

**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”
Centro de Energia Nuclear na Agricultura**

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

Márcio Leite de Oliveira

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Ecologia Aplicada

**Piracicaba
2015**

Márcio Leite de Oliveira
Bacharel e Licenciado em Ciências Biológicas

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

versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011

Orientador:
Prof. Dr. **HILTON THADEU ZARATE DO COUTO**

Tese apresentada para a obtenção do título de
Doutor em Ciências. Área de concentração:
Ecologia Aplicada

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Oliveira, Márcio Leite de

Distribuição e estimativa populacional do veado-mão-curta (*Mazama nana*) utilizando amostragem não invasiva / Márcio Leite de Oliveira. - - versão revisada de acordo com a resolução CoPGr 6018 de 2011. - - Piracicaba, 2015.

60 p. : il.

Tese (Doutorado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz". Centro de Energia Nuclear na Agricultura.

1. Mazama 2. DNA fecal 3. Ecologia molecular 4. Microssatélite 5. Citocromo b
6. Mata Atlântica I. Título

CDD 639.9797357
O48d

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATÓRIA

Dedico o presente trabalho aos amigos que fiz no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos.

AGRADECIMENTOS

Aos brasileiros, especialmente aos mais carentes, que financiaram esta pesquisa e minha bolsa.

À cadela Granada, companheira, amiga e fonte inesgotável de uma alegria contagiante.

Ao meu pai Carlos Amadeu, que construiu uma história de vida regada de exemplos de como ser honesto e a sempre pensar nos mais humildes, que nada têm e que tudo precisam. Além disso, um espelho para minha carreira acadêmica.

À minha mãe Cristina, por me ensinar o que é doar-se pelos outros, principalmente dando cuidado, atenção e carinho.

Aos meus irmãos Maurício e Juliana, que sempre foram meus grandes companheiros e estiveram presentes ao meu lado quando preciso.

Aos meus sobrinhos, queridos companheiros e ajudantes muito prestativos.

À Fernanda, pelo imenso amor que compartilhamos, pela cumplicidade e por não se cansar com tantas idas e vindas ao campo. Desculpe-me pelas tralhas de campo espalhadas pela casa!

Aos amigos Mateus (consultor de economia e política), Luís (consultor sobre veículos 4x4), Iha (consultor sobre água), Marini (consultor sobre vôlei, tecnologias, armas e biologia molecular), Pedro (terapeuta de laboratório e mateiro) e Francisco (terapeuta de campo, mateiro e motorista após o almoço), pela amizade que, apesar da distância de uns, sempre se mantém viva, e pelos momentos de descontração e apoio.

Aos amigos da MastoCasa, Edson Abreu Jr., Pamela Brennand, Leléu e Roth, pela amizade e por abrirem a porta de seu lar.

Aos colegas do Laboratório de Mamíferos da Esalq: Pamela, Edson, Joyce do Prado, Elisandra Chiquito, Alexandre Percequillo, Cecília Assis, Gustavo Libardi, Vanessa Salles, Inaê Almeida, Ricardo Bovendorp, entre outros.

Ao Thiago Marques, pela amizade e companheirismo nas disciplinas de pós-graduação.

À Mara Casarin, secretária da pós-graduação, que me acompanhou por esses sete anos, entre mestrado e doutorado, sempre prestativa, eficiente e gentil.

Ao Prof. Hilton Thadeu Zarate do Couto, pelos ensinamentos e orientação na condução deste trabalho.

Ao Prof. José Maurício Barbanti Duarte, pela amizade, orientação na condução deste trabalho e discussões sobre a universidade.

Ao Alexandre Vogliotti (Geléia), pela amizade, ensinamentos de campo e de ecologia de cervídeos.

Ao técnico de laboratório João Airton Boer, pela ajuda na rotina do laboratório e pelos momentos de alegria e bom humor.

Ao Guilherme Batista do Nascimento, pela amizade e ajuda nas análises estatísticas.

Ao Prof. Vitorio Barato Neto, pela revisão gramatical do texto em português.

Aos abnegados que me ajudaram no trabalho de campo: Antônio Correia Jr, Fábio Correa, Josi Cerveira, Juliano Oliveira, Marcelo Oliveira, Henrique Oliveira, Thiago Rodrigues, Cíntia Gruener, Anderson Quintino, Fernanda Gurski, Sérgio, Victor Batista, Marcos Tortato, Hugo Morzele, Jorge Donoso, João do Carmo, José do Carmo, Thiago Gurski, Francisco Grotta, Alexandre Vogliotti, Marina Figueiredo, Pedro Peres, Diego Cavassa, Martín Herrera.

Aos pesquisadores que forneceram dados de ocorrência de *Mazama nana*: Carlos Brocardo, Cíntia Gruener, Alexandre Vogliotti, Hugo Morzele, Paulo Kuester, Edson Abreu Jr., Alessandro, Pedro Volkmer de Castilho, Simone Michelin, Júlia Ferrúa dos Santos, Jorge Cherem e Gabriela Mette.

Aos órgãos ICMBio, FATMA, IAP, Sec. Meio Ambiente do RS, Corsan e FUNDEMA, pela permissão de acesso às áreas e, em muitas delas, alojamento e transporte.

Nas pessoas de Antônio Correia Jr., Juliano Oliveira e Fábio Correa, agradeço aos servidores do ICMBio com quem tive contato durante as coletas de campo. Pessoas, cada uma a sua maneira, muito prestativas, solidárias e amigáveis, que nos proporcionaram momentos de imensa alegria e convívio familiar.

Aos membros do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, pela amizade, companheirismo e trabalho em equipe. E que equipe!

Ao Vinícius de Moraes, Toquinho, Chico Buarque, Tom Jobim, Gilberto Gil, Elis Regina, Lenine, Oswaldo Montenegro, Raul Seixas, Zé Ramalho, John Lennon, Paul McCartney, George Harrison, Ringo Starr, Freddie Mercury e garotos do Iron Maiden, por me acompanharem tanto no trabalho de campo, quanto no laboratório.

O presente projeto foi financiado pelo CNPq e pela FAPESP (12/01095-2).

“É função da ciência descobrir a existência de um reino geral de ordem na natureza,
e encontrar as causas que governam essa ordem.”

(Dmitri Mendeleev)

“Modelos são todos errados, mas alguns são úteis.”

(George Box)

SUMÁRIO

RESUMO.....	13
ABSTRACT.....	15
1 INTRODUÇÃO.....	17
2 DESENVOLVIMENTO.....	19
2.1 Revisão Bibliográfica.....	19
2.1.1 O veado-mão-curta (<i>Mazama nana</i>).....	19
2.1.2 Distribuição geográfica e densidade.....	23
2.1.3 DNA Fecal.....	24
2.2 Metodologia.....	26
2.2.1 Área de estudo.....	26
2.2.2 Coleta das amostras.....	27
2.2.3 Análise laboratorial.....	30
2.2.3.1 Extração do DNA.....	30
2.2.3.2 Identificação específica.....	31
2.2.3.3 Identificação individual.....	31
2.2.4 Análise dos dados.....	33
2.2.4.1. Parâmetros genéticos da população.....	33
2.2.4.2. Estimativa populacional.....	33
2.2.5 Procedimentos de modelagem.....	34
2.2.5.1 Base de variáveis ambientais.....	34
2.2.5.2 Implementação do software.....	35
2.2.5.3 Avaliação dos modelos.....	35
2.2.6 Densidade e probabilidade de ocorrência.....	35
2.2.7 Determinação de áreas prioritárias para a conservação.....	36
2.3 Resultados.....	36
2.3.1 Modelagem de distribuição.....	36
2.3.2 Áreas prioritárias para a conservação.....	39
2.3.3 Densidade.....	40
2.3.4 Densidade e adequabilidade ambiental.....	45
2.4 Discussão.....	46
3 CONCLUSÕES.....	51
REFERÊNCIAS.....	53

RESUMO

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

O veado-mão-curta (*Mazama nana*) é uma espécie de cervídeo que ocupa a região Sul do Brasil, norte da Argentina e leste do Paraguai, tendo sido severamente afetada pela redução drástica das áreas florestadas. Trata-se, também, da espécie de cervídeo neotropical menos estudada pela ciência. Frente a essa situação, o presente projeto propôs-se a entender como essa espécie se distribui em sua área de ocorrência, propôs áreas prioritárias para sua conservação e estimou a densidade de duas populações. Dada a raridade e a alta elusividade da espécie, propôs-se o uso de metodologias indiretas para se atingir o objetivo proposto. Assim, foram usadas metodologias baseadas na coleta de amostras fecais, extração do DNA e posterior análises molecular e genética. Foram coletadas amostras fecais com o auxílio de um cão farejador em unidades de conservação distribuídas ao longo do Sul do Brasil. Após a identificação da espécie por meio da amplificação de um fragmento do citocromo B e corte com enzimas de restrição (PCR/RFLP) e com os dados de localização das amostras, foram feitas modelagens de distribuição com o software Maxent. Foram escolhidas duas unidades de conservação, onde foram realizadas coletas de amostras fecais, baseadas em faixas, para possibilitar a estimativa da densidade de animais nestas populações. Estabeleceu-se a distribuição geográfica potencial de *M. nana* no Brasil para os Estados do Paraná, Santa Catarina, norte e centro do Rio Grande do Sul, extremo sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul. Porção leste do Paraguai e, na Argentina para a província de Misiones. A densidade da espécie para a região norte do Parque Nacional do Iguaçu foi de 1,9 ind/km² e para o Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo foi de 5,5 ind/km². A população potencial da espécie foi de 152.991 indivíduos, sendo 15.524 indivíduos a população dentro das áreas protegidas. Sugere-se a manutenção do estado de conservação da espécie como Vulnerável, tanto na lista Brasileira como na lista Internacional de fauna ameaçada de extinção.

Palavras-chave: Cervidae; DNA fecal; Ecologia molecular; Microsatélite; Citocromo b; Mata Atlântica

ABSTRACT

Dwarf brocket deer (*Mazama nana*) distribution and population estimates with non-invasive sampling

The Brazilian dwarf brocket (*Mazama nana*) is a deer species that occupies the forests of southern Brazil, north of Argentina and east of Paraguay. It has been greatly affected by the drastic reduction of forested areas. It is also the less studied neotropical deer. Considering this situation, this project aimed to shed light on the species distribution along its range, to indicate conservation priority areas and estimate the density of two populations. Given the rarity and high elusiveness of the species, it is proposed the use of indirect methods to achieve this goal. Fecal samples collection based methodologies were used, followed by DNA extraction and subsequent molecular and genetic analysis. Fecal samples were tracked and collected in protected areas spread over south Brazil, with the help of a scat detection dog. After species identification by PCR/RFLP and samples spatialization, species distribution modeling was carried out using Maxent software suit. Two protected areas were chosen for a faecal sampling based on transects, in order to estimate the population density. Potential geographical distribution of *M. nana* in Brazil was established at states of Paraná, Santa Catarina, northern and center Rio Grande do Sul, extreme South of São Paulo and Mato Grosso do Sul. Also at Eastern Paraguay and Misiones province in Argentina. Species density at the northern area of Iguaçu National Park was 1.9 ind/km² and at the State Park of Vila Rica do Espírito Santo was 5.5 ind/km². The species potential population was 152,991 individuals, including 15,524 individuals inside protected areas. It is suggested to maintain species conservation status as vulnerable on the Brazilian and on the International red list of threatened species.

Keyword: Cervidae; Faecal DNA; Molecular ecology; Microsatellite; Cytochrome b; Atlantic forest

1 INTRODUÇÃO

Desde Humboldt, no século XIX, com o início da Ecologia com uma visão mais formal, passando por Raymond Lindeman e Robert MacArthur nos meados do século XX, que tornaram essa ciência mais matematizada e abriram as portas para a implementação dos mais diversos modelos para a interpretação do mundo natural, tentamos entender e prever a interação dos seres vivos com o meio ambiente bem como os fatores determinantes das distribuições geográficas e densidades das espécies. Após a Primavera Silenciosa de Rachel Carson, na década de 1960, e a explosão do movimento “verde”, nas décadas seguintes, a atualmente chamada Biologia da Conservação tem buscado bases metodológicas e conceituais na Ecologia. Essa base teórica tem sido usada para prever extinções, propor medidas de contingenciamento e avaliar o estado de conservação de espécies e ecossistemas.

Nesse contexto de geração de conhecimento científico, amparando a Biologia da Conservação, é que se insere a presente tese de doutoramento. O foco da mesma é o estudo do veado-mão-curta (*Mazama nana*), considerado o cervídeo, ao mesmo tempo, menos conhecido pela ciência no Brasil (VOGLIOTTI, 2008) e mais ameaçado de extinção na região Neotropical (ABRIL et al., 2010). Possivelmente, isso se deva ao seu comportamento elusivo, ocupando florestas tropicais de acesso trabalhoso e, por tais florestas, mais especificamente a Floresta de Araucárias, terem sido severamente extirpadas em decorrência da exploração humana.

A determinação de parâmetros elementares, como a densidade e a distribuição, básicos para qualquer estudo ecológico da espécie, tem-se mostrado bastante difícil para as espécies do gênero *Mazama*, dada a já citada elusividade, que impede visualizações e capturas necessárias em metodologias tradicionais de estudos ecológicos (VOGLIOTTI, 2003). Formas de contornar esse impasse foram surgindo ao longo do tempo, como a amostragem genética não invasiva por meio das fezes (KOHN; WAYNE, 1997), a localização das amostras fecais por cães farejadores (SMITH et al., 2001) e a predição do nicho ecológico e da distribuição geográfica com reduzidos dados de ocorrência, cujos primórdios é revisado por Guisan e Thuiller (2005).

Diante do escasso conhecimento sobre a ecologia e o estado de conservação do veado-mão-curta, o presente trabalho visou a entender como essa espécie se

distribui em sua área de ocorrência, propôs áreas prioritárias para sua conservação e estimou a densidade de duas populações. Ainda, foi testada a existência de correlação entre a densidade da espécie e a adequabilidade do ambiente.

2 DESENVOLVIMENTO

2.1 Revisão Bibliográfica

2.1.1 O veado-mão-curta (*Mazama nana*)

Surgida na Eurásia, a família *Cervidae* é constituída por 17 gêneros, largamente distribuídos no globo, com exceção dos extremos polares (EISENBERG; REDFORD, 1999; MERINO; ROSSI, 2010). Durante o início do Plioceno, essa família adentrou no continente americano, vindo da Ásia, pelo estreito de Bering. Mais tarde, no limite entre o Plioceno e o Pleistoceno (2,5 milhões de anos atrás), ao redor de oito *taxa*, de tamanho médio e chifres ramificados, cruzaram a região do Panamá (EISENBERG, 1987; WEBB, 2000; GILBERT et al., 2006; DUARTE et al., 2008). Esses *taxa* pertenciam basicamente a dois clados denominados por Duarte et al. (2008) de clado “Cinza” e clado “Vermelho”. Após adentrar na América do Sul, o clado vermelho rapidamente se diversificou graças aos refúgios florestais formados na glaciação pleistocênica e à baixa plasticidade ecológica das espécies a qual as impediu de transitar entre esses refúgios (GONZALEZ et al., 2010).

No clado vermelho, estariam as espécies associadas a ambientes florestais mais fechados, como *M. americana*, *M. nana*, *M. bororo* e *Odocoileus virginianus* (MERINO; ROSSI, 2010). Este último, uma espécie plástica que ocupa ampla gama de habitats (GALLINA et al., 2010). Já no clado cinza, estariam as espécies associadas a ambientes vegetacionais mais abertos, como campos e savanas, sendo elas *Blastocerus dichotomus*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Hippocamelus bisulcus*, *H. antisensis*, *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*. Essas espécies, justamente por serem mais plásticas (PINDER; LEEUWENBERG, 1997) puderam deslocar-se entre os refúgios pleistocênicos, resultando em menor diferenciação geográfica e consequente especiação (GONZALEZ et al., 2010). Fica clara, hoje, a polifilia do gênero *Mazama*, que futuramente deve ser desmembrado em dois ou três gêneros.

Já mais recentemente no tempo evolutivo, há 1,8 milhão de anos, o clado vermelho deu origem a duas variantes de *M. americana* e posteriormente (1,0 milhão de anos atrás) houve o desmembramento de um ramo onde se encontram *M. nana* e *M. bororo*, que se diferenciaram há 700 mil anos (DUARTE et al., 2008).

Em relação a outros cervídeos, os animais do gênero *Mazama* são de pequeno porte, com a porção anterior do corpo 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 (BARRETTE, 1987). Entretanto, essas generalizações são simplificações grosseiras a respeito de um grupo de animais onde cada espécie é única e aparentemente muito adaptada ao hábitat que ocupa (BARRETE, 1987). Estariam, assim, sendo encobertas nessas generalizações muitas informações acerca da história natural e da biologia evolutiva dessas espécies.

A validação do veado-mão-curta (*M. nana*) como espécie inicia-se com Czernay (1987), passa através de estudos citogenéticos que se iniciaram com Duarte (1992), análises morfológicas feitas por Rossi (2000) e uma final conclusão por Abril e Duarte (2008). Os estudos citogenéticos mostram um polimorfismo cromossômico bastante acentuado com o número diploide variando de 36 a 40 cromossomos e aparecendo até 6 cromossomos B.

A espécie (*M. nana*) é a menor do gênero, com menos de 15 kg de peso e 45 cm de altura, possuindo uma coloração avermelhada e homogênea (DUARTE, 1996) (Figura 1). A característica física que dá origem ao nome popular (veado-mão-curta) foi constatada por Czernay (1987), que os descreve com membros anteriores mais curtos que os posteriores, apesar de isso ser uma característica comum em todo o gênero. Outro nome popular da espécie, “pororó”, advém do comportamento, talvez folclórico, de que a espécie despista os caçadores, correndo em círculos e emitindo um alto som que originou a onomatopeia desse seu nome (GIAI, 1976).



Figura 1 – Espécime de *Mazama nana* do sexo masculino (Foto: J. M. B. Duarte).

A reprodução da espécie culmina com nascimentos entre setembro e fevereiro, originando apenas um filhote por fêmea (CRESPO, 1982) e aparentemente não existe ciclo de chifres nos machos (DUARTE¹). Não há informações quanto à área de vida da espécie, densidade, uso do espaço e ecologia alimentar (ABRIL et al., 2010). É relatado um período de atividade predominantemente noturno na região do Iguazu (Brasil) e da contigua Misiones (Argentina) (VOGLIOTTI, 2008; DI BITETTI et al., 2008).

Eisenberg e Redford (1999) descrevem a distribuição de *M. nana* contendo o sudeste do Paraguai, o norte da província de Misiones na Argentina e os estados brasileiros do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e São Paulo, estendendo-se até às porções sul do Mato Grosso do Sul e de Minas Gerais. Duarte (1998) revisando antigos trabalhos da literatura zoológica e agregando seus dados de coleta, revisa tal distribuição:

¹ DUARTE, J.M.B. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil) Comunicação pessoal, 2015.

Cabrera (1960) cita como área de ocorrência da espécie o sudeste do Brasil, nordeste da Argentina e leste do Paraguai. Grubb (1990) ainda acredita na ocorrência da espécie na Bolívia. Segundo Vieira (1955), no Brasil a espécie ocorre no Mato Grosso, São Paulo e Rio Grande do Sul, o que é contestado por Duarte (1996), para quem a espécie ocorre do norte do Estado do Paraná ao centro do Rio Grande do Sul, adentrando no Paraguai e na Argentina.

Nesse mesmo trabalho, Duarte propõe um mapa de distribuição das espécies do gênero *Mazama*, onde *M. nana* aparece na região citada, mas nota-se que sua distribuição não se estende às regiões leste dos estados da região Sul do Brasil.

Por fim, Rossi (2000), baseado em oito localizações de coleta de exemplares de museu por ele analisados, descreve a espécie como presente nos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná e na parte sul de São Paulo.

Quanto ao hábitat, a espécie parece ser associada à Floresta Ombrófila Mista (Floresta de Araucária), Floresta Estacional Semidecidual e vegetação de transição entre cerrados e Floresta Ombrófila (ROSSI, 2000). Prefere hábitats úmidos (CZERNAY, 1987) e, contraditoriamente a isso, regiões de montanhas florestadas (DUARTE, 1996; CABRERA; YEPES, 1960). Ocupa também áreas de florestas secundárias e com alta abundância de bambus (CHÉBEZ; VARELA, 2001). No Parque Nacional do Iguaçu, *M. nana* ocupa áreas de Floresta Ombrófila Mista e com maiores densidades vegetacionais arbustivas, diferenciando-se de *M. americana* que, no mesmo parque, ocupa áreas de Floresta Estacional Semidecidual e com vegetação menos densa nos estratos inferiores (VOGLIOTTI, 2008).

O estado de conservação de *M. nana* é baseado em inferências sobre um declínio populacional previsto maior ou igual a 30%, o que a faz ser classificada como Vulnerável tanto na lista Brasileira quanto na IUCN (União Internacional para Conservação da Natureza). Essa inferência é baseada na associação da espécie com florestas do sul do Brasil, Argentina e Paraguai, em especial a Floresta Ombrófila Mista, cujos 90% dos remanescentes são menores que 200 ha e que, devido a isso, as populações da espécie estão expostas a ataques de cães e a enfermidades de animais domésticos, como bovinos (DUARTE et al., 2012; DUARTE et al., no prelo). Um fator agravante é o alto polimorfismo cromossômico da espécie, que pode interferir negativamente no sucesso reprodutivo da mesma,

levando a declínios populacionais e extinções locais (ABRIL; DUARTE, 2008), apesar disto ter sido pobremente avaliado até o momento.

2.1.2 Distribuição geográfica e Densidade

A densidade dos organismos varia sob influência de uma série de fatores. Nascimentos, mortes, imigrações e emigrações são processos intrínsecos da população que podem impactar a densidade num dado momento e em um determinado local. Entretanto, existem fatores extrínsecos que exercem influência sobre tais processos e/ou ainda os sobrepõem. Esses fatores, cuja fonte é o ambiente, podem ser tanto físicos, como temperatura, umidade, etc., quanto biológicos, como competição e predação (HUTCHINSON, 1959; RICKLEFS; MILLER, 1999; GASTON, 2009).

Questionamentos tais quais por que determinados animais ocupam determinados locais, alguns geograficamente amplos e outros bem restritos, algumas espécies com distribuições quase que totalmente sobrepostas e outras completamente distintas, há tempos guiam a curiosidade dos cientistas na busca de como, e em qual medida, essas distribuições são moldadas (WALLACE, 1860; GRINNELL, 1917). O fator primário na determinação das distribuições é a adequabilidade ambiental (RICKLEFS; MILLER, 1999). Processos conjuntos e dinâmicos, como elevados nascimentos aliados à dispersão, são vetores que tendem a estender os limites da distribuição de uma espécie bem como, em outra direção, mortes podem levar a extinções locais e a conseqüente retração das distribuições (GASTON, 2009). Entretanto, esses vetores são o resultado da pressão que o meio exerce sobre os indivíduos, e o mais proeminente deles são as barreiras físicas, como os rios e as cordilheiras; mas outros, tais como temperatura, vegetação, regime pluviométrico, tipo do solo impedem os animais de, aleatória e irrestritamente, espalharem-se pelo globo (GRINNELL, 1917).

Uma abordagem que se tem mostrado uma ferramenta cada vez mais importante nas últimas duas décadas é a modelagem de distribuição de espécies. Essa ferramenta é especialmente útil para prever a distribuição de uma espécie quando existem poucos registros de ocorrência (PEARSON, 2007). Esses pontos de ocorrência são sobrepostos a conjuntos de informações ambientais para modelar seu nicho ecológico sob uma perspectiva de dimensões ambientais (HUTCHINSON,

1959) e projetar sua distribuição no espaço geográfico. Porém, é preciso ficar claro que essa projeção é nada mais que o espaço geográfico com condições abióticas adequadas à espécie, resultante de seu nicho fundamental e sem levar em consideração a acessibilidade, seja ela histórico-evolutiva seja imposta por barreiras geográficas (PETERSON; SOBERÓN, 2012). Em outras palavras, essa distribuição potencial é o Nicho Fundamental sem as interações bióticas, chamado de Nicho Potencial (JACKSON; OVERPECK, 2000), constricto pela acessibilidade (SOBERON; PETERSON, 2005). Um dos algoritmos mais utilizados para esse tipo de modelagem é o Maxent, que com os dados de ocorrência (presença) e, não necessariamente, os dados de ausência da espécie, utiliza-se do princípio de máxima entropia para predizer uma distribuição potencial (PHILLIPS et al., 2006; BALDWIN, 2009).

Assim sendo, esse método pode ser visto como um componente fundamental no planejamento da conservação das espécies, determinando sua potencial distribuição e as áreas de maior adequabilidade para a espécie (PEARSE; BOYCE, 2006; RODRIGUEZ et al., 2007). Uma vez que a adequabilidade ambiental prevista pelos modelos prediz os limites superiores da abundância local (VANDERWAL et al., 2009), podem-se fazer inferências sobre a densidade. Entretanto, pode ser argumentado que isso meramente se trata de uma questão circular, uma vez que os modelos são construídos com os dados de ocorrência e que a detectabilidade dessa ocorrência é maior em áreas de alta densidade (JIMÉNEZ-VALVERDE, 2011). De qualquer forma, essa possível relação densidade-adequabilidade ambiental tem promissora utilização na biologia da conservação, uma ciência de crise, que precisa de respostas rápidas e que, mesmo não contando com a ferramentaria ideal, utiliza-se destas com precaução e conservadorismo.

2.1.3 DNA Fecal

Em se tratando de estudar espécies elusivas, que não proporcionam fácil observação e coleta de dados, as amostras fecais representam um material prontamente disponível, fácil de coletar e que pode oferecer uma série de informações (PUTMAN, 1984). Entretanto, a obtenção, em grande quantidade, das amostras fecais é outra dificuldade no caso dos cervídeos do gênero *Mazama*, já que estas são inconspícuas e confundem-se com a serrapilheira. Uma das maneiras de se contornar esse problema e aumentar a detectabilidade das amostras é a

utilização de cães farejadores, que indicam o local da defecação efusivamente (SMITH et al., 2001; OLIVEIRA et al., 2012). Para ampliar a gama de informações que as fezes podem proporcionar, foi proposto o estudo do DNA contido nelas (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 à endocrinologia e servindo como base para vários estudos ecológicos, podendo até ser estimada a abundância populacional (KOHN; WAYNE, 1997; KOHN et al., 1999). 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; DUARTE, 2013; BEJA-PEREA et al., 2009).

Para um estudo ecológico detalhado, através do DNA contido nas fezes, é necessário determinar com precisão dados como: espécie a que pertence a amostra de fezes e a identificação individual da amostra frente à população a que pertence. Para isso, são utilizados marcadores moleculares específicos, e cada uma dessas informações é obtida (OLIVEIRA; DUARTE, 2013).

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 subfragmentos de tamanhos diferentes, permitindo a identificação das espécies pelos padrões de restrição. Atualmente, essa técnica distingue, também, as amostras de *Mazama* das de *Ozotoceros bezoarticus* e *Blastocerus dichotomus* (SOUZA et al., 2013).

Para a análise molecular das fezes, também podem ser utilizados marcadores moleculares altamente polimórficos denominados microssatélites. Eles 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).

2.2 Metodologia

2.2.1 Áreas de estudo

Foram realizadas coletas de amostras fecais em 14 unidades de conservação selecionadas na região Sul do Brasil (Figura 2). O Parque Nacional do Iguaçu, em sua região norte, e o Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo foram escolhidos para um estudo mais intensivo que objetivou estimar a abundância populacional.

As áreas foram escolhidas levando-se em conta a formação florestal a que pertenciam e o respectivo tamanho (Tabela 1). Foram contempladas as formações florestais de Floresta Ombrófila Mista, Floresta Ombrófila Densa, Floresta Estacional Semidecidual e Floresta Estacional Decidual. Foram escolhidas áreas com tamanhos menores que 600 ha e maiores que 5.000 ha no intuito de detectar as condições ambientais extremas, possivelmente associadas ao tamanho das áreas.

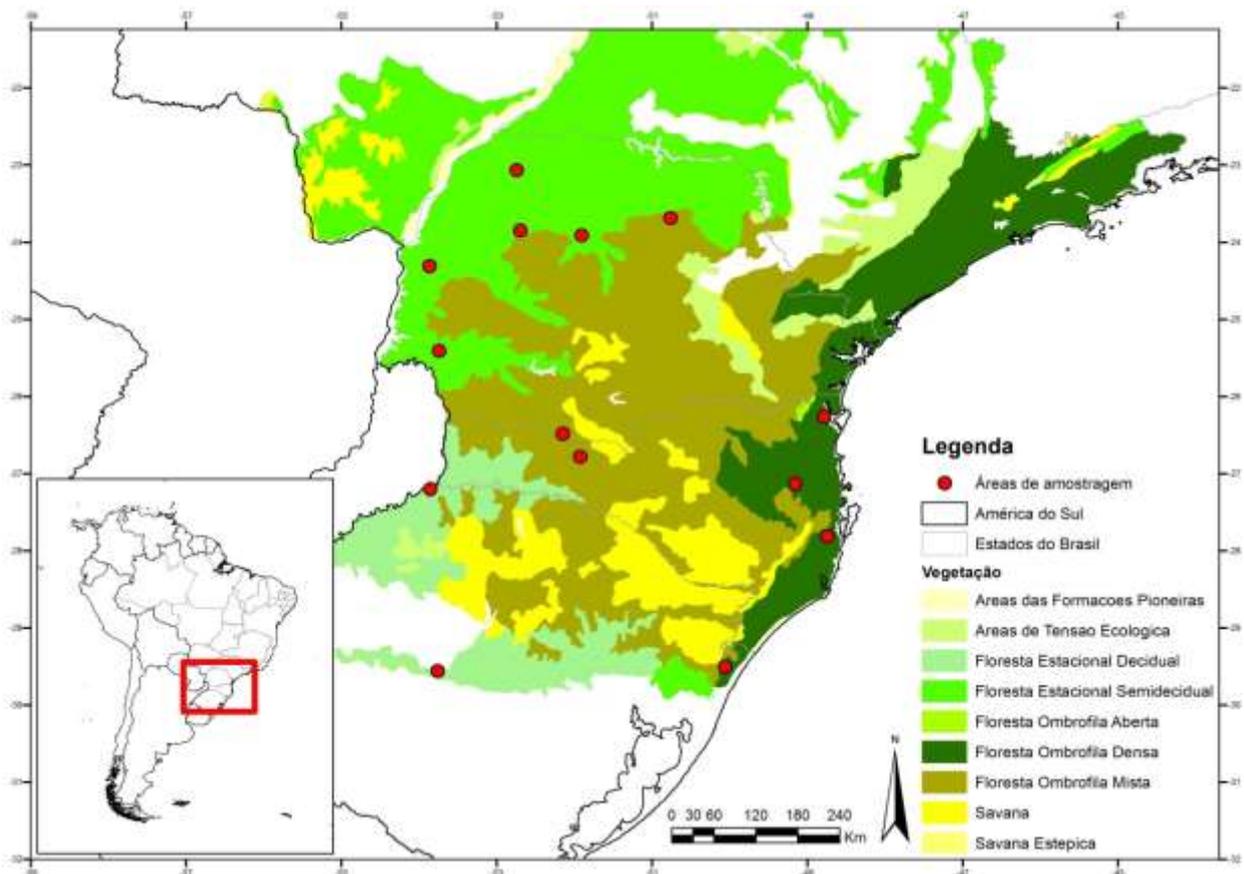


Figura 2 – Mapa com a localização das unidades de conservação amostradas e as regiões vegetacionais da Mata Atlântica segundo classificação IBGE, 1992.

Tabela 1 – Caracterização das áreas de estudo com a respectiva Unidade da Federação (UF), tamanho em hectares e a formação florestal predominante.

Nome da área	UF	Tamanho (ha)	Formação florestal
R. B. do Ibicuí Mirim	RS	567	Estacional Decidual
P. E. do Turvo	RS	16.979	Estacional Decidual
P. E. de Amaporã	PR	209	Estacional Semidecidual
P. E. Vila Rica do Espírito Santo	PR	349	Estacional Semidecidual
P. E. de São Camilo	PR	387	Estacional Semidecidual
R. B. das Perobas	PR	8.716	Estacional Semidecidual
P. N. do Iguaçu	PR	169.696	Estacional Semidecidual
P. N. M. Morro do Finder	SC	48	Ombrófila Densa
R. B. Mata Paludosa	RS	117	Ombrófila Densa
P. N. da Serra do Itajaí	SC	57.375	Ombrófila Densa
P. E. da Serra do Tabuleiro	SC	94.608	Ombrófila Densa
P. E. do Penhasco Verde	PR	305	Ombrófila Mista
E. E. da Mata Preta	SC	6.566	Ombrófila Mista
P. N. das Araucárias	SC	12.847	Ombrófila Mista

2.2.2 Coleta das amostras

Foram realizados dois delineamentos diferentes para a coleta das amostras. O primeiro delineamento, com a finalidade de obter dados para a modelagem da distribuição, foi realizado percorrendo trajetos no interior das unidades. Para isso, foram escolhidos trajetos distribuídos de forma que a amostragem se estendesse pelos extremos geográficos da unidade, evitando a interdependência dos pontos de eventuais coletas. Durante as incursões ao campo, coletaram-se amostras preferencialmente frescas. Cada unidade de conservação foi amostrada por, no máximo, quatro dias ou até atingir 20 amostras. Essas amostras foram identificadas apenas ao nível de espécie.

No outro delineamento, para a estimativa populacional, foram escolhidas duas das áreas amostradas para o estudo de modelagem: o Parque Nacional do Iguaçu e o Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo. Para a seleção das áreas, foi levado em consideração: a) Presença de *M. nana* na área; b) Facilidade de acesso, e c) Apoio logístico da Unidade de Conservação para o projeto. No P. N. do Iguaçu, foi feito um grid com sete trajetos paralelos de 2.000 metros de comprimento e 330 metros de distância entre si (Figura 3). Esse grid foi percorrido uma vez por mês, durante três meses. No P. E. V. R. do Espírito Santo, foram feitos transectos

paralelos de diferentes comprimentos, também a cada 330 metros, cobrindo toda a extensão do parque (Figura 4). Esse parque foi amostrado uma vez por mês, durante dois meses. As amostras coletadas nesse delineamento foram identificadas ao nível de espécie e indivíduo. A área amostral foi definida como a sendo a área de um “buffer” de 330 m (raio de uma hipotética área de vida de 35 ha) ao redor dos grid, excluindo regiões externas à unidade de conservação.

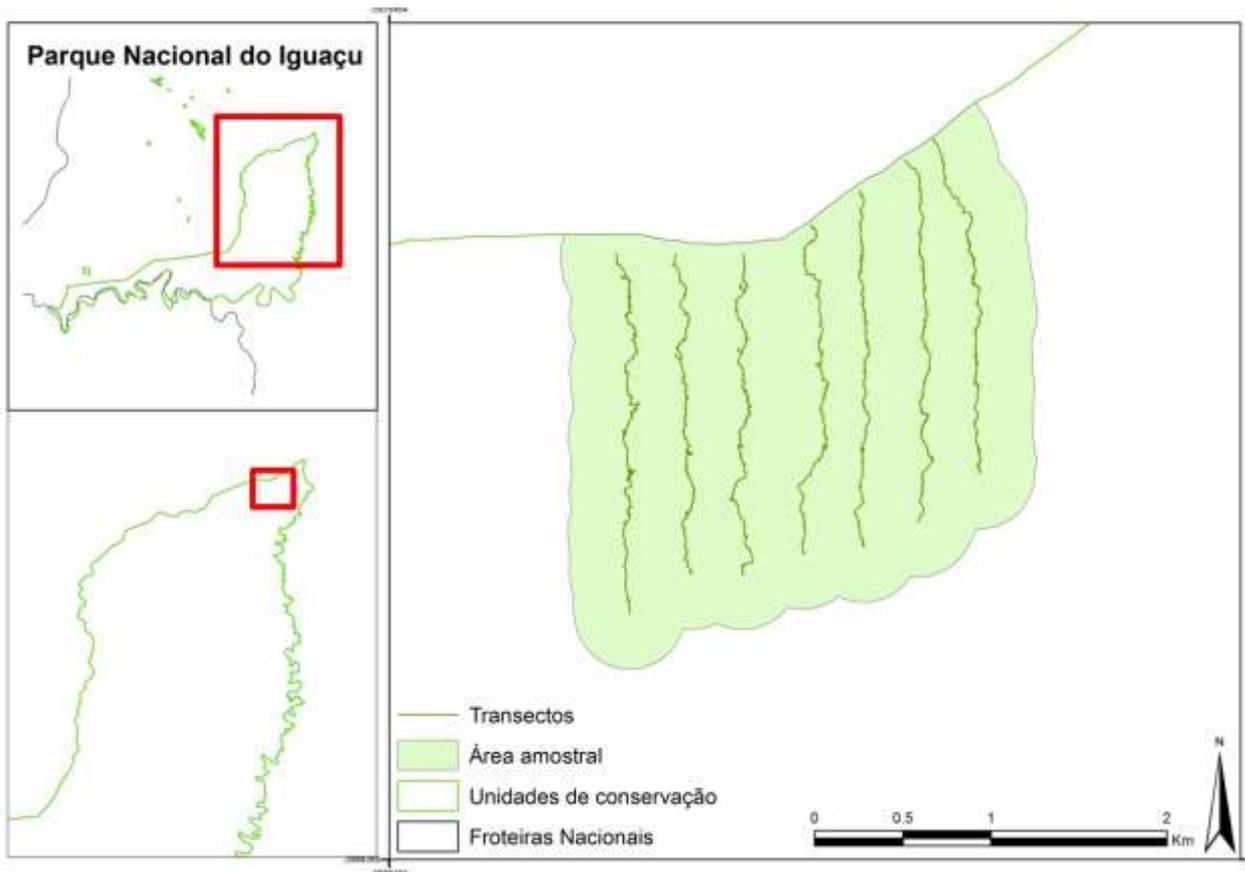


Figura 3 – Representação esquemática dos transectos amostrados no Parque Nacional do Iguaçu e da área amostral correspondente a um “buffer” de 330 m ao redor desses.

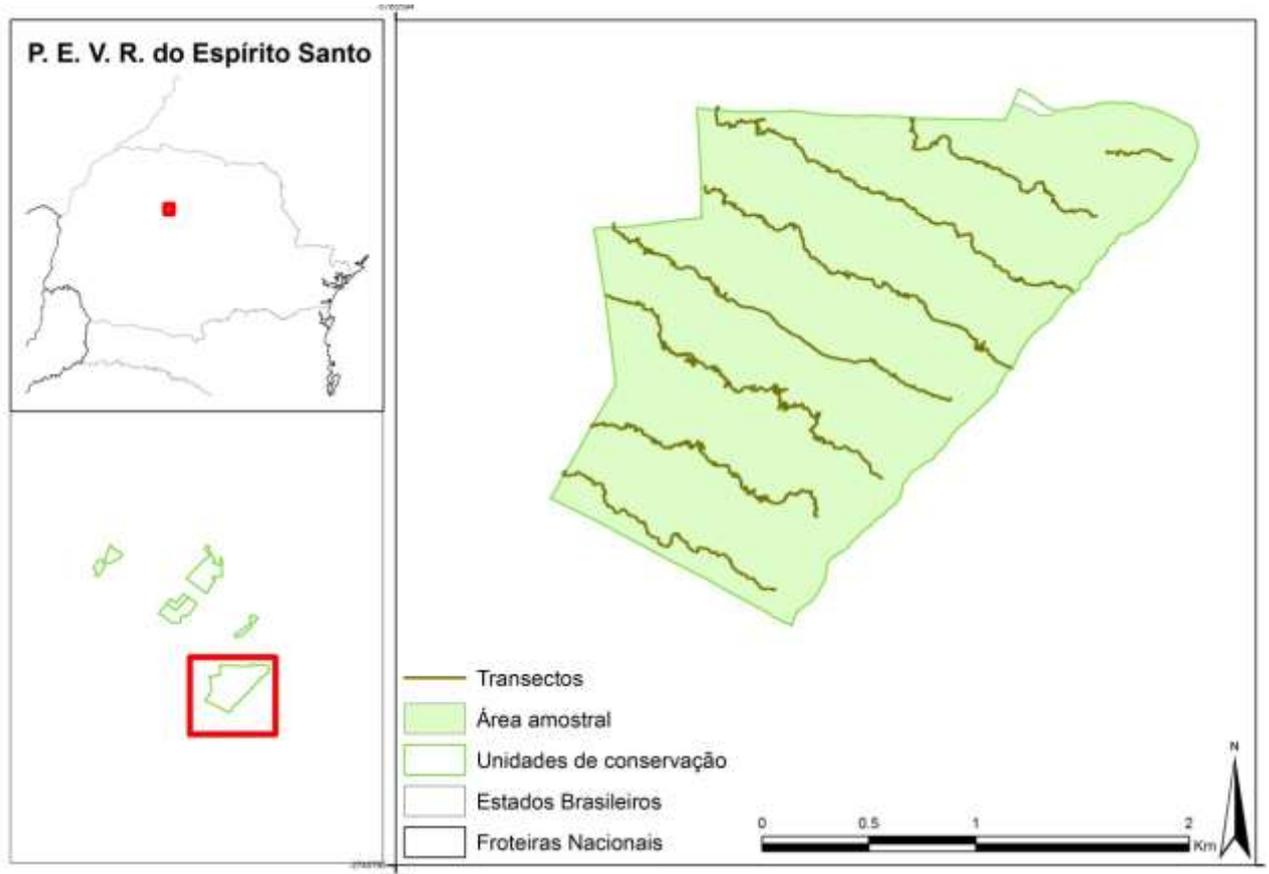


Figura 4 – Representação esquemática dos transectos amostrados no Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo e da área amostral correspondente a um “buffer” de 330 m ao redor desses.

Os trajetos, em ambos os delineamentos (276 km), foram percorridos com um cão farejador previamente treinado para o encontro de fezes de cervídeos. O cão, de propriedade do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (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 Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Jaboticabal. Ainda, como medida de controle sanitário adicional, as fezes do animal, quando em campo, são enterradas. O pesquisador manteve-se sempre junto à linha estabelecida para o trajeto e o cão realizou incursões em um raio máximo de 20 m em torno do mesmo.

Fez parte do treinamento do cão uma habituação à presença de outros animais, como medida para evitar que ele interagisse com a fauna nativa durante o trabalho em campo.

O local de coleta de cada amostra teve sua coordenada geográfica anotada para posterior georreferenciamento. As amostras foram coletadas sem o contato

com as mãos, e armazenadas, durante as expedições de campo, em tubos plásticos de centrifuga com tampa de rosca (50 mL), hermeticamente fechados. Essas medidas visavam a evitar a contaminação do material genético. Os tubos que recebiam os cibalos fecais foram completados com 40 mL de etanol absoluto.

2.2.3 Análise laboratorial

2.2.3.1 Extração do DNA

O DNA foi extraído utilizando o protocolo de extração baseado em sílica (GLENN et al., 2004 adaptado de BOOM et al., 1990, HÖSS; PÄÄBO, 1993; HÖSS, 1994) descrito abaixo:

1. Em um tubo de 1,5 mL, adicionar o cíbalo inteiro.
2. Adicionar 1 mL de tampão de extração e incubar a 60°C pelo menos 1h agitando esporadicamente.
3. Centrifugar por 1 min a 12.000 rpm e transferir 500 µL do sobrenadante para um novo tubo, tomando cuidado para não pipetar fezes.
4. Adicionar 500 µL do tampão de extração e 40 µl da solução de sílica.
5. Esperar 10 min em temperatura ambiente.
6. Agitar no vórtex rapidamente para misturar a sílica; em seguida, centrifugar por 15 s a 12.000 rpm.
7. Descartar o sobrenadante por aspiração.
8. Adicionar ao pellet de sílica 1 mL de tampão de lavagem. Agitar no vortex e centrifugar por 15 seg. à 12.000 rpm. Descartar o sobrenadante tomando cuidado para não puxar o pellet de sílica do fundo.
9. Repetir o passo 8.
10. Adicionar ao pellet de sílica 1 mL de etanol a 70%, agitar no vórtex e centrifugar 15 s a 12.000 rpm. Descartar o sobrenadante tomando cuidado para não puxar o pellet de sílica do fundo.
11. Repetir o passo 10.
12. Secar o pellet final com a tampa aberta.
13. Ressuspender o pellet em 75 µL de TE (10 mM Tris-HCL, 1 mM EDTA) *overnight* a 55°C em banho-maria.
14. Agitar no vórtex e centrifugar por 2 min a 12.000 rpm. Transferir o sobrenadante para um novo tubo.

15. Adicionar mais 75 μL de TE. Se uma quantia significativa de sílica for arrastada para novo tubo, centrifugar rapidamente e transferir o sobrenadante para um novo tubo.

16. Armazenar em 4°C (breve período, dias ou semanas) ou -20°C (longo tempo).

2.2.3.2 Identificação específica

Um fragmento de 224 pb do gene mitocondrial citocromo b foi 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: 0,5 μM de cada iniciador; 1X de tampão; 0,8 mM de dNTP; 1,44 mM de MgCl_2 ; 1,0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA; 1U de Taq DNA Polimerase; 5,0 μL de DNA e água ultrapura qsp 25,0 μL .

O programa de temperaturas da reação foi de 94° C por 5 minutos, 45 ciclos de 94° C por 50 segundos, 57° C por 45 segundos e 72° C por 1 minuto, e, por fim, 72° C por 10 minutos.

Após a amplificação, os produtos de PCR de 224 pb foram corados com GelRed™ (Biotium), submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2% e, sob transiluminador de luz ultravioleta, fotodocumentados e analisados.

Após a confirmação da amplificação, os produtos foram 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; SOUZA et al., 2013). O resultado foi fotodocumentado.

2.2.3.3 Identificação individual

As amostras fecais foram genotipadas com a utilização de 4 iniciadores, e a genotipagem foi feita em um sequenciador automático *ABI 3730 XL*. As reações de PCR foram realizadas seguindo as seguintes concentrações dos reagentes: 1,3 μM de cada iniciador; 1,2X de tampão; 0,72 mM de dNTP; 3,6 mM de MgCl_2 ; 1,2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de BSA; 1U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen Platinum®); 4,5 μL de DNA, e água ultrapura qsp 17,0 μL . O programa de temperaturas da reação foi de 94° C por 5 minutos; 45 ciclos de 94° C por 1 min; temperatura de anelamento por 45 segundos

e 72° C por 1 minuto, e, por fim, 72° C por 10 minutos. Foram feitas reações em triplicata e um genótipo consenso foi determinado, após análise dos eletroferogramas no software GeneMarker v 2.6.4 (HULCE et al., 2011), seguindo os seguintes critérios:

- a) Uma vez detectado um resultado heterozigoto em uma das réplicas, ele foi considerado em definitivo, não sendo considerado um eventual resultado homozigoto nas réplicas seguintes;
- b) Detectado um homozigoto, ele só foi considerado se em conformidade com uma das réplicas.

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

A seleção dos melhores iniciadores para essa identificação foi realizada entre um rol de 19 iniciadores, sendo cinco deles propostos por Oliveira e Duarte (2013), doze desenvolvidos recentemente, no NUPECCE, para as espécies *M. bororo*, *M. gouazoubira* e *M. nana*, e dois iniciadores desenvolvidos por Brinkman et al. (2010) para *Odocoileus hemionus*. Cada iniciador foi testado em quatro amostras de DNA de *M. nana*, extraído de amostras de pelo (2), sangue (2), fezes (12) e sob cinco diferentes temperaturas de anelamento. Os resultados foram analisados frente ao sucesso de amplificação e a presença de bandas inespecíficas (Tabela 2).

Tabela 2 – Iniciadores de locos microssatélites testados em amostras de *Mazama nana*. Quanto às bandas inespecíficas, 1 representa ausência, 2 presença de poucas e 3 presença de muitas. Com asterisco os iniciadores selecionados frente aos sucessos de amplificação e ao número de bandas inespecíficas apresentado.

Iniciador	Tamanho aproximado do fragmento (pb)	Espécie original	Sucesso de amplificação Pelo/sangue (%)	Sucesso de amplificação fezes (%)	Bandas inespecíficas	Melhor temp. (°C)	Referência
RT01	215	<i>Rangifer tarandus</i>	25	0	1	55	Oliveira e Duarte (2013)
* RT09	110	<i>Rangifer tarandus</i>	50	40	1	53	Oliveira e Duarte (2013)
RT30	190	<i>Rangifer tarandus</i>	50	0	2	59	Oliveira e Duarte (2013)
NVHRT16	180	<i>Rangifer tarandus</i>	75	10	1	57	Oliveira e Duarte (2013)
BM757	185	<i>Rangifer tarandus</i>	50	10	1	58	Oliveira e Duarte (2013)
Nana01	190	<i>Mazama nana</i>	100	0	2	56	-
Nana02	165	<i>Mazama nana</i>	0	0	3	66	-
Nana03	195	<i>Mazama nana</i>	25	0	2	66	-
Goua 24	170	<i>Mazama gouazoubira</i>	25	0	2	59	-
Goua 25	175	<i>Mazama gouazoubira</i>	100	10	1	53	-
Goua 17	175	<i>Mazama gouazoubira</i>	75	20	2	59	-
* Goua 03	110	<i>Mazama gouazoubira</i>	100	30	1	49	-
* Goua 07	130	<i>Mazama gouazoubira</i>	100	40	1	49	-
* Goua 10	110	<i>Mazama gouazoubira</i>	100	30	1	49	-
BCP 01	280	<i>Mazama bororo</i>	25	0	3	52	-
BCP 06	200	<i>Mazama bororo</i>	25	0	3	50	-
BCP 07	150	<i>Mazama bororo</i>	0	0	3	52	-
SBTD 01	135	<i>Odocoileus hemionus</i>	0	0	1	61	Brinkman et al. (2010)
SBTD 05	120	<i>Odocoileus hemionus</i>	0	0	1	61	Brinkman et al. (2010)

2.2.4 Análise dos dados

2.2.4.1 Parâmetros genéticos da população

Os resultados das genotipagens individuais foram utilizados para a determinação de padrões genéticos das duas populações escolhidas, como diversidade alélica e heterozigosidade observada e esperada. Bem como a probabilidade de identidade (P_{ID}), probabilidade de dois indivíduos compartilharem, aleatoriamente, o mesmo genótipo para os locos analisados (PAETKAU et al., 1998; WAITS et al., 2001), necessária para a estimativa da população.

2.2.4.2 Estimativa populacional

A partir da identificação das amostras fecais ao nível de indivíduo, foi determinada a população mínima da área. Como premissa para este trabalho, cada combinação genotípica foi considerada um indivíduo diferente. O erro embutido nessa premissa foi calculado, levando em consideração as frequências alélicas na população e a probabilidade de repetição da mesma combinação em outro animal da população.

O número de genótipos únicos identificados foi considerado equivalente à população mínima da área (MNKA – Minimum number known alive) (KREBS, 1966). Além disso, foi utilizado o estimador Jackknife de segunda ordem (SMITH; VAN BELLE, 1984), que originalmente foi proposto para estudos de captura e recaptura, e que se mostrou adequado para estudos com probabilidades de capturas baixas e heterogêneas (ROSENBERG et al., 1995). A análise foi implementada pelo software EstimateS (COLWELL, 2013). Foram feitas 10.000 reamostragens aleatórias com repetição.

Ainda, foi possível estabelecer, através de um mínimo polígono convexo, um indicativo da área de vida de dois indivíduos do P. N. do Iguazu que tiveram mais que três amostras genotipadas.

2.2.5 Procedimentos de modelagem da distribuição

2.2.5.1 Base de variáveis ambientais

Para gerar os modelos de distribuição da espécie, foi 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). Foram selecionadas para um teste de correlação prévio as variáveis altitude (VALERIANO, 2008), declividade, porcentagem de cobertura arbórea (HANSEN et al., 2003), densidade de drenagem (XIMENES, 2008), distância da rede de drenagem (XIMENES, 2008) e as variáveis climáticas (HIJMANS, 2005): sazonalidade de precipitação (bio15, coeficiente de variação), sazonalidade de temperatura (bio4, desvio-padrão*100), temperatura mínima no mês mais frio do ano (bio6), temperatura média anual (Bio1), variação diurna média de temperatura [Bio2, Média mensal (T_{máx}-T_{mín})], isothermalidade (Bio3, (bio2/bio7) (* 100)), temperatura média no trimestre mais frio (bio11) e precipitação anual (bio12).

Após o teste, foram escolhidas as variáveis que não eram correlacionadas ($r^2 \leq 0,8$; teste de Pearson), retirando-se bio1, bio3, bio6 e bio15. Com as variáveis que permaneceram, foi feita uma análise de componentes principais (PCA) no software PAST 3.06 (HAMMER et al., 2001), onde se notou que a variável densidade da rede de drenagem era pouco explicativa, sendo retirada do grupo restante. Por fim, o modelo foi gerado utilizando as variáveis: porcentagem de cobertura arbórea, altitude, declividade, distância da rede de drenagem, Bio2, Bio4, Bio11 e Bio 12.

2.2.5.2 Implementação do software

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 152 amostras identificadas no laboratório como sendo da espécie *M. nana*, acrescidos de 119 pontos de ocorrência originados da base de dados do NUPECCE e de outros pesquisadores, foi feita a modelagem da distribuição. Foram utilizados 70% dos pontos para “treinar” o modelo e 30% para testá-lo (PEARSON, 2007). Os pontos foram amostrados pelo método de bootstrap, com dez partições aleatórias com substituição.

A modelagem foi feita pelo software Maxent 3.3.3k (PHILLIPS et al., 2004, 2006), que utiliza apenas dados de presença da espécie e estima uma probabilidade de distribuição, encontrando a distribuição da probabilidade com a máxima entropia. O algoritmo de máxima entropia foi o único utilizado por ser considerado o mais adequado e, por isso, o mais utilizado (BALDWIN, 2009).

2.2.5.3 Avaliação dos modelos

A avaliação do modelo foi feita pela AUC (Area Under the Curve), cálculo do erro de omissão e teste binomial de duas proporções (FIELDING; BELL, 1997; ELITH et al., 2006; PEARSON, 2007; PHILLIPS; DUDÍK, 2008).

O limite de corte para se predizer a ocorrência da espécie foi realizado pelo “Minimum training presence logistic threshold”.

2.2.6 Densidade e probabilidade de ocorrência

Partindo da premissa de que a densidade de amostras fecais em uma trilha é diretamente proporcional à densidade da espécie, foi testada a correlação (Índice de Pearson) da densidade de amostras fecais encontradas nas trilhas com os valores de adequabilidade ambiental das mesmas. Para isso, foram computados quantos metros de trilhas havia em cinco classes de adequabilidade ambiental (0,0 a 0,2; 0,2 a 0,4; 0,4 a 0,6; 0,6 a 0,8 e 0,8 a 1,0) e quantas amostras fecais de *M. nana* haviam sido coletadas nessas classes. Dividindo-se o número de amostra pelo comprimento das trilhas, obteve-se a densidade em cada categoria.

Como não houve uma correlação significativa, partiu-se para uma abordagem mais teórica, que consistiu em fazer um modelo linear, baseado na reta teórica com origem na intersecção dos eixos X e Y, e que cruza o ponto onde a densidade mais baixa (1,9 ind/Km²) das duas áreas em que as abundâncias foram estimadas (Parque Nacional do Iguaçu) e a respectiva adequabilidade ambiental média dessa área amostral (0,865). Assim, foi possível estimar, de modo conservador, as densidades potenciais esperadas em todos os pixels onde o modelo previu a ocorrência da espécie, alcançando-se a total abundância potencial da espécie em sua área de distribuição e a abundância potencial da mesma dentro de áreas protegidas.

2.2.7 Determinação de áreas prioritárias para a conservação

A determinação das áreas prioritárias para a conservação foi feita estabelecendo-se duas categorias: “prioridade” e “alta prioridade”. A categoria “prioridade” contém áreas com valores de adequabilidade ambiental maiores que 0,5 e menores que 0,75. Já a categoria “alta prioridade” contém áreas com valores de adequabilidade ambiental maiores que 0,75. Ambas as categorias só levam em conta áreas do território brasileiro e externas às unidades de conservação.

2.3 Resultados

2.3.1 Modelagem de distribuição

Foram coletadas 605 amostras nas unidades de conservação amostradas, sendo 591 localizadas pelo cão farejador. Dessas, 185 eram da categoria “fresca” e 420 da categoria “não fresca”. Todas tiveram o DNA extraído e o protocolo de identificação específica (PCR/RFLP) aplicado. Foi possível identificar-se, 471 amostras, um sucesso de amplificação de 78% (Tabela 3). Quando separadas as duas categorias de idade, nota-se um sucesso de amplificação de 79% para as amostras da categoria “fresca” e de 60% para as amostras da categoria “não fresca”.

Tabela 3 – Amostras coletadas de cada espécie nas respectivas áreas com os respectivos tamanhos em hectares da unidade de conservação e a formação florestal predominante. Mn – *M. nana*; Mb – *M. bororo*; Mg – *M. gouazoubira*; Ma – *M. americana*.

Nome da área	Tamanho (ha)	Formação florestal	Total	Mn	Mb	Mg	Ma
E. E. da Mata Preta	6.566	Ombrófila Mista	182	5	0	6	147
P. E. da Serra do Tabuleiro	94.608	Ombrófila Densa	3	0	2	0	0
P. E. de Amaporã	209	Estacional Semidecidual	0	0	0	0	0
P. E. de São Camilo	387	Estacional Semidecidual	14	10	0	0	0
P. E. do Penhasco Verde	305	Ombrófila Mista	0	0	0	0	0
P. E. do Turvo	16.979	Estacional Decidual	13	2	0	0	10
P. E. Vila Rica do Espírito Santo	349	Estacional Semidecidual	124	59	0	0	0
P. N. da Serra do Itajaí	57.375	Ombrófila Densa	19	12	4	0	0
P. N. das Araucárias	12.847	Ombrófila Mista	19	10	0	6	1
P. N. do Iguaçu	169.696	Estacional Semidecidual	205	54	0	0	125
P. N. M. Morro do Finder	48	Ombrófila Densa	0	0	0	0	0
R. B. das Perobas	8.716	Estacional Semidecidual	20	0	0	0	14
R. B. do Ibicuí Mirim	567	Estacional Decidual	6	0	0	4	0
R. B. Mata Paludosa	117	Ombrófila Densa	0	0	0	0	0
TOTAL	-	-	605	152	6	16	297

Com essas informações, foi feita a modelagem de distribuição da espécie no software Maxent 3.3.3k, e o resultado do modelo médio pode ser observado na Figura 5. Foram utilizados 100 pontos, uma vez que o software Maxent só considera um ponto por km² (Figura 6).

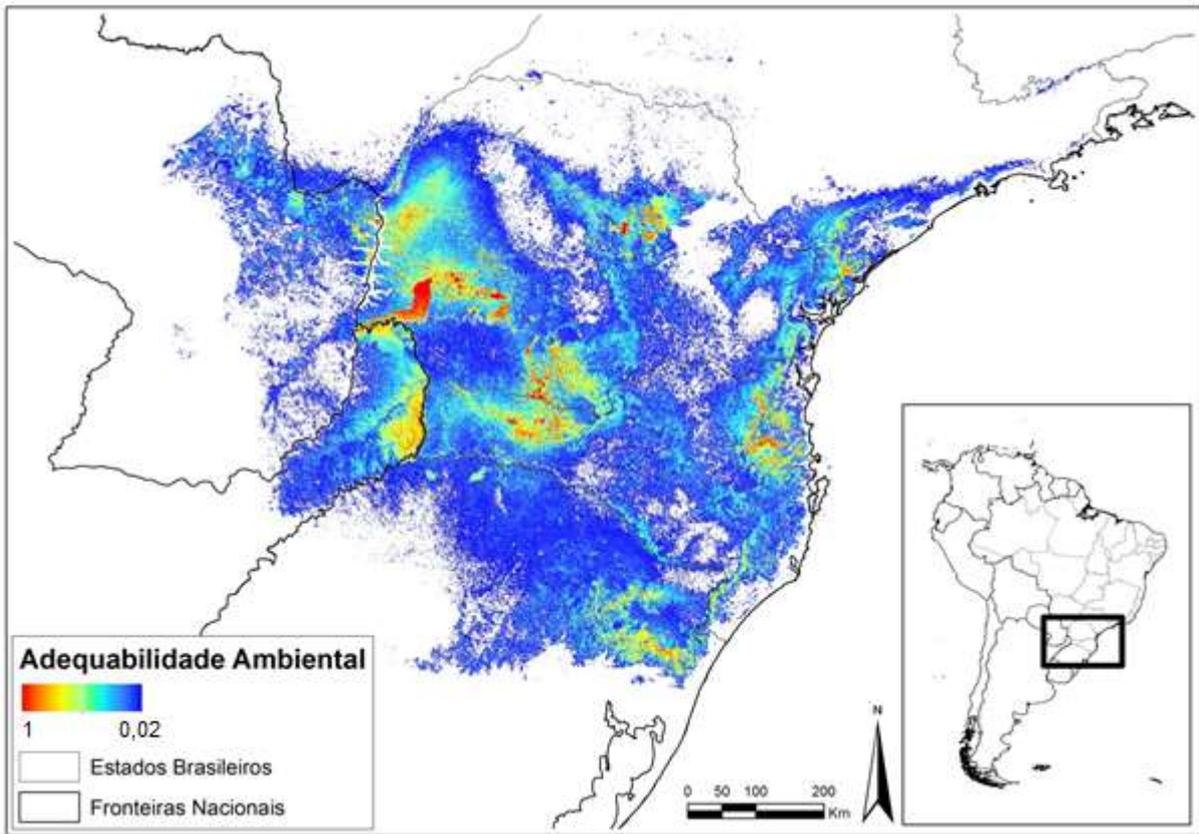


Figura 5 – Modelagem de distribuição de *Mazama nana*. Modelo de máxima entropia.

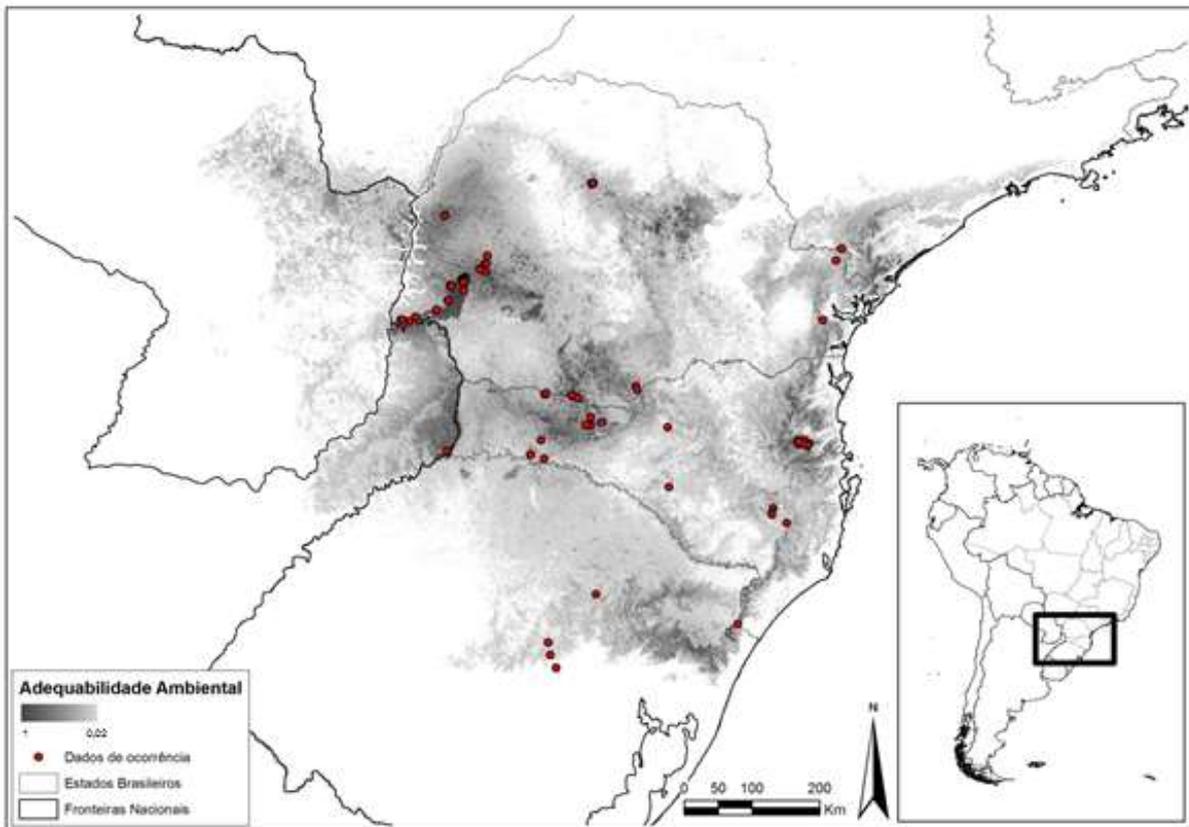


Figura 6 – Modelagem de distribuição de *Mazama nana*. Modelo de máxima entropia, com os pontos utilizados para alimentar o modelo.

Foram feitas 10 partições aleatórias dos dados, e o valor de AUC de teste externo (teste independente) médio foi de 0.943 +/- 0.009. O modelo apresentou resultado significativamente diferente do acaso ($p < 0.001$) para um teste de proporção binomial, unicaudal. O valor do erro de omissão, para o modelo médio cortado com o “Minimum training presence logistic threshold” de 0,0219; foi de 0,02.

As variáveis que mais contribuíram para o modelo foram: porcentagem de cobertura arbórea (33,7%), sazonalidade de temperatura – bio4 (28,5%) e variação diurna média de temperatura – bio2 (21,9%).

2.3.2 Áreas prioritárias para a conservação

Para a determinação de áreas prioritárias para a conservação da espécie, foram destacados os pixels com adequabilidade ambiental acima de 0,5 e 0,75 fora de unidades de conservação (Figura 7).

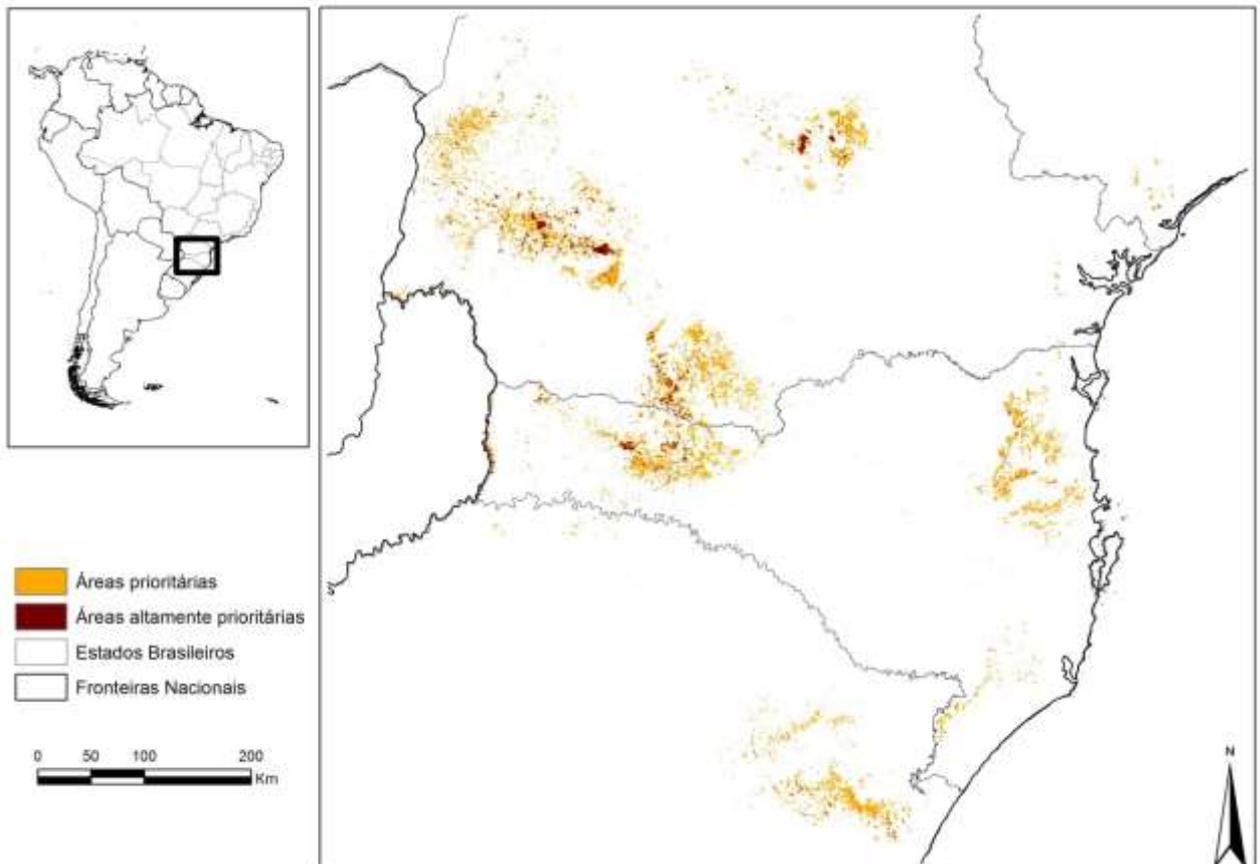


Figura 7 – Áreas prioritárias para a conservação de *Mazama nana* no Brasil, externas às unidades de conservação. Áreas em laranja e marrom apresentam respectivamente valores de adequabilidade ambiental (modelo de máxima entropia) a cima de 0,5 e 0,75.

2.3.3 Densidade

Foram coletadas com o delineamento amostral em transectos paralelos, destinado à estimativa da densidade da espécie, 80 amostras no Parque Nacional do Iguaçu e 104 amostras no Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo. No P. N. do Iguaçu, 54 amostras foram identificadas como pertencentes à espécie *M. nana* e 21 como pertencentes à *M. americana*. Já no P. E. V. R. do Espírito Santo, foram identificadas apenas amostras de *M. nana*, alcançando 39 amostras.

Após a amplificação das amostras da região norte do P. N. Iguaçu e do P. E. V. R. do Espírito Santo com os iniciadores de locos microssatélites (Tabela 4), necessários para identificação ao nível de indivíduo, foi construída uma tabela com os parâmetros genéticos da população (Tabela 5), constando a Probabilidade de identidade (P_{id}), heterozigotidade dos locos, diversidade alélica e teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg, e uma tabela com os genótipos encontrados e a classificação dos mesmos como: a) únicos na população; b) classificação ambígua; e c) iguais a outro genótipo considerado único (Tabela 6).

Tabela 4 – Caracterização dos Lócus microssatélite utilizados na espécie *Mazama nana* com o respectivo valor de “Alelic drop-out” (ADO), Amplitude dos fragmentos amplificados em pares de base, números de alelos, repetição de bases, sequencia dos iniciadores utilizados e fluorescência adicionada.

Painel de microssatélites						
Lócus	ADO	Amplitude	Alelos	Repetição	Iniciadores (5' → 3')	Fluorescência
RT09	0.06	101-115	5	GT	TGAAGTTTAATTTCCACTCT CAGTCACTTTCATCCCACAT	FAM
Goua3	0.09	98-110	3	AAAC	AGTTGGGATCCTTTAGGCTG CCTGACATCCAGGTTTCTTG	FAM
Goua7	0.09	123-147	9	CAT	GTCTGATCCAAATCTGAGGGTC TCATAGCATCCAAGGCAAATA	HEX
Goua10	0.03	100-130	8	TTG	TAGTGGGACGTTTGTGTTGTT TGGATCTTTGGAGAGGGTCTAA	FAM

Tabela 5 – Caracterização dos Locus microssatélites em cada população estudada junto ao número de amostras utilizadas (N), número de alelos, Heterozigosidades esperadas e observadas, Probabilidade de identidade (Pid) e teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE, P-val).

Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo						
Locus	N	Alelos	Heterozigosidade		Pid	HWE
			Hexp	Hobs		P-val
Goua7	7	7	0.71	0.65	0.1217	0.8149
Goua3	14	3	0.36	0.43	0.4386	1.0000
RT09	17	4	0.35	0.29	0.4440	0.1198
Goua10	14	6	0.37	0.36	0.4065	0.5230
Produto					0.0096	
Parque Nacional do Iguaçu						
Locus	N	Alelos	Heterozigosidade		Pid	HWE
			Hexp	Hobs		P-val
Goua10	2	4	0.75	1.00	-	-
Goua7	8	7	0.79	0.75	0.0682	0.1916
Goua3	2	2	0.50	1.00	-	0.4567
RT09	8	4	0.58	0.75	0.2463	1.0000
Produto					0.0168	

A abundância populacional, a densidade e a relação da densidade populacional com a densidade de amostras fecais encontram-se na Tabela 7. As áreas formadas pelos mínimos polígonos convexos de dois indivíduos foram de 42 e 47 ha (Figura 8).

Tabela 6 – Genótipos e identificação das amostras fecais de *Mazama nana* no P. N. do Iguazu e no P. E. V. R. do Espírito Santo

(continua)

Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo					
Amostra	RT09	Goua3	Goua7	Goua10	Classificação
PEVe001	105109	110110	138138	109112	
PEVe002	109109	110110	-	109124	
PEVe008	101101	-	-	-	
PEVe010	109109	106110	132138	109109	
PEVe013	109111	-	-	-	
PEVe015a	105109	98110	132135	-	
PEVe015b	105109	106110	-	-	
PEVe019	105109	110110	132132	109127	
PEVe057	109109	110110	138138	109109	Único
PEVe068	109109	110110	132144	109109	
PEVe077	109109	106110	132141	109109	
PEVe089	109109	106110	-	106109	
PEVe092	109109	98110	132132	109109	
PEVe095	109109	110110	132132	109109	
PEVe097	109109	98110	132135	127130	
PEVe100	109109	110110	132138	109109	
PEVe102	109109	110110	135138	109109	
PEVe044	-	-	132147	109124	PEVe002
PEVe069	109109	98110	-	109109	PEVe092
PEVe098	105109	98110	-	-	PEVe015a
PEVe099	-	-	135138	-	PEVe102
PEVe005	-	106110	132132	-	Ambíguo
Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo					
Amostra	RT09	Goua3	Goua7	Goua10	Classificação
PEVe049	-	-	126132	-	
PEVe052	-	-	126135	-	
PEVe053	-	-	135141	-	
PEVe062	109109	-	-	109109	
PEVe074	-	110110	-	-	
PEVe075	-	110110	-	109109	
PEVe080	105109	98110	-	109109	Ambíguo
PEVe081	-	110110	-	109109	
PEVe082	109109	110110	-	-	
PEVe086	-	110110	-	109109	
PEVe093	109109	-	-	-	
PEVe103	109109	110110	-	109109	

Tabela 6 – Genótipos e identificação das amostras fecais de *Mazama nana* no P. N. do Iguaçu e no P. E. V. R. do Espírito Santo.

(Conclusão)

Parque Nacional do Iguaçu					
Amostra	RT09	Goua3	Goua7	Goua10	Classificação
PNle006	-	106110	138138	-	Único
PNle019	105109	-	132138	-	
PNle023	105109	106110	126138	103109	
PNle026	105105	-	132138	-	
PNle050	-	-	141141	-	
PNle063	105109	-	138144	-	
PNle075	105105	-	123129	-	
PNle077	105109	-	123129	-	
PNle046	-	-	138138	-	PNle006
PNle020	105109	-	132138	-	PNle019 (Cris)
PNle021	105109	-	132138	-	
PNle025	105109	-	132138	-	
PNle036	105109	-	132138	-	
PNle048	105109	-	132138	-	
PNle068	105109	-	132138	-	
PNle027	105105	-	132138	-	PNle026 (Allyson)
PNle029	105105	-	132138	-	
PNle039	105105	-	132138	-	
PNle044	105105	-	132138	-	
PNle045	105105	-	132138	-	
PNle047	105105	-	132138	-	
PNle051	105105	-	132138	-	
PNle053	105105	-	132138	-	
PNle057	105105	-	132138	-	
PNle058	105105	-	132138	-	
PNle071	105105	-	132138	-	
PNle002	-	-	132138	-	Ambíguo
PNle003	-	106110	-	-	
PNle008	105109	106110	-	100106	
PNle010	111115	-	-	-	
PNle018	-	-	132138	-	
PNle022	-	106110	132138	-	
PNle031	-	-	132138	-	
PNle032	-	106110	-	-	
PNle033	-	-	132138	-	
PNle040	-	106110	132138	-	
PNle049	105105	-	-	-	
PNle055	105109	-	-	-	
PNle056	-	-	132138	-	
PNle061	105105	-	-	-	
PNle069	-	106110	-	-	

Tabela 7 – Abundância populacional (n) baseada em população mínima (MNKA) e Jackknife de segunda ordem (com respectivo desvio padrão, D.P.) para *Mazama nana* no P. N. do Iguaçu e no P. E. V. R. do Espírito Santo com a respectiva área amostral utilizada no cálculo da densidade (ind/km²). A densidade de amostras (amost./km) foi calculada a partir da divisão dos números de amostras encontradas pelo comprimento das trilhas percorridas em cada unidade de conservação.

	P. E. V. R. do Espírito Santo	P. N. do Iguaçu
Área amostral (ha)	349,2	494,2
MNKA (n)	17	8
Jackknife seg. ord. (n) (D.P.)	19,25 (4,77)	9,24 (2,19)
Densidade (ind/km ²)	5,5	1,9
Dens. de amostras (amost./km)	3,7	1,2
Dens./Dens. de Amostras	1,49	1,56

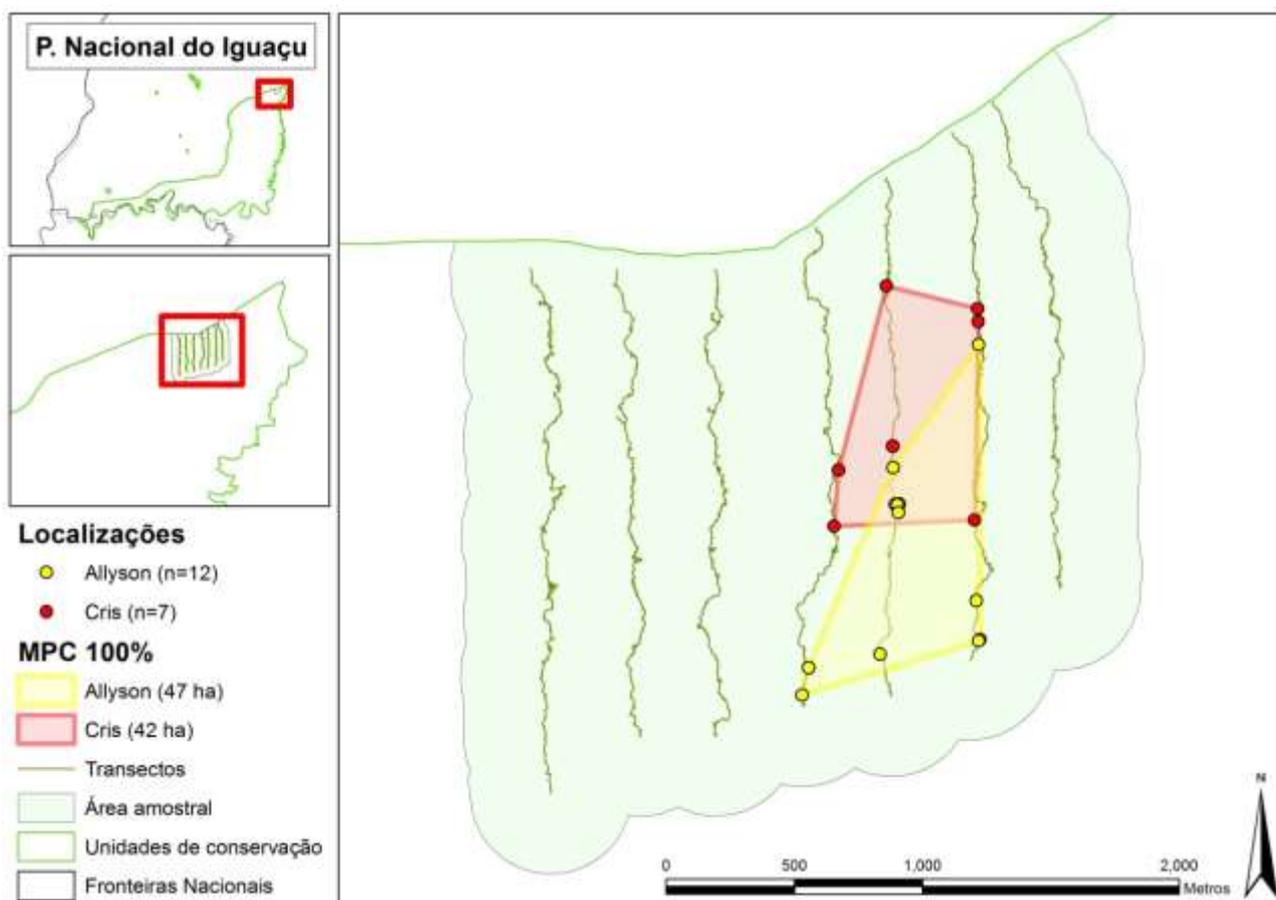


Figura 8 – Áreas de vida, utilizando a localização das amostras fecais, de dois indivíduos de *Mazama nana* no P. N. do Iguaçu.

2.3.4 Densidade e adequabilidade ambiental

Assumindo a densidade de indivíduos como sendo a densidade de amostras fecais identificadas como sendo *M. nana* multiplicado por 1,52 (Relação Densidade/Densidade de amostras), construiu-se um gráfico onde se plotou a densidade em função da adequabilidade ambiental (Figura 8). A correlação das duas variáveis foi baixa ($R = 0,24$).

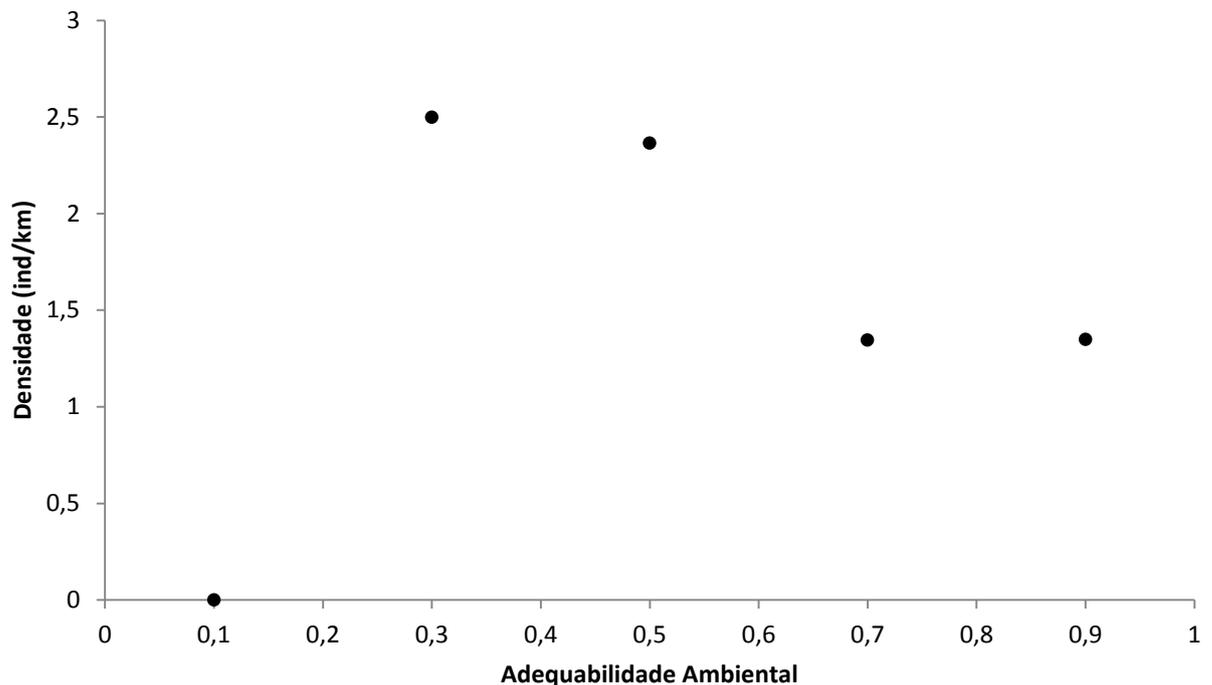


Figura 8 – Gráfico da densidade de *Mazama nana* em função da adequabilidade ambiental prevista pelo modelo de máxima entropia.

Baseado na relação teórica entre densidade e adequabilidade ambiental, construiu-se um modelo linear unindo a origem dos eixos ao ponto de densidade e adequabilidade ambiental média da área amostral no P. N. do Iguaçu (Fig. 9). A equação dessa reta ($y=2,1965x$, em que: y é a densidade, e x a adequabilidade ambiental) foi usada para determinar a densidade potencial da espécie em cada pixel de 1 km^2 onde a mesma possuía alguma probabilidade de ocorrência. A população potencial total da espécie foi de 152.991 indivíduos, sendo 15.524 indivíduos a população dentro das áreas protegidas.

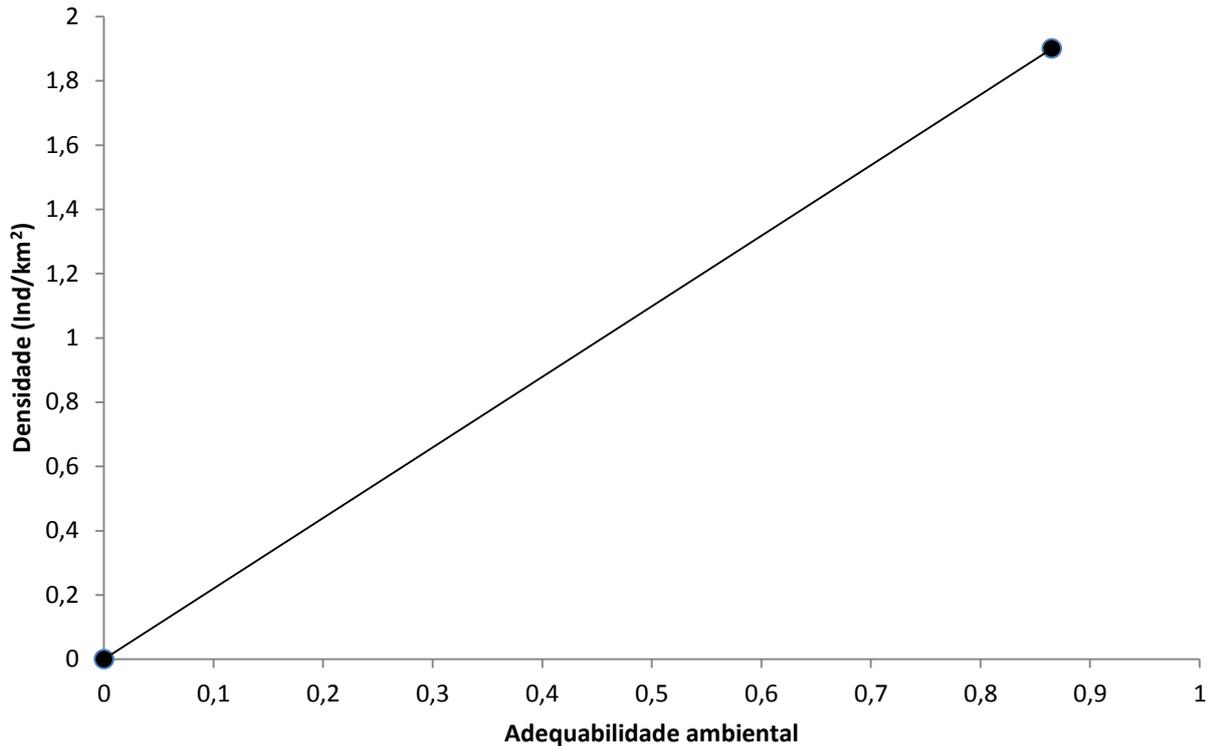


Figura 9 – Gráfico com a função teórica entre a densidade de *Mazama nana* e a adequabilidade ambiental, utilizando a área amostral no P. N. do Iguazu como um ponto da reta que cruza a origem.

2.4 Discussão

A distribuição geográfica determinada pelo modelo de máxima entropia coincide, em grande parte, com o previsto na literatura, desde Vieira (1955). A espécie, segundo os dados de adequabilidade ambiental, deve ocupar grande parte da região Sul do Brasil, exceto os campos do sul do Rio Grande do Sul, estendendo-se pela província de Misiones na Argentina, leste do Paraguai e extremo sul dos Estados brasileiros do Mato Grosso do Sul e de São Paulo. Nota-se, nessa distribuição (Fig. 5), a existência de quatro grandes regiões com alta adequabilidade ambiental, sendo elas: Serras do Nordeste do Rio Grande do Sul, Serra do Mar entre o sul de São Paulo e o nordeste de Santa Catarina, centro-nordeste do Estado do Paraná, na região de Telêmaco Borba, e, por fim, uma grande região que engloba o P. N. do Iguazu e estende-se pelo leste de Misiones e centro de Santa Catarina. É importante ressaltar que a distribuição da espécie não se estende até Minas Gerais (EISENBERG; REDFORD, 1992), abrangendo o Sudeste brasileiro (CABRERA,

1960). Ao contrário do previsto por Duarte (1996), existem fortes indícios, tanto com pontos de ocorrência quanto por alta adequabilidade ambiental prevista no modelo, de que a espécie ocupa a região leste dos Estados do Paraná e Santa Catarina, principalmente a região da Serra do Itajaí. Ainda, a espécie pode estar presente na região do extremo sul do Mato Grosso do Sul, informação mencionada por Vieira (1955), mas contestada por Duarte (1996).

A modelagem de distribuição de *M. nana* não é um fim em si mesma e, sim, um ponto de partida para novas coletas de verificação da informação prevista, tanto de presença quanto de ausência. Ainda, é preciso entender como ocorre a interação ecológica das espécies de *Mazama*, uma vez que *M. nana* foi detectada em simpatria com *M. americana*, *M. bororo* e *M. gouazoubira*. Indícios dessa interação foram propostos por Vogliotti (2008), que sugere que *M. nana* esteja em áreas de vegetação com maior densidade nos estratos inferiores e *M. americana* em áreas de florestas com estratos inferiores mais abertos. Paira a dúvida de como ocorre essa partição do hábitat entre as demais espécies e se sua atual distribuição é influenciada por uma eventual competição. Um exemplo é o sul do Estado de São Paulo, onde o modelo indica uma distribuição potencial de *M. nana*, mas, até o presente momento, só foi registrada a ocorrência de *M. bororo*, *M. gouazoubira* e *M. americana* (DUARTE²).

As variáveis que mais contribuíram para o modelo (porcentagem de cobertura arbórea, sazonalidade de temperatura e variação diurna média de temperatura) indicam a associação da espécie com áreas florestadas, com invernos mais frios e verões quentes, comuns na região Sul do Brasil. Esse tipo de informação pode ser a chave para explicar a interação com outras espécies simpátricas do gênero *Mazama*, podendo verificar-se se essas mesmas variáveis, e em que nível, determinam suas ocorrências.

Quanto às áreas prioritárias para a conservação de *M. nana*, é necessário um diagnóstico detalhado dessas regiões, onde deve ser feito o mapeamento dos remanescentes, o monitoramento das populações, a detecção de possíveis ameaças, etc. De maneira geral, devem ser feitos mais estudos para se qualificar as informações do local, viabilizar a criação de unidades de conservação e adotar medidas de precaução no licenciamento de empreendimentos.

² DUARTE, J.M.B. (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – UNESP, Jaboticabal - SP, Brasil) Comunicação pessoal, 2015.

O painel de marcadores microssatélites parece ser promissor para a distinção das amostras ao nível de indivíduo. Entretanto, faz-se necessária a prospecção e inclusão de mais alguns loci no intuito de se diminuir os valores da probabilidade de identidade para limites mais restritivos, entre 0,01 e 0,0001 (WAITS et al., 2001), uma vez que existem chances consideráveis (p.e. até 12%) de os genótipos aqui classificados como iguais aos genótipos únicos serem, na verdade, outros indivíduos. Quanto à técnica de extração e amplificação de DNA fecal, é preciso aperfeiçoar os protocolos, sendo nítida a instabilidade no comportamento das amostras frente à amplificação de réplicas e de amplificação de uma mesma amostra em diferentes loci. Ainda assim, acreditamos ser possível usar as genotipagens para se chegar a uma abundância, mesmo que mínima (número de genótipos diferentes encontrados) nas duas áreas estudadas, como realizado por Miotto et al. (2007) para pumas em unidades de conservação no cerrado.

Pela primeira vez, foi estimada a densidade de *M. nana* (1,9 a 5,5 ind/km²), evidenciando a promissora utilização da metodologia baseada na coleta de amostras fecais e posterior extração e amplificação do DNA nelas contido. Esse valor fica entre o encontrado para *M. americana* (1,0 a 6,9 ind/km²) (HURTADO-GONZÁLEZ; BODMER, 2004; BRANAN et al., 1985; JASON; EMMONS, 1990; RIVERO et al., 2004) e acima do encontrado para *M. bororo* (1,4 ind/km²) (DUARTE et al., 2005). É importante ressaltar que a baixa detectabilidade dos indivíduos, bem como os erros de identificação de espécies crípticas e noturnas podem subestimar as densidades de *M. americana* calculadas com base em censo e contagens de visualizações em transectos, com exceção do trabalho de Rivero et al. (2004) que se basearam na taxa de defecação e posterior contagem de amostras fecais. Esse último trabalho foi o que encontrou as maiores densidades (3,5 a 6,9 ind/km²), evidenciando as subestimativas dos trabalhos anteriores. Entretanto, como esses autores não identificaram as amostras fecais da maneira mais adequada, optando pela fecalometria (VOGLIOTTI, 2008), eles podem ter agrupado amostras de *M. gouazoubira* com *M. americana*, incorrendo em uma possível superestimativa.

Os valores de área de vida encontrados para *M. nana* (42 a 47 ha) parecem ficar entre os das espécies do clado vermelho do gênero *Mazama*, onde foram encontrados valores de 52,2 a 100,0 ha para *M. americana* (MARQUES; SANTOS-JÚNIOR, 2003; BODMER comunicação pessoal a VARELA et al., 2010; MAFFEI; TABER, 2003) e de 11,5 e 48,5 para *M. bororo* (VOGLIOTTI, 2003). A

estimativa do presente trabalho, devido à escassez de pontos e à concentração deles em poucos meses, muito provavelmente, está subestimada e contendo sérios vieses. Entretanto, essa estimativa é a única disponível até o momento para a espécie e pode ser usada como um valor mínimo em medidas de manejo populacional.

A baixa correlação entre a densidade de amostras fecais e a adequabilidade ambiental indica que outros fatores, além das variáveis ambientais, devem influenciar nas densidades populacionais (Figura 8). Esses fatores podem ser: a competição com espécies ecologicamente semelhantes (VOGLIOTTI, 2008; DI BITETTI et al., 2008); a predação por carnívoros de grande porte (CAVALCANTI; GESE, 2010; AZEVEDO; MURRAY, 2007); bem como efeitos estocásticos associados a populações fragmentadas (HANSKI, 1998; FRANKHAM et al., 2004). Ou, ainda, serem diretamente antrópicos, como caça, predação por animais domésticos e incidência de doenças, cujos animais domésticos sejam reservatórios.

A abundância populacional potencial da espécie obtida neste estudo (152.991 indivíduos, sendo 15.524 indivíduos dentro das áreas protegidas) é apenas um indicativo e um ponto de partida para futuros estudos, uma vez que é baseada na relação teórica entre densidade e adequabilidade ambiental (VANDERWAL et al., 2009). Esse valor parece estar em consonância com os 5.500 indivíduos estimados para *M. bororo* dentro de unidades de conservação, haja vista que essa é uma espécie com distribuição geográfica bem mais restrita que *M. nana* (DUARTE et al., 2005). Entretanto, novos experimentos devem ser feitos para determinar a relação entre a adequabilidade ambiental e a densidade, incorporar os fatores bióticos como competição e predação, e testar se essa relação se mantém dentro e fora de áreas protegidas.

Com os dados de densidade e distribuição, determinados pelo presente trabalho, e à luz dos critérios estabelecidos pela IUCN (2012), a espécie não pode ser classificada em nenhuma das categorias de ameaça de extinção. Entretanto, fica mantido o critério de declínio populacional estimado de 30 por cento ou mais, suspeitado e sem perspectiva de cessarem os impactos que estão causando essa redução (fragmentação do hábitat, caça, predação por cães, agrotóxicos e doenças adquiridas de ungulados domésticos) (DUARTE et al., no prelo).

Por fim, o presente estudo representou um avanço significativo no conhecimento sobre a distribuição e a densidade de *M. nana*, informações antes

totalmente desconhecidas pela ciência. Os resultados obtidos sugerem maiores esforços metodológicos, visando à melhora das genotipagens individuais e sexagem das amostras fecais. Fica relegado, agora, para *M. americana* citótipo Paraná (ABRIL et al., 2010), o posto de espécie de *Mazama* menos conhecido pela ciência e, talvez, a mais ameaçada de extinção.

3 CONCLUSÕES

Propõe-se a distribuição geográfica potencial de *M. nana* no Brasil, nos Estados do Paraná, Santa Catarina, norte e centro do Rio Grande do Sul, extremo sul de São Paulo e Mato Grosso do Sul, porção leste do Paraguai e, na Argentina, na província de Misiones.

A densidade de *M. nana* na região norte do Parque Nacional do Iguaçu foi de 1,9 ind/km² e no Parque Estadual Vila Rica do Espírito Santo foi de 5,5 ind/km². A área de vida da espécie variou, ao menos, entre 42 e 47 ha.

A densidade da espécie estudada, calculada a partir da densidade de amostras fecais, não se correlacionou diretamente com a adequabilidade ambiental, indicando que outros fatores devem influenciá-la.

Recomenda-se manter o estado de conservação da espécie como vulnerável, tanto na lista Brasileira, como na lista Internacional de espécies ameaçadas de extinção.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, V.V.; DUARTE, J.M.B. Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 31, n. 1, p. 53-57, 2008.
- ABRIL, V.V.; CARNELOSSI, E.A.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J.M.B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetics and Genome Research**, Würzburg, v. 128, p. 177-187, 2010.
- 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.
- AZEVEDO, F.C.C.; MURRAY, D.L. Spatial organization and food habits of jaguars (*Panthera onca*) in a floodplain forest. **Biological Conservation**, Cambridge, v. 137, p. 391-402, 2007.
- BALDWIN, R.A. Use of maximum entropy modeling in wildlife research. **Entropy**, Basel, v. 11, p. 854-866, 2009.
- 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.
- BOOM, R.; SOL, C.J.A.; SALIMANS, M.M.M.; JANSEN, C.L.; WERTHEIM-VANDILLEN, P.M.E. Rapid and simple methods for purification of nucleic acids. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 28, n. 3, p. 495-503, 1990.
- BRANAN, W.V.; WERKHOVEN, M.C.M.; MARCHINTON, R.L. Food habits of brocket and white-tailed deer in Suriname. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 49, p. 972-976, 1985.
- BRINKMAN, T.J.; SCHWARTZ, M.K.; PEARSON, D.K.; PILGRIM, K.L.; HUNDERTMARK, K.J. Effects of time and rainfall on PCR success using DNA extracted from deer fecal pellets. **Conservation Genetics**, Dordrecht, v. 11, p. 1547-1552, 2010.
- CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de America del Sur. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia", Zoología**, Mar Del Plata, v. 4, n. 2, p. 309-732, 1960.

CABRERA, A.; YEPES, J. **Mamíferos sulamericanos**. Buenos Aires: Cia Argentina de Editores, 1960. 160 p.

CAVALCANTI, S.M.C.; GESE, E.M. Kill rates and predation patterns of jaguars (*Panthera onca*) in the southern Pantanal, Brazil. **Journal of Mammalogy**, Lincoln, v. 93, n. 3, p. 722-736, 2010.

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.

COLWELL, R.K. **EstimateS**: statistical estimation of species richness and shared species from samples. Version 9: user's guide and application. 2013. Disponível em: <<http://purl.oclc.org/estimates.2013>>. Acesso em: 22 jan. 2015.

CRESPO, J.A. Ecología de la comunidad de mamíferos del P.N. Iguazú, Misiones. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales: Ecología**, Buenos Aires, v. 3, n. 2, p. 45-162, 1982.

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

DI BITETTI, M.S.; PAVIOLO, A.; FERRARI, C.A.; ANGELO, C.; DI BIANCO, Y. Differential responses to hunting in two sympatric species of brocket deer (*Mazama americana* and *Mazama nemorivaga*). **Biotropica**, Washington, v. 40, n. 5, p. 636-645, 2008.

DUARTE, J.M.B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. 1992. 153 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Jaboticabal, 1992.

_____. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. Jaboticabal: FUNEP, 1996. 14 p.

_____. **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 1998. 124 p. Tese (Doutorado em Genética) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu, 1998.

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.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J.L.; OLIVEIRA, M.L. ***Mazama nana***: the IUCN red list of threatened species. In press.

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**, Brasília, v. 3, p. 59-67, 2011.

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. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. In: WEMMER, C. **Biology and management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, 1987. p. 60-64.

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

FIELDING, A.H.; BELL, J.F. A review of methods for the assessment of prediction errors in conservation presence/absence models. **Environmental Conservation**, Cambridge, v. 24, n. 1, p. 38-49, 1997.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge: Cambridge University Press, 2004. 236 p.

GALLINA, S.; MANDUJANO, S.; BELLO, J.; ARÉVALO, H.F.L.; WEBER, M. White-tailed-deer *Odocoileus virginianus* (Zimmerman 1780). In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 101-118.

GASTON, K.J. Geographic range limits: achieving synthesis. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B**, London, v. 276, p. 1395–1406, 2009.

GIAI, A.G. **Vida de un naturalista en Misiones**. Buenos Aires: Albatros, 1976. 171 p.

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

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>. Acesso em: 29 mar. 2004.

GONZALEZ, S.; DUARTE, J.M.B.; MALDONADO, J.E. Molecular phylogenetics and evolution. In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 12-17.

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

GRINNELL, J. Field tests of theories concerning distributional control. **The American Naturalist**, Chicago, v. 51, p. 115-128, 1917.

GRUBB, P. List of deer species and subspecies. **The Journal of British Deer Society**, Hampshire, v. 8, n. 3, p. 153-155, 1990.

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

HAMMER, Ø.; HARPER, D.A.T.; RYAN, P.D. PAST: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. **Palaeontologia Electronica**, College Station, v. 4, n. 1, p. 1-9, 2001.

HANSEN, M., DEFRIES, R.S.; TOWNSHEND, J.R.G.; CARROLL, M.; DIMICELI, C.; SOHLBERG, R.A. Global percent tree cover at a spatial resolution of 500 meters: first results of the MODIS vegetation continuous fields algorithm. **Earth Interactions**, Washington, v. 7, n. 10, p. 1-15, 2003.

HANSKI, I. Metapopulation dynamics. **Nature**, London, v. 396, p. 41-49, 1998.

HIJMANS, R.J.; CAMERON, S.E.; PARRA, J.L.; JONES, P.G.; JARVIS, A. Very high resolution interpolated climate surfaces for global land areas. **International Journal of Climatology**, London, v. 25, p. 1965-1978, 2005.

HÖSS M. More about the silica method. **Ancient DNA Newsletter**, Rockville, v. 2, n. 1, p. 10-12, 1994.

HÖSS, M.; PÄÄBO, S. DNA extraction from pleistocene bones by a silica-based purification method. **Nucleic Acids Research**, Oxford, v. 21, n. 16, p. 3913-3914, 1993.

HULCE, D.; LI, X.; SNYDER-LEIBY, T.; LIU, C.J. GeneMarker® genotyping software: tools to increase the statistical power of DNA fragment analysis. **Journal of Biomolecular Techniques**, Athens, v. 22, n. 35, p. 35-36, 2011.

HURTADO-GONZÁLES, J.L.; BODMER, R.E. Assessing the sustainability of brocket deer hunting in the Tamshiyacu-Tahuayo Communal Reserve, Northeastern Peru. **Biological Conservation**, Cambridge, v. 116, n. 1, p. 1-7, 2004.

HUTCHINSON, G.E. Homage to Santa Rosalia or why are there so many kinds of animals? **The American Naturalist**, Chicago, v. 93, p. 145-159, 1959.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA – IBGE. **Mapa de vegetação do Brasil**. Rio de Janeiro. 1992.

INTERNATIONAL UNION FOR CONSERVATION OF NATURE. **Guidelines for application of IUCN red list criteria at regional and national levels**: version 4.0. Gland; Cambridge, 2012. 41 p.

JACKSON, S.T.; OVERPECK, J.T. Responses of plant populations across spatial scales. **Paleobiology**, Cambridge, v. 26, p. 194-220, 2000.

JASON, C.H.; EMMONS, L.H. Ecological structure of the non-flying mammal community at the Cosha Cashu Biological Station, Manu National Park, Peru. In: GENTRY, A. **Four Neotropical forests**, New Haven: Yale University Press, 1990. p. 314-338.

JIMÉNEZ-VALVERDE, A. Relationship between local population density and environmental suitability estimated from occurrence data. **Frontiers of Biogeography**, Oakland, v. 32, p. 59-61, 2011.

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.; 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.

KREBS, C.J. Demographic changes in fluctuating populations of *Microtus californicus*. **Ecological Monographs**, Washington, v. 36, p. 239-273, 1966.

MAFFEI, L.; TABER, A. B. Area de acción de *Mazama americana* (Cervidae) em um bosque seco de Bolivia. **Ecologia Bolivia**. La Paz, v. 38, p. 179-180, 2003.

MARQUES, S.R.; SANTOS-JÚNIOR, T.S. Mamíferos terrestres de médio e grande porte. In: ALHO, C.J.R. (Ed.). **Monitoramento da fauna silvestre do APM Manso**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2003. p. 153-177. (Relatório Técnico a Furnas Centrais Elétricas).

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.

MIOTTO, R.A.; RODRIGUES, F.P.; CIOCHETI, G.; GALETTI, P.M. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis

in two protected Cerrado areas in the Brazilian Southeast. **Biotropica**, Zurich, v. 39, p. 647-654, 2007.

OLIVEIRA, M.L.; DUARTE, J.M.B. Amplifiability of mitochondrial, microsatellite and amelogenin DNA loci from fecal samples of red brocket deer *Mazama americana* (Cetartiodactyla, Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 12, n. 1, p. 44-52, 2013.

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: an experiment in a continuous Atlantic Forest remnant. **Zoologia**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 183–186, 2012.

PAETKAU, D.; WAITS, L.P.; CLARKSON, P.L.; CRAIGHEAD, L.; VYSE, E.; WARD, R.; STROBECK, C. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. **Conservation Biology**, Cambridge, v. 12, p. 418-429, 1998.

PEARCE, J.L.; BOYCE, M.S. Modelling distribution and abundance with presence-only data. **Journal of Applied Ecology**, London, v. 43, p. 405–412, 2006.

PEARSON, R.G. **Species' distribution modeling for conservation educators and practitioners**: synthesis. American Museum of Natural History, 2007. Disponível em: <<http://ncep.amnh.org>>. Acesso em: 12 mar. 2012.

PETERSON, A.T.; SOBERÓN, J. Species distribution modeling and ecological niche modeling: getting the concepts right. **Natureza & Conservação**, São Carlos, v. 10, n. 2, p. 102-107, 2012.

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

PHILLIPS, S.J.; ANDERSON, R.P.; SCHAPIRED, R.E. Maximum entropy modeling of species geographic distributions. **Ecological Modelling**, Amsterdam, v. 190, p. 231–259, 2006.

PHILLIPS, S.J.; DUDÍK, M.; SCHAPIRE, R.E. A maximum entropy approach to species distribution modeling. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON MACHINE LEARNING, 21., 2004, New York. **Proceedings...** New York: ACM Press, 2004. p. 655–662.

PINDER, L.; LEEUWENBERG, F. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*). In: DUARTE, J.M.B. **Biologia e conservação dos Cervídeos Sul-Americanos**. Jaboticabal: FUNEP, 1997. p. 59-68.

PUTMAN, R.J. Facts from faeces. **Mammal Review**, London, v. 14, n. 2, p. 79-97, 1984.

RICKLEFS, R.E.; MILLER, G. **Ecology**. 4th ed. New York: W.H. Freeman, 1999. 896 p.

RIVERO, K.; RUMIZ, D.I.; TABER, A.B. Estimating brocket deer (*Mazama gouazoubira* and *M. americana*) abundance by dung pellet counts and other indices in seasonal Chiquitano forest habitats of Santa Cruz, Bolivia. **European Journal of Wildlife Research**, Berlin, v. 50, n. 4, p. 161-167, 2004.

RODRIGUEZ, J.P.; BROTONS, L.; BUSTAMANTE J.; SEOANE, J. The application of predictive modelling of species distribution to biodiversity conservation. **Diversity and Distributions**, Oxford, v. 13, p. 243–251, 2007.

ROSENBERG, D.K.; OVERTON, W.S.; ANTHONY, R.G. Estimation of animal abundance when captures probabilities are low and heterogeneous. **Journal of Wildlife Management**, Bethesda, v. 59, n. 2, p. 252-261, 1985.

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.

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

SMITH, D.A.; RALLS, K.; DAVENPORT, B.; ADAMS, B.; MALDONADO, J.E. Canine assistants for conservationists. **Science**, Washington, v. 291, n. 5503, p. 435, 2001.

SMITH, E.P.; VAN BELLE, G. Nonparametric estimation of species richness. **Biometrics**, Malden, v. 40, p. 119-129, 1984.

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, p. 639-641, 2013.

VALERIANO, M.M. **TOPODATA**: guia de utilização de dados geomorfométricos locais. São José dos Campos: INPE, 2008. Disponível em <<http://www.dsr.inpe.br/topodata/>>. Acesso em: 17 maio 2012.

VANDERWAL, J.; SHOO, L.P.; JOHNSON, C.N.; WILLIAMS, S.E. Abundance and the environmental niche: environmental suitability estimated from niche models predicts the upper limit of local abundance. **The American Naturalist**, Chicago, v. 174, n. 2, p. 282-291, 2009.

VARELA, D.M.; TROVATI, R.G.; GUZMÁN, K.R.; ROSSI, R.V.; DUARTE, J.M.B. Red brocket deer – *Mazama americana*. In: DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S. **Neotropical cervidology**. Jaboticabal: FUNEP, 2010. p. 151-159.

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 etnozootologia, monitoramento fotográfico e radiotelemetria.** 2003. 99 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2003.

_____. **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.

WAITS, L.P.; LUIKART, G.; TABERLET, P. Estimating the probability of identity among genotypes in natural populations: cautions and guidelines. **Molecular Ecology**, Vancouver, v. 10, p. 249-256, 2001.

WALLACE, A.R. On the zoological geography of the Malay Archipelago. **Proceedings of the Linnean Society of London**, London, v. 4, p. 172-184, 1860.

WEBB, S.D. Evolutionary history of new world deer. In: VRBA, E.S.; SCHALLER, G.B. **Antelopes, deer, and relatives: fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation.** New Haven; London: Yale University Press, 2000. p. 38-64.

XIMENES, A.C. **Mapas auto-organizáveis para a identificação de ecorregiões do interflúvio Madeira-Purus: uma abordagem da biogeografia ecológica.** 155 p. Dissertação (Mestrado em Sensoriamento Remoto) - Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais, São José dos Campos. 2008.