUNCE, M. Profiling the Dead: Generating Microsatellite Data from Fossil Bones of Extinct Megafauna—Protocols, Problems, and Prospects. **PLoS ONE**, v. 6, n. 1, p. 1-11, 2011.

ANDERSEN, K.; BIRD, K. L.; RASMUSSEN, M.; HAILE, J.; BREUNING-MADSEN, H.; KJAER, K. H.; ORLANDO, L.; GILBERT, T. P.; WILLERSLEV, E. Meta-barcoding of 'dirt' DNA from soil reflects vertebrate biodiversity. **Molecular Ecology**, v.21, n. 8, p. 1966-1979, 2011.

BARNETT, R.; YAMAGUCHI, N.; SHAPIRO, B.; NIJMAN, V. Using ancient DNA techniques to identify the origin of unprovenanced museum specimens, as illustrated by the identification of a 19th century lion from Amsterdam. **Contributions to Zoology**, v. 76, n. 2, p. 87-94, 2007.

BARRETE, C. The comparative behavior and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: WEMMER, C. M. (Ed.) **Biology and management of the Cervidae**. Washington D.C., London: Smithsonian Institution Press, 1987. Parte I, p. 200-213: Review papers and theoretical issues. 1987.

BESNARD, G.; BERTRAND, J.A.M.; DELAHAIE, B.; BOURGEOIS, Y.X.C.; LHUILLIER, E.; THÉBAUD, C. Valuing museum specimens: high-throughput DNA sequencing on historical collections of New Guinea crowned pigeons (Goura). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.117, p.71–82, 2016.

BOURLIÈRE, F. The comparative ecology of rain forest mammals in Africa and tropical America: some introductory remarks. In: MEGGERS, B. J., E. S. AYENSU; W. D. DUCKWORTH (Eds.). **Comparative ecology of rain forest mammals**. Washington D.C.: Smithsonian Institution Press, p. 279-292, 1973.

BRASIL. Ministério da Agricultura. Escritório de Meteorologia. **Atlas climatológico do Brasil: Reedição de mapas selecionados**. Rio de Janeiro. 1969. 108p.

DARRIBA, D.; TABOADA, G.L.; DOALLO, R.; POSADA, D. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods**, v.9, n.8, p.772, 2012.

DORADO-PÉREZ, G. **Prácticas generales de bioquímica y biología molecular**. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba, España. Disponível em: www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/47%20SECUENCIACI%C3%93N%20DNA.pdf. Acesso: 21/05/2016.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology And Evolution**, v. 29, p. 1969-1973, 2012.

DUARTE, J. M. B.; GIANNONI, M. L. A. A new species of deer in Brazil (*Mazama bororo*). **Deer Specialist Group Newsletter**, v. 13, n. 3, p. 5, 1996.

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

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, v. 67, n. 403-410, 2003.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 49, p. 17-22, 2008.

DUARTE, J.M.B.; TALARICO, A.C.; VOGLIOTTI, A.; GARCIA, J.E.; OLIVEIRA, M.L.; MALDONADO, J.E.; GONZALEZ, S. Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx** (In Press).

DUARTE, J.M.B.; BRAGA, F.G.; VOGLIOTTI, A.; ABRIL, V. V.; PIOVEZAN, U.; REIS, M. L.; RAMOS, H. G. C.; ZANETTI, E. V. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção**, Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Icmbio, p.96-97, 2012.

EISENBERG, J. F.; REDFORD, K. H. **Mammals of the neotropics: The central neotropics**. Chicago: The University of Chicago Press, n. 3, 609p. 1999.

ESRI. ArcGIS Desktop: Release 10. Redlands, CA: **Environmental Systems Research Institute**, 2011.

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

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO J. E.; ORTEGA J.; TALARICO A. C.; BIDEGARAY-BATISTA L.; GARCIA J. E.; DUARTE, J. M. B. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 754-758, 2009.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucleic Acids Symposium Series**, v. 41, p.95-98, 1999.

HENDRICKS, S. A.; CLEE, P. R. S.; HARRIGAN, R. J. POLLINGER, J. P.; FREEDMAN, A. H.; CALLAS, R.; FIGURA, P. J.; WAYNE, R. K. Re-defining historical geographic range in species with sparse records: Implications for the Mexican wolf reintroduction program. **Biological Conservation**, v. 194, p. 48-57, 2016.

IUCN. 2014. **IUCN Red List Threatened Species**. IUCN Red List Unit, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Cambridge, United Kingdom. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>> Acesso em: 14 de abril de 2016.

LEONARD, J. A. Ancient DNA applications for wildlife conservation. **Molecular Ecology**, v. 17, p. 4186-4196, 2008.

LOZIER, J. D.; CAMERON, S. A. Comparative genetic analyses of historical and contemporary collections highlight contrasting demographic histories for the bumble bees *Bombuspen sylvanicus* and *B. impatiens* in Illinois. **Molecular Ecology**, v. 18, p. 1875–1886, 2009.

MAACK, R. Notas preliminares sobre clima, solos e vegetação no Estado do Paraná. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, vol.3, Curitiba. 1948.

MEDRANO J. F.; AASEN E.; SHARROW L.; DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v. 8, n. 1, p. 43, 1990.

MILLER, M.A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" In: **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, p. 1-8, 2010.

MONTEIRO, V. K. **Mata Atlântica: A floresta em que vivemos**. Porto Alegre: Núcleo Amigos da Terra, 2003. 71p.

PÄÄBO S.; POINAR H.; SERRE D.; JAENICKE-DESPRÉS V.; HEBLER J.; ROHLAND N.; KUCH M.; KRAUSE J.; VIGILANT L.; HÖFREITER M. Genetic analyses from ancient DNA. **Annual Review of Genetics**, v. 38, p. 645–679, 2004.

PAPLINSKA, J. Z.; TAGGART, D. A.; CORRIGAN, T.; ELDRIDGE, M. D. B.; AUSTIN, J. J. Using DNA from museum specimens to preserve the integrity of evolutionarily significant unit boundaries in threatened species. **Biological Conservation**, v. 144, p. 290–297, 2011.

RAMBAUT, A: **FigTree 1.3.1**. 2010, [<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>]

RIBEIRO, M. C.; METZGER, J. P.; MARTENSEN, A. C.; PONZONI, F. J.; HIROTA, M. M. The Brazilian Atlantic forest: how much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Conserv. Biol.**, v. 142, p. 1141-1153, 2009.

ROSSI, R.V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo. 174p. 2000.

RUTLEDGE, L. Y.; BOS, K. I.; PEARCE, R. J.; WHITE, B. N. Genetic and morphometric analysis of sixteenth century *Canis* skull fragments: implications for historic eastern and gray wolf distribution in North America. **Conservation Genetics**, v. 11, p. 1273-1281, 2010.

TEX, R.; MALDONADO, J. E.; THORINGTON, R.; LEONARD, J. A. Nuclear copies of mitochondrial genes: another problem for ancient DNA. **Genetica**, v. 138, n. 9-10, p. 979-984, 2010.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p. 4673–4680, 1994.

VOGLIOTTI, A. **História natural de Mazama bororo (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada). Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. 99p. 2003.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Small brocket deer *Mazama bororo* (Duarte 1996). *In: Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer*. DUARTE, J.M.B; GONZÁLEZ, S. (eds.). Jaboticabal: Funep/ IUCN, p 172-176. 2010.

VOGLIOTTI, A.; DUARTE, J. M. B. Veado-mateiro-pequeno (*Mazama bororo*). *In: Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção*. DUARTE, J.M.B.; REIS, M.L. (orgs.) – Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2012, p.70-79. 2012.

VOGLIOTTI, A.; OLIVEIRA, M.L.; DUARTE, J.M.B. *Mazama bororo*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2016. Acesso em 01/09/2016.

WANDELER,P.; HOECK, P.E.A.; KELLER, L.F. Back to the future: museum specimens in population genetics. **Trends in Ecology and Evolution**, v.22, n.12, 2007.

WEBER, M.; GONZÁLEZ S. Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. **Écoscience**, v. 10, p. 443-454, 2003.

WISELEY, S.M.; MALDONADO, J.E.; FLEISCHE, S.C.A technique for sampling ancient DNA that minimizes damage to museum specimens. **Conservation Genetics**, v.5, p. 105–107, 2004.

WOIDE, D.; ZINK, A.; THALHAMMER, S. Technical Note: PCR Analysis of Minimum Target Amount of Ancient DNA. **American Journal Of Physical Anthropology**, v. 142, p. 321–327, 2010.

CAPÍTULO 5 – Filogeografia e caracterização genética de *Mazama bororo*

Resumo

Estudos filogeográficos e de caracterização genética populacional geram informações indispensáveis à conservação das espécies. Cervídeos neotropicais apresentam escassos trabalhos nesse sentido, sendo que a espécie *Mazama bororo*, é a que apresenta menor distribuição geográfica atualmente, com populações reconhecidas em parques e unidades de conservação nos estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina, inseridos no bioma Mata Atlântica. Desta forma, o objetivo do presente trabalho foi o de avaliar a diversidade genética e a conectividade entre populações desta espécie através do gene mitocondrial citocromo *b* e locos microssatélites. Como resultados observou-se uma média de diversidade haplotípica $h=0,60$, heterozigosidade esperada de 0,63883 sem subdivisão populacional histórica e três grupos a partir dos marcadores nucleares. Esses resultados indicam a necessidade de monitoramento da espécie, através de estudos ecológicos e genéticos, com o objetivo de buscar a realidade de distribuição atual da espécie e manutenção das populações históricas de *M. bororo*.

Palavras-chave: cervídeos neotropicais, Mata Atlântica, genes mitocondriais, microssatélites, diversidade genética.

Introdução

A filogeografia é definida como o estudo dos princípios e processos históricos e contemporâneos que determinam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas dentro de uma espécie, ou entre espécies próximas (AVISE et al., 1987). A aplicação de métodos de análises filogeográficas tem sido uma ferramenta muito poderosa em estudos de biologia da conservação, permitindo avaliar o potencial evolutivo das espécies (DOMINGUEZ-DOMINGUEZ; VAZQUEZ-DOMINGUEZ, 2009).

Estudos filogeográficos em cervídeos neotropicais são escassos. Dentre os trabalhos já publicados, González et al. (1998), avaliou a distribuição histórica e

atual de veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*). A partir do uso de sequências da região controladora (Dloop), do DNA mitocondrial, os resultados indicam que a maioria das populações sobreviventes são pequenas, isoladas e geneticamente diferenciadas, sendo que a recente fragmentação do habitat do veado-campeiro fornece uma aparência artificial de subdivisão que não existia historicamente. Abril et al. (2010), através de um estudo que integrou dados citogenéticos, moleculares e geográficos de *Mazama americana*, obteve uma nítida separação da espécie em dois clados, correspondente com as diferentes localidades amostradas, indicando assim a existência de Unidades Evolutivamente Significativa (“Evolutionary Significant Units”, ESUs) (RYDER, 1986) e, conseqüentemente, a necessidade de manejo diferenciado na espécie.

Tendo em vista que a filogeografia, dentre outras possibilidades, permite inferir processos que determinaram a origem, distribuição e manutenção da biodiversidade (DOMINGUEZ-DOMINGUEZ; VAZQUEZ-DOMINGUEZ, 2009), estudos a partir desta temática envolvendo *Mazama bororo* (DUARTE, 1996), a espécie do gênero considerada como a mais ameaçada atualmente, é de significativa relevância. Esta espécie está categorizada como vulnerável (VU) na lista mundial da União Internacional para a Conservação da Natureza – IUCN (VOGLIOTTI et al., 2016), na lista de espécies ameaçadas do estado de São Paulo (São Paulo, 2010), na lista do estado do Paraná (IAP, 2010), assim como na Lista Nacional (Biodiversidade Brasileira) (DUARTE et al., 2012). Um dos principais fatores de ameaça à *M. bororo* é sua restrita distribuição à ecorregião das Florestas Costeiras da Serra do Mar do sudeste paulista e leste paranaense (GONZALEZ et al., 2009), considerada como uma das menores do mundo dentre toda a família dos cervídeos (WEBER; GONZÁLEZ, 2003).

Apesar de pequena, a distribuição de *M. bororo* tem mais de 3600 km² de áreas oficialmente protegidas e muitas delas estão conectadas entre si, formando um dos maiores blocos da Mata Atlântica no Brasil (DUARTE et al., 2005), sugerindo que não existe estruturação genética dentro da espécie.

Estudos filogeográficos desenvolvidos para diferentes grupos de organismos na Mata Atlântica apontam para a existência de descontinuidades filogeográficas neste bioma (BATALHA-FILHO et al., 2010; CARNAVAL et al., 2009; PELLEGRINO

et al., 2005; CABANNE et al., 2008), sendo que a principal hipótese para explicar as descontinuidades observadas utilizada por estes estudos é a teoria dos refúgios florestais (HAFFER, 1969; VANZOLINI; WILLIAMS, 1970; BROWN; AB'SÁBER, 1979).

Dessa forma, estudos filogeográficos e de caracterização genética em *M. bororo* além de serem essenciais para avaliar a diversidade genética, estruturação e conectividade entre áreas de ocorrência desta espécie, contribuem para o conhecimento da filogeografia do bioma Mata Atlântica.

Material e Métodos

Amostras de DNA

Um total de 46 amostras de DNA de *M. bororo* com localização geográfica conhecida, provenientes de pelo (sete amostras) e de fezes (20 amostras), que estavam armazenadas no banco de células do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), localizado em Jaboticabal, São Paulo, Brasil, além de 19 amostras de ossos, provenientes de coleções de museus, foram utilizadas com o objetivo de analisar filogeograficamente *M. bororo*, a partir de marcadores mitocondriais (Apêndice C).

Além das sete amostras de pelo descritas acima, outras 15 amostras, pertencentes a animais de cativeiro, sem localidade geográfica conhecida, foram utilizadas para caracterizar e analisar a diversidade genética da espécie, a partir de marcadores nucleares do tipo microssatélites, totalizando 22 amostras. Estas 15 amostras também estavam armazenadas no banco de células do NUPECCE (Apêndice D).

Extração do DNA, amplificação e sequenciamento

A extração do DNA proveniente das amostras de pelo foi a partir do protocolo de Sambrook et al. (1989) e para a extração de DNA fecal foi utilizado o protocolo de sílica (BOOM et al., 1990). A extração do DNA de ossos, provenientes das coleções de museus foi realizada utilizando o protocolo de Medrano et al. (1990). A fim de minimizar os riscos de contaminação e garantir a confiabilidade dos resultados,

controles negativos foram utilizados em todas as extrações de DNA e quantificados em NanoDrop 2000 (“Thermo Scientific”), além de ponteiras com filtro e luvas descartáveis em todas as etapas. A Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) foi realizada em fluxo laminar equipado com luz ultravioleta, sempre acompanhada de controles negativos que foram submetidos à etapa de amplificação para a confirmação de ausência de contaminação nas reações.

Marcadores mitocondriais

Para a amplificação das 46 amostras utilizadas no estudo de filogeografia foram utilizados iniciadores para uma região de 224 pares de bases (pb) do gene mitocondrial citocromo b (IDMAZ224 L e IDMAZ H) (sequência “forward”: 5’ CATCCGACACAATAACAGCA 3’, sequência “reverse” 5’ TCCTACGAATGCTGTGGCTA 3’) (GONZÁLEZ et al., 2009).

As amostras de DNA de pelo foram amplificadas em um termociclador convencional, da marca “Biometra T1 Thermocycler”, e a reação de amplificação apresentou 25,0 µL de volume final, contendo: 1X de ImmoMix™, Bioline, 0,3 µM de cada iniciador, 0,3 µM de BSA, 15 ng/µL de DNA e 7,6 µL de água.

As condições da reação de amplificação da polimerase em cadeia (PCR) foram: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram visualizados em gel de agarose a 1% para avaliar a amplificação e verificar o tamanho dos fragmentos baseados no marcador de 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

A reação de amplificação da polimerase em cadeia para as amostras de DNA provenientes de coleção de museu e de fezes foram amplificadas em um termociclador em tempo real (Rotor Gene, Qiagen), que apresentou 20,0 µL de volume final, contendo: 1X de SensiFAST™HRM Kit, 0,8 µM de cada iniciador, 0,3 µL de BSA, 10 ng/µL de DNA e 6,9 µL de água. A reação envolveu a seguinte programação: 95°C por 2 minutos/ 95°C por 5 segundos/ 54°C por 10 segundos (10 ciclos) / 54°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 53°C por 10 segundos (15 ciclos)/ 72°C por 20 segundos.

Após a confirmação da amplificação das amostras em gel de agarose 2%, os produtos de PCR foram purificados, seguindo o protocolo de Dorado-Pérez (2012).

O sequenciamento das amostras amplificadas foi realizado no sequenciador automático 3730XL “Applied Biosystems”.

Marcadores microssatélites

As 22 amostras utilizadas para a análise de caracterização e diversidade genética da espécie (Apêndice D) foram amplificadas a partir de 13 locos microssatélites, sendo 10 deles originalmente desenvolvidos para a espécie *Mazama gouazoubira*: Mgoua 7, Mgoua16, Mgoua17, Mgoua19, Mgoua20, Mgoua21, Mgoua24 e Mgoua25 (CAPARROZ et al., 2015), Mgoua3 e Mgoua 4 (dados ainda não publicados), além de três locos desenvolvidos para a espécie *Rangifer tarandus* (WILSON, 1997). A reação de amplificação apresentou 11,0 µL de volume final, contendo; 1X do tampão (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 2 mM MgCl₂, 0,12 mM de dNTP, 0,3 µM de BSA, 0,5 µM de cada primer (sendo o “forward” marcado com fluorescência), 1 unidade de Taq polimerase e 2,6 µL de água ultra pura. O restante do volume da reação de 11 µL foi completado com amostra de DNA. A reação foi realizada em termociclador convencional, da marca “Biometra T1 Thermocycler”, seguindo as condições: 95°C por 5 min, 35 ciclos a 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min; e extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram aplicados em gel de agarose a 2% para avaliar a amplificação e verificar o tamanho dos fragmentos baseados no marcador de 1kb plus DNA ladder (Invitrogen).

Após a confirmação de amplificação, os produtos de PCR foram analisados em sequenciador automático MegaBACE 1000, com “ladder” ET-ROX 550 (GE Healthcare, Amersham, UK) e analisados através do programa GENETIC PROFILER 2.2.

Análise dos dados

Análises filogeográficas

A qualidade das sequências obtidas foi analisada visualmente e também a partir do programa PHRED, contido nos pacotes do programa Codon Code Aligner v. 6.0.2. Os valores de PHRED indicam a qualidade de cada base a partir da

probabilidade de erro na definição da mesma. Dessa forma é realizada a análise de qualidade de cada sequência e a remoção das bases das extremidades das sequências onde valores de PHRED são inferiores a 20. Consequentemente, sequências com número inferior a 50 bases com PHRED 20 são excluídas.

O alinhamento das sequências foi realizado a partir do programa Clustal W (THOMPSON et al., 1994), contido no Bioedit v. 7.2.5, (HALL, 1998). Para identificação da espécie de cada amostra, as sequências obtidas foram comparadas com as sequências referentes ao gene citocromo b de 985 bp depositadas no “Genbank”, um banco de sequências do “National Center for Biotechnology Information” (NCBI), a partir da ferramenta “blast” (blast.ncbi.nlm.nih.gov).

A diversidade haplotípica (h) e a diversidade nucleotídica (π), foram obtidos a partir do programa DnaSP v.5 (LIBRADO; ROZAS, 2009).

Através do programa Population Analysis with Reticulate Trees, PopART, v.1.7 (LEIGH; BRYANT, 2015), foi realizada a análise TCS Network, proposta por Templeton (1992), que tem como objetivo estimar relações genealógicas entre as sequências (CLEMENT et al., 2002). Foi realizada a Análise de Variância Molecular (AMOVA) (EXCOFFIER et al., 1992) através do programa Arlequin v. 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), utilizando amostras de 46 indivíduos, com o objetivo de avaliar se a estruturação apresentada pela população era significativa estatisticamente. A significância estatística dos valores de Φ_{ST} no teste AMOVA foi testada utilizando-se 10.000 permutações. Para minimizar o efeito de suposições prévias foram testados dois cenários diferentes para avaliar a estrutura populacional de *M. bororo*: um considerando a existência de três grupos de acordo com a fitofisionomia a qual cada amostra pertence (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Contato, região que compreende espécimes entre diferentes tipos de formação florestal) (Fundação SOS Mata Atlântica, 2013), e outro cenário considerando a localidade exata de cada um dos 46 espécimes (Apêndice C). Finalmente, foi realizada a análise para investigar o teste de neutralidade (Tajima's D e Fu's F_s).

Análises de caracterização e diversidade genética

Os genótipos obtidos foram testados para verificar se havia evidência de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW), através do teste de Guo e

Thompson (1992), com 10.000 passos de desmemorização (EXCOFFIER et al., 2005) e desequilíbrio de ligação (LD) entre os pares de locos. Os índices de diversidade foram mensurados a partir da heterozigosidade esperada (H_E) e observada (H_O) e número de alelos por loco (A), sendo todos os testes realizados utilizando os pacotes do programa Arlequin.

O programa MICRO-CHECKER v.2.2.3, que emprega as simulações de Monte Carlo para análise das diferenças do tamanho de alelos esperados (Van Oosterhout et al. 2004), foi utilizado para identificar possíveis erros de genotipagem que podem ocorrer durante a amplificação dos dados como o “stutter”, bem como avaliar a existência de alelos nulos e perda de alelos.

Ainda, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.3 (PRITCHARD ET AL. 2000; FALUSH ET AL. 2003; PRITCHARD; WEN 2004) para avaliar a possível existência de subdivisão da população. Foram conduzidas 10 corridas independentes para cada valor de K , a partir de 20.000 gerações MCMC, seguidos de um “burn-in” de 10.000. Os resultados finais gerados pelo programa STRUCTURE foram analisados utilizando-se o STRUCTURE HARVESTER (EARL; von HOLDT, 2012), a partir da avaliação do número mais provável de distintos clusters (EVANNO et al., 2005).

Resultados e Discussão

Análises filogeográficas

Uma região de 107 pb foi analisada para as 46 amostras de *M. bororo*, gerando 8 haplótipos distintos para os dois cenários avaliados.

Os haplótipos 1 e 4 foram compartilhados por mais de uma amostra, sendo o haplótipo 1 composto por 31 animais, o haplótipo 4 por nove, sendo os demais haplótipos exclusivos (haplótipos 2, 3, 5, 6, 7 e 8) (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Sítios polimórficos (8) observados para oito haplótipos detectados em um fragmento de 107 pb do gene mitocondrial do citocromo *b* em 46 amostras de *Mazama bororo*..

Haplótipos	8	22	28	61	76	78	79	81	Nº sequências
H1	C	A	C	G	C	G	G	A	31
H2	.	.	.	.	.	.	A	G	1
H3	.	.	.	A	.	.	.	.	1
H4	.	.	.	.	.	A	.	.	9
H5	T	.	.	.	.	.	.	.	1
H6	.	.	T	.	.	.	.	T	1
H7	.	.	.	.	T	A	.	.	1
H8	.	T	.	.	.	A	.	.	1

O resultado da análise AMOVA, para o cenário que compreende as amostras subdivididas entre os três grupos de fitofisionomias (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e contato) apresentou valor de $\Phi_{ST} = 0,09$ ($P < 0,03$, com 10.000 permutações), demonstrando que as três regiões apresentam diferenciação suportada por uma baixa significância estatística. Porém, o resultado obtido para o cenário que leva em consideração a localização geográfica de cada amostra forneceu uma estimativa global de $\Phi_{ST} = 0,24903$ ($P < 0,06$, com 10.000 permutações), ou seja, 24,90% da variação total se encontra entre as amostras. Dessa forma, podemos concluir que os grupos que relacionam o tipo de fitofisionomia aqui considerados não representam relevantes barreiras geográficas ao fluxo gênico dessa espécie.

A diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) para as três fitofisionomias são apresentadas na Tabela 5.2. A região Floresta Ombrófila Mista foi a que apresentou a maior diversidade haplotípica, e a região Floresta Ombrófila Densa apresentou a maior diversidade nucleotídica.

Tabela 5.2 - Número de amostras (N), número de haplótipos (A), diversidade haplotípica (h) e diversidade nucleotídica (π) para populações de *Mazama bororo* pertencentes a três fitofisionomias (Floresta Ombrófila Densa, Floresta Ombrófila Mista e Área de Contato).

	Região		
	Floresta Ombrófila Densa	Floresta Ombrófila Mista	Área de Contato
N	27	5	14
A	6	4	2
h	0,399	0,900	0,527
π	0,0604	0,01308	0,00493

A rede de haplótipos gerada (Figura 5.1) mostra que o haplótipo 1 é compartilhado pela maior quantidade de espécimes, com 31 amostras. O outro haplótipo compartilhado por mais de uma amostra é o haplótipo 4.

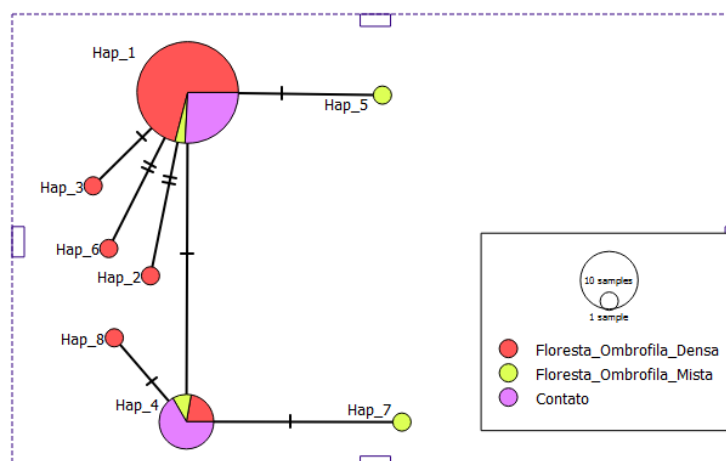


Figura 5.1. Rede de haplótipos gerada a partir de uma região de 107 pb do gene mitocondrial citocromo *b* a partir de 46 amostras de *Mazama bororo*.

Esses resultados indicam que as sequências analisadas pertencentes à área de contato e Floresta Ombrófila Densa apresentam maior similaridade genética quando comparadas com as sequências provenientes da Floresta Ombrófila Mista. Porém, analisando-se o resultado do teste de diferenciação entre os três grupos verifica-se que existe uma diferenciação significativa entre a Floresta Ombrófila Densa em relação à Floresta Ombrófila Mista ($\Phi_{ST} = 0.10161$, $p < 0,03$) e entre a Floresta Ombrófila Densa e à área de Contato ($\Phi_{ST} = 0.11318$, $p < 0,03$).

Os testes de neutralidade indicaram valores negativos para o grupo de animais pertencentes à Floresta Ombrófila Densa e Floresta Ombrófila Mista, indicando que a variação observada tem seleção neutra, porém não apresentou neutralidade para o grupo da área de Contato (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Resultado dos testes de neutralidade para sequências do gene citocromo *b* de *Mazama bororo*.

Grupo	Tajima'sD	P	Fu'SF	P
Floresta Ombrófila Densa	-1.71319	0.03300	-3.18966	0.00400
Floresta Ombrófila Mista	-0.17475	0.44800	-1.64826	0.04400
Contato	1.43413	0.96200	1.25082	0.69700

Comparando-se a distribuição haplotípica do DNA histórico e recente (Figura 5.3) percebe-se que as amostras provenientes das regiões mais extremas (Bahia, Goiás e Rio Grande do Sul), compartilham o mesmo haplótipo com amostras de DNA recente.

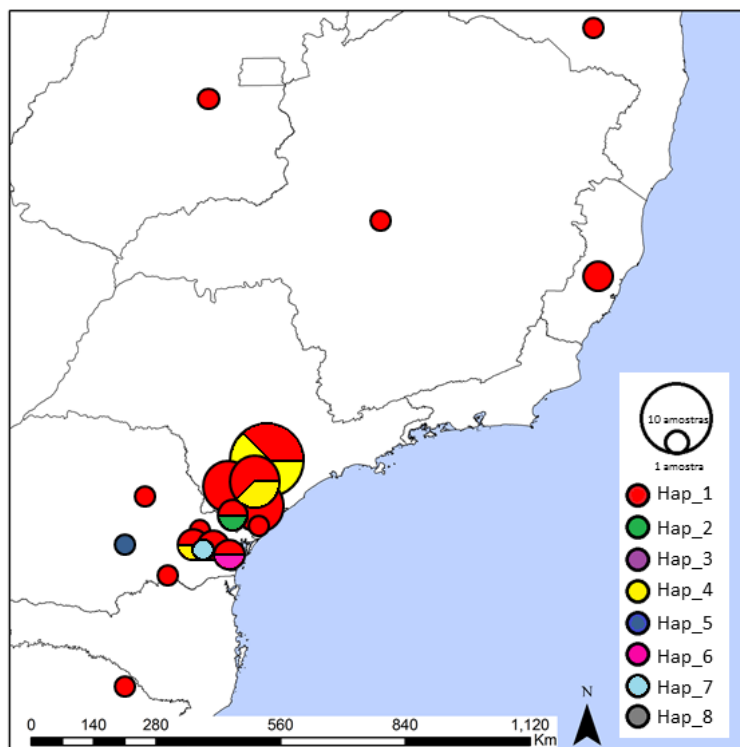


Figura 5.3. Os oito haplótipos identificados a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b e sua respectiva localidade geográfica.

Esse fato não concorda com as três discontinuidades da Mata Atlântica apontadas por diferentes grupos de organismos (CARNAVAL et al., 2009; BATALHA-FILHO et al., 2010). A principal hipótese de diversificação utilizada por estes estudos para explicar as discontinuidades observadas é a teoria dos refúgios florestais (HAFFER, 1969; VANZOLINI; WILLIAMS, 1970; BROWN; AB'SÁBER, 1979). Porém, estudos mais recentes demonstram que a Mata Atlântica era menos subdividida em fragmentos durante o Último Máximo Glacial do que atualmente (LEITE et al., 2016). Desta forma, os resultados filogeográficos aqui apresentados, embora tenham sido gerados a partir de um pequeno fragmento de um único gene, demonstram a ausência de barreiras geográficas para *M. bororo* neste contínuo (norte-sul) e um alto número de haplótipos entre os espécimes localizados na Floresta Ombrófila Densa e Mista. Ainda, é possível inferir que um grupo originou-se

numa área e dispersou-se para outra se uma filogenia do grupo foi determinada (FUTUYMA, 2002). Desta forma, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, pode-se sugerir que o estado de Paraná se mostra como o possível centro de origem e de dispersão da espécie, uma vez que o haplótipo 1 demonstra-se como o mais ancestral e as diferentes populações estão geneticamente relacionadas entre si, sem a demonstração de uma forte estruturação geográfica.

Em relação às 22 amostras pertencentes às coleções de museus, três delas (com idade entre 60 e 115 anos) representam haplótipos distintos dos demais: haplótipo 5 (MHNCI 151), haplótipo 6 (MHNCI172) e haplótipo 7 (BMNH 3.7.1.103). Além disso, os haplótipos 5 e 7 são os únicos exclusivos da Floresta Ombrófila Mista. Esse tipo de formação florestal compreende quatro amostras analisadas, sendo todas elas provenientes de coleções de museus. Porém, uma dessas amostras (MHNCI 4084) é de 1996, sugerindo a possível ocorrência da espécie neste tipo de formação, necessitando-se assim de novos e sistemáticos trabalhos de campo em busca de espécimes de *M. bororo* nessas regiões.

Análises de caracterização e diversidade genética

A amplificação dos 13 locos microssatélites heterólogos foi atingida para a média de 20 amostras testadas de *M. bororo*, sendo que um deles (Mgoua 25) foi monomórfico, e os demais apresentaram de dois a 11 alelos por loco (Tabela 5.4).

Quatro locos apresentaram desvio do EHW (RT01, RT09, Mgoua7 e Mgoua17), sendo que, de acordo com os resultados apontados pelo programa MICRO-CHEKER, deva-se, possivelmente, à existência de alelos nulos (Mgoua7 e Mgoua17), além da presença de “stutter” e alelos nulos (RT09) (Tabela 4).

Com exceção dos locos RT09 e Mgoua4, os demais apresentaram-se em desequilíbrio de ligação.

A diversidade genética observada a partir de marcadores microssatélites para *M. bororo* (cinco alelos por loco e *He* média de 0,63) é inferior aos valores médios apresentados para veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) (15 alelos por loco e *He* média de 0,87) (COSSÉ *et al.*, 2007, 2010) como também aos apresentados para cervo do pantanal (*Blastocerus dichotomus*) (6 alelos por loco e *He* média de 0,76) (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Tabela 5.4 - Medidas de diversidade para os 11 locos em 22 amostras de *Mazama bororo*. Número de amostras (N), número de alelos observados (A), heterozigosidade observada (*Ho*) e esperada (*He*) locos com desvio do EHW (*).

Loco	N	A	Ho	He	Estrutura de repetição do loco	Tamanho do fragmento amplificado (pb)
RT01*	22	8	0,6363	0,7949	(GT) ₂₂	220-234
RT09*	22	4	0,3181	0,5422	(GT) ₂₁	108-114
RT30	21	8	0,5714	0,5935	(GT) ₂₁	181-217
Mgoua3	16	2	0,6250	0,4838	(AAAC) ₅	108-112
Mgoua4	18	6	0,4705	0,5971	(AAGG) ₁₀	185-201
Mgoua7*	18	11	0,3333	0,8650	(CAT) ₁₅	119-152
Mgoua16	22	5	0,6363	0,6627	(TACA) ₁₂	208-224
Mgoua17*	21	3	0,0000	0,5528	(ACA) ₁₁	120-129
Mgoua19	22	6	0,8181	0,8129	(TCTA) ₁₁	131-159
Mgoua20	21	8	0,9523	0,8455	(ATAA) ₁₁	179-207
Mgoua21	13	3	0,6923	0,6646	(CATA) ₁₁	151-159
Mgoua24	22	3	0,2727	0,2505	(ACA) ₁₀	150-156
Média	20	5,58	0,5272	0,6388		

Embora não existam dados publicados a respeito da diversidade genética de outros cervídeos pertencentes ao gênero *Mazama*, é possível considerar que a diversidade apresentada por *M. bororo* neste estudo seja baixa, visto que *M. bororo* é a espécie mais recente do gênero, com menos de 1 milhão de anos de divergência de *Mazama americana* (DUARTE et al., 2008).

A partir da análise realizada no programa STRUCTURE, embora não se tenha pré-estabelecido populações, uma vez que a maioria das amostras não apresentam localidades conhecidas, observa-se uma significativa estruturação ($K = 3$) entre as populações ($\text{LnP}(D) = -385,5$ e $\text{Var} [\text{LnP}(D)] = 50,2$)(Figura 5.4).

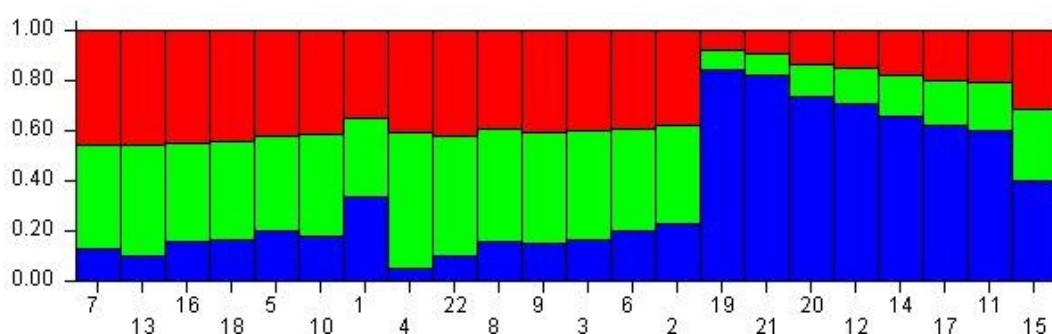


Figura 5.4. Composição genética proporcional de cada amostra de *Mazama bororo* inferida a partir do STRUCTURE, com $K = 3$, sem informação populacional “a priori”. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical e o comprimento de cada cor por barra indica a probabilidade do espécime pertencer a cada grupo genético. Os números abaixo das barras verticais representam a identificação de cada espécime (Apêndice D).

A partir desses resultados é possível verificar uma nítida separação entre os animais com localidade conhecida provenientes do estado de São Paulo (4, 22, 3, 6, 2) e do estado do Paraná (21). Como consequência é possível atribuir os animais sem localidade conhecida a uma destas populações, com exceção dos indivíduos 1 e 15, que apresentam um padrão diferenciado dos demais. Sendo assim, atribui-se as amostras 7, 13, 16, 18, 10, 8 e 9 à população de São Paulo, sabendo-se que com exceção da amostra 7 as demais são provenientes do Criadouro Onça Pintada, PR. E, por fim, as amostras 19, 20, 12, 14, 17 e 11 são atribuídas à população do estado do Paraná, sabendo-se que com exceção da amostra 14, que é proveniente do Centro de Triagem de Animais Silvestres (CETAS), PR, as demais são do Criadouro Onça Pintada.

Dessa forma, conclui-se que o Criadouro Onça Pintada, o único do país que possui uma população de veado-mateiro-pequeno, apresenta espécimes das duas populações diferenciadas geneticamente a partir das localidades conhecidas neste trabalho, uma informação importante quando se trata de uma espécie vulnerável e que necessita de políticas públicas para sua conservação. Os resultados apontam para uma diferenciação que pode ser recente, uma vez que não houve indicativo de subdivisão populacional entre os animais de São Paulo e Paraná analisados a partir do marcador mitocondrial.

Assim, conclui-se que o Criadouro mencionado possui o estoque genético da população de vida livre, informação essencial para medidas que visem possíveis

reintroduções, tendo em vista a vulnerabilidade de *M. bororo* em seu ambiente natural, sugerindo-se a tomada de ações que mantenham as áreas de preservação da Mata Atlântica e que a espécie seja monitorada ecológica e geneticamente.

Referências Bibliográficas

ABRIL, V. V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B. Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenet Genome Res.**, v. 128, p. 177–187, 2010.

AVISE, J. C.; ARNOLD J.; BALL R. M.; BERMINGHAM E.; LAMB T.; NEIGEL J. E.; REEB C. A.; SAUNDERS N. C. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.

BATALHA-FILHO, H.; WALDSCHMIDT, A. M.; CAMPOS, L. A. O.; TAVARES, M. G.; FERNANDES-SALOMÃO, T. M. Phylogeography and historical demography of the Neotropical stingless bee *Melipona quadrifasciata* (Hymenoptera, Apidae): incongruence between morphology and mitochondrial DNA. **Apidologie**, p. 534-547, 2010.

BOOM, R.; SOL, C. J. A.; SALIMANS, M. M. M.; JANSEN, C. L.; WERTHEIM VAN DILLEN, P. M. E. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n.3, p. 495-503, 1990.

BROWN, K. S.; AB'SÁBER, A. N. Ice-ages forest refuges and evolution in the neotropics: correlation of paleoclimatological, geomorphological, and pedological data with modern biological endemism. **Paleoclimas**, v. 5, p. 1-30, 1979.

CABANNE, G. S.; D'HORTA, F. M.; SARI, E. H. R.; SANTOS, F. R.; MIYAKI, C. Y. Nuclear and mitochondrial phylogeography of the Atlantic forest endemic *Xiphorhynchus fuscus* (Aves: *Dendrocolaptidae*): biogeography and systematic implications. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, p. 760-773, 2008.

CAPARROZ, R.; MANTELLATTO, A.M.B.; BERTIOLI, D.J.; FIGUEIREDO, M.G., DUARTE, J.M.B. Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. **Genetics and Molecular Biology**, v. 38, n.3, p.338-345, 2015.

CARNAVAL, A. C.; HICKERSON, M. J.; HADDAD, C. F. B.; RODRIGUES, M. T. E.; MORITZ, C. Stability predicts genetic diversity in the Brazilian Atlantic forest hotspot. **Science**, v. 323, p. 785-789, 2009.

COSSÉ M, GONZÁLEZ S, MALDONADO, J E. Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Genetics and Molecular Research**, v. 4, p. 1118-1122, 2007.

COSSÉ M. **Uso de hábitat y estructura genética de la subespecie *Ozotoceros bezoarticus uruguayensis*, pautas para su conservación**. Tesis. Universidad de la Republica, Uruguay, 2010.

CLEMENT M.; SNELL Q.; WALKE P.; POSADA D.; CRANDALL, K. **TCS: estimating gene genealogies**. Proc 16th Int Parallel Distrib Process Symp, v. 2, p. 184, 2002.

DORADO-PÉREZ, G. **Prácticas generales de bioquímica y biología molecular**. Departamento de bioquímica y biología molecular. Universidad de Córdoba, España. Disponível em: www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/47%20SECUENCIACI%C3%93N%20DNA.pdf. Acesso: 21/05/2016.

DUARTE, J. M. B.; GIANNONI, M. L. A new species of deer in Brazil (*Mazama bororo*). **Deer Specialist Group Newsletter**, v. 13, n. 3, p. 5, 1996.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Mol. Phylogenet. Evol**, v. 49, p. 17-22, 2008.

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

DUARTE, J.M.B.; VOGLIOTTI, A.; ZANETTI, E.S.; OLIVEIRA, M.L.; TIEPOLO, L.M.; RODRIGUES, F.L.; ALMEIDA, L.B. **Biodiversidade Brasileira- Avaliação do Estado de Conservação dos Ungulados**, ano II, n.3, p.42-49, 2012.

EARL ,D.A.;vonHOLDT B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resource**, v.4, p.359–361, 2012.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular Ecology**, v.14, p.2611–2620, 2005.

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P.E.; QUATTRO, J.M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v.131, p.479-491, 1992.

EXCOFFIER, L.; LAVAL, G.; SCHNEIDER, S. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. **Evolution Bioinformatics Online**, v.1, p.47–50, 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. Arlequin suite ver. 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resource**, v.10, p.564-567, 2010.

FALUSH, D.; STEPHENS, M. PRITCHARD, J.K. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v.164, p.1567–1587, 2003.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS. **Atlas dos remanescentes florestais da mata atlântica período 2011-2012**, Relatório Técnico, 61p., 2013.

FUTUYMA, D.J. Biogeografia. *In*: **Biologia Evolutiva**. FUTUYMA, D.J. FUNPEC-RP (Ed). Ribeirão Preto, p. 202-405, 2002.

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E.; LEONARD, J. A.; VILÀ, C.; DUARTE, J. M. B.; MERINO, M.; BRUM-ZORRILLA, N.; WAINE, R. K. Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Molecular Ecology**, v.7, p. 47-56, 1998.

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO J. E.; ORTEGA J.; TALARICO A. C.; BIDEGARAY-BATISTA L.; GARCIA J. E.; DUARTE, J. M. B. Identification of the endangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, v. 9, p. 754-758, 2009.

GUO, S.W.; THOMPSON, E.A. Performing the exact test of Hardy–Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p.361–372, 1992.

HAFFER, J. Speciation in Amazonian forest birds. **Science**, v. 165, p. 131-137, 1969.

HALL, T. A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp**, ser. 41, p. 95-98, 1999.

INSTITUTO AMBIENTAL DO PARANÁ. **Mamíferos ameaçados do Paraná**. SEMA/IAP.93p, 2010

LEIGH, J. W. & BRYANT, D. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution*, v. 6, n. 9, p. 1110-1116, 2015.

LEITE, Y. L. R.; COSTA, L.P.; LOSS, A.C.; ROCHA, R.G.; BATALHA-FILHO, H.; BASTOS, A.C.; QUARESMA, V.S.; FAGUNDES, V.; PARESQUE, R.; PASSAMANI, M.; PARDINI, R. Neotropical forest expansion during the last glacial period challenges refuge hypothesis. **PNAS**. v. 113, n. 4, p. 1008-13, 2016.

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

MEDRANO J. F.; AASEN E.; SHARROW L.; DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v. 8, n. 1, p. 43, 1990.

OLIVEIRA, E.J.F.; GARCIA, J.E.; DUARTE, J.M.B.; CONTEL, E.P.B. Development and characterization of microsatellite loci in the marsh deer (*Blastocerus dichotomus* Cervidae). **Conservation Genetics**, v.10, p. 1505-1506, 2009.

PELLEGRINO, K. C. M., RODRIGUES, M. T., WAITE, A. N., MORANDO, M., YASSUDA, Y. Y. E SITES, J. W. (2005). Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwini* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river systems in the Brazilian Atlantic Forest. **Biological Journal of the Linnean Society** 85, 13-26

PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v.155, p.945–959, 2000.

PRITCHARD, J.K.; WEN, W. **Documentation for STRUCTURE software: versión 2**. Chicago (IL): Department of Human Genetics, University of Chicago, 2004.

RYDER, O. A. Species conservation and systematic: the dilemma of subspecies. **Trends in Ecology and Evolution**, n.1, p.9-10, 1986.

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

SÃO PAULO. Decreto Estadual nº 56.031, de 20 de julho de 2010. Declara as espécies da fauna silvestre ameaçadas, as quase ameaçadas, as colapsadas, sobrexplotadas, ameaçadas de sobrexplotação e com dados insuficientes para avaliação no Estado de São Paulo e dá providências correlatas. **Diário Oficial do Estado de São Paulo**, Seção 1, nº 136, 21/07/2010:3. 2010.

TEMPLETON A. R.; CRANDALL K. A.; SING C. F.; A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. **Genetics**, v. 132, p. 619–633, 1992.

THOMPSON, J.D.; HIGGINS, D.G.; GIBSON, T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v.22, n.22, p. 4673–4680, 1994.

Van OOSTERHOUT, C.; HUTCHINSON, W.F.; WILLS, D.P.M.; SHIPLEY, P. 2004. MICROCHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, p.535–538, 2004.

VANZOLINI, P. E.; WILLIAMS, E. E. South American anoles: the geographic differentiation and evolution of the *Anolischrysolepis* species group (Sauria: *Iguanidae*). **Arquivos de Zoologia de São Paulo**, v. 19, p. 1-298, 1970.

VOGLIOTTI, A.; OLIVEIRA, M.L.; DUARTE, J.M.B. *Mazama bororo*. **The IUCN Red List of Threatened Species**, 2016. Acesso em 01/09/2016.

WEBER, M.; GONZÁLEZ S. Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution. **Écoscience**, v. 10, p. 443-454, 2003.

WILSON, G.A.; STROBECK, C.; WU, L.; COFFIN, J.W. Characterization of microsatellite loci in caribou *Rangifer tarandus*, and their use in other artiodactyls. **Molecular Ecology**, v.6, p. 69-79, 1997.

Considerações finais

Os resultados obtidos no presente trabalho trazem avanços no conhecimento da biologia de *Mazama bororo*, contribuindo também na elucidação de incertezas taxonômicas a respeito do gênero *Mazama*.

A existência de uma alta taxa de erro de identificação de cervídeos do gênero *Mazama* no material presente nos museus analisados indica a necessidade de revisão de todo o acervo presente em coleções de história natural. Essa revisão tornará possível o desenvolvimento de diversos estudos que utilizam esse tipo de material biológico sem a propagação de erros e inviabilização dos resultados obtidos.

A confirmação de que *Mazama americana jucunda* e *M. bororo* correspondem à mesma entidade biológica demonstra a necessidade de elevar a subespécie *M. a. jucunda* a categoria de espécie e de tornar o nome *M. bororo* uma sinonímia de *Mazama jucunda*.

O fato da distribuição histórica de *M. bororo* revelar-se maior do que a descrita traz subsídios para o planejamento de ações conservacionistas da espécie, uma vez que sua redução populacional foi muito mais intensa do que a esperada. Além disso, a identificação de espécimes pertencentes à *M. bororo* com idade recente e em regiões de registro inéditas apontam para a necessidade de novos estudos de distribuição atual da espécie, com a finalidade de confirmação/atualização de sua distribuição atual presente na literatura.

Por fim, a ausência de subdivisão genética histórica no veado-mateiro-pequeno demonstra que os espécimes estabeleciam fluxo gênico entre si ao longo da extensão do bioma Mata Atlântica, indicando também a inexistência de subdivisões nesse bioma, como já indicado para outras espécies. Além disso, esses resultados suportam possíveis ações de manejo dos espécimes entre diferentes regiões geográficas.

Dessa forma, os dados aqui apresentados contribuem para o conhecimento dessa espécie ameaçada, suportando o planejamento de futuras ações conservacionistas.

APÊNDICES

A. Identificação molecular das amostras de DNA de coleções de museus a partir de um fragmento de 224 pb do gene mitocondrial citocromo b.

Nº de tombo e Museu	Espécie museu	Espécie molecular	Localidade	Ano depósito
3907 MZUSP	<i>M. americana</i>	<i>M. bororo</i>	SP	1934
32160 MZUSP	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	SP	-----
2181 MZUSP	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. bororo</i>	SP	-----
8123 MZUSP	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	MA	1955
2171 MZUSP	<i>M. americana</i>	<i>M. gouazoubira</i>	SP	2006
2173 MZUSP	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. bororo</i>	SP	-----
32337 MZUSP	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	SP	-----
32619 MZUSP	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	SP	-----
6237 UFPB	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PB	2011
6652 UFPB	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PE	2012
6797 UFPB	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PB	2012
2422 UFPE	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	MA	2000
0123 MAMM	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. americana</i>	RS	-----
0126 MAMM	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. bororo</i>	RS	-----
257 MAMM	<i>M. americana</i>	<i>M. nana</i>	RS	-----
1341 ZUEC	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	SP	-----
1578 ZUEC	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. bororo</i>	SP	1979
1579 ZUEC	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. bororo</i>	SP	1979
1642 ZUEC	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	SP	1993
1766 ZUEC	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	SP	1994
1820 MBML	<i>M. americana</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	1993
1848 MBML	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	1996
1850 MBML	<i>M. americana</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	1996
2079 MBML	<i>M. americana</i>	<i>M. bororo</i>	ES	1994
2780 MBML	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	2005
2819 MBML	<i>M. americana</i>	<i>M. bororo</i>	ES	2008
3443 MBML	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	-----
3444 MBML	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	2010
3445 MBML	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	2010
3550 MBML	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	ES	-----
0727 PUC	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	RS	-----
1822 PUC	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	RS	2012
1565 MNRJ	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. bororo</i>	MG	1934
5104 MNRJ	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. bororo</i>	GO	1936
60647 MNRJ	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. bororo</i>	BA	1956
3892 FZB	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	RS	1992
055 FZB	<i>M. rufina</i>	<i>M. bororo</i>	RS	2000
FZB 1026	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. bororo</i>	RS	1983
3601 FZB	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	RS	2012
4104 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PR	1996
4096 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PR	1999
4103 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PR	1999
4095 MHNCI	<i>M. rufina</i>	<i>M. bororo</i>	PR	2001
4375 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. americana</i>	PR	2004
4107 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PR	1997
4374 MHNCI	<i>M. nana</i>	<i>M. nana</i>	PR	2004
1078 MHNCI	<i>M. rufina</i>	<i>M. nana</i>	PR	1987
5574 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PR	2004
4085 MHNCI	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PR	1996

Continua...

Continuação...

Nº de tombo e Museu	Espécie museu	Espécie molecular	Localidade	Ano depósito
4795 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	1996
5580 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	2003
5592 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.nana</i>	PR	-----
4101 MHNCI	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M.bororo</i>	PR	2002
5056 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	1996
3746 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	1997
394 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	1949
3412 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.nana</i>	PR	1995
151 MHNCI	<i>M. simplicicornis</i>	<i>M. bororo</i>	PR	1945
393 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.bororo</i>	PR	1950
396 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.bororo</i>	PR	1950
4084 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.bororo</i>	PR	1996
5990 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	2007
394 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M. bororo</i>	PR	1949
4106 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.nana</i>	PR	1999
147 MHNCI	<i>M. simplicicornis</i>	<i>M.nana</i>	PR	1945
2513 MHNCI	<i>M. rufina</i>	<i>M.nana</i>	PR	1985
5769 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	2005
3411 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	-----
6172 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	1999
4079 MHNCI	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M. gouazoubira</i>	PR	2001
4014 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.gouazoubira</i>	PR	1998
3956 MHNCI	<i>M. gouazoubira</i>	<i>M.nana</i>	PR	1999
2449 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.nana</i>	PR	1992
153 MHNCI	<i>M. simplicicornis</i>	<i>M.americana</i>	PR	1945
6093 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.nana</i>	PR	2008
4053 MHNCI	<i>Mazama sp.</i>	<i>M.nana</i>	PR	2001
154 MHNCI	<i>M. simplicicornis</i>	<i>M.bororo</i>	PR	1944

B. Amostras provenientes de crânios depositados em coleções de museus identificadas como pertencentes à espécie *M.bororo*, a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b.

Nº de tombo e Museu	Estado	Localidade	Ano de coleta
3907 MZUSP	SP	Cananéia	1934
2181 MZUSP	SP	-----	-----
2173 MZUSP	SP	-----	-----
0126 MAMM	RS	-----	-----
1578 ZUEC	SP	Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo	1979
1579 ZUEC	SP	Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo	1979
2079 MBML	ES	Estação Biológica Santa Lúcia, Santa Teresa	1994
2819 MBML	ES	Santa Teresa	2008
1565 MNRJ	MG	Barra do Paraopeba, Morada Nova de Minas	1934
5104 MNRJ	GO	Anápolis	1936
60647 MNRJ	BA	Vitória da Conquista	1956
1026 FZB	RS	Estação Ecológica Aracuri ,Esmeralda	1983
4095 MHNCI	PR	Rio Sagrado, Morretes	2001
4101 MHNCI	PR	Klabin Reflorestadora, Telêmaco Borba	2002
151 MHNCI	PR	Vale do rio Ivaí, Prudentópolis	1945
393 MHNCI	PR	Cubatão, Paranaguá	1950
396 MHNCI	PR	Cubatão, Paranaguá	1950
6194 MHNCI	PR	BR 277, km 20, Morretes	2008
4084 MHNCI	PR	Rodovia do Xisto, km 112, Lapa	1996
394 MHNCI	PR	Curitiba	1949
154 MHNCI	PR	Curitiba	1944
3.7.1.103 BMNH	PR	Roça Nova, Piraquara	1901

C. Relação das 46 amostras de *Mazama bororo* utilizadas para o estudo de filogeografia da espécie a partir de um fragmento do gene mitocondrial citocromo b.

Identificação da amostra	Tipo de material	Origem geográfica	Tipo de formação florestal	Ano de coleta	Acervo
T71	Pelo	Barra do Turvo - SP	Floresta Ombrófila Densa	1995	NUPECCE
T72	Pelo	Barra do Turvo - SP	Floresta Ombrófila Densa	1995	NUPECCE
T204	Pelo	Parque Estadual de Intervales - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
T208	Pelo	Parque Estadual de Intervales - SP	Floresta Ombrófila Densa	2001	NUPECCE
T210	Pelo	Parque Estadual de Intervales - SP	Floresta Ombrófila Densa	2001	NUPECCE
T373	Pelo	Bocaiuva do Sul - PR	Contato	2016	NUPECCE
NPC111	Pelo	Parque Estadual Carlos Botelho - SP	Floresta Ombrófila Densa	2016	NUPECCE
JAC 3	Fezes	Jacupiranga - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
JAC 6	Fezes	Jacupiranga - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
JAC 5	Fezes	Jacupiranga - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
JAC 210	Fezes	Jacupiranga - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
JAC 212	Fezes	Jacupiranga - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
PEI 005	Fezes	Parque Estadual de Intervales - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
PEI 39	Fezes	Parque Estadual de Intervales - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
PEI 264	Fezes	Parque Estadual de Intervales - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
PEI 002	Fezes	Parque Estadual de Intervales - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
FJX 1_99	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
FJX 8_106	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
FJX6_104	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE

Continua...

Continua...

Identificação da amostra	Tipo de material	Origem geográfica	Tipo de formação florestal	Ano de coleta	Acervo
FJX_2_100	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
FJX_103	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
FJX_7_105	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
FJX_3_101	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
FJX_4_102	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
EUCATEX 001	Fezes	Pilar do Sul - SP	Contato	2000	NUPECCE
C. BOTELHO 3	Fezes	Parque Estadual Carlos Botelho - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
C. BOTELHO 04	Fezes	Parque Estadual Carlos Botelho - SP	Floresta Ombrófila Densa	2000	NUPECCE
MZUSP 3907	Osso	Cananéia	Floresta Ombrófila Densa	1934	Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo
ZUEC 1578	Osso	Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo	Floresta Ombrófila Densa	1979	Museu de História Natural Professor Adão José Cardoso
ZUEC 1579	Osso	Parque Estadual Carlos Botelho, São Paulo	Floresta Ombrófila Densa	1979	Museu de História Natural Professor Adão José Cardoso
MBML 2079	Osso	Estação Biológica Santa Lúcia, Santa Teresa	Floresta Ombrófila Densa	1994	Museu de Biologia Professor Mello Leitão
MBML 2819	Osso	Santa Teresa	Floresta Ombrófila Densa	2008	Museu de Biologia Professor Mello Leitão
MNRJ 1565	Osso	Barra do Paraopeba, Morada Nova de Minas	Contato	1934	Museu Nacional do Rio de Janeiro
MNRJ 5104	Osso	Anápolis	Contato	1936	Museu Nacional do Rio de Janeiro
MNRJ 60647	Osso	Vitória da Conquista	Floresta Ombrófila Densa	1956	Museu Nacional do Rio de Janeiro
FZB 1026	Osso	Estação Ecológica Aracuri, Esmeralda	Contato	1983	Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul
MHNCI 4095	Osso	Rio Sagrado, Morretes	Floresta Ombrófila Densa	2001	Museu de História Natural Capão da Imbuia

Continua...

Continua...

Identificação da amostra	Tipo de material	Origem geográfica	Tipo de formação florestal	Ano de coleta	Acervo
MHNCI 4101	Osso	Klabin Reflorestadora, Telêmaco Borba	Contato	2002	Museu de História Natural Capão da Imbuia
MHNCI 151	Osso	Vale do rio Ivaí, Prudentópolis	Floresta Ombrófila Mista	1945	Museu de História Natural Capão da Imbuia
MHNCI 393	Osso	Cubatão, Paranaguá	Floresta Ombrófila Densa	1950	Museu de História Natural Capão da Imbuia
MHNCI 396	Osso	Cubatão, Paranaguá	Floresta Ombrófila Densa	1950	Museu de História Natural Capão da Imbuia
MHNCI 6194	Osso	BR 277, km 20, Morretes	Floresta Ombrófila Densa	2008	Museu de História Natural Capão da Imbuia
MHNCI 4084	Osso	Rodovia do Xisto, km 112, Lapa	Floresta Ombrófila Mista	1996	Museu de História Natural Capão da Imbuia
MHNCI 394	Osso	Curitiba	Floresta Ombrófila Mista	1949	Museu de História Natural Capão da Imbuia
MHNCI 154	Osso	Curitiba	Floresta Ombrófila Mista	1944	Museu de História Natural Capão da Imbuia
BMNH 3.7.1.103	Osso	Roça Nova, Piraquara	Floresta Ombrófila Mista	1901	Museu de História Natural de Londres

D. Relação das 22 amostras de *Mazama bororo* utilizadas nas análises de caracterização e diversidade genética a partir de 13 marcadores nucleares do tipo microssatélites.

Identificação da amostra	Tipo de material	Origem geográfica	Ano de coleta
Msg64 (1)	Pelo	Desconhecida	
T71 (2)	Pelo	Barra do Turvo – SP	1995
T72 (3)	Pelo	Barra do Turvo – SP	1995
T204 (4)	Pelo	Parque Estadual de Intervales – SP	2000
T208 (5)	Pelo	Parque Estadual de Intervales – SP	2001
T210 (6)	Pelo	Parque Estadual de Intervales – SP	2001
T213 (7)	Pelo	Desconhecida	1990
T332 (8)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2012
T333 (9)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2012
T334 (10)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2012
T335 (11)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2012
T336 (12)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2012
T337 (13)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2012
T338 (14)	Pelo	Centro de Triagem de Animais Selvagens - PR	2011
T340 (15)	Pelo	Centro de Triagem de Animais Selvagens - PR	2012
T373 (21)	Pelo	Bocaiuva do Sul - PR	2016
NPC111 (22)	Pelo	Parque Estadual Carlos Botelho - SP	2016
Bororo 1 (16)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2013
Bororo 2 (17)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2013
Bororo 3 (18)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2013
Bororo 4 (19)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2013
Bororo 5 (20)	Pelo	Criadouro Onça Pintada - PR	2013