

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

**FILOGENIA MOLECULAR DE *Mazama americana*
(ARTIODACTYLA: CERVIDAE) COMO AUXÍLIO NA
RESOLUÇÃO DAS INCERTEZAS TAXONÔMICAS**

**Louise Helena Martins Maran
Bióloga**

2016

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

**FILOGENIA MOLECULAR DE *Mazama americana*
(ARTIODACTYLA: CERVIDAE) COMO AUXÍLIO NA
RESOLUÇÃO DAS INCERTEZAS TAXONÔMICAS**

Louise Helena Martins Maran

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Coorientadora: Profa. Dra. Susana González

**Dissertação apresentada à Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP,
Câmpus de Jaboticabal, como parte das
exigências para a obtenção do título de
Mestre em Genética e Melhoramento Animal**

2016

M311f Maran, Louise Helena Martins
Filogenia molecular de *Mazama americana* (ARTIODACTYLA:
CERVIDAE) como auxílio na resolução das incertezas taxonômicas /
Louise Helena Martins Maran. -- Jaboticabal, 2016
vii, 55 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Banca examinadora: Marcos Túlio Oliveira, Claudio de Oliveira
Bibliografia

1. Filogenia molecular. 2. Veado-mateiro. 3. Unidade
evolutivamente significativa. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 636.082:599.735.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.
e-mail: louise.maran@outlook.com



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

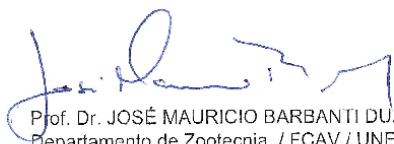


CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO: FILOGENIA MOLECULAR DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA:
CERVIDAE) COMO AUXÍLIO NA RESOLUÇÃO DAS INCERTEZAS
TAXONÔMICAS

AUTORA: LOUISE HELENA MARTINS MARAN
ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
CO-ORIENTADORA: SUSANA GONZÁLEZ

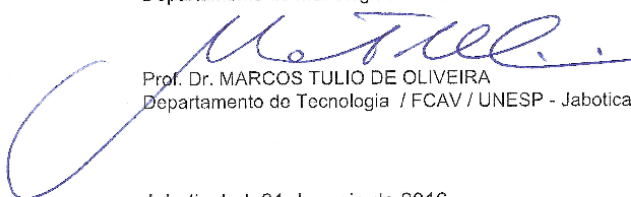
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E
MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. CLÁUDIO DE OLIVEIRA
Departamento de Morfologia / UNESP / Instituto de Biociências - Botucatu, SP



Prof. Dr. MARCOS TULIO DE OLIVEIRA
Departamento de Tecnologia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 31 de maio de 2016.

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LOUISE HELENA MARTINS MARAN – Nascida em 31 de agosto de 1988, na cidade de Marília, São Paulo, Brasil, graduou-se em Licenciatura em Ciências Biológicas pela Universidade Federal da Grande Dourados - UFGD, Dourados, Mato Grosso do Sul, no ano de 2013. Durante o curso de graduação foi aluna voluntária de iniciação científica no Programa Institucional Voluntário de Iniciação Científica – PIVIC, no período de 2011 a 2012, na área de educação ambiental. Ingressou no curso de Mestrado em Genética e Melhoramento Animal em março de 2014 na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Câmpus de Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte e coorientação da Profa. Dra. Susana González. Durante a execução deste trabalho recebeu bolsa financiada pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

“No começo pensei que estivesse lutando para salvar seringueiras. Depois pensei que estava lutando para salvar a Floresta Amazônica. Agora, percebo que estou lutando pela humanidade.”
(Chico Mendes)

DEDICO

Aos meus pais **Armando Carlos Maran** e **Suleide Simões Martins Maran** pelo apoio incondicional durante toda a minha caminhada, por todo o amor e companheirismo e por sempre acreditarem junto comigo. Vocês tornaram o sonho possível.

Aos meus irmãos **Gabriel Martins Maran** e **Rafael Martins Maran** que estão sempre ao meu lado, e ao meu amor **Enéias Rosa de Oliveira** por todo amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. **José Maurício Barbanti Duarte** pela oportunidade, por toda orientação e crescimento profissional e acadêmico.

A minha coorientadora Profa. Dra. **Susana González** por toda a colaboração e suporte, mesmo estando longe.

Ao programa de **Genética e Melhoramento Animal**, ao **CNPq** e a **CAPES** por acreditar e investir neste trabalho.

Ao técnico **João Airton Boer** pelo auxílio no laboratório, pelos ensinamentos, pela boa convivência e amizade.

A todos os professores que contribuíram para o meu crescimento nessa etapa, em especial ao Prof. Dr. **Vitor Fernandes Oliveira de Miranda** pelos conselhos a respeito das análises filogenéticas.

A **Aline (Kokotinha)** e **Iara** pelo apoio, conselhos e companheirismo nos momentos de “surto”, e, principalmente, por se tornarem grandes amigas e companheiras para todas as horas.

A todos do grupo **NUPECCE** que me receberam de braços abertos desde o primeiro contato, por todo o aprendizado e momentos de descontração nos cafezinhos e confraternizações, em especial à galera da Genética **Aline (Kokotinha)**, **Iara**, **Janaína**, **Mirela**, **Lívia**, **Marina**, **Lorena**, **Carol**, **Jorge** e **Douglas**. Muito obrigada de coração a todos os “nupecianos”.

Aos meus pais **Armando** e **Suleide**, aos meus irmãos **Gabriel** e **Rafael** e ao **Enéias** por todo amor e cuidado, por nunca duvidarem da minha capacidade e sempre me motivarem a superar as dificuldades.

A toda família **Martins** e **Maran** por vibrarem junto comigo em mais esta conquista.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	II
LISTA DE FIGURAS.....	III
LISTA DE TABELAS.....	V
RESUMO.....	VI
ABSTRACT.....	VII
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. OBJETIVOS.....	4
III. REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 Família Cervidae e Gênero <i>Mazama</i>	5
3.2 A espécie <i>Mazama americana</i>	8
3.3 Taxonomia Inconclusiva.....	10
3.4 Análises Filogenéticas.....	14
3.5 Marcadores Moleculares.....	16
3.6 Evolutionarily Significant Units – ESU.....	17
IV. MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Amostragem.....	20
4.2 Extração e Quantificação de DNA.....	23
4.3 Polimerase Chain Reaction (PCR), Eletroforese e Purificação de DNA.....	23
4.4 Sequenciamento.....	25
4.5. Análises dos dados.....	25
4.5.1 Visualização e edição das sequências de DNA.....	25
4.5.2 Análises Filogenéticas e Análises Haplotípicas.....	26
V. RESULTADOS.....	27
5.1. Sequenciamento.....	27
5.2. Árvores Filogenéticas e Análises Haplotípicas.....	28
VI. DISCUSSÃO.....	38
VII. CONCLUSÃO.....	40
VI. REFERÊNCIAS.....	41

LISTA DE ABREVIACÕES

2n - Número diplóide

Cit-b - *Citocromo-b*

COI - *Citocromo oxidade I*

DD - Dados deficientes

D-loop - Região controladora mitocondrial *D-loop*

ESU - Evolutionarily Significant Units

IUCN - International Union for Conservation of Nature

mM - Milimolar

MgCl₂ - Cloreto de Magnésio

mtDNA - DNA Mitocondrial

NCBI - National Center for Biotechnology Information

ND5 - *NADH Dehidrogenase subunit 5*

NF - Número fundamental de braços cromossômicos

ng/μl - Nanograma por microlitro

nm - Nanômetros

NUPECCE - Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos

pb - Pares de bases

pmol - Picomol

μl – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 01. Veado-mateiro (<i>M. americana</i>). Foto de J.M.B. Duarte.....	8
Figura 02. Mapa da distribuição do veado-mateiro (<i>M. americana</i>). (Fonte: Duarte e González, 2010).....	9
Figura 03. Evolução cromossômica de seis citótipos de <i>M. americana</i> (PR = Paraná; CA = Carajás; SA = Santarém; JA = Jarí; JU = Juína; RO = Rondônia). (Fonte: ABRIL et al., 2010).....	13
Figura 04. Imagem de eletroferograma no programa BioEdit (Gene <i>Cit-b</i> , fragmento de 480 pb) utilizado para revisão visualmente.....	26
Figura 05. Imagem de eletroferograma do gene <i>IL-16</i> , visualizado no programa BioEdit, revelando a presença de picos sobrepostos que impossibilitaram a utilização da sequência para gerar análises filogenéticas.....	28
Figura 06. Relações filogenéticas de <i>M. americana</i> inferidas através do gene mitocondrial <i>Cit-b</i> , análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Citótipos Carajás e Paraná ocupando mesmo clado (Quadro Amarelo) e agrupamento de cinco citótipos (Quadro Verde). Out group relacionados na Tabela 02.....	30
Figura 07. Relações filogenéticas de <i>M. americana</i> inferidas através do gene mitocondrial <i>COI</i> , análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Citótipos Carajás e Paraná ocupando mesmo clado (Quadro Amarelo) e agrupamento de três citótipos (Quadro Verde). Out group relacionados na Tabela 02.....	31
Figura 08. Relações filogenéticas de <i>M. americana</i> inferidas através do gene mitocondrial <i>D-loop</i> , análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Dois clados do citótipo Carajás (Quadro Vermelho) e um agrupamento dos indivíduos do citótipo Paraná (Quadro Azul). Out group relacionados na Tabela 02.....	33

Figura 09. Relações filogenéticas de *M. americana* inferidas através do gene mitocondrial *ND5*, análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná ocupando o mesmo clado (Quadro Amarelo), indivíduos agrupados do citótipo Carajás (Quadro Vermelho) e agrupamento de três citótipos (Quadro Verde). Out group relacionados na Tabela 02.....**34**

Figura 10. Relações filogenéticas de *M. americana* inferidas através dos genes mitocondriais *Cit-b*, *COI*, *D-loop* e *ND5*, análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná agrupados (Quadro Amarelo), agrupamentos em três clados de indivíduos do citótipo Carajás e agrupamento de cinco citótipos (Quadro Verde). Out group relacionados na Tabela 02.....**36**

Figura 11. Rede de haplótipos gerada a partir de 44 espécimes de *M. americana* de seis citótipos, com fragmentos concatenados dos quatro genes mitocondriais. Indivíduos do citótipo Carajás e Paraná compartilham o mesmo haplótipo (Hap 9)..**37**

LISTA DE TABELAS

Tabela 01. Relação dos indivíduos de *Mazama americana* analisados, número diplóide (2n), número fundamental de cromossomos (NF), grupos cromossômicos (A, C,D, E e B), citótipos e origem dos animais.....**21**

Tabela 02. Número de acesso no GenBank das sequências de genes mitocondriais utilizadas como grupo externo nas análises filogenéticas, espécies e genes.....**23**

Tabela 03. Genes mitocondriais e nucleares amplificados e os iniciadores (*primers*) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento.....**24**

FILOGENIA MOLECULAR DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) COMO AUXÍLIO NA RESOLUÇÃO DAS INCERTEZAS TAXONÔMICAS

RESUMO - Estudos recentes com a espécie *Mazama americana* apontam duas linhagens cromossômicas dentro deste possível complexo de espécies crípticas e entre elas verificou-se a existência de eficiente barreira reprodutiva por isolamento pós-zigótico. No entanto, o efeito das pequenas diferenças cromossômicas entre populações é ainda pouco esclarecido, não sendo claro se seriam polimorfismos intraespecíficos, diferenças subespecíficas ou específicas. Marcadores moleculares permitem investigar se ocorreu fluxo entre estas populações e se este fluxo ainda ocorre no presente, auxiliando na elucidação dos processos evolutivos que ocorreram na diferenciação cromossômica e qual o real efeito dessas variações no isolamento e especiação no táxon. Diante do exposto, o presente trabalho estudou as relações filogenéticas entre variantes cromossômicas, com alto número diplóide, de *M. americana* com o objetivo de compreender melhor a história evolutiva da espécie e verificar a existência de unidades evolutivamente significativas dentro deste complexo específico, contribuindo para o delineamento de programas de conservação da espécie. As relações filogenéticas da espécie foram examinadas utilizando genes mitocondriais (*citocromo b*, *citocromo oxidase I*, região controladora *D-loop* e *NADH dehidrogenase subunit 5*), com 44 indivíduos de veados-mateiro provenientes de diferentes localidades do Brasil. Os resultados encontrados não corroboram a existência de unidades evolutivamente significativas dentro do grupo amostrado. A topologia encontrada nas árvores filogenéticas não mostram agrupamentos por citótipos, mas sim uma pofilifilia dos clados das árvores filogenéticas.

Palavras-chave: Genes mitocondriais, Filogenia molecular, Veado - mateiro, Unidade Evolutivamente Significativa

MOLECULAR PHYLOGENY OF *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) AS AID IN THE RESOLUTION OF UNCERTAINTY TAXONOMICAL

ABSTRACT - Recent studies on the species *Mazama americana* point two chromosomal lineages within red brocket deer and among them there was the existence of effective reproductive barrier post-zygotic isolation. However, the effect of these small chromosomal differences between these populations is not clearly established, it is not clear whether they would be intraspecific polymorphisms, subspecific or specific differences. The molecular markers allow to investigate if there was flows occurred between these populations and whether these flows still occur in the present, helping to unravel the evolutionary processes that have occurred on chromosome differentiation and what the actual effect of these changes in isolation and speciation in the taxon. Given the above, this research project studied the phylogenetic relationships among chromosomal variants of *M. americana* with the aim of elucidating the evolutionary history of the species and verify the existence of evolutionarily significant units within this particular complex, contributing to the design of programs conservation of the species. The phylogenetic relationships of the species were examined using mitochondrial genes (*cytochrome-b*, *cytochrome oxidase I*, control region *D-loop* and *NADH dehydrogenase subunit 5*, with 44 individuals of red brocket deer from different locations in Brazil. The results do not support the existence of distinct evolutionary units within the sampled groups. The topologies found in phylogenetic tree show no groupings cytotypes but a polyphyly of clades of the phylogenetic tree.

Keywords: Evolutionary Significant Units, Mitochondrial genes, Molecular phylogeny, Red brocket deer

I - INTRODUÇÃO

A espécie *Mazama americana*, popularmente conhecida como veado-mateiro é a maior espécie do gênero *Mazama*, pesando entre 30 a 40 Kg, altura entre 58 a 80 centímetros e comprimento de 90 a 145 centímetros (DUARTE, 1996). A pelagem apresenta cor marrom-avermelhada com manchas brancas em alguns pontos do corpo (BODMER, 1997). A distribuição do veado-mateiro ocorre em quase toda a região neotropical e, tão ampla quanto sua distribuição é a variabilidade citogenética e molecular encontrada na espécie. A taxonomia de *M. americana* é incerta quanto ao número de subespécies e até mesmo quanto ao desdobramento destas subespécies em espécies (VOGLIOTTI, 2004; DUARTE et al., 2008; ABRIL et al., 2010).

As primeiras descrições de *M. americana* foram baseadas apenas em aspectos morfológicos (ERXLEBEN, 1777). Somente com os avanços tecnológicos nas ferramentas moleculares e na citogenética foi possível utilizar aspectos genéticos como peça fundamental na solução de problemas taxonômicos e, no caso da espécie *M. americana* estes estudos têm apontado diferenças genéticas bastante significativas.

Duarte (1998) realizou um amplo estudo citogenético da espécie e encontrou extensa variação cromossômica, identificando sete citótipos de acordo com a região de origem dos animais analisados. Um estudo molecular, realizado por Carnelossi (2008) revelou, por meio de informações filogenéticas geradas com genes mitocondriais, duas linhagens evolutivas dentro de *M. americana*. Abril et al. (2010), em um estudo associando análises citogenéticas e moleculares de veados-mateiro identificaram seis citótipos, além da possível evolução cromossômica dos mesmos. Estes resultados corroboraram a existência de duas linhagens cromossômicas, uma com menor número diplóide (Juína e Rondônia) e outra com maior número diplóide (Paraná, Carajás, Santarém e Jari) e, mais tarde, estudos detectaram a presença de isolamento pós-zigótico entre as duas linhagens evolutivas, embora o mesmo mecanismo de isolamento não ficou claro no cruzamento entre os citótipos com maior número de cromossomos (SALVIANO, 2011, CURSINO et al., 2014).

A genética molecular pode ser de grande importância para a caracterização desta espécie, uma vez que a análise de certas regiões do DNA permite inferir sobre parte da história evolutiva destes indivíduos e conhecer melhor acerca do grau de diferenciação entre os citótipos (GILBERT et al., 2006). Para a conservação e gestão da biodiversidade, espécies desconhecidas ou não descritas representam um grande problema (WILSON, 2003), pois, não identificar uma população, bem como não definir o seu tamanho, têm impacto direto em ações que preveem o manejo adequado de populações ameaçadas e o delineamento de estratégias de conservação (ROJAS, 1995). Lacunas nas relações filogenéticas podem resultar em negligência no manejo de espécies ameaçadas, hibridização não natural e uso inadequado de recursos financeiros (FRANKHAM et al., 2006).

Infelizmente, definir o que é uma espécie envolve questões complexas e amplas sobre sua biologia, morfologia, genética e outros aspectos (VOGLIOTTI, 2004), sendo difícil imaginar um ramo da biologia que tenha enfrentado mais problemas epistemológicos do que o ligado a definição do significado de espécie (ALEIXO, 2007). Ryder, em 1986, observando a dificuldade abordou pela primeira vez o Conceito “Evolutionary Significant Units” (ESU), onde passou a reconhecer como unidades independentes uma população ou um grupo de populações que se apresenta diferenciada em termos genéticos, morfológicos ou ecológicos de populações próximas e refletem uma história de isolamento geográfico em níveis variáveis.

Moritz, em 1994, elaborou um critério genético para identificar estas unidades. Para o autor uma ESU deve apresentar monofilia recíproca para haplótipos do DNA mitocondrial e mostrar divergência significativa nas frequências alélicas de locos nucleares. Ainda segundo o autor, identificar uma ESU é compreender que dentro da mesma espécie existem unidades demográficas que ocupam áreas geográficas distintas e se apresentam diferenciadas geneticamente de outras unidades semelhantes.

Frente a isso, o presente trabalho estudou as relações filogenéticas entre variantes cromossômicas (citótipos) de *M. americana* por meio da análise dos genes mitocondriais *Cit-b*, *COI*, região controladora *D-loop* e *ND5*, no intuito de verificar a existência de unidades evolutivamente significativas dentro deste complexo

específico. Além disso, contribuir para a tomada de decisões em trabalhos futuros com relação ao manejo adequado e independente, quando necessário, destas unidades até que seja possível compreender melhor sobre a taxonomia da espécie.

A hipótese deste trabalho é de que as diferenças genéticas observadas entre os citótipos de veados-mateiro permite separá-los em, pelo menos, duas unidades evolutivamente significativas.

II - OBJETIVOS

Este trabalho objetivou estudar as relações filogenéticas entre variantes cromossômicas (citótipos) de *M. americana*, com alto número cromossômico, no intuito de compreender melhor sobre a história evolutiva da espécie e verificar a existência de unidades evolutivamente significativas dentro deste complexo específico, contribuindo para o delineamento de programas de conservação da espécie.

III - REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Família Cervidae e Gênero *Mazama*

A família Cervidae pertence à Ordem Artiodactyla e a subordem Ruminantia. É composta por ruminantes ungulados denominados cervos e veados, sendo representada por 52 espécies que se distribuem em 19 gêneros (WALKER, 1992; WILSON e REEDER, 2005; DUARTE et al., 2006; WILSON et al., 2009). Além disso, é bastante característico da família a alta taxa de evolução cariotípica, grande inconsistência acerca das relações evolutivas em diferentes níveis entre suas espécies (GILBERT et al., 2006; WILSON et al., 2009; HASSANIN et al., 2012) e a ampla distribuição geográfica destes animais, que se estende por toda América, Eurásia, ilhas continentais associadas e norte da África (NOWAK, 1999).

Análises citogenéticas apontam a taxa de evolução cariotípica dos cervídeos como uma das mais altas dentro da ordem Mammalia (SCHERTHAN, 1991). Os primeiros estudos acerca da evolução cromossômica destes animais sugeriram que o cariótipo ancestral ou basal hipotético da família Cervidae apresentava número diplóide (2n) e número fundamental de braços cromossômicos (NF) iguais a 70, sendo 68 cromossomos autossomos acrocêntricos, um X acrocêntrico e um Y metacêntrico (TAYLOR et al., 1969; Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990). Segundo Neitzel (1987) este cariótipo teria se conservado e poderia ser encontrado em duas espécies recentes, porém filogeneticamente distantes, a espécie *Mazama gouazoubira* e *Hydropotes inermis*. Além disso, o autor levantou a hipótese de que a variação cariotípica apresentada pelas diferentes espécies de cervídeos poderia ser uma característica evolutiva do grupo. Abril et al. (2010) sugerem que a evolução cromossômica dos cervídeos seguiu padrões distintos entre as subfamílias.

Embora escassos, os registros fósseis na América do Norte apontam para dois possíveis ramos de cervídeos no Novo Mundo, a tribo Odocoileini e Rangiferini que teriam se diversificado em paralelo na Ásia e no final do Plioceno se estabeleceram na América do Norte. A grande migração dos mamíferos terrestres ("Great American Interchange") ocorrida no final do Plioceno há 2,5 milhões de anos, da América do Norte para a América do Sul, proporcionou um intercâmbio da fauna

entre os continentes favorecendo uma diversificação genética maior nos mamíferos da América do Sul em relação aos da América do Norte em um curto espaço de tempo (WEBB, 2000).

Após esta migração, os cervídeos da América Central e do Sul teriam dado origem a duas formas morfológicas, a primeira composta por pequenas espécies com chifres pontiagudos, representada pelos gêneros *Pudu* e *Mazama*, e a segunda composta por espécies de grande estatura onde os machos apresentam chifres ramificados, representada pelos gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus* (EISENBERG, 2000).

A incerteza de quem migrou primeiro após a formação do istmo panamenho pode esconder uma diferenciação ocorrida na América Central anterior à grande migração, o que evidência, mais uma vez, a complexa história evolutiva destes animais (WEBB, 2000). Gilbert et al. (2006) levantam a hipótese de que a colonização da América do Sul ocorreu em duas etapas, em um primeiro momento por um ancestral do ramo dos cervídeos da América do Sul no início do Plioceno, e posteriormente por *M. americana* e *O. virginianus* no final do Plioceno e início do Pleistoceno. Além disso, ressaltam que, provavelmente, devido à enorme semelhança morfológica entre os cervídeos da América Latina, pode ter ocorrido seleção similar e independente ao longo do tempo para as espécies do gênero *Mazama*.

Dentre os gêneros da família, o gênero *Mazama* (RAFINESQUE, 1817) apresenta a maior diversidade entre os cervídeos neotropicais (DUARTE e MERINO, 1997). Segundo a IUCN (2016) o gênero é composto por dez espécies: *M. americana*, *M. temama*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. nana*, *M. bororo*, *M. rufina*, *M. pandora*, *M. bricenii* e *M. chunyi*. Destas, cinco ocorrem no Brasil, *M. gouazoubira* (Veado-catingueiro), *M. americana* (Veado-mateiro), *M. nana* (Veado-

bororó), *M. bororo* (Veado-bororó-do-sudeste) e *M. nemorivaga* (Veado-amazônico) (DUARTE et al., 2001).

A princípio, as espécies do gênero foram divididas em dois grupos: veados vermelhos (*M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*) e veados cinza (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) baseada na coloração da pelagem, no tamanho pequeno e na forma do corpo, além da presença de chifres curtos, simples e pontiagudos nos machos (ALLEN, 1915; DUARTE et al., 2008). No entanto, estudos posteriores ressaltaram a dificuldade em distinguir corretamente cada espécie tomando como base à aparência externa, pois, existe uma impressionante convergência morfológica nestes animais sendo necessário analisar características morfológicas, ecológicas, citogenéticas e moleculares para uma classificação taxonômica coerente (DUARTE e MERINO, 1997; GEIST, 1999; DUARTE et al., 2008).

Duarte et al. (2008), em um estudo sobre a história evolutiva dos Cervídeos sulamericanos do gênero *Mazama* sugerem a existência de uma relação polifilética entre estes animais baseada nos altos índices de divergência molecular e citogenética encontrados entre os grupos que são morfologicamente similares. Inferências filogenéticas geradas a partir do DNA mitocondrial (mtDNA) indicaram que os veados vermelhos não se agrupam nos mesmos ramos das árvores filogenéticas que os veados cinzas, e que estes últimos deveriam ser alocados em um gênero distinto de *Mazama*, o qual tem como espécie tipo *M. americana*.

A genética molecular e a citogenética são de grande importância para a avaliação, monitoramento e manejo para a conservação de espécies ameaçadas (CARNELOSSI, 2008). De acordo com Vogliotti (2004), dados sobre a biologia, ecologia e comportamento do gênero *Mazama* ainda são pouco esclarecidos devido ao fato dos animais do gênero serem bastante evasivos, principalmente em ambientes naturais, além de apresentar muitas dúvidas acerca das relações evolutivas entre as espécies descritas até o presente momento, sendo evidente a importância de novas pesquisas para melhor esclarecer estas relações evolutivas dentro do gênero (GILBERT et al., 2006; CARNELOSSI, 2008).

3.2 A Espécie *Mazama americana*

A espécie *Mazama americana*, a maior espécie do gênero (DUARTE, 1996; VARELA et al., 2010), apresenta alta variabilidade de aspectos ecológicos, citogenéticos e moleculares. Popularmente é conhecida como veado-mateiro, seu peso varia entre 30 e 40 Kg, apresenta dorso arqueado com altura variando de 58 a 80 centímetros e comprimento de 90 a 145 centímetros. Sua coloração é marrom-avermelhada e apresenta manchas brancas abaixo da cauda, porção interna dos membros, região submandibular, ponta da maxila superior e face interna das orelhas. Nos membros posteriores, ocorre uma faixa negra que se estende até a região anterior dos mesmos (Figura 01) (DUARTE, 1996; BODMER, 1997).



Figura 01. Veado-mateiro (*M. americana*). Foto de J.M.B. DUARTE.

Duarte (1996) aponta as grandes matas, quase sempre cobertas por densa vegetação e à beira de rios como habitat de preferência destes animais. São bons nadadores e usam pequenos rios como via de movimentação ampliando sua rota de

fuga (VOGLIOTTI, 2004). A ampla distribuição destes animais resulta em uma sobreposição com relação à distribuição de outros veados do gênero, como *M. gouazoubira*, *M. nana* e, possivelmente, *M. bororo* (VOGLIOTTI, 2004). Sua área de ocorrência abrange praticamente toda a região neotropical, desde o norte da Argentina, Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela incluindo Suriname e Trindade e Tobago (EISENBERG, 1989; EMMONS, 1990). Ribeiro (1919) e Vieira (1955) também apontam veados-mateiro na Guiana, Guiana Francesa, Peru e Paraguai (Figura 02).

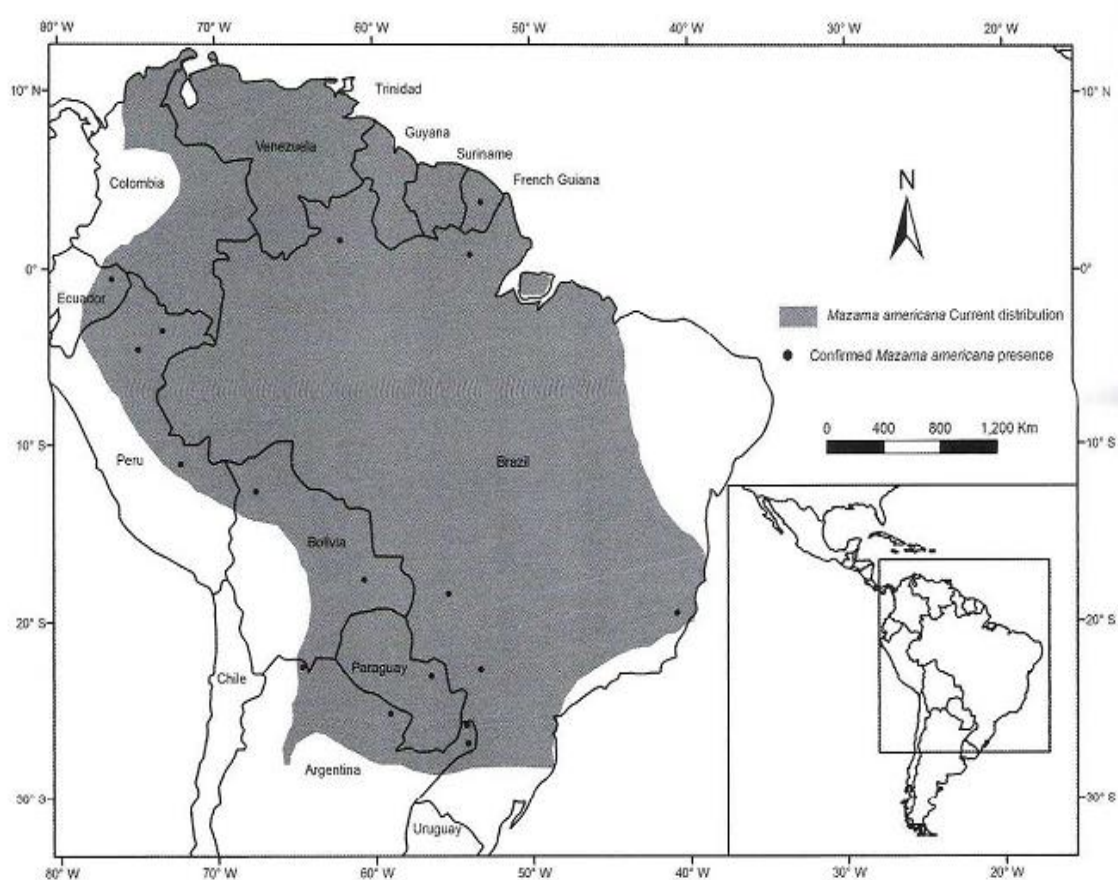


Figura 02. Mapa da distribuição do veado-mateiro (*M. americana*). (Fonte: DUARTE e GONZÁLEZ, 2010).

Em nível internacional, a espécie está categorizada como DD (dados deficientes) na IUCN (2016). Isso porque o comportamento evasivo e a preferência por habitats com densa vegetação implicam em dificuldades de coleta e observação.

Segundo a IUCN, não é possível caracterizar a espécie até que sua taxonomia seja melhor estudada.

Em virtude das distintas características ecológicas, citogenéticas e moleculares encontradas em veados-mateiro a classificação taxonômica destes animais tem sido amplamente discutida. Muitas incertezas ainda permanecem com relação ao grau de diferenciação entre as distintas variantes cariotípicas (citótipos) da espécie *M. americana* e se estas poderiam gerar eficientes barreiras reprodutivas caracterizando espécies distintas. Duarte (1998) alerta que estes citótipos possuem potencial de serem espécies distintas e estar em risco de extinção devido à fragmentação de hábitat. Estudos envolvendo genética molecular de veado-mateiro buscam compreender a taxonomia da espécie, uma vez que a análise de certas regiões do DNA permite reconstruir parte da história evolutiva, além de tornar possível o melhor esclarecimento do grau de diferenciação entre os citótipos (Carnelossi, 2008).

3.3 Taxonomia Inconclusiva

A taxonomia da espécie *Mazama americana* é incerta quanto ao número de subespécies e até mesmo quanto ao desdobramento destas subespécies em espécies (DUARTE, 1996; ABRIL, 2010). A grande inconsistência acerca da classificação taxonômica da espécie persiste desde as suas primeiras descrições. Estudos de comparações morfológicas resultaram em diferentes divisões e classificações taxonômicas ao longo da história evolutiva da espécie.

Thomas (1913) classifica como espécie *M. zetta* e *M. sheila*, corroboradas por Allen (1915) que, além destas, aponta mais seis espécies *M. trinitatis*, *M. rufa*, *M. sartorii*, *M. gualea*, *M. fuscata* e *M. zamora*. Cabrera (1960) em uma nova classificação indica *M. americana gualea*, *M. americana jucunda*, *M. americana rosii*, *M. americana rufa*, *M. americana sarae*, *M. americana sheila*, *M. americana whitelyi*, *M. americana zamora* e *M. americana zetta* como subespécies de *M. americana*. Em 1987, Czernay classifica mais seis subespécies, *M. americana temama*, *M. americana cerasina*, *M. americana reperticia*, *M. americana americana*, *M.*

americana trinitatis e *M. americana carrikeri*, perfazendo um total de quinze subespécies.

Em uma revisão taxonômica do gênero *Mazama*, Rossi (2000) propôs a existência de somente uma espécie de veado-mateiro no Brasil e incluiu nessa espécie *M. bororo*, que foi descrito posteriormente por meio de sua constituição cromossômica em Duarte e Jorge (2003). Em 2005, Grubb reconheceu onze subespécies, *M. americana carrikeri*, *M. americana gualea*, *M. americana jucunda*, *M. americana rosii*, *M. americana rufa*, *M. americana sarae*, *M. americana sheila*, *M. americana trinitatis*, *M. americana whitelyi*, *M. americana zamora* e *M. americana zetta*.

A princípio, os estudos taxonômicos levavam em consideração apenas aspectos morfológicos dos animais (MEDELLIN et al., 1998; ROSSI, 2000). Apesar das semelhanças morfológicas entre as populações de *M. americana*, análises citogenéticas e inferências filogenéticas realizadas posteriormente evidenciaram uma extensa variação cariotípica e molecular dentro deste complexo específico (DUARTE et al., 2008; ABRIL et al., 2010).

Os avanços nas ferramentas da citogenética e da genética molecular possibilitaram a utilização de aspectos genéticos como peça fundamental para esclarecer problemas relacionados à história evolutiva e taxonômica de grandes grupos (FRANKHAM et al., 2006), e, no caso da família Cervidae, estes avanços têm permitido aos pesquisadores esclarecer aspectos taxonômicos antes pouco compreendidos sobre algumas de suas espécies (WEBB, 2000; PITRA et al., 2004; GILBERT et al., 2006; DUARTE et al., 2008; DUARTE e GONZÁLEZ, 2010).

À medida que novos estudos foram realizados, aumentaram as dúvidas quanto ao padrão cariotípico da espécie. A descrição citogenética de um animal com $2n=68$ e $NF=74$ foi feita primeiramente por Taylor et al. (1969). Em estudos seguintes o que se observou foi uma variação cromossômica dentro da espécie característica de acordo com a região de origem do indivíduo. Jorge & Benirschke (1977) em uma análise com três animais oriundos do México encontraram $2n=49/50/50$ e $NF=71/72/72$. Neitzel, em 1987, analisou um indivíduo do Paraguai com $2n=52$ e $NF=56$, cuja variante cariotípica coincide com o número de cromossomos de um dos quatro outros indivíduos brasileiros analisados por Duarte

e Merino (1997), que encontraram $2n=48$ e $NF=54$; $2n=50$ e $NF=54$; $2n=52$ e $NF=56$ e $2n=54$ e $NF=56$.

Duarte (1998) realizou o mais amplo estudo citogenético da espécie. Foram analisados 33 espécimes de veados-mateiro provenientes de várias localidades do Brasil e, os resultados encontrados revelaram um extenso polimorfismo cromossômico, com $2n$ variando de 42 a 53 cromossomos e o NF de 48 a 57, com exceção dos cromossomos B. Cada região amostrada no trabalho evidenciou espécimes com diferentes números cromossômicos, que eram característicos de acordo com a região de origem. As diferentes variações cromossômicas foram denominadas citótipos, que receberam os nomes de suas respectivas origens geográficas, sendo possível descrever sete citótipos: Rio Negro ($2n=44$; $NF=51$), Manaus ($2n=43-44$; $NF=49-50$), Jari ($2n=49$; $NF=56$), Acre ($2n=46-47$; $NF=48-49$), Rondônia ($2n=42-45$; $NF=47-48$), Carajás ($2n=48-51$; $NF=54-55$) e Rio Paraná ($2n=51-53$; $NF=56-57$). Os resultados de uma análise posterior, realizada por Abril e Duarte (2006), com mais 18 indivíduos de diferentes regiões, confirmaram, mais uma vez, a extensa variação cromossômica dentro de *M. americana*, o que permitiu levantar a hipótese de que alguns destes citótipos possam vir a ser outra espécie.

Carnelossi (2008) em um estudo filogenético de veados-mateiro utilizou genes mitocondriais e nucleares para gerar inferências filogenéticas entre variantes cariotípicas da espécie. As inferências geradas por meio dos genes mitocondriais revelaram duas linhagens evolutivas da espécie, uma da população da Bacia do Rio Paraná e outra dos indivíduos do oeste da Bacia do Rio Amazonas. Além disso, foi observada uma diferença genética entre as duas linhagens de *M. americana* maior que a diferença entre duas espécies bem definidas taxonomicamente (*M. bororo* e *M. nana*).

Em 2010, Abril et al. realizaram análises citogenética e molecular de veado-mateiro e identificaram seis citótipos: Rondônia, Juína, Jari, Carajás, Santarém e Paraná, com $2n$ variando de 42 a 53 cromossomos e o NF de 48 a 56 cromossomos. O citótipo Paraná apresentou o maior número diplóide e número fundamental de cromossomos e foi utilizado como base para comparações entre os cariótipos, cujas relações possibilitaram criar a hipótese de que os citótipos identificados se diferenciaram a partir de um ancestral comum em duas linhagens evolutivas (Figura

03). Por meio de uma inversão pericêntrica, fusões cêntricas e em tandem surgiram os citótipos Paraná, Carajás, Santarém e Jarí, e a partir de fusões cêntricas e em tandem surgiram os citótipos Juína e Rondônia.

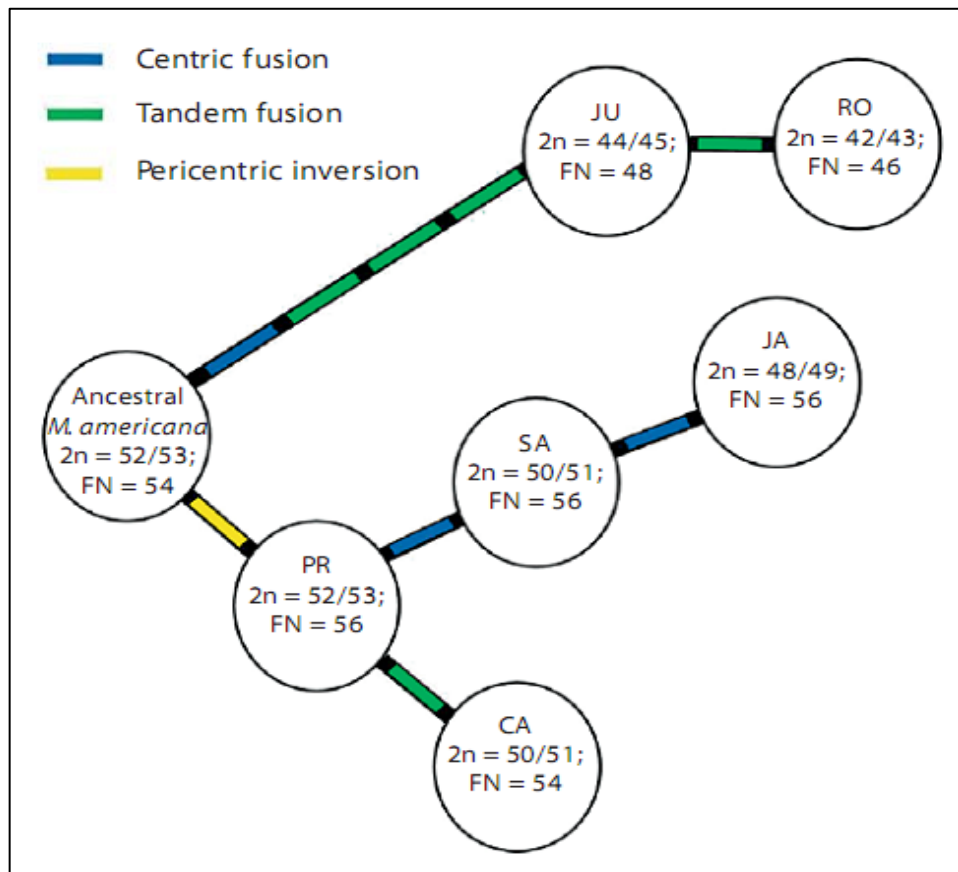


Figura 03. Evolução cromossômica de seis citótipos de *M. americana* (PR = Paraná; CA = Carajás; SA = Santarém; JA = Jarí; JU = Juína; RO = Rondônia). (Fonte: ABRIL et al., 2010).

E, corroborando com os resultados citogenéticos, as análises moleculares do mtDNA identificaram dois clados independentes, A e B, sendo o clado A composto pelos citótipos Rondônia, Juína, Jarí e Santarém e o clado B composto pelos citótipos Paraná, Carajás e Santarém. Além disso, foi observado um alto valor de diferenciação e de distância genética entre os dois clados, onde A é geneticamente mais próximo das espécies *M. bororo* e *M. nana* do que do clado B, reforçando novamente que a espécie *M. americana* possa, na verdade, ser um complexo de espécies crípticas.

Salviano (2011) e Cursino et al. (2014) procuraram provar a existência de isolamento reprodutivo pós-zigótico entre as duas linhagens cromossômicas de *M. americana* analisando a viabilidade reprodutiva em machos híbridos e fêmeas híbridas, respectivamente. Os resultados obtidos com os cruzamentos entre indivíduos pertencentes à citótipos de linhagem cromossômica distinta demonstraram eficiente isolamento reprodutivo pós-zigótico, o que suporta a separação das linhagens em duas espécies, de acordo com o Conceito Biológico de espécie. O estudo aponta como provável causa deste isolamento reprodutivo o acúmulo de rearranjos cromossômicos envolvidos na diferenciação entre as linhagens A e B. No entanto, questões referentes às pequenas variações cromossômicas que ocorrem dentro de cada linhagem ainda não foram esclarecidas, uma vez que não mostraram um claro isolamento reprodutivo.

Estudos citogenéticos e moleculares da espécie *M. americana* buscam resolver a questão ainda incerta da sua taxonomia, pois, embora não apresente variação morfológica intraespecífica, exibe extensa variação cariotípica (DUARTE et al., 2008). Somar informações genéticas é de grande importância para solucionar os problemas taxonômicos das espécies do gênero *Mazama*, além de auxiliar na compreensão dos mecanismos de especiação que envolve rearranjos cromossômicos e alta instabilidade cromossômica (DUARTE e JORGE, 2003).

3.4 Análises Filogenéticas

A busca pela classificação e identificação das espécies, bem como a compreensão de suas relações evolutivas é historicamente importante para estudos envolvendo incertezas taxonômicas de grandes grupos. A taxonomia classifica os organismos com base em similaridades de estruturas ou características, enquanto a filogenia busca relacionar os organismos com base em eventos evolucionários. Sob a premissa de que as espécies evoluem a partir de um ancestral comum, as espécies mais próximas apresentam mais características em comum do que as mais distantes (MAZZAROLO, 2005).

Zuckerlandl e Pauling (1965) foram os pioneiros a utilizar dados moleculares para gerar inferências filogenéticas. Os autores sugerem que mudanças moleculares e substituições de aminoácidos ou nucleotídeos ocorrem em uma taxa proporcional

ao relógio molecular (velocidade em que os aminoácidos ou nucleotídeos homólogos divergem a partir de um ancestral comum) e que a filogenia pode ser deduzida a partir de um modelo de mudanças moleculares. As análises moleculares podem corroborar ou refutar o que as análises anatômicas sugerem ou, ao menos, gerar pistas para casos em que a filogenia de um determinado grupo não está bem definida, como é o caso da família Cervidae (GUALBERTO, 2008).

O método denominado parcimônia foi o modelo inicialmente utilizado para a construção de filogenias utilizando dados moleculares. O modelo foi proposto por Hennig em 1955 e ampliado em 1966. Trata-se de um método simples que considera a árvore mais parcimoniosa aquela que apresenta o menor número de passos evolutivos para explicar o padrão observado (LIU, 2006). Posteriormente a este evento, métodos estatísticos mais complexos, como a Máxima Verossimilhança e a Inferência Bayesiana, surgiram pela necessidade em utilizar mais modelos evolutivos para englobar os mecanismos de mutação e outros processos genéticos (LIU, 2006; EDWARDS et al., 2007). Estes métodos avaliam a probabilidade dos dados para um conjunto de topologias de árvores e comprimentos dos ramos, com o intuito de inferir árvores com maior acurácia (KNOWLES e KUBATKO, 2010).

É possível estudar relações filogenéticas entre indivíduos utilizando sequências de apenas um gene, ou sequências de dois ou mais genes concatenados (LIU, 2006). Maddison e Knowles (2006) ressaltaram que para construir árvores a partir de um único gene é preciso considerar apenas o processo de substituição dos nucleotídeos, enquanto que para árvores construídas a partir de dois ou mais genes concatenados é preciso considerar, além da substituição, os processos que ocorrem com as linhagens de genes dentro das populações. A classificação das linhagens (*lineage sorting*) é o processo envolvido para que cada linhagem de gene se torne fixa dentro de uma espécie e diferenciada de outras espécies, de forma que todos os alelos da mesma sejam ligados a um único alelo ancestral (HECKMAN et al., 2007).

A coalescência integrada genética de populações com métodos filogenéticos, utilizando análises com vários locos e acomodando a classificação das linhagens. Devido a essas características as análises de coalescência, envolvendo a

genealogia, tem se tornado popular e tem auxiliado a desvendar histórias populacionais complexas (LEACHÉ, 2009).

3.5 Marcadores Moleculares

A análise de sequências do DNA mitocondrial e nuclear tem sido amplamente utilizada em estudos de genética de populações de animais, determinação de parentescos, identificação de unidades taxonômicas, determinação de relações evolutivas entre linhagens, dentre outros. A crescente facilidade em gerar dados moleculares gerou forte impulso nos estudos envolvendo incertezas taxonômicas de grandes grupos (NIEMILLER et al., 2011). Cummings et al. (2008) relataram que, independente do mecanismo de especiação que ocorreu, as divergências entre as espécies devem refletir na maioria dos locos. Assim, inúmeras regiões do genoma são cada vez mais estudadas a fim de responder a diversas questões dentro da biologia da conservação (MURPHY et al., 2001).

Os genes mitocondriais dos vertebrados apresentam características desejáveis para estudos envolvendo relações evolutivas entre indivíduos, como herança uniparental (geralmente materna), raramente sofre recombinação e alto polimorfismo (AVISE et al., 1987). Dentre os genes mitocondriais, *Cyt-b* tem sido utilizado em diversos estudos envolvendo relações filogenéticas de cervídeos, além de ser o gene mais estudado em mamíferos (RANDI et al., 1998; COOK et al., 1999; LUDT et al., 2004). Outra sequência amplamente utilizada é a região controladora mitocondrial (*D-loop*). Estudos e análises comparativas em cervídeos indicam que esta sequência é altamente estruturada, com uma região central conservada e flanqueada por dois domínios periféricos altamente divergentes. Portanto, podem ser seguramente utilizadas em filogenia para vários Artiodactyla, Cetacea e Perissodactyla com mais de 60 milhões de anos de divergência evolutiva (DOUZERY e RANDI, 1997).

Os genes nucleares, embora sejam organizados e regulados de forma mais complexa, também vêm sendo utilizados como fonte de informações genéticas em diferentes espécies. Ao contrário dos genes mitocondriais, os genes nucleares são marcados por herança biparental (com exceção dos genes ligados ao cromossomo

Y), portanto, no caso dos cervídeos, permite inferir a genealogia dos genes em um contexto mais amplo, uma vez que as fêmeas apresentam filopatria e apenas os machos dispersam (AVISE, 2000; GONZÁLEZ et al., 1998). Diversos autores vêm apontando os marcadores nucleares como uma ferramenta inovadora que expressa de forma mais precisa a diversidade genética, o tamanho populacional, a divergência entre espécies e a datação destes eventos (DEGNAN e ROSENBERG, 2009), sendo a maior dificuldade nesse tipo de marcador a análise dos haplótipos separadamente (no caso de heterozigotos) e encontrar regiões polimórficas informativas em grupos mais recentes (AVISE, 2000).

Diversos autores ressaltam a necessidade do uso de mais marcadores nucleares para a obtenção de sinal filogenético consistente, e, com isso, uma maior compreensão da história evolutiva da família Cervidae (RANDI et al., 1998; PITRA et al., 2004; GILBERT et al., 2006; DUARTE et al., 2008; HASSANIN et al., 2012). A combinação de marcadores mitocondriais e nucleares fornecem informações mais robustas, pois, além de apresentarem taxas evolutivas diferentes, também possuem diferenças na forma como são herdados (AVISE, 2000). Entretanto, a ocorrência de heteroplasmia e pseudogenes representam um grande entrave para uma utilização mais ampla dos genes nucleares

3.6 Evolutionarily Significant Units - ESU

É difícil imaginar um ramo da biologia que tenha enfrentado mais problemas epistemológicos do que aquele ligado à definição do significado de espécie (ALEIXO, 2007). Embora o termo “espécie” seja uma das mais importantes unidades para a biologia sua definição é complexa e ampla sendo conhecidos mais de trinta conceitos (MAYDEN, 1997; HAUSDORF, 2011).

Espécies desconhecidas ou não descritas representam um grande entrave para a conservação e gestão da biodiversidade (WILSON, 2003). No contexto da Biologia da Conservação a definição do tamanho populacional tem importante impacto em ações como, definição de áreas prioritárias para o estabelecimento de parques e reservas, manejo de populações ameaçadas, planejamento de estratégias de reprodução em cativeiro, entre outras (ROJAS, 1995). Lacunas nas relações

filogenéticas podem resultar em negligência no manejo de espécies ameaçadas, hibridização não natural e uso inadequado de recursos financeiros (FRANKHAM et al., 2006).

A partir da segunda metade do século XX, o Conceito Biológico de Espécie passou a ser o principal conceito em uso na biologia evolutiva (FUTUYMA, 2003). Segundo esta definição, espécie passou a ser definida como um grupo de populações real ou potencialmente intercruzantes que estão isoladas reprodutivamente de outros grupos (MAYR, 1942). Em outras palavras, a capacidade de grupos de populações se entrecruzarem e deixarem descendentes férteis ou não passou a ser o critério chave para se definir limites interespecíficos neste contexto.

No entanto, a grande maioria das espécies teve sua descrição baseada no conceito morfológico ou tipológico, uma vez que foram precedentes ao conceito biológico de espécie (MAYDEN, 1997). Portanto, como a especiação nem sempre reflete em mudanças morfológicas o número de espécies deve ser maior do que o descrito atualmente (BICKFORD et al., 2007). Nas últimas décadas estudos envolvendo espécies crípticas teve um crescimento exponencial, principalmente devido ao aumento do uso de metodologias moleculares (BICKFORD et al., 2007; BEHEREGARAY e CACCONE, 2007; BROWN et al., 2007).

Diante da dificuldade em definir o que é uma espécie Ryder, em 1986, abordou pela primeira vez o Conceito “Evolutionarily Significant Units” (ESU) que, desde então, vem sendo discutido e aprofundado por diversos autores (WOODRUFF, 1989; VOGLER et al., 1994; MORITZ, 1994). Neste contexto, os autores reconhecem como unidades independentes uma população ou um grupo de populações que se encontram diferenciados em termos genéticos, morfológicos ou ecológicos de populações próximas e refletem uma história de isolamento geográfico em níveis variáveis. Estas populações ao apresentarem características próprias necessitam ser manejadas como unidades independentes para fins de conservação (EIZIRIK, 1996).

A taxonomia existente para muitos grupos não reflete adequadamente a diversidade genética, então o conceito de ESU é criado no intuito de auxiliar órgãos gerenciadores de biodiversidade na tomada de decisões em relação à conservação

de espécies ameaçadas (AVISE, 1987). Avaliar se o nível de variabilidade entre populações apresenta uma distribuição contínua ou está subdividida é de extrema importância, pois, no primeiro caso, qualquer área de ocorrência da população é representativa da espécie, no entanto, no segundo caso, ocorrendo estruturação a representatividade de cada subpopulação necessitaria ser preservada independentemente (MORITZ e FAITH, 1998).

Identificar uma Unidade Evolutivamente Significativa é compreender que dentro da mesma espécie existem unidades demográficas que ocupam áreas geográficas distintas e se apresentam diferenciadas geneticamente de outras unidades semelhantes (MORITZ, 1994). Um critério genético foi sugerido por Moritz para identificar estas unidades e diz: uma ESU deve apresentar monofilia recíproca para haplótipos do DNA mitocondrial e mostrar divergência significativa nas frequências alélicas de locos nucleares. Para o autor, a criação deste conceito priorizou a geração de informações para a conservação de populações, pois, busca nas inferências sobre o passado evolutivo hipóteses para as evoluções futuras.

A extinção de uma ESU resulta em uma perda irreparável da diversidade genética e evolutiva, uma vez que se trata de um grupo de indivíduos que não estaria representado por outras unidades demográficas da mesma espécie. Na prática, uma ESU busca complementar os critérios tradicionais de classificação taxonômica de uma espécie e definir ações prioritárias e estratégia para conservação de uma unidade evolutivamente significativa com mais rapidez.

IV - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Amostragem

O presente estudo analisou amostras de DNA de 44 indivíduos da espécie *M. americana* de diferentes localidades do Brasil. Esses indivíduos são representantes de citótipos com alto número cromossômico - Alto Rio Negro (2n=44; NF=49), Belém (2n=49; NF=56), Carajás (2n=50/51, NF=54), Manaus (2n=48, NF=52), Paraná (2n=52/53, NF=56) e Santarém (2n=50/51, NF=56) (Tabela 01). Ao contrário do claro isolamento reprodutivo entre indivíduos da linhagem cromossômica com baixo número diplóide e da linhagem com alto número diplóide, o efeito das pequenas diferenças cromossômicas e moleculares entre os citótipos com número cromossômico mais alto ainda não está esclarecido.

Todas as amostras utilizadas para a construção dos dados filogenéticos estão estocadas no NUPECCE, sendo provenientes de capturas, apreensões, criadores particulares e públicos, zoológicos, entre outros. Para enraizar as árvores filogenéticas foram utilizadas sequências de genes mitocondriais de *Mazama gouazoubira*, *Odocoileus virginianus* e *Blastocerus dichotomus* como grupos externos (Tabela 02). Todas as sequências dos grupos externos foram obtidas no GenBank, <www.ncbi.nlm.nih.gov> do National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tabela 01. Relação dos indivíduos de *Mazama americana* analisados, número diplóide (2n), número fundamental de cromossomos (NF), grupos cromossômicos (A,C,D, E e B), citótipos e origem dos animais.

Identificação	2n	NF	Grupo A	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Cromossomos B	Citótipos	Origem
T31	44	49	2	0	10	29	4	Alto Rio Negro	Alto Rio Negro/AM
T258	49	56	6	0	2	38	5	Belém	Cat. Santarém/PA
T310	49	56	6	0	2	38	4	Belém	Belém/PA
T164	50	54	2	0	8	38	3 a 4	Carajás	Carajás/PA
T165	51	54	2	0	8	38	3	Carajás	Carajás/PA
T166	51	54	2	0	8	38	3	Carajás	Cat. Carajás/PA
T227	50	54	2	0	8	38	4	Carajás	Carajás/PA
T228	50	54	2	0	8	38	2 a 3	Carajás	Carajás/PA
T229	51	54	2	0	8	38	2 a 3	Carajás	Carajás/PA
T230	50	54	2	0	8	38	3	Carajás	Carajás/PA
T231	51	54	2	0	8	38	3	Carajás	Carajás/PA
T233	50	54	2	0	8	38	3	Carajás	Carajás/PA
T254	50	54	2	0	8	38	3 a 6	Carajás	Imperatriz/MA
T296	50	54	2	0	8	38	4	Carajás	Marabá/PA
T297	51	54	2	0	8	38	3	Carajás	Marabá/PA
T311	51	54	2	0	8	38	3	Carajás	Cat. Marabá/PA
T35	49	54	3	0	6	38	2 a 3	Carajás^{V1}	Cat. Manaus/AM
T36	49	53	3	0	7	37	3 a 4	Carajás^{V2}	Jari/PA
T39	50	54	3	0	7	37	2 a 4	Carajás^{V2}	Parauapebas/PA
T41	49	54	3	0	7	37	4	Carajás^{V2}	Cat. Carajás/PA
T43	49	54	3	0	7	37	3 a 4	Carajás^{V2}	Cat. Carajás/PA

T44	50	54	3	0	7	37	3 a 4	Carajás^{V2}	Cat. Carajás/PA
T161	50	54	3	0	7	37	2 a 3	Carajás^{V2}	Carajás/PA
T274	50	54	3	0	7	37	3	Carajás^{V2}	Açailândia/MA
T45	48	53	3	0	7	36	4	Carajás^{V3}	Cat. Carajás/PA
T40	48	54	4	0	6	36	5 a 6	Carajás^{V4}	Carajás/PA
T167	49	54	4	0	6	36	2 a 5	Carajás^{V4}	Marabá/PA
T232	49	54	4	0	6	36	1 a 5	Carajás^{V4}	Cat. Carajás/PA.
T326	49	54	4	0	6	36	3	Carajás^{V4}	Cat. Imperatriz/MA
T30	48	52	3	0	5	37	2 a 5	Manaus	Oriximiná/PA
T104	53	56	2	0	6	42	4 a 5	Paraná	Paraguai
T110	53	56	2	0	6	42	3 a 4	Paraná	Terra Boa/PR
T179	53	56	2	0	6	42	2 a 4	Paraná	Paraguai
T192	52	56	2	0	6	42	4 b	Paraná	PNI/PR
T205	53	56	2	0	6	42	4	Paraná	Cat. Itaipu/PR
T255	52	56	2	0	6	42	4	Paraná	Anápolis/GO
T256	52	56	2	0	6	42	3	Paraná	Cat. Itaipu/PR
T267	53	56	2	0	6	42	4	Paraná	PNI/PR
T268	52	56	2	0	6	42	3	Paraná	Cat. Itaipu/PR
T270	52	56	2	0	6	42	7	Paraná	PNI/PR
T271	52	56	2	0	6	42	3	Paraná	PNI/PR
T235	51	56	2	1	6	40	4	Paraná^{V1}	Cat. P. Prudente/SP
T259	51	56	4	0	4	40	4	Santarém	Cat. Santarém/PA
T260	51	56	4	0	4	40	3	Santarém	Itaituba/PA

Tabela 02. Número de acesso no GenBank das sequências de genes mitocondriais utilizadas como grupo externo nas análises filogenéticas, espécies e genes.

Número acesso	Espécie	Gene
DQ789229.2	<i>Mazama gouazoubira</i>	<i>Cit-b</i>
DQ379370.1	<i>Odocoileus virginianus</i>	<i>Cit-b</i>
JF459199.1	<i>Mazama gouazoubira</i>	<i>COI</i>
JF443323.1	<i>Odocoileus virginianus</i>	<i>COI</i>
AF012556.1	<i>Mazama gouazoubira</i>	<i>D-loop</i>
AY326250.1	<i>Blastocerus dichotomus</i>	<i>D-loop</i>
KJ772514.1	<i>Mazama gouazoubira</i>	<i>ND5</i>

4.2 Extração e Quantificação de DNA

A extração do DNA foi realizada a partir de amostras de pelo e sangue. Foi utilizada Proteinase K e fenol/clorofórmio para as amostras de pelo, e LISEII e Proteinase K para as amostras de sangue, seguindo protocolos descrito por Sambrook et al. (1989), com algumas modificações. Para certificar a pureza do DNA extraído as amostras foram quantificadas por meio de fluorescência em aparelho QuantiFluor® One dsDNA System. Para isso, um microlitro do produto da extração de DNA de cada uma das amostras e 199 µl de QuantiFluor foram aplicados no aparelho para leitura, com a finalidade de obter uma solução de trabalho de aproximadamente 15ng/µl de DNA. Todas as soluções de trabalho foram armazenadas em geladeira a 5°C.

4.3 Polymerase Chain Reaction (PCR), Eletroforese e Purificação do DNA

Para amplificação do DNA as amostras foram submetidas à técnica de PCR (Mullis, 1983) em termociclador convencional, da marca Biometra T1 Thermocycler. Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando uma reação padrão, com modificações para alguns iniciadores e volume final de 20 µl contendo: 13 µl de água, 1,5 µl de Tampão (10X), 0,5 µl de MgCl₂ a 50mM, 1 µl de dNTP (2mM), 0,5 µl de cada primer (*forward* e *reverse*) (10µM), 1U Taq (Tecnologia) e 3 µL de DNA (15 ng/µl). O presente estudo analisou quatro genes mitocondriais: *citocromo-b* (*Cit-b*),

citocromo oxidase I (COI), região controladora *D-loop* e *NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5)* (Tabela 03), além de três genes nucleares: *α-Lactalbumina (LAC)*, *Interleucina 16 (IL-16)* e *Fator de crescimento de Mastócitos (MGF)* (Tabela 03). O programa de amplificação utilizado foi: ciclo inicial de 5 minutos a 94°C para desnaturar a fita de DNA, 36 ciclos a 94°C por 1 minuto, temperatura de pareamento dos iniciadores (Tabela 3) por 1 minuto e extensão final com temperatura a 72°C por 10 minutos.

Tabela 03. Genes mitocondriais e nucleares amplificados e os iniciadores (*primers*) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento.

Genes	Iniciadores (Primers)	Sequências (Forward/Reverse)	Tamanho fragmento (pb)	Temperatura pareamento	Fonte
<i>Cit-b</i>	L14724 H15149	5'CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG3' 5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTGTCTCA3'	480 pb	55°C	Kocher et al., 1989
<i>Cit-b</i>	FARH FARL	5'TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTTCA3' 5'CCATGAGGACAAATATCATTCTGAT3'	660 pb	55°C	Duarte et al., 2008
<i>COI</i>	LCO1490 HCO 2198	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3' 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3'	658 pb	59°C	Folmer et al., 1994
<i>D-loop</i>	ThrL15926 DLH16340	5'GAATTCCCCGGTCTTGTAACC 3' 5' CCTGAAGTAGGAACCAGATG 3'	660 pb	55°C	Vilà et al., 1999
<i>ND5</i>	Leu11775 ND512427	5'GGTGCAACTCCAAATAAAAG3' 5'TTTTCRGTTCAGCTARTG3'	691 pb	53°C	Caparroz et al., 2015
<i>ND5</i>	ND512326 ND512988	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3 5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'	688 pb	53°C	Caparroz et al., 2015
<i>ND5</i>	ND513167 ND513709	5'AATARTTGGAAGCCTTTTCG3' 5'TATGATACAGGRGATTCTGG3'	581 pb	53°C	Caparroz et al., 2015
<i>LAC</i>	<i>LAC F</i> <i>LAC R</i>	5'ATCTGTAACATCTCCTGTGA3' 5'TCAGTAAGRTCATCATCCAG3'	462 pb	58°C	Hassani, A. e Douzery, E.J. (2003)
<i>IL-16</i>	<i>IL-16 F</i> <i>IL-16 R</i>	5'CCAGGCAAGCTGTGATCGT3' 5'GAAGATCCTGTAACTGTCAGAGG3'	423 pb	52°C	Rezaei et al.(2010)
<i>MGF</i>	<i>MGF -16 F</i> <i>MGF -16 R</i>	5'ATCCATTGATGCCTTCAAGG3' 5'CTGTCAATTCCTAAGGGAGCTG3'	850 pb	58°C	Lyons et al.(1997)

Para verificar a qualidade e a quantidade do DNA amplificado foi utilizada a técnica de eletroforese em gel de agarose (2%) preparado com tampão TBE 1X (10mM Tris HCl, pH 7,6; 1mM EDTA, pH 8,0; e 89mM de ácido bórico, pH 8,3) e agarose padrão (Agargen). Para a visualização do DNA em transiluminador de luz ultravioleta 302 nm (BioAgency) as amostras foram coradas com GelRed™ e, posteriormente, analisadas em software Image Analysis da Kodak. Para confirmar o tamanho dos fragmentos foi utilizado o marcador TrackIt™ 50 pb DNA Ladder (Invitrogen). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C. Para eliminar qualquer excesso de primers, dNTPS, ou qualquer outro reagente de PCR que possa interferir no sequenciamento das amostras, foi realizado um processo de purificação do DNA utilizando etanol 95% descrito por Dorado-Pérez (2012), com algumas modificações.

4.4 Sequenciamento

O sequenciamento das amostras foi realizado com os respectivos iniciadores das reações e Kit ABI BigDye Terminator (Applied Biosystems) no sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems), localizado no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) - Câmpus de Jaboticabal/SP. Todas as sequências obtidas foram submetidas à consulta de similaridade de nucleotídeos com sequências depositadas no GenBank <www.ncbi.nlm.nih.gov> do NCBI para confirmação da espécie.

4.5 Análises dos Dados

4.5.1 Visualização e Edição das Sequências de DNA

As sequências de nucleotídeos foram exportadas para o programa BioEdit (HALL, 1999), onde foram revisadas visualmente com seus respectivos eletroferogramas (Figura 04) e foi gerada uma matriz de dados para cada um dos genes. O alinhamento das sequências foi realizado por meio da ferramenta Clustal W também no programa BioEdit. Para cada um dos genes estudados foi selecionado um modelo evolutivo utilizando o programa jModelTest2 (POSADA, 2008) no

CIPRES Science Gateway (MILLER et al. 2010), baseado nas características das sequências de nucleotídeos desses fragmentos. O modelo evolutivo eleito o melhor para os quatro genes mitocondriais foi o Hasegawa-Kishino-Yano (HKY + G) que leva em consideração as substituições nucleotídicas. As sequências de genes nucleares foram descartadas devido a problemas que serão relatados mais adiante.



Figura 04. Imagem de eletroferograma no programa BioEdit (Gene *Cit-b*, fragmento de 480 pb) utilizado para revisão visualmente.

4.5.2 Análises Filogenéticas e Haplotípicas

Para todas as matrizes de dados obtidas através dos genes mitocondriais *Cit-b*, *COI*, *D-loop* e *ND5*, as árvores filogenéticas foram geradas utilizando o método de Inferência Bayesiana através do pacote do programa Beast - Bayesian Inference of Species Trees from Multilocus Data (DRUMMOND et al., 2012). Para estimar a distribuição da probabilidade posterior foi utilizado o método Markov Chain Monte Carlo (MCMC), também no programa Beast.

As análises foram realizadas utilizando 25 milhões de gerações tanto para as árvores dos quatro genes individualmente como para gerar a árvore concatenada dos genes. 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 duzentos foram aceitos. As árvores resultantes foram condensadas no programa TreeAnnotator e a sua visualização foi realizada através do programa FigTree v.1.3.1.

Foram realizadas análises haplotípicas com os genes mitocondriais concatenados. Para confecção das relações filogeográficas entre os citótipos de *M. americana* estudados, primeiramente, foi utilizado o programa DNAsp (ROZAS et al. 2009) para calcular os haplótipos e, então, os arquivos *.NEXUS foram exportados para o programa PopART onde foram geradas as redes haplotípicas.

V - RESULTADOS

5.1 Sequenciamento

No presente estudo foram amplificados com sucesso os genes mitocondriais *Cit-b*, *COI*, *D-loop* e *ND5*, embora algumas amostras apresentaram problemas de amplificação, como bandas inespecíficas, ou eletroferograma com muitos picos sobrepostos impossibilitando a leitura das sequências e seu uso nas análises filogenéticas.

Com relação ao genoma nuclear, foram analisados os genes *LAC*, *IL-16* e *MGF* como possíveis candidatos a serem utilizados nas árvores filogenéticas. Embora algumas amplificações tenham sido positivas no gel de agarose 2%, ou seja, não apresentaram bandas inespecíficas, não aconteceu o mesmo no resultado do sequenciamento. As leituras das sequências revelaram muito picos sobrepostos (Figura 05), possivelmente indicando a presença de pseudogenes, em número superior a 50% das amostras sequenciadas, consequentemente, impedindo a utilização dos mesmos no estudo.

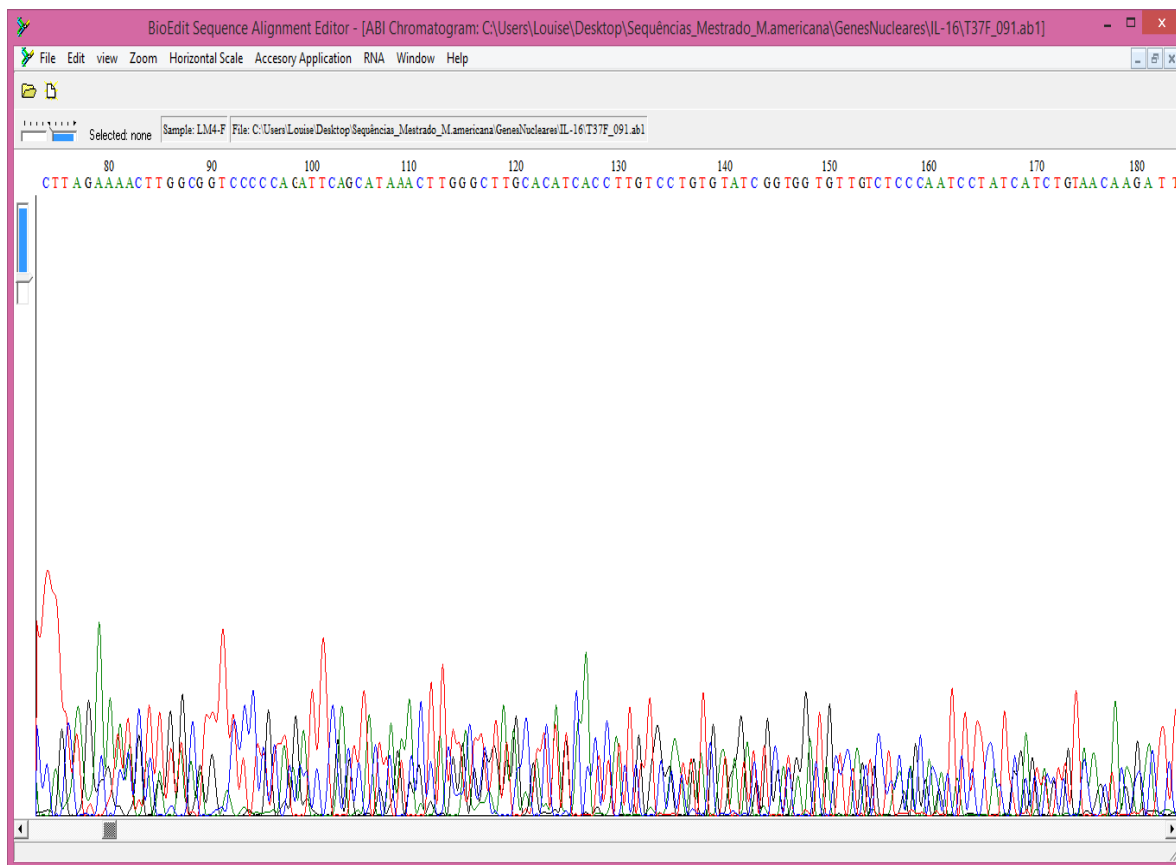


Figura 05. Imagem de eletroferograma do gene *IL-16*, visualizado no programa BioEdit, revelando a presença de picos sobrepostos que impossibilitaram a utilização da sequência para gerar análises filogenéticas.

5.2 Árvores filogenéticas e Análises Haplotípicas

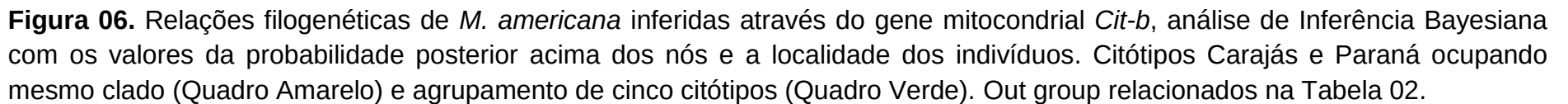
As inferências filogenéticas foram geradas a partir de análises bayesianas com os quatro marcadores mitocondriais individualmente, representadas respectivamente nas Figuras 06, 07, 08 e 09, e com os quatro marcadores concatenados, ilustrada na Figura 10.

As topologias encontradas nas árvores dos genes *Cit-b* e *COI* individualmente não indicam agrupamento por citótipos e sim uma independência das características moleculares refletidas nos clados das árvores filogenéticas. Indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná, que apresentam diferenças no número diplóide e no número fundamental de cromossomos estão agrupados em um mesmo clado. Além disso, na árvore filogenética inferida por meio do gene *Cit-b* (Figura 06) foram amostrados

dois indivíduos do citótipo Santarém e outros dois do citótipo Belém e a topologia encontrada mostrou o agrupamento destes indivíduos, mesmo apresentando conjuntos cromossômicos distintos.

Na construção da árvore filogenética do gene *COI* (Figura 07) foi utilizada a sequência de apenas uma amostra do citótipo Belém. Este indivíduo (T258) se agrupou em um ramo monofilético com o animal T259, do citótipo Santarém e T104, do citótipo Paraná. O indivíduo T260, outro representante do citótipo Santarém, se agrupou com o indivíduo T235, um citótipo variante de Paraná e com o T31, representante do citótipo Alto Rio Negro, ou seja, mesmo apresentando cariótipos semelhante, os dois indivíduos do citótipo Santarém não se agruparam. Estes resultados não corroboram a existência de unidades evolutivamente significativas dentro do grupo amostrado, pois, segundo Moritz (1994) o que caracteriza uma ESU é a presença de monofilia recíproca para haplótipos do DNA mitocondrial, o que não foi observado.

ARN - Alto Rio Negro (2n=44; NF=49)
BE - Belém (2n=49; NF=56)
CA - Carajás (2n=50/51; NF=54)
MA - Manaus (2n=48; NF=52)
PR - Paraná (2n=52/53; NF=56)
SA - Santarém (2n=50/51; NF=56)
CA^V/PR^V - Citótipos variantes



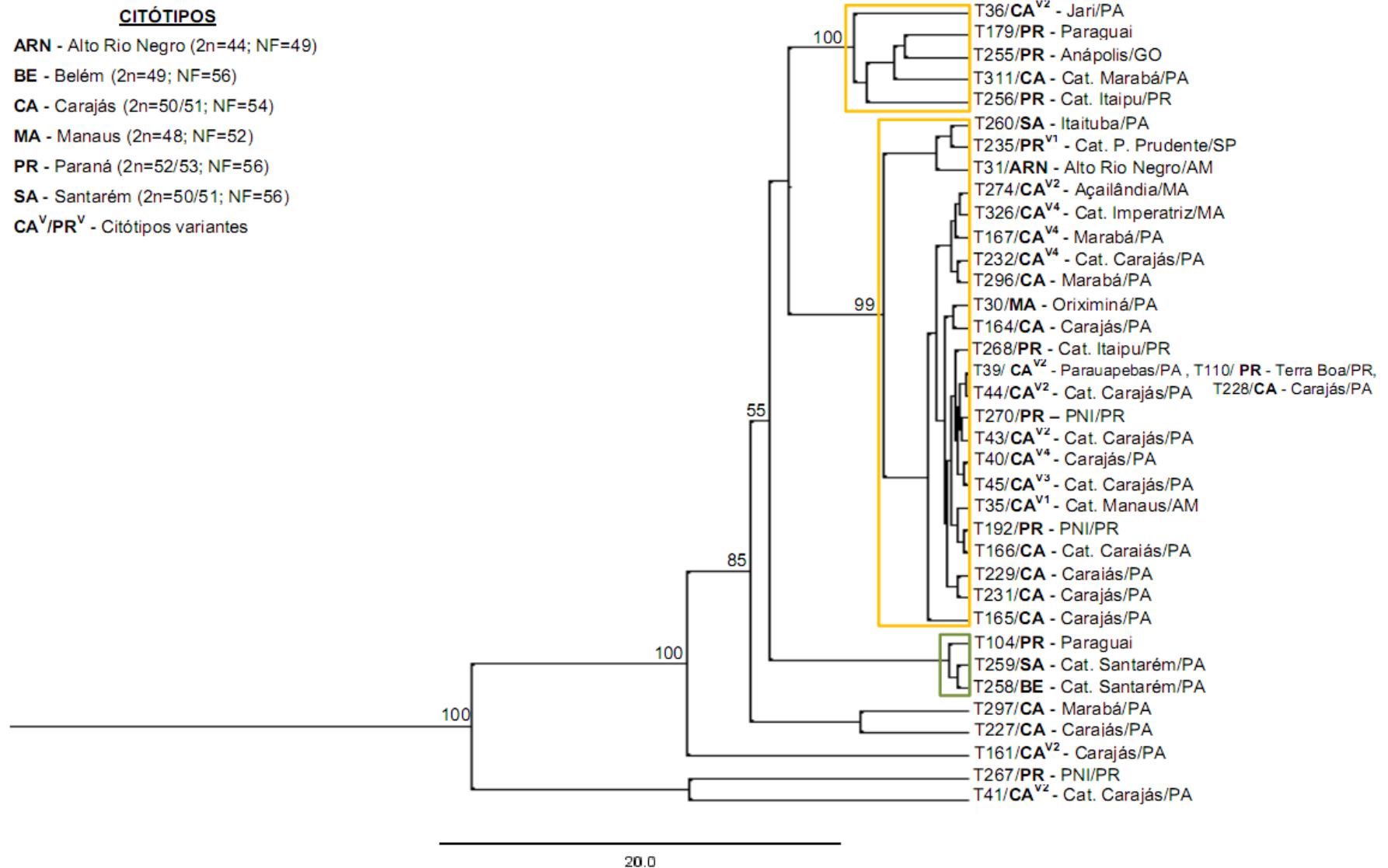


Figura 07. Relações filogenéticas de *M. americana* inferidas através do gene mitocondrial *COI*, análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Citótipos Carajás e Paraná ocupando mesmo clado (Quadro Amarelo) e agrupamento de três citótipos (Quadro Verde). Out group relacionados na Tabela 02.

Nas árvores geradas a partir dos marcadores mitocondriais *D-loop*, *ND5* e na árvore concatenada com os quatro genes, a topologia encontrada foi um pouco diferente e foi possível visualizar indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná em clados separados. Na árvore gerada a partir do gene *D-loop* (Figura 08), por exemplo, é possível visualizar três agrupamentos, dois de indivíduos de Carajás e um de indivíduos do Paraná. Os indivíduos do citótipo Santarém mostraram uma polifilia, onde o animal T260 se agrupou com indivíduos do Paraná, e o T259 se agrupou com indivíduos do citótipo Carajás. Os dois animais do citótipo Belém também não se agruparam, sendo que o T310 formou um grupo-irmão com os animais T259, do citótipo Santarém e dois indivíduos do citótipo Carajás (T35 e T36), enquanto o indivíduo T258 formou um grupo-irmão com os animais T31, do citótipo Alto Rio Negro, T227, do citótipo Carajás e T235, um citótipo variante de Paraná.

A topologia encontrada na árvore do gene *ND5* (Figura 09) corroborou a separação entre indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná. Os dois indivíduos do citótipo Santarém não se agruparam, sendo que o T259 se agrupou com indivíduos do citótipo Carajás e o animal T260 com os animais T258, do citótipo Belém e T235, do citótipo Paraná, assim como foi observado na árvore filogenética do gene *D-loop*.

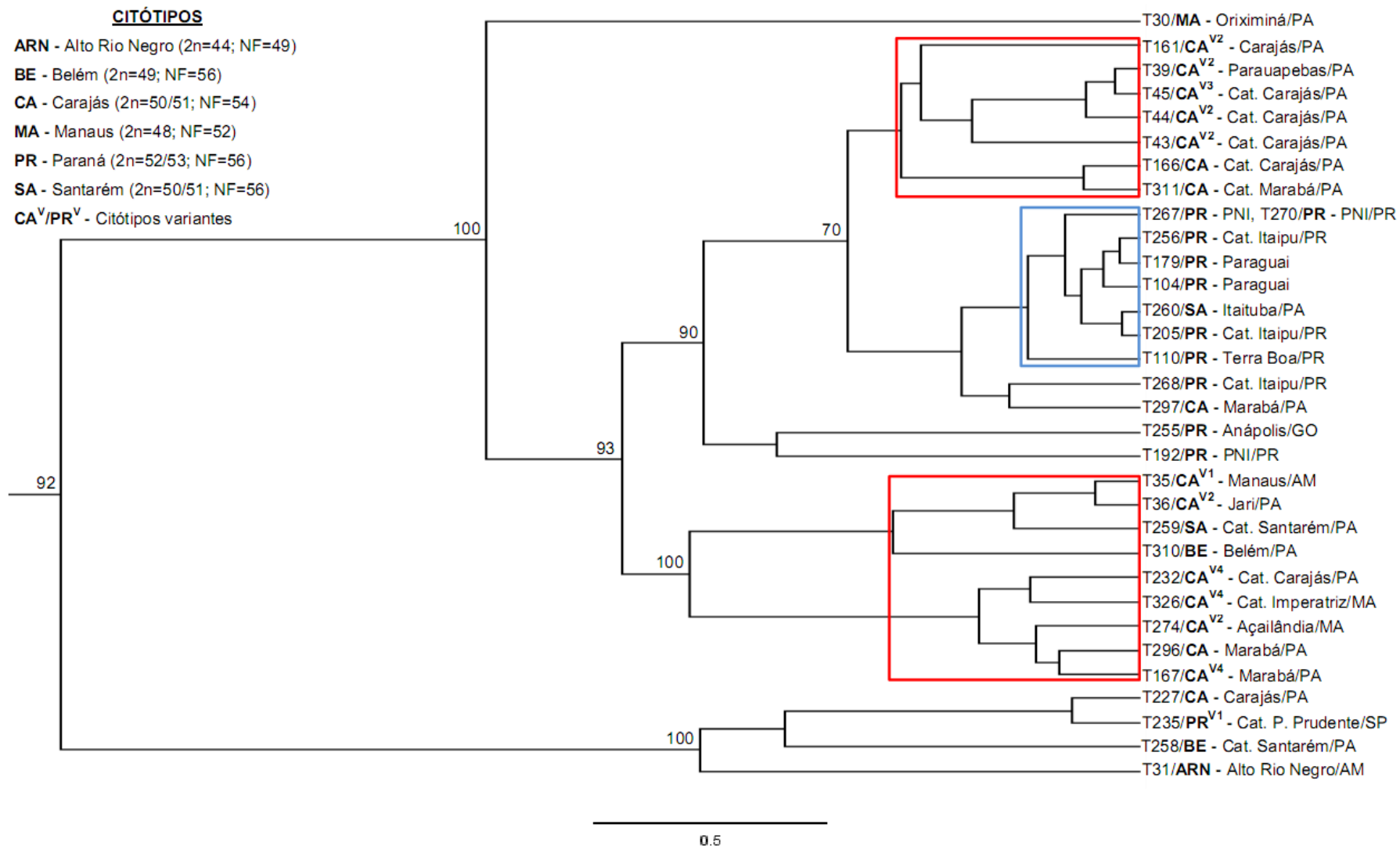


Figura 08. Relações filogenéticas de *M. americana* inferidas através do gene mitocondrial *D-loop*, análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Dois clados do citótipo Carajás (Quadro Vermelho) e um agrupamento dos indivíduos do citótipo Paraná (Quadro Azul). Out group relacionados na Tabela 02.

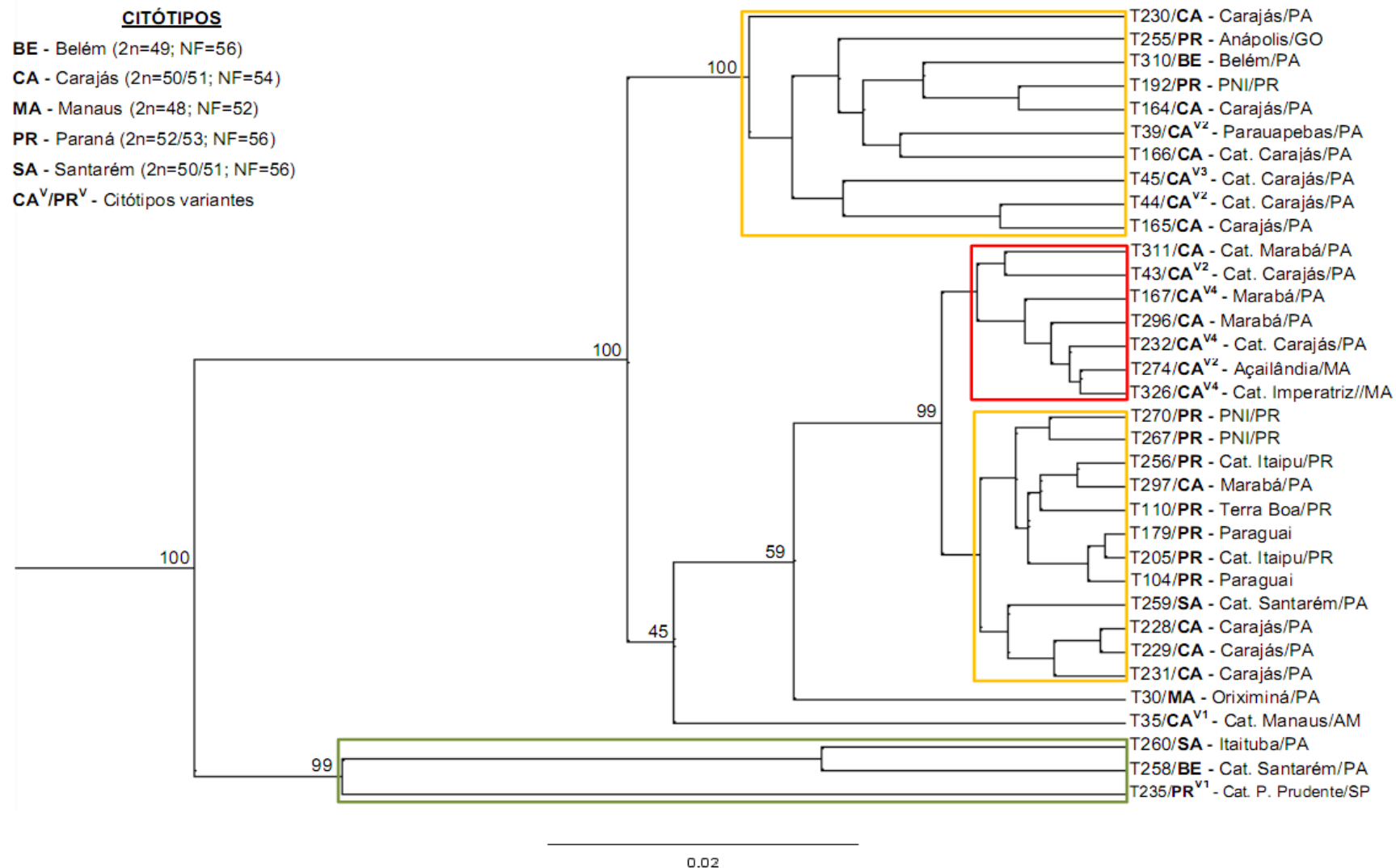


Figura 09. Relações filogenéticas de *M. americana* inferidas através do gene mitocondrial *ND5*, análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná ocupando o mesmo clado (Quadro Amarelo), indivíduos agrupados do citótipo Carajás (Quadro Vermelho) e agrupamento de três citótipos (Quadro Verde). Out group relacionados na Tabela 02.

A Figura 10 mostra a árvore com os quatro genes mitocondriais concatenados. Mais uma vez, foi possível observar o agrupamento de indivíduos do citótipo Carajás. Os indivíduos do citótipo Santarém, novamente, não se agruparam. O animal T259 formou um grupo irmão com os indivíduos T104 e T205, ambos do citótipo Paraná, enquanto o animal T260 se agrupou com indivíduos dos citótipos Belém (T258), Carajás (T227), Paraná (T235) e Alto Rio Negro (T31). Os resultados encontrados demonstram que as diferenças cromossômicas existentes entre os animais não implicaram numa cicatriz molecular detectável por meio destes marcadores mitocondriais

Além das análises filogenéticas, foi realizada uma análise haplotípica com os quatro genes mitocondriais concatenados e os resultados encontrados expressam uma relação entre os haplótipos semelhantes à árvore filogenética. A matriz com os genes concatenados foi construída a partir de um fragmento de 3640 pb e a diversidade haplotípica foi alta, de 1.00. Foram utilizadas 44 amostras de *M.americana* na construção da matriz, sendo possível identificar 42 haplótipos (Figura 11), além do compartilhamento de haplótipo entre indivíduos do citótipo Carajás e Paraná (Haplótipo 9).

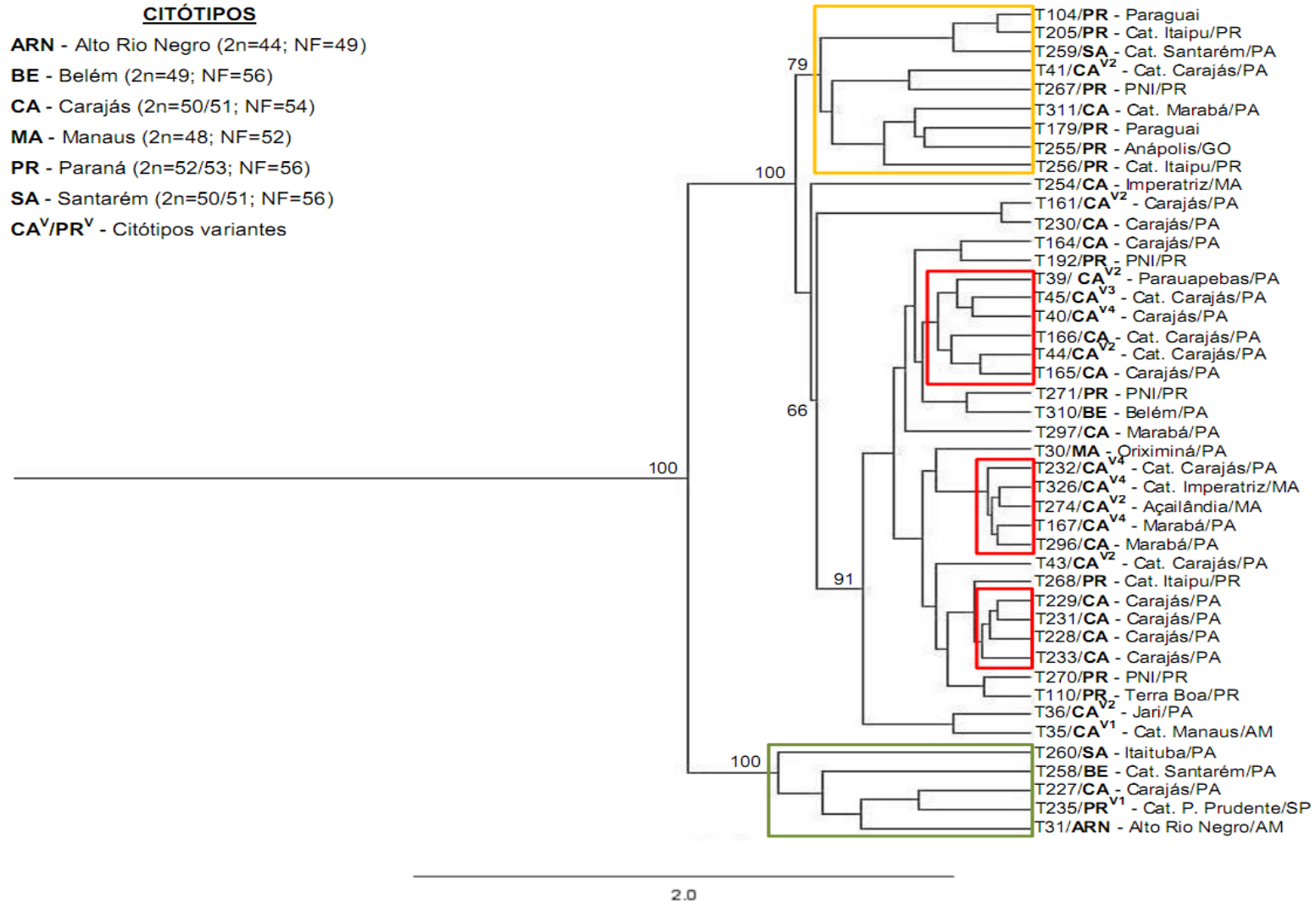


Figura 10. Relações filogenéticas de *M. americana* inferidas através dos genes mitocondriais *Cit-b*, *COI*, *D-loop* e *ND5*, análise de Inferência Bayesiana com os valores da probabilidade posterior acima dos nós e a localidade dos indivíduos. Indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná agrupados (Quadro Amarelo), agrupamentos em três clados de indivíduos do citótipo Carajás e agrupamento de cinco citótipos (Quadro Verde). Out group relacionados na Tabela 02.

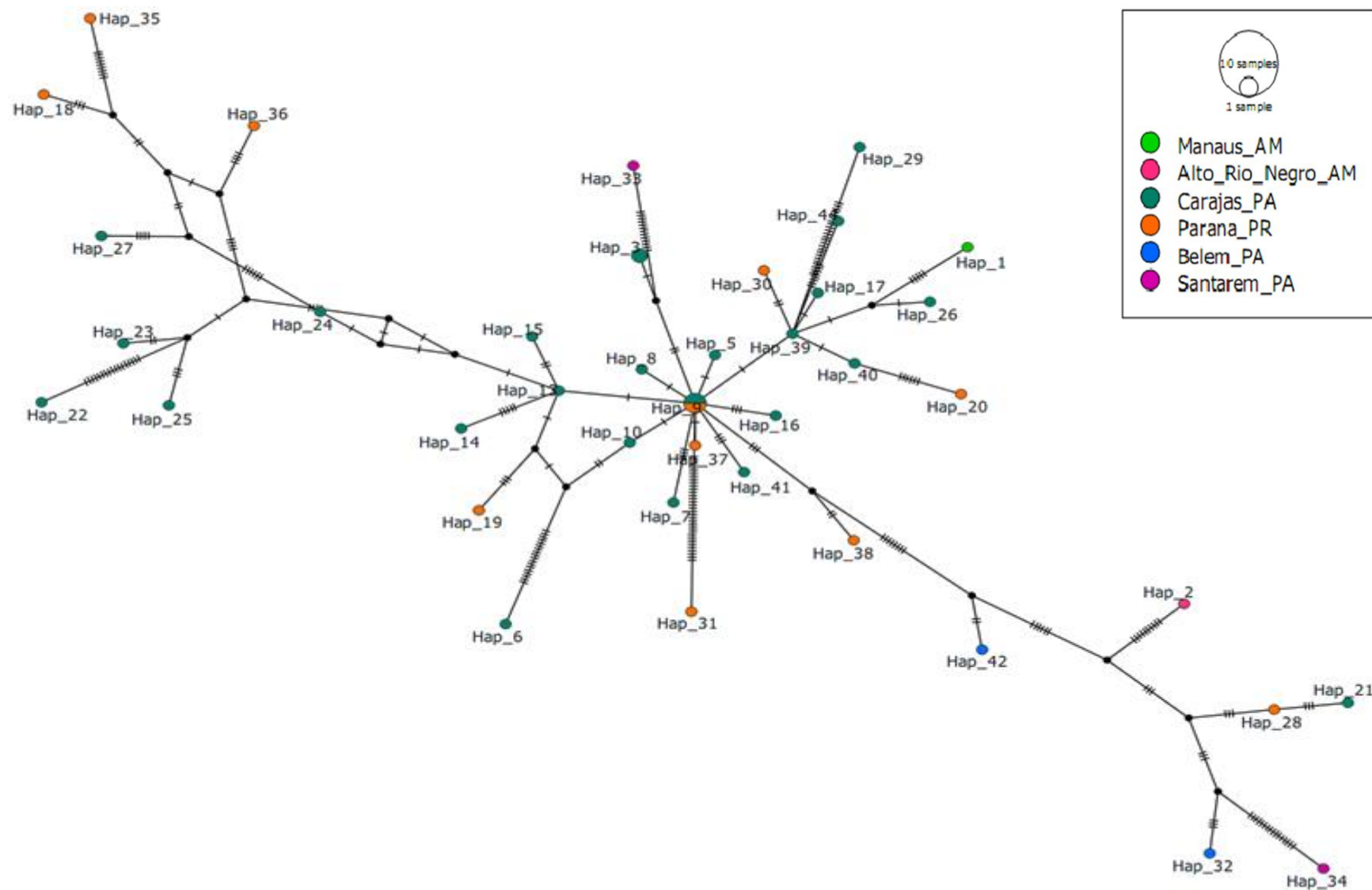


Figura 11. Rede de haplótipos gerada a partir de 44 espécimes de *M. americana* de seis citótipos, com fragmentos concatenados dos quatro genes mitocondriais. Indivíduos do citótipo Carajás e Paraná compartilham o mesmo haplótipo (Hap 9).

VI - Discussão

A espécie *Mazama americana* é marcada por uma grande diversidade cromossômica e diferenças moleculares significativas, como por exemplo, a identificação de citótipos distintos de acordo com a região de origem do animal e a identificação de duas linhagens evolutivas, embora apresente uma semelhança morfológica impressionante (Duarte, 1998; Carnelossi, 2008; Duarte et al., 2008; ABRIL et al., 2010). Em mamíferos o conceito morfológico, onde o fenótipo é o parâmetro determinante da especiação, nem sempre é aplicável, principalmente quando se trata de um possível complexo de espécies crípticas, como é o caso do veado-mateiro (DUARTE, 1998). Desta maneira, estudos genéticos envolvendo marcadores moleculares e citogenética se tornam ferramentas indispensáveis para analisar e compreender melhor a evolução da espécie (ABRIL et al., 2010).

Em busca de uma melhor compreensão acerca das relações filogenéticas entre variantes cromossômicas de *M. americana*, que apresentam alto número diplóide, o presente trabalho utilizou o conceito de ESU proposto por Moritz, em 1994, para identificar clados monofiléticos que sugerissem a separação dos citótipos em unidades distintas. Os resultados encontrados não corroboraram a existência de unidades evolutivamente significativas entre os citótipos analisados de veado-mateiro que seguissem o padrão cromossômico. Estudos anteriores já haviam relatado que as variações cromossômicas em *M. americana* parecem ter ocorrido mais rapidamente do que as variações moleculares (CARNELOSSI, 2008; Abril, 2010).

De fato, houve certa discrepância entre as topologias das árvores filogenéticas. Por exemplo, análises realizadas com a região *D-loop*, o gene *ND5* e com a árvore concatenada dos genes mitocondriais, geraram árvores filogenéticas onde foi observada a separação dos citótipo Carajás e Paraná em clados distintos. Abril et al. (2010) investigaram aspectos citogenéticos e moleculares de veado-mateiro e ressaltaram que, devido ao fato destes animais apresentarem uma radiação recente, pode ser que tanto os sinais moleculares como os cariótipos ainda não se estabilizaram (ABRIL et al. 2010)

e, por isso, ainda ocorram divergências entre os dados citogenéticos e moleculares.

Nos cervídeos as frequências de rearranjos cromossômicos foram mais altas que em outros taxa, e apenas os cruzamentos responsáveis por pequenos danos promoveram a fixação homozigota dos rearranjos cromossômicos, como no caso dos gêneros *Muntiacus* e *Mazama*, os quais apresentaram alta taxa de evolução cariotípica dentro da família Cervidae (NEITZEL, 1987). No caso dos *Mazama* os principais rearranjos foram aqueles que reduziram o número diplóide das populações como no caso das fusões cêntricas e em tandem, presentes em grande quantidade na diferenciação entre os citótipos de *M. americana* (FONTANA & RUNBINI, 1990).

Em 2008, Duarte et al. descreveram a presença de uma distância genética entre os citótipos de *M. americana*, em que a separação das variantes teria ocorrido no final do Plioceno com isolamento dos indivíduos e posterior diversificação genética. Segundo Abril et al. (2010) cada citótipo descrito dentro do complexo do veado-mateiro apresenta tipos e números específicos de rearranjos cromossômicos diferenciando-os de um possível ancestral comum. Os resultados encontrados com as análises filogenéticas e haplotípicas entre seis citótipos de *M. americana* corroboram a extensa variedade citogenética e molecular dentro da espécie. No entanto, os resultados discrepantes, ou seja, indivíduos de citótipos distintos que não se agruparam nas árvores filogenéticas geradas por meio do gene *Cit-b* e *COI* e se agruparam nas análises com a região controladora *D-loop*, o gene *ND5* e na árvore concatenada, ainda não permite a clara compreensão do que seriam estas variações dentro deste complexo.

Assim como é difícil definir o que é espécie, também é difícil definir até que ponto diferenças genéticas permitem sugerir a existência de isolamento que caracterize outra espécie (HAUSDORF, 2011). Partindo desta dificuldade, o presente trabalho buscou ampliar o conhecimento sobre a história evolutiva deste grupo estudando também os genes nucleares.

A utilização de marcadores moleculares diferentes possibilita a obtenção de sinais filogenéticos mais consistentes e, com relação ao genoma nuclear alguns genes são conhecidamente polimórficos, como é o caso da α -

Lactoalbumina (GILBERT et al., 2006) e dos genes *Interleucina 16* e Fator de Crescimento de Mastócitos, amplificados para outros Cetardiodactyla (REZAEI et al., 2010; MATTHEE et al., 2001). No entanto, a leitura dos eletroferogramas indicou a ocorrência de sobreposição de picos de fluorescência e estes podem sugerir a presença de pseudogenes, que dificultam ou até mesmo impossibilitam a utilização dos marcadores moleculares (BENSASSON et al., 2001).

O isolamento reprodutivo entre as variantes cariotípicas em *M. americana* tem sido provado de maneira incontestável entre linhagens cromossômicas mais distintas. Entretanto, os resultados obtidos entre citótipos próximos não revelam um isolamento completo, apesar de sugerir real separação entre as variantes (CURSINO et al. 2014, SALVIANO 2011). A ausência de um padrão monofilético claro para cada um dos citótipos no presente estudo, utilizando marcadores mitocondriais, mesmo aqueles mais variáveis como o *D-Loop*, sugere que a separação destes citótipos, se existente, se deu em um tempo relativamente recente e curto para alterar o padrão haplotípico. Dentro deste contexto, haveria necessidade de utilizar algum marcador molecular que tenha padrão evolutivo mais rápido, como por exemplo, os microssatélites. A divergência estimada entre algumas variantes cariotípicas mais próximas, de menos de 300.000 anos (DUARTE et al. 2008), poderia afetar as frequências alélicas de marcadores microssatélites e indicar estruturação populacional entre citótipos bastante próximos como os de Carajás e Paraná, por exemplo. Esta informação se torna vital, uma vez que a determinação de que estas seriam espécies distintas elevaria uma delas (PR) à categoria de ameaçada de extinção, gerando políticas públicas de proteção mais embasadas.

VII - Conclusões

Os resultados encontrados no presente trabalho não corroboram a existência de unidades evolutivamente significativas dentro de citótipos de *M. americana*. No entanto, é possível que o isolamento recente não tenha induzido mudanças no DNA detectáveis por meio dos marcadores utilizados no presente

estudo. Então, para compreender melhor a evolução deste grupo sugere-se que estudos posteriores devam buscar marcadores moleculares com altas taxas de mutação, como por exemplo, os microssatélite.

VIII - Referências

ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Variação cariotípica em veado-mateiro, *Mazama americana* (Cervidae, Artiodactyla). In: **Congresso Sul-americano de Mastozoologia**, Gramado. Anais Gramado: Mamíferos RS, p.21, 2006.

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). **Cytogenetic and Genome Research**, v.128, p.177-187, 2010.

ALEIXO, A. Conceito de espécie e o eterno conflito entre continuidade e operacionalidade: Uma proposta de normatização de critérios para o reconhecimento de espécies pelo Comitê Brasileiro de Registros Ornitológicos. **Revista Brasileira de Ornitologia**, v.15, p.297-310, 2007.

ALLEN, J. A. Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, New York, v.34, n.18, p.521-553, 1915.

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 Systematic. **Annual Review of Ecology and Systematics**, Palo Alto, v.18, p.489-522, 1987.

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

BARRETTE, C. The Comparative behavior and ecology of chevrotains, musk and deer morphologically conservative deer. In: Wemmer, C.M. (Ed.). **Biology and Manegement of the Cervidae**. Washington D.C.; London: Smithsonian Institution Press, Review papers and theoretical issues, p.200-213, 1987.

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

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

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

BODMER, R.E. Ecologia e conservação dos veados-mateiro e catingueiros na Amazônia. In: Duarte, J.M.B. (Ed.) **Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, cap.5, p.70-77, 1997.

BORODIN, P. M.; BARREIROS-GOMEZ, S. C.; ZHELEZOVA, A. I.; BONVICINO, C. R.; DÁNDREA, O. S. Reproductive isolation due to the genetic incompatibilities between *Thrichomys pachyurus* and two subspecies of *Thrichomys apereoides* (Rodentia, Echimyidae). **Genome**. Toronto, v.49, p.159-167, 2006.

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

CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de America del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia**, Argentina, v.4, p.309-732, 1960.

CALCAGNOTTO, D. Taxa de evolução e o relógio molecular. In: MATIOLI, S. R. (Ed.). **Biologia molecular e evolução**. Ribeirão Preto: Holos, p.51-63, 2000.

CAPARROZ, R.; MANTELLATTO, A. M.B.; BERTIOLI, D.; FIGUEIREDO, M.; 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.

CARNELOSSI, E.A.G. Diferenças moleculares entre citótipos de *Mazama americana* (Artiodactyla: CERVIDAE). **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2008.

COOK, C. E.; WANG, Y.; SENSABAUGH, G. A mitochondrial control region and cytochrome b phylogeny of sika deer (*Cervus nippon*) and report of tandem repeats in the control region, **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.12, n.1, p.47-56, 1999.

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

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

CZERNAY, S. Die Spiesshirsche und Pudus: die Gattungen *Mazama* und *Pudu*. A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt, **Die Neue Brehm-Bucherei Heft**, v.581, p.84, 1987. DEER SPECIALIST GROUP 2000. *Mazama americana*. Disponível em: <www.iucnredlist.org>.

DEGNAN, J. H. A.; ROSENBERG, N. A. Gene Tree discordance, phylogenetic, inference and the multispecies coalescent. **Trends Ecol. Evol.**, v.26, p.332-340, 2009.

DOBIGNY, G.; ANISKIN, V.; VOLOBOUEV, V. Explosive chromosome evolution and speciation in the gerbil genus *Taterillus* (Rodentia, Gerbillinae): a case of two new cryptic species. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v.96, p.117-124, 2002.

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

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

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D. e 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. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, p.14, 1996.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several population of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v.45, n.170, p.281-287, 1996.

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

DUARTE, J.M.B. Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae: Artiodactyla), no Brasil. Não paginado. **Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Genética)** – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L.; GONZÁLES, S.; NUNES, A. L. V.; GARCIA, J. M.; SZABO, M. P. J.; PANDOLFI, J. R.; ARANTES, I. G.; NASCIMENTO, A. A.; MACHADO, R. Z.; ARAÚJO, JR. J. P.; CATÃO-DIAS, J. L.; MATUSHIMA, E. R. Order Artiodactyla, Family Cervidae (deer). IN: Fowler, M. E. & Cubas, Z. S. (Ed.). **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa State University Press, Ames, p.402-422, 2001.

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. Artiodactyla - Cervidae (Veado-catingueiro, Veado-campeiro, Cervo-do-pantanal). In: Cubas, Z. S.; Silva, J. C. R.; Catão-Dias, J. L. **Tratado de Animais Selvagens**. Roca, São Paulo, p.643-649, 2006.

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

DUARTE, J.M.B; GONZÁLEZ, S. Neotropical Cervidology. **Biology and medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: Funep/IUCN, 2010.

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

EISEMBERG J. F. Mammals of the Neotropics. **The University of Chicago Press**, Chicago, v.1, p.449, 1989.

EISEMBERG, J. F. The Contemporary Cervidae of Central and South America. In: VRBA, E. S.; SCHALLER, G. B. Antelopes, deer, and relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation. **Yale University Press**, New Haven, p.189-202, 2000.

EIZIRIK, E. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de unidades evolutivamente significativas. **Revista Brasileira de Genética**, p.23-29, 1996.

EMMONS, L. H. Neotropical Rainforest Mammals, a field guide. **The University of Chicago Press**, Chicago, p.281, 1990.

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

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

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, v.34, p.157-174, 1990

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva** 2ªEdição. Ribeirão Preto: FUNPEC - RP.

GARCIA, L.; PONSÁ, M. M.; EGOZCUE, J.; GARCIA, M. Comparative chromosomal analysis and phylogeny in four *Ctenomys* species (Rodentia, Octodontidae). **Biological Journal of the Linnean Society**, London, v.69, p.103-120, 2000.

GEIST, V. Deer of the world: their evolution, behavior, and ecology. **Shrewsbury: Swan-Hill Press**, p.103, 1999.

GILBERT, C.; ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): systematics, morphology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.40, n.1, p.101-117, 2006.

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO J. E.; LEONARD, J. A.; VILÀ, C.; BARBANTI DUARTE, J. M.; et al.: Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Mol. Ecol.** 7, p.47-56, 1998.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: WILSON, D. D.; REEDER, D. M. Mammal Species of the World. **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore, p. 637-722, 2005.

GUALBERTO, A.F. Variantes moleculares de *Mazama americana* (MAMMALIA, CERVIDAE) no estado de Rondônia **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2008.

HALL, T.A. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp.** Ser.4, p.95-98, 1999.

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

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.

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

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

HENNIG, W. Grundzüge einer Theorie der phylogenetischen Systematik. Berlin: Deutscher Zentralverlag, 1966.

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

JORGE, W.; BENIRSHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer, *Mazama americana temama* (Cervidae, Artiodactyla) with a probable non-robertsonian translocation. **Cytologia**. v. 42, p. 711-721, 1997.

KATARYNA, A.; JADWISZCZAK, K. A.; BANASZEK, A. Fertility in the male common shrews, *Sorex araneus*, from the extremely narrow hybrid zone between chromosome races, **Mammalian Biology**, Berlin, v.17, p.257-267, 2006.

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

KOCHER, D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, USA, Washington, v.86, p.6196-6200, 1989.

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

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

LUDT, J. C., SCHROEDER, W., ROTTMANN, O., KUEHN, R. Mitochondrial DNA phylogeography of red deer (*Cervus elaphus*). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.31, n.3, p.1064-1083, 2004.

LYONS, L.A.; LAUGHLIN, T.F.; COPELAND, N.G.; JENKINS, N.A.; WOMACK, J. E.; O' BRIEN, S.J. Comparative Anchor Tagged Sequences (CATS) for Integrative Mapping of Mammalian Genomes. **Nature Genetics**, v.15, 1997.

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

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

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

MAYR, E. **Systematics and the origin of species**. New York: Columbia University Press, 1942.

MAZZAROLO, L. A. Conceitos básicos de Sistemática Filogenética. **Universidade Federal da Bahia**, Instituto de Biologia, 2005.

MEDELLÍN, R. A.; GARDNER, A. L.; ARANDA, J. M. The taxonomic status of the yucatán brown brocket, *Mazama pandora* (Mammalia: Cervidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**. Washington, v.111, n.1, p.1-14, 1998.

MILLER, G.H., ALLEY, R.B., BRIGHAM-GRETTE, J., FITZPATRICK, J.J., POLYAK, L., SERREZE, M., WHITE, J.W.C. Arctic Amplification: can the past constrain the future? **Quaternary Science Reviews**, v.29, p.1779-1790, 2010.

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

MORITZ, C.; FAITH, D. P. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology**, p.419-429, 1998.

MOUCHAITY, S. K.; GULLBERG, A.; JANKE, A.; ARNASON, U. The phylogenetic position of the Talpidae within Eutheria based on analysis of complete mitochondrial sequence. **Molecular Biology and Evolution**, Chicago, v.17, n.1, p.60-67, 2000.

MURPHY, J. W.; EIZIRIK, E.; JOHNSON, W. E. Molecular phylogenetics and the origins of placental mammals. **Nature**, London, v.409, n.2820, p.614-618, 2001.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G.; ASLER, A. (Ed.) Cytogenetics, basic and applied aspects. **Berlin: Springer Verlag**, p.90-102, 1987.

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

NOVACEK, M. J. Mammalian phylogeny: shaking the tree. **Nature**, London, v.356, n.6365, p.121-125, 1992.

NOWAK, R.M. Mammals of the World. 6^a Ed. **London: The Johns Hopkins University Press**, v.11, p.1362-1400, 1999.

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.

RAFINESQUE, C.S. **American Monthly Magazine**. v.1, n.5, p.369, 1817.

RANDI, E.; MUCCI, N.; PIERPAOLI, M.; DOUZERY, E. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial Cytochrome b gene. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, Edinburgh, v.265, n.1398, p.793-801, 1998.

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

RIBEIRO, A. M. Os veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista**, São Paulo, v.11, p.209-308, 1919.

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

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

ROJAS, M. The species problem and conservation: what are we protecting? In: Genes, Populations, Species: Readings from conservation biology (Ehrenfeld, D., ed.) Blackwell Science Inc./**Society for Conservation Biology**, Cambridge, MA, p.1-9, 1995.

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

SAIKI, R. K.; SCHARF, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A.; ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. **Science**, Washington, v.230, n.4732, p.1350-1354, 1985.

SALVIANO, M. B.. Avaliação da existencia de Isolamento Reprodutivo entre distintos Citótipos de Veado-Mateiro (*M. americana*) por meio de machos híbridos. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2011.

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

SCHERTHAN, H. Characterization of a tandem repetitive sequence cloned from the deer *Capreolus capreolus* and its chromosomal localisation in two muntjac species. **Hereditas**, Lund, v.115, n.1, p.43-49, 1991.

TAYLOR, K.M.; HUNGERFORD, D.A.; SNYDER, R.L. Artiodactyl Mammals: their chromosome cytology in relation to patterns of evolution. In: Benirschke, K. Comparative Mammalian Evolution. **Berlin: Springer Verlag**, p.346-356, 1969.

TAYLOR, P.J. Patterns of chromosomal variation in African rodents. **Journal of Mammalogy**, Lawrence, v.81, p.317-331, 2000.

THOMAS, O. On certain of the smaller South American Cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, London, v.11, p.585-589, 1913.

VARELA, D.M., TROVAT, I. R.G., GUZMAN, K.R., ROSSI, R.V., DUARTE, J.M.B. Red brocket deer *Mazama americana* (Erxleben 1777), in: Duarte, J.M.B., González, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology**. IUCN/FUNEP, Jaboticabal, p.151-159, 2010.

VIEIRA, C. C. Lista Remissiva dos Mamíferos do Brasil. **Arquivos de Zoologia**, São Paulo, v.8, p.458-464, 1955.

VOGLIOTTI, A. História Natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da Etnozoologia, Monitoramento Fotográfico e Rádio-telemetria. **Dissertação (Mestrado em Ecologia Aplicada)**. Universidade de São Paulo: Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, p.99, 2004.

VOGLER, A. P.; DeSalle, R., Diagnosing units of conservation management. **Conserv. Biol.** p.354-363, 1994.

WALKER, L. I.; SPOTORNO, A. E.; Tandem and centric fusions in the chromosomal evolution of the South American phyllotines of the genus *Auliscomys* (Rodentia, Cricetidae) **Cytogenetics and Cell Genetics**, Basel, v.61, p.135-140, 1992.

WANG, W.; LAN, H. Rapid and parallel chromosomal number reductions in muntjac deer inferred from mitochondrial DNA phylogeny. **Molecular Biology and Evolution**, Oxford, v.17, p.1326-1333, 2000.

WEBB, D.S. Evolutionary History of New World Cervidae. In: Vrba, E.S.; Schaller, G.B. Antelopes, Deer, and Relatives: fossil, record, behavioral ecology, systematic, and conservation. **New Haven: Yale University Press**, p.38-64, 2000.

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

WILSON D.E., REEDER D.M. Mammal Species of the World. **Johns Hopkins University Press**, Baltimore, 2005.

WILSON D. E, MITTERMEIER R. A. & CAVALLINI PAOLO Mammals of the world. **Carnivores edition**, Lynx Barcelone, Spain, v.1, 2009.

WOODRUFF, D. S. The problem of conserving genes and species. In: Conservation for the Twenty-First Century (Western, D. and Pearl, M., eds.) **Oxford University Press**, New York, p.76-88, 1989.

ZUCKERKANDL, E.; PAULING, L. Molecules as Documents of Evolutionary History. **J. Theoret. Biol.**, p.357-366, 1965.