

PROJETO DE PESQUISA

Distribuição e estimativa populacional do veado-mão-curta (*Mazama nana*) utilizando amostragem genética não invasiva e modelagem



Doutorando: Márcio Leite de Oliveira

Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas FCAV/UNESP
Mestre em Ecologia Aplicada ESALQ/USP

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Departamento de Zootecnia
FCAV/UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal

2012

1. INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A família Cervidae é constituída por 17 gêneros, largamente distribuídos no globo, com exceção dos extremos polares (EISENBERG; REDFORD, 1999). Na atualidade, o gênero *Mazama*, no Brasil, é representado por cinco espécies: *M. americana*, *M. bororo*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira* e *M. nana* (MERINO; ROSSI, 2010). Em relação a outros cervídeos, os animais do gênero *Mazama* são de pequeno porte, com a porção anterior do corpo minimamente mais baixa que a posterior, apresentando chifres não ramificados e pequenos. Esses animais, de hábitos florestais, alimentam-se basicamente de vegetais (folhas, frutos, brotos, etc.), sendo noturnos, solitários, territorialistas e ocupando pequenas áreas de vida (BARRETE, 1987).

As espécies do gênero *Mazama* não demonstram interesse pelas cevas e também são pouco atraídos por técnicas baseadas em urina e fezes (VOGLIOTTI, 2003). Essas características ecológicas e comportamentais tornam a captura, necessária para estudos ecológicos detalhados, quase impossível (VOGLIOTTI, 2003). Quando alcançada, essa captura é resultante, muitas vezes, do mero acaso. Quando a captura é indispensável, esta constitui-se de um processo especialmente trabalhoso e perigoso, pois é muito comum a ocorrência de acidentes que causam injúria aos animais, como a miopatia de captura (DUARTE, 2008; DUARTE et al., 2010; CATÃO-DIAS et al., 2010). Isso implica em poucos animais monitorados, prejudicando a obtenção razoável de dados.

Sendo assim, muito das informações ecológicas desse gênero são baseadas em generalizações feitas para os “Pequenos Cervídeos Florestais Solitários”, um grupo de cervídeos assemelhados pela morfologia, pelo tipo de habitat que ocupam e pelo comportamento social, mas que estão distribuídos em diferentes partes do planeta (BARRETE, 1987). Entretanto, essas generalizações são simplificações grosseiras a respeito de um grupo de animais onde cada espécie é única e aparentemente muito adaptada ao habitat que ocupa (BARRETE, 1987). Estariam, assim, sendo encobertas nessas generalizações muitas informações acerca da história natural e biologia evolutiva dessas espécies.

Estudos genéticos sugerem que, dentre os *Mazama*, haveria uma divisão em dois clados evolutivos: o clado cinza composto por *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* e o clado vermelho composto por *M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*. As espécies do clado cinza ocupariam vegetações de savana densa, enquanto que as espécies do clado vermelho ocupariam as áreas de florestas úmidas mais densas (DUARTE et al., 2008).

O veado-mão-curta (*Mazama nana*) é a menor espécie do gênero, com menos de 15 Kg de peso e 45 a 50 cm de altura (DUARTE, 1996; DELLAFIORI; MACIERA, 2001). Ocupa as áreas do sul do Brasil onde ocorrem a Floresta Ombrófila Mista e seus ecótonos com a Floresta Estacional semidecídua, a Floresta Ombrófila Densa e o Cerrado (ROSSI, 2000; MARGARIDO; BRAGA, 2004; ABRIL et al., 2010). Essa área foi severamente impactada pelas atividades agrícolas e de extração madeireira, restando apenas 5% das formações primárias de floresta ombrófila mista (MONTEIRO, 2003; VOGLIOTTI, 2008). Quanto ao habitat, a espécie apresenta preferência por áreas úmidas (CZERNAY, 1987), sendo também ocupadas áreas de vegetação mais densa, com abundância de bambus e mesmo as capoeiras de vegetação secundária (DUARTE, 1996; EISENBERG; REDFORD, 1999; CHÉBEZ; VARELA 2001). Segundo Vogliotti (2008), essa espécie é um dos cervídeos brasileiros menos conhecidos pela ciência, não havendo qualquer levantamento populacional da espécie na natureza (Duarte et al., 2011)

A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) em 2008 classificou a espécie, devido à falta de informações, dentro da categoria “Dados deficientes” e o Instituto Chico Mendes de Biodiversidade (DUARTE et al., 2011), baseando-se em inferências sobre a diminuição das áreas de Floresta Ombrófila Mista, a classificou como ameaçada de extinção, dentro da categoria “Vulnerável”.

Todo esse contexto de falta de informações e possível ameaça de extinção fazem necessários estudos ecológicos e genéticos, elementares para se determinar minimamente o status de conservação da espécie. Sugere-se iniciar estes estudos com a estimativa populacional da espécie e a determinação de sua distribuição que serão o marco inicial de um monitoramento por longo prazo e que indicarão áreas prioritárias para o manejo da espécie na natureza. Ainda, é necessário averiguar se a espécie realmente

se distribui pelas áreas de Floresta Ombrófila Mista e seus ecótonos, como sugerido pela literatura.

Sendo os cervídeos do gênero *Mazama* difíceis de serem avistados e capturados, uma alternativa para se estudar a distribuição e uso do hábitat por essas espécies seria a observação de indícios indiretos da presença destas, como pegadas e fezes. Um estudo com cervídeos equipados com rádio colares e simultânea coleta de amostras fecais, mostrou que esses indícios indiretos são significativamente representativos do uso do habitat (LOFT; KIE, 1988).

Bodmer (1991), utilizando dados de pegadas, indica que na Amazônia, *M. americana* utiliza áreas úmidas e inclinadas em regiões de terra firme e áreas úmidas em regiões de planícies inundáveis, já *M. gouazoubira* utiliza áreas secas dos topos de colinas. Rivero et al. (2005), em um estudo com *Mazama* na Bolívia, mais especificamente na floresta estacional Chiquitana, através da observação de indícios indiretos (pegadas e fezes) e uso de armadilhas fotográficas, encontraram uma utilização diferencial dos quatro habitats estudados.

Os resultados encontrados por Bodmer (1991) e Rivero et al. (2005) podem ser fortemente questionados uma vez que a simples observação e mensuração das síbalas fecais e das pegadas não proporcionam uma identificação segura da espécie que passou por determinado local (VOGLIOTTI, 2008; DUARTE dados não publicados). Restaria, como possível metodologia a ser empregada, os estudos baseados no DNA contido nas fezes (ALBAUGH et al., 1992; SIDRANSKY et al., 1992; KOHN; WAYNE, 1997).

A coleta e a análise das fezes têm sido uma importante fonte de informações sobre os animais selvagens, fornecendo informações desde a genética até a endocrinologia e servindo como base para vários estudos ecológicos onde pode até ser estimada a abundância (KOHN; WAYNE, 1997). Porém, alguns cuidados como: não contaminação das amostras durante a coleta, armazenamento adequado após a coleta a fim de minimizar a degradação das amostras, coleta de amostras preferencialmente frescas, entre outros, devem ser tomados (OLIVEIRA et al., 2009; BEJA-PEREA et al., 2009).

Gonzalez et al. (2009) desenvolveram iniciadores capazes de amplificar um fragmento do gene citocromo B de todas as espécies do gênero *Mazama*. Os autores submeteram esse fragmento à hidrólise com enzimas de restrição

Bstnl, Sspl e AflIII. Essas enzimas promoveram o corte específico do fragmento em fragmentos de tamanhos diferentes, permitindo a identificação das espécies pelos padrões de restrição.

Para a análise molecular das fezes também podem ser utilizados marcadores moleculares altamente polimórficos denominados microssatélites. Estes, podem discriminar essas amostras ao nível de indivíduo. Quando uma grande quantidade de amostras fecais é genotipada com esses marcadores, o número cumulativo de genótipos individuais pode ser expresso em função do número de fezes coletadas. A assíntota dessa curva pode ser determinada analiticamente e gerar uma estimativa da população local (KOHN et al., 1999). De maneira similar, modelos de marcação e recaptura podem ser úteis para analisar os dados de genotipagem fecal (KONH; KNAUER, 1999). Nessa metodologia, fezes com o mesmo genótipo são consideradas como recapturas.

Utilizando-se dessas metodologias moleculares, DUARTE et al. (2005) além de determinarem a distribuição geográfica de *M. bororo*, também estimaram, através do modelo de marcação e recaptura de Schumacher e Eschmeyer (1943), a densidade da espécie no Parque Estadual de Intervales.

Atualmente, também é possível determinar através da amplificação do gene codificador da Amelogenina, o sexo do animal que produziu as amostras (ENNIS; GALLAGHER, 1994). Isso permite determinar a proporção sexual da população (OLIVEIRA, 2010).

Um importante componente no planejamento para a conservação das espécies é a determinação de sua distribuição. Para isso, uma grande variedade de técnicas de modelagem tem sido desenvolvida (GUISAN; THUILLER, 2005). Essas técnicas utilizam associações entre variáveis ambientais e pontos de ocorrência da espécie para identificar áreas adequadas para a ocorrência da espécie (PEARSON, 2007).

Ferraz et al. (2010), observando pegadas de cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) ao longo de uma bacia hidrográfica e utilizando-se de modelagem de distribuição de espécies no software Maxent (PHILLIPS et al. 2006, PHILLIPS; DUDÍK, 2008), conseguiram determinar a distribuição da espécie em um mosaico agrícola do sudeste brasileiro.

Diante do escasso conhecimento sobre a ecologia e estado de conservação do veado-mão-curta (*M. nana*), o presente trabalho visa entender

como essa espécie se distribui em sua área de ocorrência e estimar uma dessas populações. Isso é de fundamental importância para a conservação de *M. nana*, uma vez que a espécie não possui programa de monitoramento algum. Será possível, também, determinar as áreas prioritárias para a conservação da espécie.

2. OBJETIVOS

- Determinar a distribuição potencial de *M. nana*, propondo áreas prioritárias para a conservação.
- Estimar a abundância e a proporção sexual de uma população de *M. nana*, iniciando um programa de monitoramento.

3. PLANO DE TRABALHO E CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

O trabalho terá início com a obtenção da licença de pesquisa dentro das unidades de conservação, a qual já está sendo providenciada. Essa antecipação evitará maiores delongas e atrasos na execução do projeto.

Obtida a licença, terá início a etapa de coleta das amostras em campo que ocorrerá durante sete meses. Após essa etapa terá sequência o trabalho realizado no Laboratório de Biologia Molecular do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos da FCAV/UNESP que constará de: a) extração do DNA contido nas amostras de fezes; b) identificação específica das amostras; e c) sexagem e identificação individual das amostras. O trabalho laboratorial terá duração prevista de 21 meses.

Encerrados os procedimentos de laboratório, serão analisados os dados no intuito de se estimar a população e fazer a modelagem de distribuição da espécie que levarão quatro meses.

Durante os três meses finais serão confeccionados a dissertação e o relatório científico final.

CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

Atividade	2012										2013												2014												2015			
	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D	J	F	M		
Revisão da literatura	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Participação em disciplinas				X	X																																	
Obtenção de licenças	X	X																																				
Coleta das amostras em campo		X	X	X	X	X	X	X																														
Extração do DNA das amostras									X	X																												
Identificação específica											X	X	X	X																								
Sexagem e identificação individual															X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X									
Estimativa populacional																														X								
Modelagem de distribuição																														X	X	X	X					
Confecção dos relatórios científicos												X												X													X	
Qualificação																X																						
Confecção da tese																																		X	X	X		

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ÁREAS DE ESTUDO

Será realizada uma coleta de amostras fecais em 21 unidades de conservação da região sul do Brasil, sendo que uma delas será escolhida para um estudo mais intensivo que objetivará estimar a abundância populacional.

As áreas foram escolhidas levando-se em conta a formação florestal a que pertenciam e o respectivo tamanho (Tab. 1). Foram contempladas as formações florestais de Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual.

Tabela 1 – Áreas onde será realizada a amostragem através da coleta de amostras fecais.

Nome da área	UF	Tamanho (ha)
PE da Mata São Francisco	PR	819
PE das Lauráceas	PR	27682
PE do Boguaçu	PR	6637
PE do Lago Azul	PR	4494
PE Mata dos Godoy	PR	683
PE Vale do Codó	PR	700
EE da Mata Preta	SC	6566
PE da Serra do Tabuleiro	SC	94608
PE de Amaporã	PR	209
PE de São Camilo	PR	387
PE do Penhasco Verde	PR	305
PE do Turvo	RS	16979
PE Vila Rica do Espírito Santo	PR	349
PN da Serra do Itajaí	SC	57375
PN das Araucárias	SC	12847
PN do Iguaçu	PR	169696
PNM Morro do Finder	SC	48
RB das Perobas	PR	8716
RB do Ibicuí Mirim	RS	567
RB Mata Paludosa	RS	117
RVS do Pinhão	PR	202

4.2. COLETA DAS AMOSTRAS

A coleta de fezes para a obtenção de dados para a modelagem da distribuição será realizada percorrendo trajetos no interior das unidades. Serão escolhidos trajetos distribuídos de forma a fazer com que a amostragem se

distribua por toda a unidade, evitando a interdependência dos pontos de eventuais coletas. Durante as incursões ao campo, pretende-se coletar amostras preferencialmente frescas. Cada unidade de conservação será amostrada por no máximo quatro dias ou até atingir 20 amostras.

Para a estimativa populacional, na área escolhida, será feito um grid com 11 trajetos paralelos de dois mil metros de comprimento e com duzentos metros de distancia entre si. Esse grid será percorrido uma vez por mês durante três meses a fim de se ter três seções de “capturas”.

Os trajetos serão percorridos com um cão farejador previamente treinado para o encontro de fezes de cervídeos. O cão, de propriedade do NUPECCE, é mantido sob rígido controle sanitário para evitar a introdução de enfermidades nas áreas de estudo. Esse controle é feito a cada expedição, quando o cão retorna ao hospital veterinário da FCAV/UNESP. Ainda, como medida de controle sanitário adicional, as fezes do animal, quando em campo, serão enterradas. O pesquisador se manterá sempre junto à linha estabelecida para o trajeto e o cão realizará incursões em um raio de 20m em torno do mesmo.

Fez parte do treinamento do cão uma habituação à presença de outros animais não canídeos, como medida para evitar que o mesmo interagisse com a fauna nativa durante o trabalho em campo. É importante ressaltar que esse animal já realizou trabalhos bem sucedidos no Parque Nacional do Iguaçu e nas estações ecológicas do Jataí e de Santa Bárbara, bem como em fragmentos florestais de áreas privadas no município de Cajuru, SP e no Pantanal da Nhecolândia.

O local de coleta de cada amostra terá a sua coordenada geográfica anotada para posterior georreferenciamento. As amostras serão coletadas com o auxílio de dois gravetos, impedindo o contato com as mãos, e armazenadas, durante as expedições de campo, em tubos plásticos de centrífuga com tampa de rosca (50 mL) hermeticamente fechada. Essas medidas visam evitar a contaminação do material genético.

Os tubos, que receberão as síbalas fecais, conterão 40 mL de etanol absoluto, adicionado antes das incursões ao campo. As amostras serão acompanhadas de informações como coordenadas geográficas e idade aparente. A idade será distribuída em duas categorias: “fresca” e “não fresca”.

4.3. ANÁLISE LABORATORIAL

4.3.1. Extração do DNA

A extração do DNA fecal será realizada utilizando-se do kit de extração QIAamp® DNA Stool Mini Kit, seguindo protocolo do próprio fabricante.

4.3.2. Identificação específica

Um fragmento de 224 pb do gene mitocondrial citocromo b será amplificado por meio de PCR, com iniciadores capazes de amplificar amostras de todas as espécies do gênero *Mazama*, desenhados por Gonzalez et al. (2009), seguindo as seguintes concentrações dos reagentes: 0,16μM de cada iniciador, 2X de tampão, 1,25mM de dNTP, 10,0mM de MgCl₂, 0,8ng/μL de BSA, 3U de Taq DNA Polimerase, 3,0μL de DNA e água ultrapura qsp 25,0 μL.

Após a amplificação, os produtos de PCR de 224 pb serão corados com GelRed™ (Biotium), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e, sob transiluminador de luz ultravioleta, fotodocumentados e analisados. Serão realizadas até quatro tentativas de amplificar cada amostra; após isso, mantido o insucesso, a amostra será excluída do processo.

Após a confirmação da amplificação, os produtos serão submetidos à hidrólise com as enzimas de restrição SspI, AflIII e BstN. Essas enzimas promovem o corte específico do fragmento de 224 pb em fragmentos de tamanhos diferentes, que resultam na identificação das espécies (GONZALEZ et al., 2009). O resultado será fotodocumentado.

4.3.3. Sexagem

A sexagem das amostras será realizada por meio da amplificação do locus do gene da amelogenina com o iniciador desenvolvido por Ennis e Gallagher (1994). O protocolo usado na reação de PCR será o mesmo descrito por Pajares et al. (2007) com alterações sugeridas por Oliveira (2010).

4.3.4. Identificação individual

As amostras fecais serão genotipadas com a utilização de 5 iniciadores de locos microssatélites selecionados por Oliveira (2010), e a genotipagem será feita em um sequenciador automático *ABI Prism 3100*. As reações de PCR serão realizadas também seguindo o protocolo de Oliveira (2010). Serão feitas reações em triplicata e um genótipo consenso será determinado seguindo os seguintes critérios:

- a) Uma vez detectado um resultado heterozigoto identico em duas das réplicas, o mesmo será considerado em definitivo, não sendo considerado um eventual resultado homozigoto na terceira réplica;
- b) Detectado um homozigoto, o mesmo só será considerado se em conformidade com as outras duas réplicas;
- c) Ocorrendo um homozigoto em duas das réplicas e um heterozigoto na terceira, será feita uma quarta réplica. Se a quarta réplica for homozigoto, o mesmo será confirmado. Se a quarta réplica for um heterozigoto, o mesmo será confirmado.
- d) Homozigotos com tamanhos diferentes em duas das três réplicas implicarão em uma quarta réplica. Se ocorrer um resultado heterozigoto que contempla os tamanhos de bandas anteriores, o mesmo será acatado. Qualquer resultado diferente implicará na exclusão da amostra da análise dos dados.

Os resultados das genotipagens serão utilizados para a determinação de parâmetros genéticos da população e para se estimar a abundância.

4.4. BASE DE VARIÁVEIS AMBIENTAIS

Para gerar os modelos de distribuição da espécie, será utilizada a base de variáveis ambientais disponibilizada pela Divisão de Processamento de Imagens do Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais já interpolados para a resolução de 30 arc-segundos (~1km). Essa base engloba dados climáticos, Índice de Walsh, mapa da vegetação, porcentagem de cobertura arbórea,

mapa de solos, altitude, declividade, exposição, distância vertical à drenagem e densidade de drenagem.

5. ANÁLISE DOS RESULTADOS

5.1. PARÂMETROS GENÉTICOS DA POPULAÇÃO

Os resultados das genotipagens serão também utilizados para a determinação de padrões genéticos da população como diversidade alélica e heterozigosidade observada e esperada. Para isso será testado se a população encontra-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg.

A probabilidade de identidade (P_{ID}), probabilidade de dois indivíduos compartilharem, aleatoriamente, o mesmo genótipo para todos os 5 loci que serão analisados, será estimada pela equação (PAETKAU et al., 1998):

$$P_{ID} = \frac{n^3 (2a_1^2 - a_1) - 2n^2 (a_2 + 2a_1) + n (9a_2 + 2) - 6}{(n-1)(n-2)(n-3)}$$

Onde n é o tamanho da amostra, a_i é igual a $\sum p_i^j$ e p^j é a frequência do alelo J . Os valores serão calculados para cada loco e então multiplicado para cada alelo para obter a P_{ID} total.

5.2. ESTIMATIVA POPULACIONAL E PROPORÇÃO SEXUAL

A partir da individualização das amostras fecais, serão empregados três métodos para se obter a estimativa populacional de *M. nana* na área escolhida. Um deles considerará o número de amostras distintas como o número total de indivíduos da área amostrada. Outros dois métodos (SCHNABEL, 1938; SCHUMACHER; ESCHMEYER, 1943) utilizarão modelos de captura, marcação e recaptura analisados através do programa computacional Ecological Methodology 5.1 (KENNEY; KREBS, 1998). Como esses modelos necessitam de, ao menos, três seções de capturas, cada mês será considerado uma seção. Amostras repetidas dentro da mesma “seção de captura” serão

desconsideradas. Quando uma amostra mostrar-se repetida numa seção de captura distinta, computar-se-á como uma recaptura e quando não, será computada como uma nova captura. Esses modelos assumem que a população estudada é fechada, ou seja, não ocorrem mortes, nascimentos e migrações. Assim, será assumido que a população é fechada dentro do período de três meses em que a mesma será amostrada.

Como premissa para esse trabalho, cada combinação genotípica será considerada um indivíduo diferente. O erro embutido nessa premissa será calculado, levando em consideração as frequências alélicas na população e a probabilidade de repetição da mesma combinação em outro animal da população.

Com a sexagem das amostras será possível determinar a proporção sexual da população em estudo.

5.3. MODELAGEM DA DISTRIBUIÇÃO

A função de um método de modelagem é predizer a adequabilidade do ambiente para as espécies em função das variáveis ambientais fornecidas (PHILLIPS et al., 2006). Assim, de posse da localização georreferenciada das amostras identificadas no laboratório como sendo da espécie *M. nana* e dos arquivos da base de dados ambientais que descrevem alguns fatores que provavelmente influenciam a adequabilidade do ambiente para a espécie, será feita a modelagem da distribuição.

A modelagem será feita pelo software Maxent 3.3.3a (PHILLIPS et al., 2004, 2006) o qual utiliza apenas dados de presença da espécie e estima uma probabilidade de distribuição encontrando a distribuição da probabilidade com a máxima entropia. Para isso 70% dos pontos serão usados para “treinar” o modelo e 30% para testá-lo (PEARSON, 2007). Os pontos serão amostrados pelo método de bootstrap com dez partições aleatórias com substituição. A avaliação do modelo será feita pela AUC (Area Under the Curve) e o melhor modelo será aquele com o valor AUC mais alto (ELITH et al., 2006; PHILLIPS; DUDÍK, 2008).

5.4. IMPLICAÇÕES DOS RESULTADOS ESPERADOS

Com a determinação das áreas de potencial distribuição de *M. nana*, da estimativa da abundância populacional e proporção sexual, será possível iniciar um programa de monitoramento da espécie na natureza, além de determinar as áreas mais importantes para a conservação da mesma. Esses resultados esperados também serão de grande valia para conhecimento básico desta que é uma das espécies menos estudadas de ungulados no Brasil, sendo também a mais ameaçada de extinção.

REFERÊNCIAS

ABRIL, V. V.; VOGLIOTTI, A.; VARELA, D. M.; DUARTE, J. M. B.; CARTES, J.L. Brazilian Dwarf Brocket Deer *Mazama nana* (Hensel 1872). In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 160-165.

ALBAUGH, G. P.; IYENGAR, V.; LOHANI A.; MALAYERI, M.; BALA. S.; MAIR, P. P. Isolation of exfoliated epithelial cells, a novel, non invasive approach to the study of cellular markers. **International Journal of Cancer**, Heidelberg, v. 52, p. 347-350, 1992.

BARRETTE, C. The comparative behaviour and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: WEMMER, C.M. (Ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington; London: Smithsonian Institution Press, 1987. pt. 1: Review papers and theoretical issues, p. 200-213.

BEJA-PEREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; ALVES, P. C.; SCHWARTZ, M. K. ; LUIKART, G. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources**, Vancouver, v. 9, n. 5, p. 1279-1301, 2009.

BODMER, R. E. Influence of digestive morphology on resource partitioning in Amazon ungulates. **Oecologia**, v. 85 n.3 p. 361-365, 1991.

CATÃO-DIAS, J. L.; CAMARGO, C. M. S. Capture Myopathy. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 324-329.

CHEBEZ, J.C.; VARELA, D.M. Corzuela enana. In: DELLAFIORE, C.M.; MACIEIRA, N. (Ed.). **Los ciervos autóctonos de la Argentina**. Buenos Aires: GAC, 2001. cap. 6, p. 51-56.

CZERNAY, S. Spießhirsche und Pudus. **Die Neue Brehm Bucherei**, Brehm, v. 581, p. 1-84, 1987.

DELLAFIORE, C. M.; MACEIRA, N. **Los ciervos autóctonos de la Argentina y La acción del hombre**. Ed. Grupo Abierto Comunicaciones: Buenos Aires. 2001, 95p.

DUARTE, J. M. B. A technique for the capture of free-ranging marsh deer (*Blastocerus dichotomus*). **Journal of Zoo and Wildlife Medicine**, Yulee, v. 39, n. 4, p. 596-599, 2008.

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

DUARTE, J. M. B.; ABRIL, V. V.; VOGLIOTTI, A.; ZANETTI, E. S.; OLIVEIRA,

M. L.; TIEPOLO, L. M.; RODRIGUES, L. F.; ALMEIDA, L. B. Avaliação do estado de conservação do veado-mão-curta (*Mazama nana*) no Brasil. Biodiversidade Brasileira. 2011d (no prelo).

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

DUARTE, J. M. B.; UHART, M. M.; GALVEZ, C. E. S. Capture and physical restraint. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 218-227.

DUARTE, J. M. B.; VOGLIOTTI, A.; GARCIA, J. E.; TALARICO, A. C.; RODRIGUES, F. P.; OLIVEIRA, E. J. F.; GONZÁLES, S.; MALDONADO, J.E. Distribution and abundance of the small red brocket deer (*Mazama bororo* Duarte, 1996): is it an endangered species? In: ANNUAL MEETING OF THE SOCIETY FOR CONSERVATION BIOLOGY, 2005, Brasília. **Book of abstracts...** Brasília: UnB, 2005. p. 62.

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

ELITH, J., C.H. GRAHAM, R.P. ANDERSON, M. DUDÍK, S. FERRIER, A. GUIBAN, R.J. HIJMANS, F. HUETTMMANN, J.R. LEATHWICK, A. LEHMANN, J. LI, L.G. LOHMANN, B.A. LOISELLE, G. MANION, C. MORITZ, M. NAKAMURA, Y. NAKAZAWA, J.M. OVERTON, A.T. PETERSON, S.J. PHILLIPS, K.S. RICHARDSON, R. SCACHETTI-PEREIRA, R.E. SCHAPIRE, J. SOBERON, S. WILLIAMS, M.S. WISZ AND N.E. ZIMMERMANN. Novel methods improve prediction of species' distributions from occurrence data. **Ecography** v. 29 p. 129–151. 2006

ENNIS, S.; GALLAGHER, T.F. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. **Animal Genetics**, Sydney, v. 25, p. 425-427, 1994.

FERRAZ, K. M. P. M. B.; SIQUEIRA, M. F.; MARTIN, P. S.; ESTEVES, C. F.; COUTO, H. T. Z. Assessment of *Cerdocyon thous* distribution in na agricultural mosaic, southeastern Brazil. **Mammalia**, Berlim - New York, v. 74 p. 275-280, 2010

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

GUIBAN, A.; THUILLER, W. Predicting species distribution: Offering more than simple habitat models. **Ecology Letters** v. 8 p. 993-1009, 2005..

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species 2008**. Disponível em <<http://www.iucnredlist.org/>> Acessado em: 2 nov. 2011.

KENNEY, A. J.; KREBS, C. J. **Programs for Ecological Methodology 2nd ed.** 1998.

KOHN, M. H.; WAYNE, R. K. Facts from feces revisited. **Trends in Ecology and Evolution**, London, v. 12 p. 223-227, 1997.

KOHN, M.H.; KNAUER, F. Phylogeography of brown bears in Europe and excremental PCR – the new tool in the genetic analyses of animals in the wild. **Ursus**, Missoula, v. 10 p. 315-321, 1999.

KOHN, M.H.; YORK, E.C.; KAMRADT, D.A.; HAUGHT, G.; SAUVAJOT, R.M.; WAYNE, R.K. Estimating population size by genotyping faeces. **Proceedings of the Royal Society of London. B. Biological Science**, London, v. 266, p. 657, 1999.

LOFT, E. R.; KIE, J. G. Comparison of pellet-group and radio triangulation methods for assessing deer habitat use. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 52 n. 3 p. 524-527, 1988.

MARGARIDO, T.C.C.; BRAGA, F.G. Mamíferos. In: MIKICH, S.B.; BÉRNILS, R.S. (Ed.). **Livro vermelho da fauna ameaçada no Estado do Paraná**. Curitiba: Instituto Ambiental do Paraná, 2004. p. 27-142.

MERINO, M. L.; ROSSI, R. V. Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 2-11

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

OLIVEIRA, M. L. ; MANTELLATTO, A. M. B. ; PERES, P. H. F. ; DUARTE, J. M. B. Nova ocorrência de *Mazama americana* em fragmento de Floresta Estacional Semi-decidual no interior do estado de São Paulo. In: III Congresso Latino Americano de Ecologia, 2009, São Lourenço. **Anais do III Congresso Latino Americano de Ecologia**, v. 2. p. 1-2, 2009

OLIVEIRA, M. L. Análise molecular de amostras fecais de uma população de veado-mateiro (*Mazama americana*) para a obtenção de informações genéticas e ecológicas. Dissertação de Mestrado – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba. 69p. 2010.

PAETKAU, D. et al. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. **Conservation Biology**, v.12 p. 418-429, 1998

PAJARES, G.; ÁLVAREZ, I.; FERNÁNDEZ, I.; PÉREZ-PARDAL, L.; GOYACHE, F.; ROYO, L.J. A sexing protocol for wild ruminants based on PCR

amplification of amelogenin genes AMELX and AMELY. **Archiv Tierzucht**, Dummerstorf, v. 50, p. 442-446, 2007.

PEARSON, R.G. **Species' distribution modeling for conservation educators and practitioners**. 2007. Synthesis. American Museum of Natural History. Disponível em <http://ncep.amnh.org>.

PHILLIPS, S.J., DUDÍK, M., SCHAPIRE, R.E. A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: **Proceedings of the 21st International Conference on Machine Learning**, ACM Press, New York, 2004, p. 655–662.

PHILLIPS, S.J.; ANDERSON, R.P.; SCHAPIRE, R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecol. Model.** v. 190 p. 231–259, 2006.

PHILLIPS, S.J.; M. DUDÍK. 2008. Modeling of species distributions with Maxent: new extensions and a comprehensive evaluation. **Ecography** v. 31 p. 161–175, 2008.

RIVERO, K.; RUMIZ, D. I.; TABER, A. B. Differential habitat use by two sympatric brocket deer species (*Mazama americana* and *M. gouazoubira*) in a seasonal Chiquitano forest of Bolivia. **Mammalia**, London, v. 69, n. 2, p. 169-183, 2005.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. 2000. 147 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

SCHNABEL, Z.E. The estimation of the total fish population of a lake. **The American Mathematical Monthly**, Washington, v. 45, p. 348-352, 1938.

SCHUMACHER, F.X.; ESCHMEYER, R.W. The estimation of fish population in lakes and ponds. **Journal of The Tennessee Academic Science**, Memphis v. 18, p. 228-249, 1943.

SIDRANSKY, D.; TOKINO, T.; HAMILTON, S. R.; KINZLER, K. W.; LEVIN, B.; FROST, P.; VOGELSTEIN, B. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. **Science**, Washington, v. 256, p. 102-105, 1992.

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

VOGLIOTTI, A. **Partição de habitats entre os cervídeos no Parque Nacional do Iguaçu**. 2008. 69 p. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo,

Piracicaba, 2008.