

UNIVERSIDADE ESTADUAL “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Campus de Jaboticabal

Projeto de Doutorado

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

Discente: Rullian César Ribeiro

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Jaboticabal, 2018

## Resumo

O veado-campeiro é um cervídeo neotropical que pode ser encontrado em fitofisionomias abertas desde o sul do Amazonas até a Argentina. Ele é classificado pela IUCN como “quase ameaçado (NT)”, devido à perda de *habitat* e outras consequências relacionadas às intervenções antrópicas no meio ambiente. Devido a essa situação, o Plano Nacional para a Conservação de Cervídeos Ameaçados de Extinção sugere várias ações para o aumento do conhecimento sobre as populações relictuais. Dentre as ações sugeridas, está o desenvolvimento de trabalhos que caracterizam as variáveis genéticas destas populações. Na literatura, temos uma lacuna no conhecimento em relação às áreas amostradas no Brasil, à quantidade de marcadores analisados juntos e às análises utilizadas para caracterizar estas populações. O presente trabalho objetiva amostrar e caracterizar as populações de veado-campeiro, ao longo de sua distribuição no Brasil. Essa caracterização se dará por meio de amostragem não invasiva, baseada em extração de DNA fecal, propiciando amostragem ampla e numerosa. Para tal, serão realizadas análises genético-populacionais com a utilização de grande número de marcadores mitocondriais, trazendo novas perspectivas sobre as populações da espécie. Diante do exposto, hipotetizamos que estas populações devam apresentar estruturação genética e que a mesma ocorra em função do isolamento por distância. O teste dessas hipóteses implicará na proposição ou balizamento de ações de manejo populacional e definição de unidades significativas evolutivas para fins conservacionistas.

Palavras-chave: ESU, DNA mitocondrial, Cervidae, filogenética, estrutura populacional.

## 1. Introdução e justificativa

Os veados e os cervos, como são conhecidos popularmente, fazem parte da família Cervidae (GRAY, 1872), uma das mais diversas famílias dentro do grupo dos mamíferos, possuindo cerca de 60 espécies dispersas pelo mundo (WILSON; REEDER, 2005). Dentro da região neotropical, foram descritos, até o momento, seis gêneros e 17 espécies de cervídeos (WEBER; GONZALEZ, 2003). No entanto, o grupo possui incertezas taxonômicas ligadas ao gênero *Mazama* (DUARTE; JORGE, 1996; DUARTE *et al.*, 2008; VARGAS-MUNAR *et al.*, 2010; SALVIANO *et al.*, 2017), o que poderá resultar em alteração no número de espécies descritas conforme ocorram avanços nas pesquisas taxonômicas sobre esse grupo.

Dentre os Cervidae, o veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus* LINNAEUS, 1758) é encontrado em fitofisionomias de formações abertas, compreendida entre a latitude de 4° e 41°S, como o cerrado, o pampa gaúcho e o pantanal no Brasil. Seu período de atividade é diurno, portanto, visto com certa facilidade nos ambientes em que habita (GONZALEZ *et al.*, 1998; 2002). Ele possui tamanho médio, variando de 1,20 a 1,50 metro de comprimento e 0,7 a 0,75 metro de altura, com peso entre 30 e 40 Kg (GIMENEZ-DIXON, 1986).

A espécie é seletiva em relação a sua alimentação, preferindo brotos, folhas e flores mais tenras, que sejam de fácil digestão e alto valor energético, sendo considerado um animal podador-pastador que procura ativamente e continuamente seu alimento (MCARTHUR; PIANKA, 1966; RODRIGUES, 1996; DUARTE *et al.*, 2012). Apesar de ser seletivo em relação ao seu alimento, o veado-campeiro possui plasticidade para se adaptar às condições do meio onde está inserido, podendo variar sua dieta escolhendo plantas que, geralmente, não são suas preferências em condições de ampla variedade de alimento (COSSE, 2001).

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

Apesar de sua ampla distribuição, existem poucos trabalhos de genética populacional realizados para a espécie. Dentre eles existem alguns trabalhos realizados com marcadores mitocondriais como o realizado por Gonzalez e colaboradores (1998). Foram identificados 45 haplótipos diferentes do fragmento mitocondrial D-Loop (453 pares de bases, pb) em seis localidades, distribuídas entre o Brasil, Uruguai e Argentina. As análises mostraram que as populações uruguaias deveriam ser consideradas subespécies distintas, o que levou a realização de um trabalho de cunho taxonômico para a descrição de duas novas subespécies, *O. b. arerunguaensis* e *O. b. uruguayensis* (GONZALEZ *et al.*, 2002).

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

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

No trabalho de Rodrigues e colaboradores (2007) foi utilizada a técnica de RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) como uma outra ferramenta molecular para investigar a divergência populacional e a variação genética das populações existentes no Parque nacional de EMAS e no Pantanal. O autor encontrou fenótipos únicos para cada um dos indivíduos que compõe as populações, inferindo uma variabilidade genética moderada/alta, que corrobora os resultados encontrados por Gonzalez e colaboradores (1998). É sugerido que essa diversidade genética esteja relacionada com a com um grande número populacional histórico que sofreu um recente declínio populacional. No entanto, devido ao tipo de marcador utilizado por Rodrigues e colaboradores alguns de seus

resultados diferem dos encontrados por Gonzalez, como por exemplo a árvore filogenética gerada através da análise de *neighbor-joining*. O resultado desta análise não separou as populações estudadas em clados distintos, como ocorreu no estudo de Gonzalez e colaboradores (1998). Os autores discutem este resultado assumindo que o tipo de marcador utilizado por eles não é o mais adequado para utilização em filogenias.

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

Mantelato e colaboradores (2017) amostraram duas populações de veados campeiro da região central do pantanal através de uma abordagem amostral não invasiva utilizando a coleta de fezes frescas. Utilizaram-se de microssatélites também heterólogos para averiguar os índices de diversidade genética. Com os dados gerados pelo trabalho é possível verificar uma alta diversidade genética, mesmo sendo menor que a encontrada por Cosse e colaboradores (2007).

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

No que tange às questões conservacionistas, alguns fatores podem ser apontados como principais causas do declínio populacional da espécie em ambientes naturais, como a caça predatória e de subsistência e a perda de habitat. Estima-se que mais de 2 milhões de couros de veados neotropicais tenham sido exportados para a Europa entre 1860 e 1870 (THORNBACK; JENKINS, 1982). Além disso, a carne de veado tem sido uma das principais fontes de proteína para algumas comunidades rurais (ROBINSON; BENNETT, 1999; PERES, 2000), o que, junto à prática da caça esportiva e às questões culturais associadas a cada região, também gera impactos negativos às populações de veados. Esses

argumentos ajudam a explicar o porquê a caça ainda atua como um fator tão significativo para a redução do número de indivíduos nas populações (WEBER; GONZALEZ, 2003).

A perda de habitat foi um dos fatores que mais contribuíram para que este cervídeo se tornasse uma espécie ameaçada, visto que, de 1900 até o momento, essa área foi reduzida a apenas 1% de seu tamanho original (WEBER; GONZALEZ, 2003; GONZALEZ *et al.*, 2010). Junto a isto, os atropelamentos em rodovias e dentro das lavouras, a prática de reflorestamento com a utilização de espécies exóticas – como ocorreu no sul do Brasil, onde houve a substituição de campos por plantações de *Pinnus sp.* – e a transmissão de enfermidades por outros ungulados domésticos são fatores agravantes para a conservação da espécie (WEBER; GONZALEZ, 2003; DUARTE *et al.*, 2012; GONZALEZ *et al.*, 2016).

Uma vez entendidas as possíveis ameaças para a espécie, é necessário que ações sejam determinadas para que ocorra a conservação das populações que ainda restam pelo Brasil. O Plano Nacional para a Conservação de Cervídeos Ameaçados de Extinção (PNCCAE) (DUARTE *et al.*, 2012) possui como um de seus objetivos a manutenção da viabilidade populacional genética e demográfica dos cervídeos encontrados em território nacional. Esse documento propôs, dentre seus objetivos específicos, aumentar o conhecimento científico do grupo para que estes sirvam de subsídio para elaboração de ações para a conservação em um período de cinco anos, contados a partir de sua publicação.

Para a espécie *O. bezoarticus*, as ações previstas no plano de manejo do PNCCAE são: (i) Elaborar e executar projeto para investigar a ocorrência de novas populações da sub-espécie *Ozotoceros bezoarticus bezoarticus* ao longo de sua área de distribuição original, especialmente na Estação Ecológica de Santa Bárbara, SP; Serra do Ibitipoca, MG; Água Doce, SC; Vilhena, RO; e Banhado do Taim, RS; (ii) Elaborar e executar projetos para se conhecer a atual situação da estrutura genética das populações naturais de *Ozotoceros bezoarticus*; e (iii) Confirmar e estudar a população disjunta de *Ozotoceros bezoarticus* da Ilha de Marajó. Além do PNCCAE, a espécie encontra-se na lista vermelha da *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) como “quase ameaçada” (*Near Threatened*, NT) (GONZALEZ *et al.*, 2016).

Ao passo em que se conhece o perfil genético das populações em questão, é possível que sejam determinadas Unidades Evolutivas Significativas (ESUs). Estas são definidas como linhagens de determinada espécie que possuam fluxo gênico altamente restrito em relação a outras linhagens do mesmo táxon e que sejam separadas filogeneticamente, apresentando monofilia para haplótipos mitocondriais ou diferença significativa na

frequência de alelos nucleares de determinado *locus* (MORITZ, 1994; FRASER; BERNATCHEZ, 2001). A descoberta de ESUs auxiliará na construção de planos de manejo da espécie melhor fundamentados, permitindo a determinação de áreas prioritárias para a conservação e até mesmo possíveis áreas para que ocorram projetos de reintrodução da espécie.

Para que possam ser realizadas as ações para a conservação do veado-campeiro, fica clara a importância de se conhecer o perfil genético de suas populações relictuais no Brasil. Para isso, há a necessidade de obtenção de material biológico de populações para suprir a lacuna amostral da espécie, uma vez que os estudos, no Brasil, se limitam aos indivíduos provenientes do Parque Nacional de Emas-GO, do pantanal-MS, e uma pequena população localizada no município de Pirai do Sul-PR como já citado anteriormente.

Diante do apresentado, o desenvolvimento desse projeto é de grande relevância científica e prática, uma vez que propõe estudar, ao longo da distribuição geográfica do veado-campeiro no Brasil, o panorama genético das populações relictuais que se tem conhecimento através de marcadores mitocondriais. Esperamos confirmar a existência das populações relatadas pelo PNCCAE e colaboradores de nosso grupo de pesquisa, delimitar as regiões geográficas das subespécies e testar a hipótese de que estas populações apresentem estruturação genética devido a seu isolamento por distância.

## 2. Objetivo

Este projeto possui como objetivos:

- Caracterizar a diversidade genética das populações de veados-campeiros (*Ozotoceros bezoarticus*) ao longo de sua distribuição geográfica no Brasil, utilizando marcadores mitocondriais a partir de amostragem fecal;
- Elucidar a estrutura populacional do veado-campeiro no Brasil;
- Realizar a reconstrução filogenética das populações amostradas;
- Determinar possíveis ESUs, a partir da descoberta de haplótipos exclusivos em determinadas populações, para servirem de base na elaboração de planos de manejo e ações para a conservação da espécie;
- Determinar os limites geográficos das subespécies que ocorrem no Brasil, *Ozotoceros bezoarticus bezoarticus* e *Ozotoceros bezoarticus leucogaster*.

### 3. Material e métodos

#### 3.1. Área de estudo

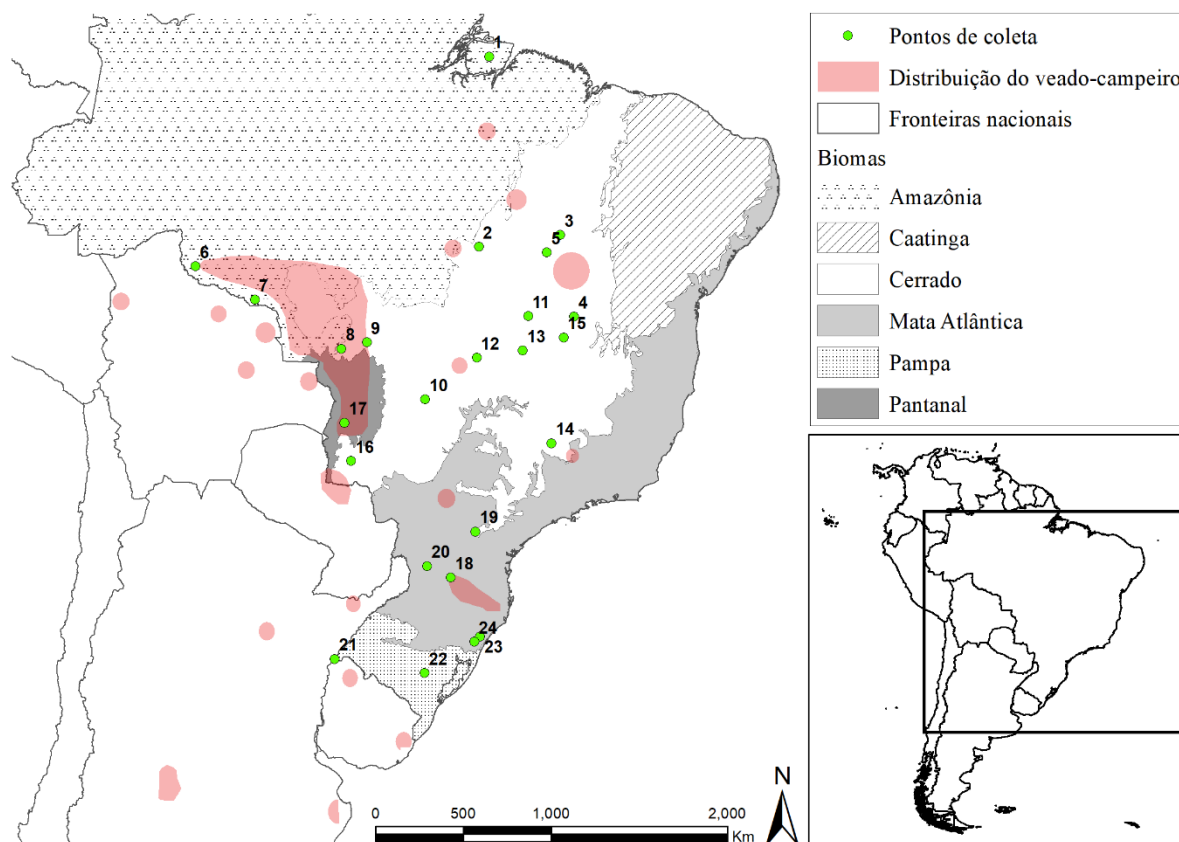
As coletas serão realizadas ao longo da distribuição atual do veado-campeiro dentro do território brasileiro. As áreas a serem amostradas foram definidas de acordo com o Plano de Ação Nacional para a Conservação de Cervídeos (DUARTE, 2012), relatos existentes na literatura (MAZOLLI; BENEDET, 2009; NOGUEIRA *et al.*, 2011) e registros de armadilhas fotográficas e avistamentos comunicados por colaboradores do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE). Como é possível verificar na Tabela 1 e na Figura 1, a região amostrada contemplará desde os Estados de Mato Grosso e Rondônia até o Rio Grande do Sul, passando pelas formações abertas de cerrado, pantanal, pampa, mata atlântica e amazônia.

**Tabela 1** – Identificação (ID) das populações de veado-campeiro a serem amostradas, nome do local onde ocorrerá a coleta, biomas predominantes, categorias de classificação dos locais de coleta: estação ecológica (E.E.), parque nacional (PARNA), parque estadual (PE), reserva extrativista (REVIS), reserva extrativista (RESEX), área de proteção ambiental (APA) e reserva do patrimônio particular nacional (RPPN); unidades federais (UF): Pará (PA), Tocantins (TO), Piauí (PI), Bahia (BA), Rondônia (RO), Mato Grosso (MT), Goiás (GO), Distrito Federal (DF), Minas Gerais (MG), Mato Grosso do Sul (MS), Paraná (PR), Santa Catarina (SC), Rio Grande do Sul (RS).

ID	UF	Nome	Categoria	Bioma
1	PA	Ilha de Marajó	REVIS	campos naturais
2	TO	Araguaia	PARNA	cerrado
3	PI	Nascentes do Rio Parnaíba	PARNA	cerrado
4	BA	Veredas do Oeste Baiano	REVIS	cerrado
5	BA/TO	Serra Geral do Tocantins	E.E.	cerrado
6	RO	Barreiro das Antas	RESEX	cerrado
7	RO	Corumbiara	PE	amazônia
8	MT	Serra das Araras	E.E.	cerrado
9	MT	Chapada dos Guimarães	PARNA	cerrado
10	GO	Emas	PARNA	cerrado
11	GO	Chapada dos Veadeiros	PARNA	cerrado
12	GO	Serra Dourada	PE	cerrado
13	DF	Brasília	PARNA	cerrado
14	MG	Serra da Canastra	PARNA	cerrado
15	MG/BA	Grande Sertão Veredas	PARNA	cerrado
16	MS	Serra da Bodoquena	PARNA	pantanal
17	MS	Nhecolândia	----	pantanal
18	PR	Campos de Palmas	REVIS	mata atlântica
19	PR	Ita-Y-Tiba	RPPN	mata atlântica
20	SC	Coxilha Rica	----	mata de araucária
21	RS	Espinilho	PE	pampa



22	RS	Podocarpus	PE	pampa
23	RS	Aparados da Serra	PARNA	mata atlântica
24	RS	São Francisco de Paula	Floresta nacional	cerrado



**Figura 1.** Mapa do Brasil destacado os pontos de coleta nos círculos em verde, com o número de identificação (ID) correspondente às localidades da tabela 1. Em representação gráfica os biomas conforme informado pela legenda. Em sobreposição aos biomas está representado a distribuição atual do veado campeiro conforme informado pela IUCN (Download em 20 de março de 2018).

### 3.2. Coleta de material biológico

A obtenção de material biológico para a extração de DNA total e posterior análise de mtDNA será realizada a partir da coleta de fezes com o auxílio de cão farejador treinado para a detecção de fezes de cervídeos, independente destas estarem frescas ou não. Este tipo de metodologia vem sendo utilizada com grande sucesso pelo nosso grupo de pesquisa, frente a seu caráter não invasivo e alta acurácia na detecção e redução do tempo destinado para encontrar as fezes, devido à eficiência do cão (OLIVEIRA *et al.*, 2012; PERES, 2015; OLIVEIRA, 2015; DUARTE *et al.*, 2017).

Após o reconhecimento prévio da área onde será feita a coleta, serão traçados transectos baseados na área de vida da espécie (RODRIGUES; MONTEIRO-FILHO,

2000; TOMAS *et al.*, 2001; VILA *et al.*, 2008) com 2,5 Km de distância entre cada um deles, visando a individualização dos dados. O tempo de permanência em cada área será de no máximo 7 dias ou até que o cão encontre o total de 15 amostras. As fezes encontradas possuem sua coordenada geográfica marcada com o auxílio de um aparelho GPS e, em seguida, serão identificadas e armazenadas em tubos de polipropileno de 50 mL contendo álcool absoluto.

O cão utilizado é de propriedade do NUPECCE, sendo mantido nas instalações da UNESP. Para reduzir a probabilidade de que o cão leve alguma enfermidade para os locais de coleta, há um rígido cuidado sanitário, com a realização de exames periódicos no Hospital Veterinário “Governador Laudo Natel” da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Jaboticabal, em especial quando do retorno do animal ao canil após as idas à campo. Durante o trabalho de campo, o cão foi treinado para interagir o mínimo possível com a fauna silvestre e permanecer em um raio de 20 m ao redor do pesquisador que o conduz, evitando desvios do transecto e possíveis acidentes. Ainda como procedimento padrão, todas as suas fezes são enterradas durante o trabalho.

Já existem amostras coletadas para o PARNA EMAS (n = 20) e para a região do pantanal da Nhecolândia (n = 20). Estas amostras encontram-se depositadas no banco de amostras do NUPECCE sob refrigeração e identificadas.

### 3.3. Extração, Amplificação e sequenciamento do DNA fecal

Para a extração do DNA total será utilizado o protocolo padrão em sílica (GLENN *et al.* 1998), que vem sendo usado com sucesso (OLIVEIRA, 2015; PERES, 2015).

A acurácia na diferenciação morfológica das fezes dos veados neotropicais é baixa (COSTA *et al.*, 2016), portanto, será necessária a identificação molecular das mesmas. Para isto, será utilizado um fragmento de 224 pares de bases (pb) do gene mitocondrial Citocromo b (CytB), que será amplificado por meio de PCR (MULLINS; FALOONA, 1987) com os *primers* IDMAZ224 e IDMAZ H (GONZALEZ *et al.*, 2009). Esta região pode ser amplificada para todas as espécies de cervídeos brasileiros, sendo possível a identificação das espécies em questão após a comparação com os padrões nucleotídicos das sequências (GONZALEZ *et al.*, 2009; SOUZA *et al.*, 2013). Posterior à confirmação de que as fezes pertencem à espécie estudada, serão feitas as amplificações de outras regiões.

Ao todo serão utilizados cinco fragmentos gênicos (Tabela 2) para a realização das análises genéticas. Além do fragmento CytB supracitado, será utilizado outro fragmento

do mesmo gene com 306 pb desenvolvidos no NUPECCE, dados não publicados. Ainda, serão amplificados os fragmentos das regiões D-Loop (159 pb) (MORENO *et al.*, 2016), que foi descrita como a mais polimórfica para a espécie (GONZALEZ *et al.*, 1998), NADH Dehidrogenase subunit 5 (ND5, 224 pb) (dados não publicados) e Citocromo oxidase I (COI, 159 pb) (GONZALEZ, 2018).

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

Genes	Iniciadores (Primers)	Sequência (Forward/Reverse)	Fragmento (pb)	Temperatura de anelamento (°C)	Referência
COI	F	5'GTGCTCCAGATATAGCATTTCC3'	159	55	GONZALEZ, 2018
	R	5'GCTAGATTGCCAGCTAAAGGG3'			
CytB	IDMAZ224	5'CATCCGACACAATAACAGCA3'	224	55	GONZALEZ, 2009
	IDMAZ H	5'TCCTACGAATGCTGTGGCTA3'			
CytB	F	5'CCATCAGACGCAGACAAA3'	306	58	Dados não publicados
	R	5'GCGTTGTTTAGATGTGTGAAG3'			
D-loop	F	5'GCGGCATGGTAATTAAGCTC3'	159	55	MORENO <i>et al.</i> , 2016
	R	5'GCTAGATTGCCAGCTAAAGGG3'			
ND5	F	5'TGTCACATGGTCCATCATAG3'	224	58	Dados não publicados
	R	5'GCAGAGCTGCTGTGTTT3'			

Para purificação do DNA, o produto da PCR será tratado com o conjunto enzimático Ilustra™, ExoProStar™ 1-Step (GE®), seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as amostras serão sequenciadas para a fita senso e anti-senso, por meio do conjunto de reagentes Big Dye (Perkin-Elmer ®) no sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, California, CA) no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO/Unesp Jaboticabal).

Após o sequenciamento, os eletroferogramas gerados serão inspecionados manualmente com o auxílio do programa BioEdit v. 7.2.0 (GARCIA *et al.*, 1999) para o reparo de possíveis erros. Após a inspeção, será gerada uma sequência consenso para posterior alinhamento com a utilização da ferramenta ClustalW.

Todas as análises subsequentes serão realizadas individualmente para cada fragmento e com o auxílio do software DnaSP v. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009) será realizada a concatenação das sequências para a realização das mesmas, buscando assim a comparação da informação gerada por cada fragmento em relação as sequências concatenadas.

## 4. Análise dos resultados

### 4.1. Distribuição par-a-par (*Mismatch distribution*)

No programa DnaSP v. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009) será realizada a análise de distribuição par-a-par, que infere a história demográfica das populações estudadas gerando gráficos que serão avaliados posteriormente de acordo com seu padrão modal. Em uma população em equilíbrio demográfico, há um longo e contínuo tempo, é esperado que seja apresentado um padrão multimodal de distribuição, enquanto que uma população que passou por uma recente expansão apresenta uma curva de distribuição unimodal. Eventos de gargalo populacional geralmente apresentam resultados próximos a zero, ou padrões bimodais. Este último padrão também pode ser atribuído a populações que tiveram contato em um primeiro momento e, após seu isolamento por um longo período de tempo, voltaram a conectar-se (SLATKIN; HUDSON, 1991; ROGERS; HARPENDING, 1992; FRANKHAM *et al.*, 2004).

### 4.2. Diversidade genética e teste de neutralidade

Com o software DnaSP v. 5.10.01 (LIBRADO; ROZAS, 2009) serão calculados os índices de diversidade genética, como a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ), que indica a probabilidade de dois nucleotídeos se retirados ao acaso de uma determinada sequência serem diferentes entre si, e a diversidade haplotípica ( $H_d$ ) que mostra a probabilidade de duas sequências tiradas ao acaso de uma população, serem iguais. O número de sítios segregantes ( $S$ ) indicará a quantidade de sítios polimórficos existentes na população. Ainda será calculado o número médio de diferenças nucleotídicas ( $k$ ) entre os indivíduos, o número de sítios migrantes ( $N_m$ ) e os índices de fluxo gênico, que são a diferenciação de frequência gênica entre populações ( $D_{st}$ ) e a proporção interpopulacional da variabilidade genética ( $G_{st}$ ), dado por  $G_{st} = D_{st}/H_t$ , onde  $H_t$  é o índice de heterozigosidade da população total.

Ainda com o mesmo programa, serão realizados os testes de  $F_s$  de  $F_u$  e  $D$  de Tajima. Esses testes avaliarão se os polimorfismos observados nas sequências seguem o modelo de variação neutra. O teste  $F_s$  de  $F_u$  é feito a partir da distribuição de frequência dos haplótipos em função de  $\theta$  (“teta”) ( $\theta = 4N\mu$ , em que  $N$  corresponde ao tamanho efetivo da população e  $\mu$  à taxa de mutação por sequência por geração). Valores negativos e significativos para  $F_s$  são sinais de expansão populacional (FU, 1997). O teste  $D$  de Tajima utiliza as diferenças entre o número de sítios migrantes polimórficos e o número

de diferenças nucleotídicas. Valores negativos e significativos para o D de Tajima indicam seleção purificadora, efeito carona ou expansão populacional. Os valores positivos são indicativos de seleção estabilizadora ou contração populacional (TAJIMA, 1989).

#### **4.3. Distância genética**

Para as estimativas de distância genética será utilizado o programa MEGA6 (TAMURA *et al.*, 2013). O programa utiliza um algoritmo onde as sequências nucleotídicas são comparadas duas-a-duas entre si, gerando, desta forma, um valor numérico para a distância genética entre elas. Após a comparação entre todos os dados, é possível obter um valor médio de distância genética geral e/ou entre agrupamentos pré-definidos pelo pesquisador. O modelo de substituição nucleotídica adotado para as análises será o Kimura 2P, que pressupõe que as taxas de transversão e transição são diferentes, porém a frequência de bases se mantém a mesma (SCHNEIDER, 2007).

#### **4.4. Construção de rede de haplótipos**

A rede haplotípica será construída utilizando o programa TCS1.21, onde as sequências de DNA serão analisadas par-a-par utilizando o critério da parcimônia. Quando estas apresentarem diferenças mutacionais acima de 95%, a ligação entre os haplótipos é rompida, indicando o número máximo de mutação entre estas (CLEMENT *et al.*, 2000).

O índice de confiabilidade utilizado será de 95%, com a exclusão dos “gaps” como quinto estado. Todos os indivíduos sequenciados serão utilizados para compor a matriz de dados da análise.

#### **4.5. Estruturação genética**

No programa Arlequin 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010) será feito o teste de variância molecular (AMOVA) para elucidar a distribuição da diversidade genética dentro e entre as populações amostradas de acordo com sua localidade de origem. Como um teste adicional para as definições dos grupos a serem analisados pela AMOVA, será utilizado o programa SAMOVA 2.0 (DUPALUP *et al.*, 2002), que relaciona as populações geograficamente homogêneas com a máxima diferenciação genética que pode ocorrer entre elas.

#### **4.6. Reconstrução filogenética**

A reconstrução filogenética será feita através da inferência Bayesiana com o auxílio do programa BEAST 1.7.4 (DRUMMOND *et al.*, 2012). Com esta será possível entender as relações evolutivas entre as populações brasileiras de veado-campeiro assim como o tempo em que estas se divergiram. O melhor modelo de substituição de nucleotídeos é pressuposto através do programa JModelTest, utilizando-se o *Bayesian Information Criterion* (DARRIBA *et al.*, 2012). Para estimar o tempo de divergência entre as populações será utilizado o relógio molecular relaxado (*Uncorrelated Lognormal Relaxed clock*) (DRUMMOND *et al.*, 2006). A MCMC (*Markov Chain Monte Carlo*) será feita com 10.000.000 corridas, sendo a convergência e estabilização das corridas observadas pelo programa Tracer 1.5 (RAMBAUT *et al.*, 2018). As 10.000 primeiras árvores são descartadas por *burn-in* pelo programa Tree Annotator 1.7.4 e a melhor árvore deve ser visualizada e editada usando o programa FigTree 1.3.

#### **4.7. Determinação dos limites geográficos das subespécies brasileiras e determinação de ESUs**

Para se realizar a determinação dos limites geográficos das subespécies, cada ponto de coleta de fezes possuirá sua coordenada geográfica marcada e, após a confirmação de que a amostra realmente é de veado-campeiro, serão utilizadas as ferramentas citadas até o momento para comparar os haplótipos obtidos com outros haplótipos que já existem depositados em bancos de dados (como o *GenBank* e o NCBI), nos quais já está definido a qual subespécie pertencem. Para a determinação das ESUs será levada em consideração a definição elaborada por Moritz (1994) e Fraser e Bernatchez (2001), que leva em consideração a monofilia de uma linhagem e o baixo fluxo gênico entre linhagem que estejam sob o mesmo táxon superior.

### **5. Plano de trabalho e cronograma**

Na Tabela 3 encontra-se um resumo das atividades a serem realizadas ao longo do tempo de doutorado dividido por trimestres. A primeira etapa do trabalho está relacionada com a elaboração do projeto para que este possa ser submetido às agências de fomento. A partir disto, serão realizadas as campanhas a campo para coleta de fezes. A cada volta de uma campanha é feita a triagem e o processamento do material coletado. Após esse processamento, os materiais serão enviados para o centro de sequenciamento para a

obtenção das sequências e posterior realização das análises populacionais para a produção dos resultados referentes ao trabalho. Juntamente a esse processo, serão cursadas as disciplinas referentes ao curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, FCAV-UNESP. Durante o tempo de doutoramento, far-se-á necessária a realização de levantamento bibliográfico referente ao trabalho que estará sendo realizado. Durante o último ano de pós-graduação, será feita a redação da tese, qualificação e defesa da mesma. Eventualmente, os resultados parciais obtidos pelo projeto serão levados a congressos pertinentes à área de pesquisa, no sentido de divulgar e discutir com a comunidade científica estes resultados, preparando-os para publicações futuras.

**Tabela 3** – Resumo das atividades que serão realizadas durante o tempo de doutoramento.

Etapas	Trimestres/2019				Trimestres/2020				Trimestres/2021				Trimestres/2022			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Levantamento bibliográfico	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Disciplinas a serem cursadas	X	X	X	X	X	X	X	X								
Submissão de projeto a agências de fomento e busca de financiamento	X	X	X													
Obtenção do material biológico			X	X	X	X	X	X	X	X						
Extração, amplificação, purificação e sequenciamento do DNA					X	X	X	X	X	X	X	X				
Análises das sequências e alinhamento dos dados					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X		
Obtenção e discussão dos resultados					X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	
Redação dos resultados e de manuscritos									X	X	X	X	X	X	X	X
Qualificação da tese													X			
Preparação e defesa da tese														X	X	X

## 6. Referências bibliográficas

BRAGA, F. G.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. **Characterization of the genetic variability of Pampas deer in the state of Paraná.** Deer specialist group News, n. 20, 2005.

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

CLEMENT, M.; POSADA, D.; CRANDALL, K. A. **TCS: a computer program to estimate gene genealogies.** Molecular Ecology, Oxford, v. 9, n. 10, p. 1657-1660, 2000.

COSSE, M. 2001. **Dieta y solapamiento de la población de venado de campo DLos AjosL, (L. 1758) (ARTIODACTYLA: CERVIDAE).** Montevideo. Dissertação. Maestria en Zoología, Facultad de Ciencias, Montevideo Uruguay.

COSSE, M.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. **Cross-amplification tests of ungulate primers in the endangered Neotropical pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*)**. Genetics and Molecular Research. v. 6, n. 4, p.1118-1122, 2007.

COSTA, E. B. V.; OLIVEIRA, M. L.; PERES, P. H. F.; GROTTA-NETO, F.; VOGLIOTTI, A.; PIOVEZAN, U.; DUARTE, J. M. B. **Low accuracy of identifying Neotropical deer species by scat morphology**. Studies on Neotropical Fauna and Environment. 2016.

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

DRUMMOND, A. J.; HO, S. Y. W.; PHILLIPS, M. J.; RAMBAUT, A. **Relaxed phylogenetics and dating with confidence**. PLoS Biol, v. 4, n. 5, p. 699-710, 2006

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.; JORGE, W. **Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil**. Archivos de Zootecnia, v. 45, p. 281-287, 1996.

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

DUARTE, J. M. B.; TALARICO, Â.; VOGLIOTTI, A.; GARCIA, J.; OLIVEIRA, M.; MALDONADO, J.; GONZÁLEZ, S. **Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo***. Oryx, v. 51, n.4, p. 656-664, 2017.

DUARTE, J. M. B.; PIOVEZAN, U.; ZANETTI, E.S.; RAMOS, H.G.C. 2012. **Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Cervídeos Ameaçados de Extinção**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. 128 páginas.

DUPANLOUP, I.; SCHNEIDER, S.; EXCOFFIER, L. **A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations**. Molecular Ecology, Oxford, v. 11, n. 12, p. 2571-2581, 2002.

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

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **A primer of conservation genétics**. Cambridge University Press, São Paulo, 2004.

FRASER, D. J.; BERNATCHEZ, L. **Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units**. Molecular Ecology, v.10, p. 2741-2752, 2001.

FU, Y. X. **Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection**. Genetics, Austin, v. 147, p. 915–925, 1997.



GARCÍA, J. *et al.* **Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis.** *Nucleic Acids Symposium Series*. Oxford, v. 41, p. 95-98, 1999.

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

GIMENEZ DIXON, M. 1986. ***Ozotoceros bezoarticus*.** *Red Data Book*, IUCN: Switzerland.

GONZÁLEZ, S. **Taxonomical identification of Neotropical deer species using molecular mitochondrial markers.** 2018 International Congress of Genetics, 10 to 14 September, Foz do Iguacu-Brazil, 2018.

GONZALEZ, S.; ÁLVAREZ-VALIN, F.; MALDONADO, J. E. **Morphometric differentiation of endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with description of new subspecies from Uruguay.** *Journal of mammalogy*, v. 83, n. 4, p. 1127-1140, 2002.

GONZÁLEZ, S.; COSSE, M.; BRAGA, F. G.; VILA, A. R.; MERINO, M. L.; DELLAFIORE, C.; CARTES, J. L.; MAFFEI, L.; DIXON, M. G. 2010. **Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus 1758).** In: DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ, S. (eds) *Neotropical Cervidology: biology and medicine of Latin American deer*. Funep/IUCN, Jaboticabal, p. 119–132.

GONZÁLEZ, S.; JACKSON, J. J.; MERINO, M. L. 2016. ***Ozotoceros bezoarticus*.** *The IUCN Red List of Threatened Species 2016*: e.T15803A22160030. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T15803A22160030.en>. Downloaded on 02 September 2018.

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

GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J.E.; ORTEGA, J.; TALARICO, A.C.; BIDEGARAYBATISTA, 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.

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

MANTELLATTO, A. M. B.; CAPARROZ, R.; CHRISTOFOLETTI, M. D.; PIOVEZAN, U.; DUARTE, J. M. B. **Genetic diversity of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) population in the Brazilian Pantanal assessed by combining fresh fecal DNA analysis and a set of heterologous microsatellite loci.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 40, n. 4, p. 774-780, 2017.

MAZZOLLI, M.; BENEDET, M. R. C. **Registro recente, redução de distribuição e atuais ameaças ao veado-campeiro *Ozotoceros bezoarticus* (Mammalia, Cervidae) no Estado de Santa Catarina, Brasil.** Revista Biotemas, v. 22, n.2, p. 137-142, 2009.

MCARTUR, R.H.; PIANKA, P. E. **On optimal use of patchy environment.** The American Naturalist, v. 100, p. 603-609, 1966.

MORENO, F.; FIGUEIRO, G.; MANNISE, N.; IRIARTE, A.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J.M.B.; COSSE, M. **Use of next-generation molecular tools in archaeological neotropical deer sample analysis.** Journal of Archaeological Science: Reports. v.10, p. 403-410, 2016.

MORITZ, C. **Defining ‘Evolutionary Significant Units’ for conservation.** Trends in Ecology & Evolution, v.9. n.10, p. 373-375. 1994.

MULLINS, K. B.; FALOONA, F. **Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase chaptalized chain reaction.** Methods of enzymology, Maryland Heights, v. 155, p. 335-348, 1987.

NOGUEIRA, C. C. *et al.* **Vertebrados da Estação Ecológica Serra Geral do Tocantins: faunística, biodiversidade e conservação no Cerrado brasileiro.** Biota Neotropica, v.11 n.1, p. 229-338, 2011.

SLATKIN, M.; HUDSON R. R. **Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population.** Genetics, Austin, v. 129, p. 555-562, 1991.

OLIVEIRA, M.L.; NORRIS, D.; RAMÍREZ, J. F. M.; PERES, P. H. F.; GALETTI, M.; DUARTE, J. M. B. **Dogs can detect scat samples more efficiently than humans: na experiment in a continuous Atlantic Forest remnant.** ZOOLOGIA, v. 29, n. 2, p. 183–186, 2012.

OLIVEIRA, M.L. **Distribuição e estimativa populacional do veado-mão-curta (*Mazama nana*) utilizando amostragem não invasiva.** 2015. 60 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

PERES, C. A. **Effects of subsistence hunting on vertebrate community structure in Amazonian forests.** Conservation Biology, v. 14, p. 240-253, 2000.

PERES, P. H. F. **Uso do espaço pelo veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*; Fisher, 1814): uma comparação entre colares GPS e DNA fecal.** 2015. 84 p. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

RAIMONDI, V. B.; MARUYAMA MORI, G.; PIEDRABUENA, M. R.; WOLFENSON, L.; MIROL, P. **Isolation and characterization of fifteen microsatellite loci from the endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Cervidae).** Conservation Genet Resour. v. 4, p. 1089-1092, 2012.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J.; XIE, D.; BAELE, G.; SUCHARD, M. A. **Posterior summarisation in Bayesian phylogenetics using Tracer 1.7**. Systematic Biology. 2018.

ROBINSON, J. G.; BENNETT, E. L. **Hunting for Sustainability in Neotropical Forests**. Columbia University Press, New York, New York, 1999.

RODRIGUES, F. H. G. **História natural e biologia comportamental do Veado-campeiro no Parque Nacional das Emas**. In: XIV Encontro Anual de Etologia, p. 223-231, 1996.

RODRIGUES, F. H. G.; MONTEIRO-FILHO, E. L. A. **Home range and activity patterns of pampas deer in emas national park, Brazil**. Journal of Mammalogy, v. 81, n. 4, p. 1136-1142, 2000.

RODRIGUES, F. P.; GARCIA, J. F.; RAMOS, P. R. R., BORTOLOZZI, J.; DUARTE, J. M. B. **Genetic diversity of two Brazilian populations of the Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*, Linnaeus 1758)**. Brazilian Journal of Biology, v. 67, p. 805-811, 2007.

ROGERS, A. R.; HARPENDING, H. **Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences**. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 9, p. 552-569, 1992.

SALVIANO, M. B.; CURSINO, M. S.; ZANETTI, E. S.; ABRIL V. V.; DUARTE, J. M. B.; **Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*)**, Biology of Reproduction, V. 96, n. 6, p. 1279-1287, 2017.

SCHNEIDER, H. **Métodos de análise filogenética**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, p. 200, 2007.

SLATKIN, M.; HUDSON R. R. **Pairwise comparisons of mitochondrial DNA sequences in stable and exponentially growing population**. Genetics, Austin, v. 129, p. 555-562, 1991.

SOUZA, J.N.; OLIVEIRA, M.L.; DUARTE, J.M.B. **A PCR/RFLP methodology to identify non-Amazonian Brazilian deer species**. Conservation Genetics Resources, Dordrecht, v. 5, n. 3, p. 639-641, 2013.

TAJIMA, F. **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism**. Genetics, Austin v. 123, p. 585–595, 1989.

TAMURA, K. *et al.* **Mega 6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0**. Molecular Biology and Evolution, Chicago, v. 30, p. 2725-2729, 2013.

TOMÁS, W. M.; MCSHEA, W.; MIRANDA, G. H. B.; MOREIRA, J. R.; MOURÃO, G.; LIMA BORGES, P. A. **A survey of a pampas deer, *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* (Arctiodactyla, Cervidae), population in the Pantanal wetland, Brazil, using the distance sampling technique**. Animal Biodiversity and Conservation, v. 24., n.1, p.101–106, 2001.

THORNBACK, J.; JENKINS, M. **The IUCN Mammal Red Data Book Part II.** IUCN, Gland. 1982.

VARGAS-MUNAR, D. S. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; DUARTE, J. M. B. **Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species.** Genetics and Molecular Research, v. 9, p. 1545-1549, 2010.

VILA, A. R.; BEADE, M. S.; LAMUNIÈRE, D. B. **Home range and habitat selection of pampas deer.** Journal of Zoology, v. 276, p. 95–102, 2008.

WEBER, M.; GONZALEZ, S. **Latin American deer diversity and conservation: A review of status and distribution.** Écoscience, V. 10, n. 4, p. 443-454, 2003.

WILSON, D. E.; REEDER, D. A. M. 2005. **Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference.** Johns Hopkins University Press.