



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,  
BIODIVERSIDADE E CONSERVAÇÃO**

**Análise da viabilidade de amostras não-invasivas no estudo do veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) da região do Sudoeste da Bahia.**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Rebeca Ferreira Sampaio



Jequié- BA  
2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



REBECA FERREIRA SAMPAIO

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**Análise da viabilidade de amostras não-invasivas no estudo do veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) da região do Sudoeste da Bahia.**



**Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, como parte dos requisitos à obtenção do grau de Mestre em Genética, Biodiversidade e Conservação.**

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

**Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cervini**



Jequié- BA  
2016

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Sampaio, Rebeca Ferreira.

S186 Análise da viabilidade de amostras não-invasivas no estudo do veado-catingueiro (*Mazama gouzoubira*) da região do Sudoeste da Bahia/Rebeca Ferreira Sampaio.- Jequié, UESB, 2016.

53 f. il.; 30cm. (Anexos)

Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2016. Orientador: Prof. Dr. Marcelo Cervini.

1. Veado-catingueiro (região Sudoeste da Bahia) – DNA fecal 2. Veado-catingueiro (região Sudoeste da Bahia) – Marcadores moleculares 3. Conservação da natureza – DNA fecal do veado-catingueiro 4. Educação ambiental – Marcadores moleculares do veado-catingueiro I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia II. Título.

CDD – 577.34

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Ao amor e à memória da minha mãe, dedico.

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

## **Agradecimentos**

À minha Mãe (em memória) e ao meu Pai. Os agradecimentos a eles começam por ter me dado o prazer da vida e a partir daí não paro de agradecer-los nem por um segundo.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Aqui tem sido minha primeira casa desde 2008.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação pela oportunidade de desenvolver atividade de pesquisa.

À CAPES pelo auxílio financeiro.

Ao meu orientador Dr<sup>o</sup> Marcelo Cervini, pelo auxílio, ensinamentos e inspiração.

Aos professores do programa que contribuíram na minha formação.

Ao Dr<sup>o</sup> Tiquinho por todo apoio e carinho no momento mais estafante e pelo incentivo em crescer. Você apareceu para me mostrar a luz no caminho e não e deixar seguir para o lado escuro da força.

À tia Vanda e tia Leu, que estiveram ao meu lado desde criança e acreditaram no meu sucesso. São meus ídolos e fãs. Não somente laços de sangue une caminhos e sentimentos.

Aos meus tios e primos que tanto amo e sempre me perguntam por mais quanto tempo irei estudar.

À família Yarid (Sérjão, Cris, Yasmin e Laurinha).

Aos amigos, principalmente Laila, Yuri e Ismar que me dão muita força e compartilharam comigo muitos momentos difíceis e maravilhosos.

À Dr<sup>a</sup> Jamille Bitencourt, Batalha e Marcinha pelo auxílio na utilização dos programas.

À Juli, Rúbia e Tainah, que foram minhas companheiras de pesquisa e campo, e dividiram comigo a orientação utilizando amostras não invasivas.

Aos colegas do LABMOL e LABCITO pelos momentos de desesperos e risos compartilhados. A jornada não teria sido tão agradável sem meus companheiros.

Aos colegas do mestrado, principalmente Márcinha, Anselmo, Val, Jeferson, Poli e Lane.

À experiência de ter participado da organização do V Workshop de Genética, Biodiversidade e Conservação.

À Josafá Sampaio, Josafá Filho e Josué Almeida pelo auxílio nas coletas e por compartilharem comigo seus conhecimentos sobre vivencia em campo.

Aos motoristas da UESB - Valdis, Anderson, Tiago e John - pela paciência, alegria e disposição nas coletas.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



## Biografia

Bióloga, egressa no ano de 2008, na Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia – campos de Jequié, formada como licenciada no ano de 2012. Durante a graduação desenvolvi projetos de pesquisa com abelha. Inicialmente com visitação floral, e obtive bolsa de pesquisa no estudo de morfometria de asa de abelha nativa. Aprovada no mestrado em 2014, no Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação. Neste programa desenvolvo pesquisa em genética e conservação do *Mazama gouazoubira* – popularmente conhecido como veado-catingueiro, utilizando amostras não-invasivas, sob a orientação do professor Dr. Marcelo Cervini.



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

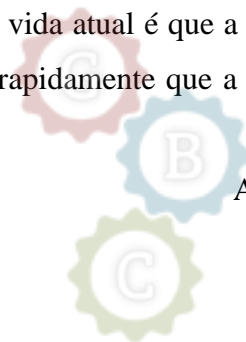
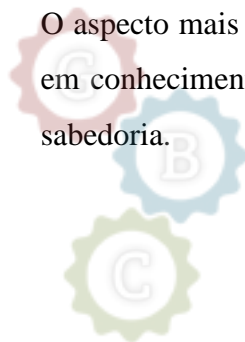


Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação



O aspecto mais triste da vida atual é que a ciência ganha em conhecimento mais rapidamente que a sociedade em sabedoria.

Asimov , Isaac



Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação





## RESUMO

O conhecimento sobre o valor da biodiversidade e dos fatores que influenciam de forma negativa na sua conservação deve ser estimado em diferentes locais e situações. Inúmeras abordagens genéticas e ecológicas devem ser empregadas para a geração do conhecimento sobre as características biológicas das espécies. O veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) é uma espécie de cervídeo com ampla distribuição no continente sulamericano. Não há informações sobre dinâmica populacional dessa espécie foram observadas na região nordeste do Brasil, com destaque para a região sudoeste do Estado da Bahia. Análise molecular utilizando amostra não-invasivas é um método empregado para esse tipo de estudo. Dessa forma, esse trabalho objetivou avaliar a eficiência em obter informações genéticas utilizando esse tipo de amostra (fezes e pelo) e de outros materiais. Setenta e cinco amostras foram coletadas em 14 pontos do sudoeste da Bahia. Foi verificada uma baixa eficiência (8,9%) na amplificação de diferentes marcadores moleculares (COI, CYTB, AMEL e IDMAZ). O mesmo foi verificado para as amostras sequenciadas (9,32%). Das amostras identificadas à nível molecular, quatro eram da espécie *Mazama gouazoubira*. O tempo de exposição das fezes às condições ambientais locais denota influenciar na eficiência nos resultados moleculares. Adequações nos protocolos devem ser realizadas para que essa metodologia apresente resultados significantes. Além da necessidade do conhecimento genético dessa espécie, a realização de palestras nas regiões de coleta das amostras, onde a caça do veado-catingueiro é cultural e rotineira, devem ser realizadas, possibilitando um maior entendimento da importância da conservação desses animais para o equilíbrio ecológico na região.

**Palavras chave: DNA fecal, marcadores moleculares, conservação, educação ambiental**





## ABSTRACT

Information about biodiversity value and the factors that influence negatively on their conservation should be estimated in different sites and situations. Numerous genetic and ecological approaches must be employed for generation of knowledge about the biological characteristics of the species. The grey brocket deer (*Mazama gouazoubira*) is a species of cervid with wide distribution in South American continent. Few information of population dynamics of this species were observed in the northeast of Brazil, especially the southwest region of the Bahia. Molecular analysis using non-invasive sample is a methodology for this type of study. Thus, this study aimed to evaluate the efficiency in obtaining genetic information using this type of sample (feces and hair) and other materials. Seventy-five samples were collected in 14 southwestern sites of Bahia. Low efficiency (8.9%) in the amplification of different molecular markers was observed (IOC CYTB, 16S, AMEL and IDMAZ). The same was found for samples sequenced (9.32%). Samples identified molecularly four were of the species *Mazama gouazoubira*. The exposure time of feces local environmental conditions denotes influence efficiency in molecular results. Adaptations in the protocols should be made to this methodology presents significant results. Besides the need of genetic knowledge of this species, the lectures in the areas of sample collection, where hunting of grey brocket is cultural and routine, enables a greater understanding of the importance of conservation of these animals for the ecological balance in the region.

**Keywords: fecal DNA, molecular markers, conservation, environmental education**



## Índice de figuras

Figura 1. Macho de <i>Mazama gouazoubira</i> em estúdio. ....	18
Figura 2. Mapa da America do Sul destacando a distribuição de <i>Mazama gouazoubira</i> na área (em vermelho). ....	19
Figura 3. Mapa político da Bahia, com destaque para a região sudoeste. ....	24
Figura 4. Registros fotográficos de espécimes de <i>Mazama gouazoubira</i> (veados-catingueiros) em Jequié (A e B) e no Parque Nacional de Boa Nova-BA (C). ....	25
Figura 5. A: Marcas de pegadas de <i>Mazama</i> , em uma área rural de Santa Inês-BA; B: Marca de chifre deixada por <i>Mazama</i> , em uma área rural de Santa Inês-BA; C e D: Fezes de <i>Mazama</i> , encontradas no município de Cravolândia-BA. ....	26
Figura 6. Mapa do Estado da Bahia, com destaque para os locais amostrados. As cores representam as diferentes cidades (legenda a esquerda do mapa). ....	33
Figura 7. Registro fotográfico de uma carcaça de veado localizada no Parque Nacional de Boa Nova, BA. Segundo relatos de funcionários do Parque, o animal foi abatido por uma onça-parda ( <i>Puma concolor</i> ). ....	34
Figura 8. Indivíduo macho de <i>Mazama gouazoubira</i> (veado-catingueiro) cativo, no município de Lençóis-BA. ....	35
Figura 9. Fotografia do gel de agarose, evidenciando o padrão de amplificação para o gene Amelogenina. M: marcador molecular 100pb; a-d: amostras de pelos; cont.-: controle negativo. ....	37
Figura 10. Fotografia do gel de agarose, evidenciando o padrão de amplificação. M: marcador molecular 1kb plus; a-g: amostras de fezes; c-: controle negativo. ....	37
Figura 11. Árvore de <i>Neighbor-Joining</i> baseada nas seqüências de CytB de <i>Mazama gouazoubira</i> das amostras analisadas e seqüências de referência obtidas do <i>GeneBank</i> . Os valores de <i>bootstrap</i> são mostrados acima dos ramos. As amostras de <i>M. guazoubira</i> que possuem um * ao lado indica que são amostras coletadas. Os códigos ao lado do nome da espécie corresponde ao seu número de acesso no <i>GeneBank</i> . ....	39
Figura 12. Palestra sobre Biodiversidade, realizada na Escola Estadual de Cravolândia. ....	41

**Índice de tabelas**

Tabela 1. Localidades amostradas com suas respectivas coordenadas. ....24

Tabela 2. Características dos genes testados no presente estudo. Pb: pares de base.....27

Tabela 3. Localidades das coletas das amostras biológicas e suas respectivas quantidades ....32

Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

Programa de Pós-Graduação em Genética, Biodiversidade e Conservação

Genética, Biodiversidade e Conservação

## Índice de abreviaturas, siglas e símbolos

ATP6: ATP Sintase Subunidade 6

BLAST: *Basic Local Alignment Search Tool*

COI: Citocromo Oxidase Subunidade I

CytB: Citocromo B

DNA: Ácido Desoxirribonucleico

DNAm: DNA mitochondrial

dNTP: Desoxirribonucleotídeos Fosfatados

EXO-SAP: Exonuclease I, *Shrimp Alkaline Phosphatase*

GPS: *Global Positioning System*

IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

ICMBio: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade

IUCN: *International Union for Conservation of Nature*

KCl: Cloreto de Potássio

MgCl<sub>2</sub>: Cloreto de Magnésio

MMA: Ministério do Meio Ambiente

NCBI: *National Center for Biotechnology Information*

ND: NADH Desidrogenase subunidade 5

p.e.: Por Exemplo

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

Tris-HCl: Hidroximetilaminometano-ácido clorídrico

## Sumário

1. Introdução.....	14
2. Referencial teórico.....	13
2.1 Conservação da Biodiversidade.....	13
2.2 Amostras não-invasivas.....	14
2.3 Marcador Molecular.....	15
2.3.1 Marcador mitocondrial.....	16
2.4 O gênero <i>Mazama</i> .....	17
2.4.1 <i>Mazama gouazoubira</i> .....	18
3. Objetivos.....	23
3.1 Objetivos específicos.....	23
4. Material e Métodos.....	24
4.1 Área de coleta.....	24
4.2 Coleta de amostras biológicas.....	25
4.3 Extração de DNA.....	26
4.5 Identificação molecular da espécie.....	28
4.6 Purificação e Sequenciamento.....	28
4.7 Análise das sequencias.....	29
4.8 Estimativa de eficiência.....	30
4.9 Atividade de extensão em área de caça.....	30
5. Resultados e Discussão.....	32
5.1 Coletas das amostras não-invasivas.....	32
5.2 Estimativas de eficiência: Amplificação por PCR.....	36
5.2.1 Amelogenina, COI e IL-16.....	36
5.2.2 Fragmento IDMAZ.....	37
5.5 Divulgação da importância da biodiversidade em áreas de caça ilegal.....	40
6. Conclusões.....	43
7. Referencias.....	44
8. Anexo 1.....	53

## 1. Introdução

Biodiversidade pode ser contemplada como toda a variedade de ecossistemas, espécies, populações e diversidade genética de organismos vivos (Frankham *et al.*, 2012). Somos responsáveis não só pela utilização e conservação da biodiversidade, como também devemos estudar a biodiversidade e os impactos das atividades humanas - por exemplo as estimativas genéticas.

A genética da conservação busca estimar parte dessa variação, com auxílio de marcadores moleculares. Futuramente, o conhecimento adquirido por meio dessa área de pesquisa permitirá desenvolver ações práticas na conservação. Outra atividade importante é a troca de conhecimento com comunidades locais, principalmente envolvidas em situações de conflito e como a caça ilegal.

Em inúmeros municípios no sudoeste da Bahia é possível encontrar relatos de conflitos da população humana com o meio-ambiente. A caça, apesar de ilegal, é uma atividade recorrente. Dentre as espécies caçadas destaca-se o *Mazama gouazoubira*.

O *Mazama gouazoubira*, conhecido popularmente como veado-catingueiro, tem ampla distribuição na América do Sul, com ocorrência no Uruguai e Paraguai, em regiões da Argentina, Bolívia e do Brasil. No Brasil, sua ocorrência perpassa desde o litoral do Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste, não tendo registros de ocorrência na região Amazônica (Pinder & Leeuwenberg, 1997; Merino & Rossi, 2010).

Esse grupo tem características ecológicas que torna o uso de amostragem não-invasiva muito viável para obtenção de amostras biológicas. Essa metodologia mostra-se eficiente em diversas espécies de animais, entretanto ainda encontramos muitas dificuldades com Cervídeos.

Com a utilização de amostragem não-invasiva é possível obter amostras de forma indireta ou que causem o mínimo de estresse e danos à espécie coletada. Essas amostras podem ser pelos, saliva e fezes, que contém células nucleadas dos indivíduos, sendo fonte de obtenção de DNA para análises genéticas.

Apesar de ser uma técnica com inúmeras vantagens, o esforço amostral e a rápida degradação das amostras com a exposição ambiental podem comprometer a eficiência nos resultados genéticos esperado. Dessa forma, a utilização e padronização dessa metodologia pode ser necessária pelas condições climáticas locais. Com isso, as informações genéticas obtidas poderão auxiliar no maior entendimento das possíveis populações de veado-catingueiro da região sudoeste da Bahia.

## 2. Referencial teórico

### 2.1 Conservação da Biodiversidade

Biodiversidade consiste na variedade de ecossistemas, espécies, populações e diversidade genética de organismos vivos, que temos a obrigação ética de preservar. A biodiversidade destaca-se também por ser fonte de recursos (ex.: agricultura, indústria farmacêutica) e de serviços ambientais (ex.: polinização, ciclo de nutrientes), além de nos proporcionar prazer (ex.: plantas ornamentais, turismo) (Frankham *et al.*, 2012).

Entretanto, falta conhecimento e informação sobre inúmeros aspectos dos organismos e de suas relações nos diferentes ambientes. Haja vista que a conservação também visa a transferência dos conhecimentos para todas as pessoas (Callegaro, *et al.*, 2013) o que permite minimizar os problemas relacionados com o meio ambiente e como diminuir os impactos que as atividades humanas realizam nos ecossistemas (Roos & Becker, 2012). É de suma importância o amplo conhecimento sobre o papel da Biodiversidade, sendo necessário reconhecer e minimizar o impacto direto e indireto das atividades humanas (Frankham *et al.*, 2003), possibilitando a mudança na percepção do ambiente através de uma visão integradora do meio (Callegaro *et al.*, 2013).

Inúmeras são as abordagens possíveis na obtenção de informações relevante sobre diversos aspectos da biodiversidade. As metodologias de análise genética têm sido utilizadas em conjunto com diferentes abordagens científicas no entendimento da biodiversidade e as possíveis ações para a sua conservação. A utilização das análises genéticas em diferentes amostras biológicas permite gerar informações sobre diferentes aspectos na dinâmica das populações.

A região sudoeste da Bahia apresenta inúmeros problemas relacionados ao uso indevido da biodiversidade, como a degradação ambiental e a caça ilegal. Essas atividades influenciam na sobrevivência de inúmeras espécies, dificultando o entendimento dos aspectos genéticos e ecológicos dos organismos nas condições ambientais da região. Dentre as espécies que sofrem com essas atividades estão os veados-catingueiros (*Mazama gouazoubira*), sofrendo com a caça ilegal recorrente, levando a diminuição da sobrevivência na região citada.

Devido a determinadas características ecológicas (exemplo: comportamento evasivo) dessa espécie faz-se necessário aplicar metodologias alternativas para a obtenção de amostras biológicas desses animais. A utilização de amostras não-invasivas pode ser destacada como uma ferramenta útil em estudos de conservação de determinadas espécies animais.



## 2.2 Amostras não-invasivas

Para muitos grupos de animais a obtenção de amostras biológicas é de difícil acesso, tanto por conta do processo de captura ser estressante (Waits & Paetkau, 2005), quanto pelo comportamento evasivo e baixa densidade nas áreas amostradas. Dessa forma, delineamentos alternativos devem ser realizados com o objetivo de minimizar esses problemas.

Em estudos de genética da conservação a coleta de amostras biológicas utilizando técnicas não-invasivas tornaram-se uma prática eficiente (Kohn & Wayne, 1997; Waits & Paetkau, 2005; Kurose *et al.*, 2005; González & Duarte, 2007;).

Amostras não-invasiva são materiais biológicos como fezes, urina, pelos, saliva em material mastigado, penas, cascas de ovo, pele morta entre outros (Beja-Pereira *et al.*, 2009). Essas amostras contêm células nucleadas dos indivíduos estudados, sendo fonte indireta de obtenção de DNA para análise genética. Por exemplo, é possível extrair DNA de amostras fecais, devido à presença de células epiteliais do intestino do organismo (Waits & Paetkau, 2005; González & Duarte, 2007).

Esse tipo de amostragem é particularmente interessante para a Biologia da Conservação, pois podem ser utilizadas em estudos de indivíduos e populações naturais sem necessitar capturar (Taberlet & Luikart, 1999; Smith *et al.*, 2003), ou mesmo avistar o organismo de interesse (Taberlet & Luikart, 1999; Beja-Pereira *et al.*, 2009). Associado a marcadores moleculares, é possível identificar indivíduos, estimar tamanho da população e movimento individual, casos forenses, delimitação das populações, parâmetros genéticos das populações (estruturação, fluxo gênico e história demográfica, avaliação dos sistemas de acasalamento e ecologia comportamental (Beja-Pereira *et al.*, 2009).

A utilização dessa metodologia foi utilizada em inúmeros estudos em diferentes espécies de animais como chimpanzé (Morin *et al.*, 1993), urso (Wasser *et al.*, 1997), aves (Segelbacher, 2002; Horváth *et al.*, 2005; Rudnick *et al.*, 2007), raposa (Smith *et al.*, 2003), felinos (Alberts *et al.*, 2010).

Estudos com amostras não-invasiva foram realizados dentro do grupo *Mazama* sob várias perspectivas, como análises genéticas (González & Duarte, 2007; González, *et al.*, 2009; Oliveira & Duarte, 2013) e fisiológico (Chistofolletti *et al.*, 2010; Krepshi *et al.*, 2012). Tendo em vista que uma das dificuldades em trabalhar com este grupo é o comportamento evasivo (Duarte *et al.*, 2012), esse obstáculo é superado por não haver necessidade em observar ou capturar o animal, todavia ainda há outros obstáculos na utilização de amostras

não-invasivas para *Mazama* tanto na obtenção das amostras quanto nos procedimentos laboratoriais.

Estudos realizados com amostras fecais de *M. americana* permitiram a identificação molecular e sexagem de 22 amostras fecais coletadas em um fragmento com 660 hectares, no Estado de São Paulo (González *et al.*, 2009; Oliveira & Duarte, 2013). González *et al.* (2009) identificaram as espécies em 213 amostras fecais de diferentes veados (*M. bororo*, *M. gouazoubira*, *M. americana*, e *M. nana*) utilizando informações moleculares. Sendo assim, a utilização dessa metodologia associado as informações geradas pela análise de diferentes marcadores moleculares permitem o maior entendimento da história de vida e dinâmica populacional das espécies.

### 2.3 Marcador Molecular

Marcadores moleculares são regiões do DNA que informam polimorfismo entre indivíduos (Solé-Cava & Matioli, 2001) utilizado em diferentes abordagens como identificação molecular de espécies (Carmo, 2011); sexagem (Pilgrim *et al.*, 2005); estimativas da variabilidade genética dentro e entre populações (Bruford & Wayne, 1993; Frankham *et al.*, 2008; Rosa & Paiva, 2009 e Oliveira & Duarte, 2013); estudos filogenéticos (Pitra *et al.*, 2004) e filogeográficos (Gilbert *et al.*, 2006) e direcionar acasalamentos em programas de conservação (Frankham *et al.*, 2008).

Devido a essa multiplicidade de abordagens e por ser uma ferramenta capaz de caracterizar indivíduo e populações, marcadores moleculares são utilizados como ferramenta na conservação e em programas de pesquisa para várias espécies. Os marcadores permite além de medir a diversidade genética, entender a historia evolutiva das espécies (Frankham *et al.*, 2008; Oliveira & Duarte, 2013).

As particularidades e limitações de cada tipo de marcador devem ser levadas em consideração (Goossens & Bruford, 2009). Dentre os diferentes tipos, pode-se destacar os marcadores mitocondriais, autossômicos e sexuais.

### 2.3.1 Marcador mitocondrial

Os primeiros estudos utilizando marcador mitocondrial são da década de 70 em estudos de evolução animal (Moritz, 2006; Wilson *et al.*, 1985). Características genéticas e estruturais tornam a mitocôndria peculiar e interessante em estudos de estrutura populacional, relações filogenéticas, e entendimento sobre aspectos biológicos e evolutivos das espécies (Arias *et al.*, 2003; Brown *et al.*, 1982; Moritz *et al.*, 1987; Gissi, 2008; Galtier *et al.*, 2009).

Dentre as características que tornam esse marcador peculiar destaca-se o genoma pequeno e geralmente circular; é universalmente distribuído pelo reino animal; na maioria dos casos possui herança uniparental, com muitas cópias por amostra; baixa frequência de recombinação e altas taxas evolutivas quando comparado à marcadores nucleares (Wilson *et al.*, 1985; Griffiths *et al.*, 2008; Moritz, 2006; Galtier *et al.*, 2009; Elson & Lightowers, 2006).

Alguns genes estão sendo utilizados com mais frequência, como o 16S, Citocromo C oxidase I (*COI*) e o Citocromo B (*CytB*). Os genes mitocondriais são bem conhecidos para algumas espécies. Por exemplo, para *Mazama gouazoubira* já foi sequenciado toda a mitocôndria e pode verificar que o genoma mitocondrial dessa espécie possui 16.356 pares de bases, com 13 genes codificadores de proteína, dois genes de subunidades de ribossomos, 22 RNAs de transferência e a região controle, além de sete locos de microssatélites (Caparroz *et al.*, 2015).

Estudos com *CytB* no gênero *Mazama* vem ajudando a esclarecer a historia evolutiva do complexo *Mazama americana*, separando em duas espécies distintas (Abril *et al.*, 2010). Utilizando esse mesmo gene como marcador espécie-específico em 11 espécies distintas de Cervidae foi observada que as espécies foram separadas em três clados distintos (Randi *et al.*, 1998).

A utilização desses genes mitocondriais em estudos filogenéticos são metodologias moleculares eficientes e robustas. Essa ferramenta associada a coletas eficientes de material biológico podem auxiliar no entendimento das espécies estudadas. Em um trabalho realizado com várias espécies de veado utilizando genes mitocondriais para análise de coalescência foi possível indicar que pelo menos três espécies entraram na América do Sul pelo Istmo do Panamá e com posterior intensa diversificação no início do Pleistoceno (Duarte *et al.*, 2008).

#### 2.4 O gênero *Mazama*

Este gênero está inserido na ordem dos Cetartiodactyla, que agrupa duas antigas ordens Artiodactyla e Cetacea. A antiga ordem Artiodactyla contém 247 espécies distribuídos em 10 famílias (IUCN), agrupados por duas sinapomorfias (Hassanin *et al.*, 2012). Apesar de todas essas classificações ainda serem controversas e precisam de mais dados para se tornarem mais robustas.

Dentro da família de Cervídeos Sul-americanos, as características que agrupam os *Mazama* é a presença de chifres sem ramificação nos machos, que são ciclicamente regulados por hormônios para troca e o porte médio em relação aos outros gêneros de *Mazama* (Duarte & Merini, 1997).

Atualmente são consideradas 10 espécies dentro deste gênero: *Mazama americana*, *M. borbor*, *M. bricenii*, *M. chunyi*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. pandora*, *M. rufina*, *M. temama* (IUCN). Entretanto, dados moleculares sugerem que este grupo é polifilético, sendo difícil agrupá-los, ao nível de espécie, - pela morfologia externa (Duarte & Merini, 1997). Dados moleculares e morfológicos sugerem que dentro do gênero *Mazama* tenha exemplos de convergência evolutiva (Smith 1985; Gilbert *et al.*, 2006; Duarte *et al.*, 2008).

Apesar de haver dados paleontológicos, morfológicos e comportamentais, a evolução deste gênero tem gerado inúmeras especulações. Podem ser destacadas as incertezas sobre as relações evolutivas do *Mazama*, leia-se a relação das espécies gênero e quanto a relação do gênero *Mazama* com os outros grupos (Pitra *et al.*, 2004). Estudos recentes com o gene *CytB* sugerem que o gênero *Mazama* está mais estreitamente relacionado com Odocoileinae, *Odocoileus virginianus* e *Odocoileus hemionus* (Pitra *et al.*, 2004).

A partir do sequenciamento completo do DNA mitocondrial, foi possível observar relacionamentos robustos entre os ruminantes, agrupando *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros*, *Pudupuda*, e duas espécies de *Mazama* (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) (Hassanin *et al.*, 2012). Adicionalmente, em outro estudo onde se combinou dados moleculares de quatro genes (*CO2*, *Cytb*, *LALb* e *PRKCI*) foi possível agrupar *M. gouazoubira* com *Blastocerus*, *Hippocamelus* e *Pudu* e não com as outras espécies de *Mazama* (Gilbert *et al.*, 2006).

Segundo Duarte e colaboradores (2008) os dados moleculares sugerem uma mudança no agrupamento desse gênero e a formação de dois clados separados. O primeiro clado agrupando as espécies *Mazama gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *Blastocelos dichotomus*,

*Hippocamelus bisulcus*, *H. anisensis* e *Ozotoceros bezoarticus*. O segundo clado com *M. bororo*, *M. nana*, *M. americana*, *M. temama* e o gênero *Odocoileus*.

Esses dados implicam nas incertezas acerca desse grupo, ressaltando a necessidade de revisão de todo o gênero *Mazama*, através de diferentes abordagens taxonômicas para a real compreensão desse gênero (Gilbert *et al.*, 2006).

Além das incertezas taxonômicas, a caça ilegal é um problema comumente enfrentado por esse grupo. Os veados em geral são caçados tanto por recreação quanto pelo consumo da carne. Essa atividade é comum em todo o mundo, sendo algumas espécies de *Mazama* as mais caçadas no Brasil (Robinson & Bodmer, 2012). No Estado da Bahia o veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) sofre com a degradação em suas áreas de ocorrência e com a caça ilegal (Dantas-Aguiar *et al.*, 2011).

#### 2.4.1 *Mazama gouazoubira*

O *Mazama gouazoubira* (Figura 01), também conhecido popularmente como veado-catingueiro ou veado-cinza, é caracterizado morfologicamente por ter porte médio em comparação com outras espécies do gênero, com peso variando entre 17-23 kg, e possuir orelhas grandes (Duarte & Merini, 1997).



Figura 1. Macho de *Mazama gouazoubira* em estúdio.

Fonte: Modificado de Duarte *et al.* (2012)

Possuem ampla distribuição, incluindo todo território do Uruguai e do Paraguai, regiões da Argentina, Bolívia e do Brasil. No Brasil, sua ocorrência perpassa desde o litoral do Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste, não tendo registros de ocorrência na região Amazônica (Figura 02) (Pinder & Leeuwenberg, 1997; Merino & Rossi, 2010).

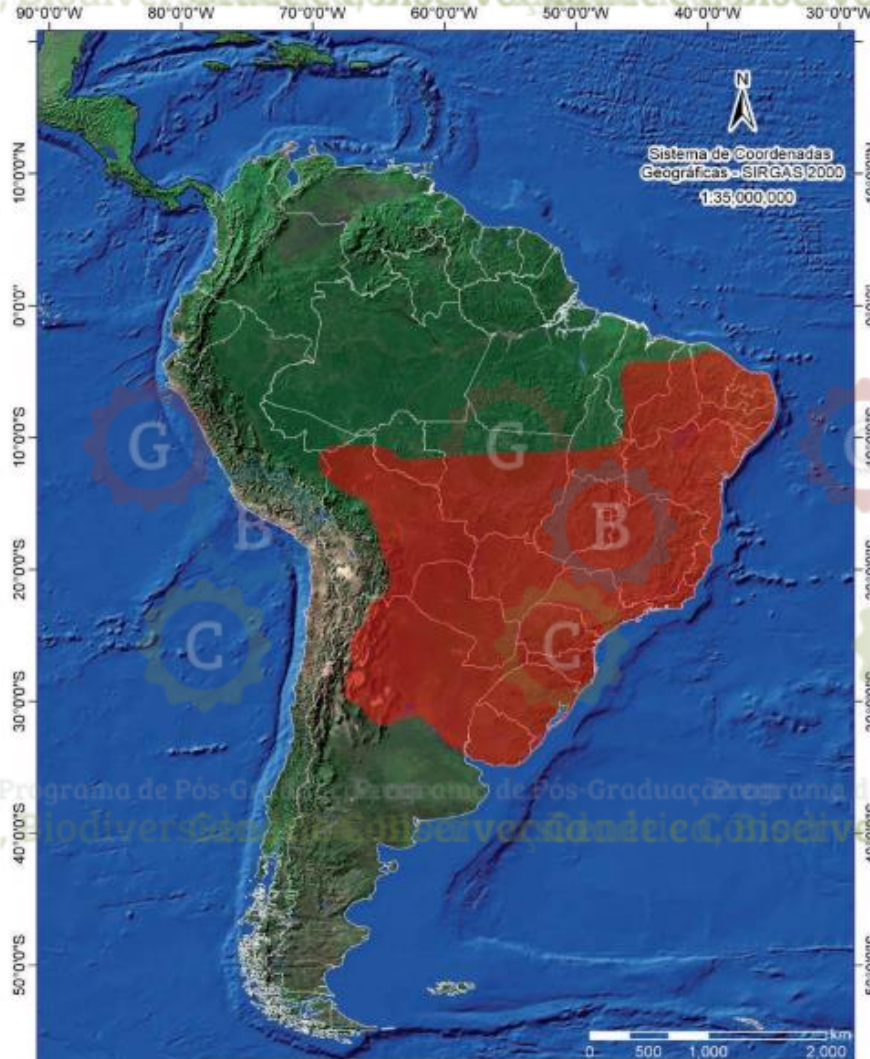


Figura 2. Mapa da America do Sul destacando a distribuição de *Mazama gouazoubira* na área (em vermelho).

Fonte: Modificado de Duarte *et al.* (2012b)

Os *M. gouazoubira* podem habitar desde floresta densa e contínua a savanas abertas, mas sempre associado e dependente de floresta para abrigo e proteção (Pinder & Leeuwenberg, 1997; Chiaravalloti *et al.*, 2010). Quando avista um possível predador os indivíduos se escondem em meio à vegetação, e, quando a fuga é eminente, o veado-

catingueiro corre por entre a vegetação, dificultando a locomoção do predador (Pinder & Leeuwenberg, 1997).

A variedade de ecossistemas ocupados pelos *M. gouazoubira* vista em sua plasticidade e a expansão demográfica e geográfica na América do Sul refletem na variação da morfologia externa como coloração do pelo e tamanho do corpo desses animais (Pinder & Leeuwenberg, 1997; Duarte *et al.*, 2008). Esses fatores também podem influenciar nos aspectos da ecologia (dieta, densidade, reprodução) e comportamento social (Pinder & Leeuwenberg, 1997).

Como reflexo da variedade de formas, sua coloração pode variar desde o cinza esverdeado até o marrom claro (Duarte & Merini, 1997). As unidades de savana possuem pelagem de coloração amarronzada, enquanto que nas unidades de florestas a coloração da pelagem é acinzentada. Já em ambiente mais árido a pelagem é mais clara relativo àqueles que habitam ambientes mais úmidos e fechados. Também possuem uma mancha clara sobre os olhos que é sujeita a variação, podendo ser conspícua, indistinta ou completamente ausente (Pinder & Leeuwenberg, 1997; Duarte & Merini, 1997).

Sua dieta é composta de partes vegetais, e pode variar de acordo com a disponibilidade de alimento (Gayot, 2004) Sendo preferencialmente composto de semente, fibras e folhas, além de flores e frutos (Bodmer, 1997).

Em *M. gouazoubira* não é possível observar um período de reprodução e nem um ciclo anual de trocas de chifres. Esses eventos podem acontecer de acordo com a disponibilidade de alimento ao longo de todo ano (Pinder & Leeuwenberg, 1997). Em período de reprodução é possível avistar grupos de animais, apesar destes possuírem hábito solitário (Pinder & Leeuwenberg, 1997; Black-Décima, 2000, Duarte *et al.*, 2012).

A área de vida pode variar de 50ha à 172ha por indivíduo (Peres, 2013), sendo sua abundância e distribuição associada a sua alimentação. Sendo assim, espera-se que a densidade em áreas de savana seja maior do que em áreas de florestas (Pinder & Leeuwenberg, 1997).

São territorialistas, sendo possível observar comportamento de marcação por sinais odoríferos e visuais ((Black-Décima, 2000; Duarte *et al.*, 2012). Os machos usam os chifres para raspar em troncos (Pinder & Leeuwenberg, 1997). Além disso, machos e fêmeas usam o depósito de urina e fezes em latrinas, para demarcar território (Pinder & Leeuwenberg, 1997; Black-Décima, 2000). O que difere no comportamento de marcação de fezes e urina entre os sexos é que os machos parecem marcar tanto dentro quanto fora de sua área central de vida. Já as fêmeas parecem marcar exclusivamente ou principalmente em suas áreas centrais (Black-Décima, 2000).

Esse grupo de cervídeo adapta-se facilmente a ambientes modificados (Duarte *et al.*, 2012) e terras cultivadas (Pinder & Leeuwenberg, 1997). Essa adaptabilidade os torna ainda mais suscetíveis a caça ilegal e a doenças transmitidas por animais domésticos (Duarte *et al.*, 2012; Pinder & Leeuwenberg, 1997).

Assim como outras espécies do gênero, *Mazama gouazoubira* sofre a pressão da caça. Os relatos de caça de *M. gouazoubira* é recorrente em toda distribuição sua na América do Sul, seja por subsistência ou esportiva, a caça traz prejuízo para as populações dessa espécie (Black-Décima *et al.*, 2010). Apesar disso, a espécie é considerada como ‘menos preocupante’ desde 2008 na lista da IUCN.

O *Mazama gouazoubira* é a espécie de cervídeo mais abundante no território brasileiro. Entretanto os conhecimentos genéticos e a dinâmica das populações nas áreas de ocorrência no nordeste brasileiro são limitados. Os trabalhos incluem dados ecológicos (Chiaravalloti *et al.*, 2010; Rodrigues *et al.*, 2014), filogenéticos (Figueirêdo, 2014) e citogenéticos (Resende, 2012; Tomazella, 2012.).

Na região sudoeste da Bahia pouca informação sobre o número de indivíduo, estudos populacionais, genéticos e ecológicos do *Mazama gouazoubira* estão disponíveis na literatura. Há trabalhos paleontológicos que registram a ocorrência desta espécie e registros fósseis de *M. gouazoubira* em dois sítios arqueológicos no estado da Bahia: na caverna Toca Fria (Iuiú, Bahia), onde foram encontrados restos de dentes do final do Holoceno (Dantas *et al.*, 2013), e no sítio arqueológico Toca do Mundinho (Iuiú, Bahia) onde foi encontrado pedaços de mandíbula sem datação (Nogueira & Barbosa, 2015).

Faz-se necessário conhecer as características genéticas e ecológicas dessa espécie para compreender seu real *status* de conservação e propor ações de conservação (Duarte *et al.*, 2012b). Sendo assim, o estudo dessa espécie na região Nordeste do Brasil, incluindo o Estado da Bahia, é de grande importância, gerando informações sobre suas características genéticas e ecológicas que permitem conhecer melhor a história de vida desses animais.

## 2.5 Características ambientais do Sudoeste Baiano

A região sudoeste da Bahia abrange 39 municípios, correspondendo a 7,5% de todo o território da Bahia. A população estimada é cerca de 1,2 milhões de habitantes (IBGE, 2007).

A vegetação no Estado da Bahia é caracterizada por uma vegetação mesófila (semidecídua), com regiões de mata atlântica, Cerrado e caatinga (Novaes *et al.*, 2008).A



vegetação no sudoeste do Estado encontra-se descaracterizado devido a substituição da mata nativa por pastagens e cultura de inúmeros vegetais. É possível verificar mudanças abruptas na vegetação, influenciando nas características climáticas e florísticas nesses ecótonos.

O clima varia entre o semi-árido e úmido com ampla variação na temperatura e na precipitação local. Essa variação pode ser observada por vários rios perenes presentes nessa região.

A agricultura e a pecuária são as principais atividades econômicas da região. Essas atividades modificaram a paisagem da região, restando poucos remanescentes florestais, geralmente restritos em regiões de maior altitude.

A região possui o Parque Nacional de Boa Nova, criado em 2010 juntamente com o Refúgio da Vida Silvestre. A região possui cerca de 15 mil hectares, preservando uma importante região de transição entre a Caatinga e a Mata Atlântica (ICMBIO, 2016).

Além da degradação do ambiente para a pecuária extensiva, inúmeras ações antrópicas afetam a biodiversidade local. A caça é uma atividade cultural na região, afetando tanto carnívoros de grande porte, como a onça-parda (*Puma concolor*) quanto inúmeros outros mamíferos da região, como a paca, tatu e o veado-catingueiro.

O Parque Nacional de Boa Nova foi criado em 2010 e tem 12.065 hectares, abrangido os municípios de Boa Nova, Dário Meira e Manuel Vitorino. Ele é intercalado pelo Refúgio da Vida Silvestre, com de 15.024 hectares. O parque esta em uma área de transição entre Caatinga e Mata Atlântica, a mata de Cipó (ICMBio, 2016).

A caça do veado-catingueiro é uma atividade comum em toda a região, Os animais são abatidos para alimentação, recreação e por se alimentarem de produtos agrícolas produzidos na região. Como agravante, a caça é uma atividade cultural, sendo realizada de forma sistêmica, apesar da legislação que criminaliza essa atividade. Devido a esse fato, é necessário a realização de palestras e cursos com temática conservacionista para os moradores das regiões onde essa prática é comum. Essas atividades extensivas são fundamentais para transferir o conhecimento dos problemas futuros que a caça pode gerar, não só nas populações de veados-catingueiros, mas em todo ecossistema local.

### 3. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo coletar amostras de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*) na região Sudoeste da Bahia e avaliar sua possível utilização em análises genéticas.

#### 3.1 Objetivos específicos

- ✓ Coletar amostras biológicas por meio de método não-invasivo;
- ✓ Quantificar a eficiência das metodologias laboratoriais para análise genética;
- ✓ Realizar a identificação molecular de espécies coletadas;
- ✓ Realizar palestras educativas sobre a conservação da biodiversidade em áreas de coleta de material biológico



de registro fotográfico de indivíduos em áreas potenciais de coleta para a otimização da amostragem (Figura 04).

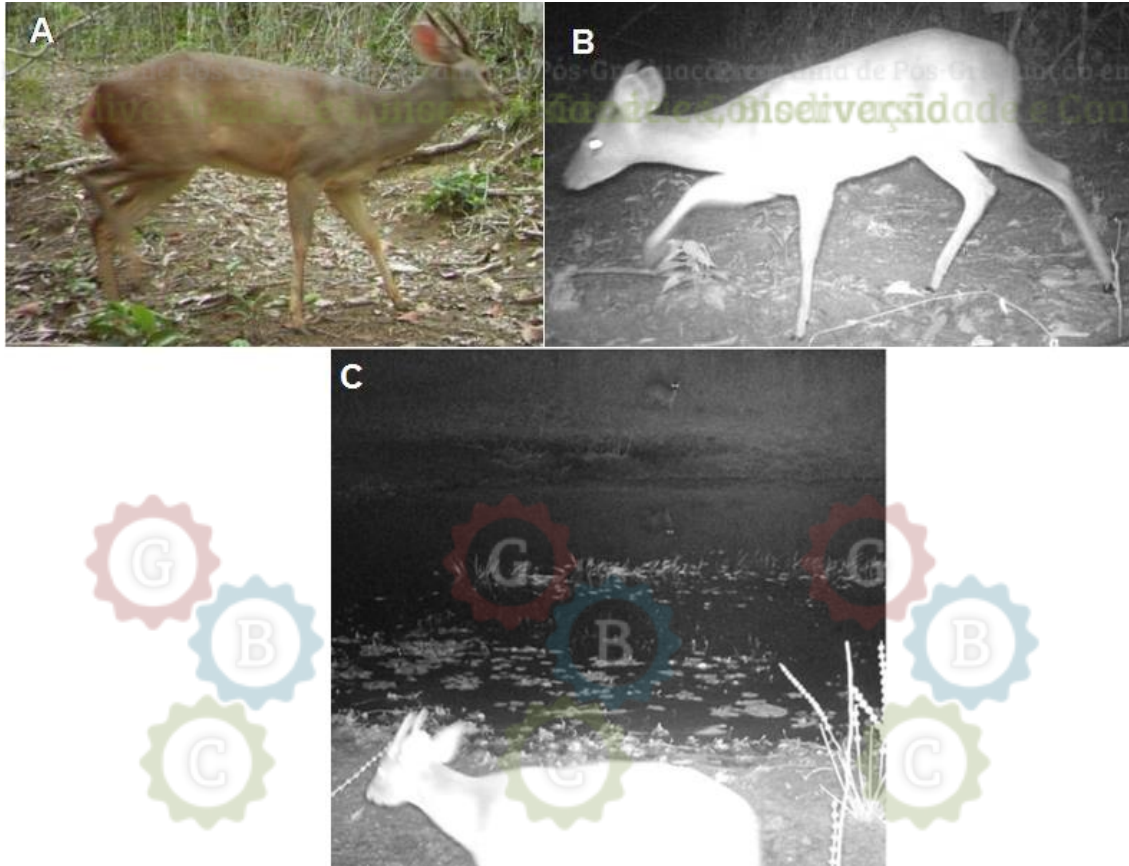


Figura 4. Registros fotográficos de espécimes de *Mazama gouazoubira* (veados-catingueiros) em Jequié (A e B) e no Parque Nacional de Boa Nova-BA (C).  
Foto: Marcelo Cervini

#### 4.2 Coleta de amostras biológicas

As coletas das amostras não-invasivas foram realizadas por busca direta e ativa, em rotas de locomoção e latrinas, identificadas a partir de rastros e registros fotográficos. Essa identificação prévia de rastros, como pegadas e marcas de chifres em troncos de árvores (marca deixada pelos machos como marcação territorial, geralmente junto com fezes) além da morfologia das fezes foram usadas como primeiras evidências para coletas (Figura 5).

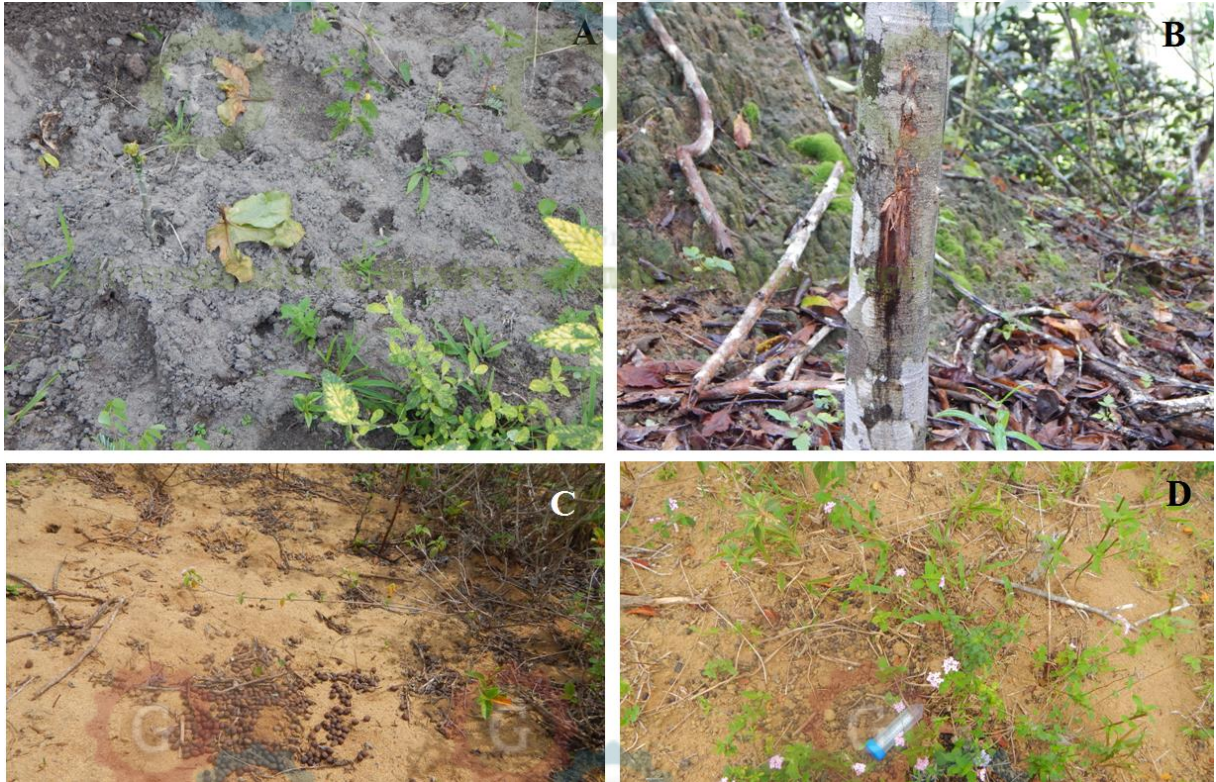


Figura 5. A: Marcas de pegadas de *Mazama*, em uma área rural de Santa Inês-BA; B: Marca de chifre deixada por *Mazama*, em uma área rural de Santa Inês-BA; C e D: Fezes de *Mazama*, encontradas no município de Cravolândia-BA.

As amostras coletadas foram armazenadas em tubos de polipropileno estéril, preenchidos com álcool absoluto e armazenadas a  $-22^{\circ}\text{C}$  para posterior extração de DNA. Os pontos de coletas foram georreferenciados com um GPS. As amostras de pelo foram coletados de restos de animais mortos encontrados nas áreas de coleta e de um espécime criado em cativeiro (Santa Inês).

Embora a abordagem do trabalho tenha sido a coleta de amostras não invasivas, também foi obtido algumas amostras de tecidos oriundos de carcaças de *M. gouazoubira* encontrados em propriedades rurais, tanto animais abatidos pela caça quanto por predação. As amostras de tecidos foram armazenadas à  $-22^{\circ}\text{C}$  em tubos estéreis com álcool absoluto.

### 4.3 Extração de DNA

A extração de DNA das amostras de fezes foi realizada com “QIAamp® Fast DNA Stool Mini Kit, seguindo o protocolo do fabricante. A extração de DNA de amostras de tecido

e pelo seguiu o protocolo de Sambrook *et al.*, (1989), com o uso de fenol-clorofórmio, seguindo de digestão com Proteinase K e precipitação com etanol.

#### 4.4 Amplificação dos genes nucleares e mitocondriais

Na tentativa de obter informações de diferentes aspectos genéticos do veado-catingueiro, foram testados genes mitocondriais, nucleares e de determinação sexual (Tabela 2).

Tabela 2. Características dos genes testados no presente estudo. Pb: pares de base.

Gene (Iniciador)	Sequência do <i>primer</i>	Tamanho do fragmento (pb)	Referência
Citocromo B (Idmaz)	5'-CATCCGACACAATAACAGCA-3'	224	González <i>et al.</i> , 2009
	5'-TCCTACGAATGCTGTGGCTA-3'		
Amelogenina (Amel)	5'-CCCGCTTGGTCTTGTCTGTT-3'	270	Pidancier <i>et al.</i> , 2006
	5'-CAGCCAAACCTCCCTCTGCC-3'		
Citocromo C oxidase subunidade I (COI)	5'-GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG-3'	600	Herbert <i>et al.</i> , 2002
	5'-TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA-3'		
Interleucina16 (Il16)	5'-CCAGGCAAGCTGTGATCGT-3'	392	Rezaei <i>et al.</i> , 2010
	5'-GAAGATCCTGTAACTGTCAGAGG-3'		

Dentre as inúmeras modificações no protocolo de amplificação dos fragmentos dos genes citados, as condições com resultados eficientes (banda com o tamanho do fragmento esperado) foram:

Para o COI: volume final de 15µL, utilizando *Buffer* 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl), MgCl<sub>2</sub> a 1,5mM, 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™), 0,5% de *tween*, 1,25 mM de dNTPs (Invitrogen™) e 10 pmol de iniciador. E temperaturas no ciclo da PCR de: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 10 segundos, 72°C por 1 minuto e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Para o fragmento do gene da Amelogenina (Amel): o volume final de 10µL, utilizando *Buffer* 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl), MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, 1U de *Taq* DNA

Polimerase (Invitrogen™), 1,5 mM de dNTPs (Invitrogen™) e 10 pmol de iniciador. E temperaturas no ciclo da PCR de: 94°C por 5 minutos; 35 ciclos a 94°C por 30 segundos, 57°C por 45 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final de 10 minutos a 72°C.

Todos os amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,2%, corado com 3µL de azul de bromofenol e 1µL GelRed. O fragmento foi visualizado e fotodocumentado com o sistema de captura L-PIX (Loccus Biotecnologia).

#### 4.5 Identificação molecular da espécie

Para a identificação da espécie proveniente das amostras coletadas foram realizados amplificação de fragmentos do gene mitocondrial *CytB*, de acordo com (González *et al*, 2006).

A PCR teve volume final de 25µL, o volume final de 10µL, utilizando *Buffer* 1X (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500mM KCl), MgCl<sub>2</sub> a 1,5 mM, 1U de *Taq* DNA Polimerase (Invitrogen™), 1,5 mM de dNTPs (Invitrogen™) e 10 pmol de iniciador. E temperaturas no ciclo da PCR de: 94°C por 3 minutos; 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 48°C por 1 minuto, 72°C por 50 segundos e extensão final de 7 minutos a 72°C.

Para a verificação de possíveis bandas inespecíficas, após cada reação de amplificação os produtos foram observados sob eletroforese em gel de agarose 1,2%, corado com 3µL de azul de bromofenol e 1µL de GelRed. O fragmento foi visualizado e fotodocumentado com o sistema de captura L-PIX (Loccus Biotecnologia).

#### 4.6 Purificação e Sequenciamento

Os produtos da PCR foram purificados com as enzimas EXO-SAP (*Exonuclease I*, *Shrimp Alkaline Phosphatase*), pois os fragmentos eram pequenos, com menos de 300pb (Bell, 2008). A reação teve 0,5µL de Exo1, 2,0µL de SAP e 5,0µL do produto de PCR (de acordo com as normas do fabricante). O programa utilizado consistiu em 50 minutos a 37° e 15 minutos a 8°.

A reação de sequenciamento foi realizada com o *Kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing* (Applied Biosystems, USA). Para a reação da *BigDye*, utilizou-se 2,0µL de tampão, 1,0µL da *BigDye*, 0,5µL de *primer* (10pmol), 5,5µL de água autoclavada e 1,0µL do

produto da purificação. O programa para a reação de sequenciamento consistiu em 1 minuto a 96°, 25 ciclos de 9°C por 30 segundos, 50°C por 15 segundos, 60°C por 4 minutos. Para a precipitação da *BigDye*, adicionou 80µL de *mix* [contendo 62,5µL de etanol 100%, 14,5µL de água autoclavada e 3,0µL de acetato de sódio (3M)] permanecendo em temperatura ambiente por 15 minutos. Posteriormente as amostras foram centrifugadas por 20 minutos (14.00rpm a 4°C). Após descarte da mistura, adiciono-se 200µL de etanol 70% gelado, centrifugando por 5 minutos (14.000rpm, a 4°C). Em seguida foi descartado a mistura. As amostras foram sequenciadas na Universidade de São Paulo (USP) utilizando sequenciador automático ABI 3730 XL DNA Analyzer (*Applied Biosystems, Foster City, California-CA*).

#### 4.7 Análise das seqüências

Para verificar a qualidade e editar as seqüências foi utilizado o programa *BioEdit SequenceAlignment Editor versão 7.1.9* (Hall, 1999) e *DNA baser v. 4.16* (Heracle BioSoft, 2013). As seqüências conjugadas foram analisadas com o programa *Mega v.6* (Tamura *et al.*, 2011).

Depois de editada, as seqüências foram comparadas, com seqüências previamente depositadas, utilizando a ferramenta *BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)*, do banco de dados da *NCBI (National Center for Biotechnology Information)* (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e então verificar homologia entre as seqüências geradas e as seqüências já depositadas no banco de dados.

As seqüências que tiveram homologia no *BLAST* também foram alinhadas com as seqüências obtidas, utilizando a ferramenta *Clustal W MultipleAlignment* do *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.1.9*. (Hall, 1999). Todas as seqüências alinhadas foram inserida no *Mega v.6* (Tamura *et al.*, 2011) no intuito de alinhar todas as seqüências, para então obter a árvore de *NeighborJoin - NJ* (Saitou e Nei, 1987) com 1000 réplicas de *bootstrap* no programa *PhyML v. 3.0*.



#### 4.8 Estimativa de eficiência

Apesar das inúmeras vantagens em utilizar fezes em estudos genéticos, o baixo sucesso na amplificação e altas taxas de erro no sequenciamento podem inviabilizar essa abordagem (Reddy *et al.*, 2012).

Sendo assim, foi estimada a eficiência na amplificação dos diferentes fragmentos dos genes já listados e do sequenciamento dos fragmentos amplificados. Entende-se por eficiência na amplificação as reações de PCR que apresentaram o fragmento com o tamanho (pb) esperado para cada gene específico. A eficiência foi calculada pelo número de amplificações eficientes dividido pelo total de amplificações realizadas - consideramos amplificações eficientes aquelas onde foi possível visualizar em gel de agarose de fragmentos de tamanho de esperado.

Já no sequenciamento foi considerado eficiente as sequências geradas (e editadas manualmente) com qualidade para posterior comparação com sequências similares disponíveis no *BLAST*.

Para otimizar o trabalho, tanto pelo custo quanto pelo tempo, é importante determinar os fatores que afetam a qualidade e quantidade de DNA da amostra e estabelecer protocolos eficientes para todas as etapas - coleta das amostras, extração de DNA e sequenciamento (Reddy *et al.*, 2012). Dessa maneira, utilizados controle positivo e negativo - o controle positivo consistia em utilizar uma amostra de DNA que recorrentemente amplificava com eficiente, o controle negativo consistia em colocar todos reagentes necessários para a PCR excetuando qualquer amostra de DNA.

#### 4.9 Atividade de extensão em área de caça

A caça de animais silvestres é uma atividade cultural na Bahia. Dessa forma, a realização de palestras ambientais em áreas onde essa atividade é comum é fundamental para a conservação da biodiversidade local. Sendo assim, foi realizada uma palestra com o tema “Biodiversidade” na Escola Estadual de Cravolândia, BA. Além de aspectos gerais da biodiversidade, foi apresentado a situação do veado-catingueiro na região e a importância de

conhecer as características dessa espécie para a sua conservação, além de discutir questões relacionados a caça e consumo desses animais na região.

A palestra foi realizada para uma turma de 28 alunos com idades entre 16 e 18 anos que vivem nas proximidades de áreas onde foram realizadas as coletas de fezes e da coleta de tecido de animais abatidos na região.

Foi aplicado um questionário (Anexo 1) para os alunos que participaram dessa atividade abordando questões relacionadas a caça na região, com a finalidade de observar o quanto natural essa atividade é do convívio dessas pessoas avaliadas.



## 5. Resultados e Discussão

### 5.1 Coletas das amostras não-invasivas

Entre Março de 2014 e Março de 2016 foram coletados um total de 57 amostras fecais 03 amostras de tecidos e 15 amostras de pelos em 7 cidades do sudoeste da Bahia, no total de 14 pontos de coletas (Tabela 3) e (Figura 6).

Tabela 3. Localidades das coletas das amostras biológicas e suas respectivas quantidades

Município	Área	Fezes	Tecidos	Pelos	Total por pontos de coleta
Boa Nova	-	6	1	1	8
Cravolândia	área a	9	0	3	12
Cravolândia	área b	1	0	1	2
Cravolândia	área c	0	0	1	1
Cravolândia	área d	0	0	1	1
Cravolândia	área e	0	1	1	2
Itiruçu	-	1	0	0	1
Jequié	-	4	1	0	5
Lafaiete Coutinho	-	3	0	0	3
Lençóis	-	1	0	1	2
Santa Inês	área a	25	0	5	30
Santa Inês	área b	1	0	0	1
Santa Inês	área c	0	0	1	1
Santa Inês	área d	6	0	0	6
<b>Total amostrado</b>		<b>57</b>	<b>3</b>	<b>15</b>	<b>75</b>

A coleta de material biológico nas áreas amostradas foi realizada por meio de busca ativa, em locais onde os animais ou seus rastros haviam sido avistados anteriormente. Essa é uma etapa custosa que envolve grande esforço amostral, pois a busca por materiais biológicos requer muita atenção em campo, tanto por conta da segurança dos pesquisadores por estarem em áreas de risco como por conta de encontrar fezes e pelos que potencialmente pertencem às espécies de interesse do estudo.

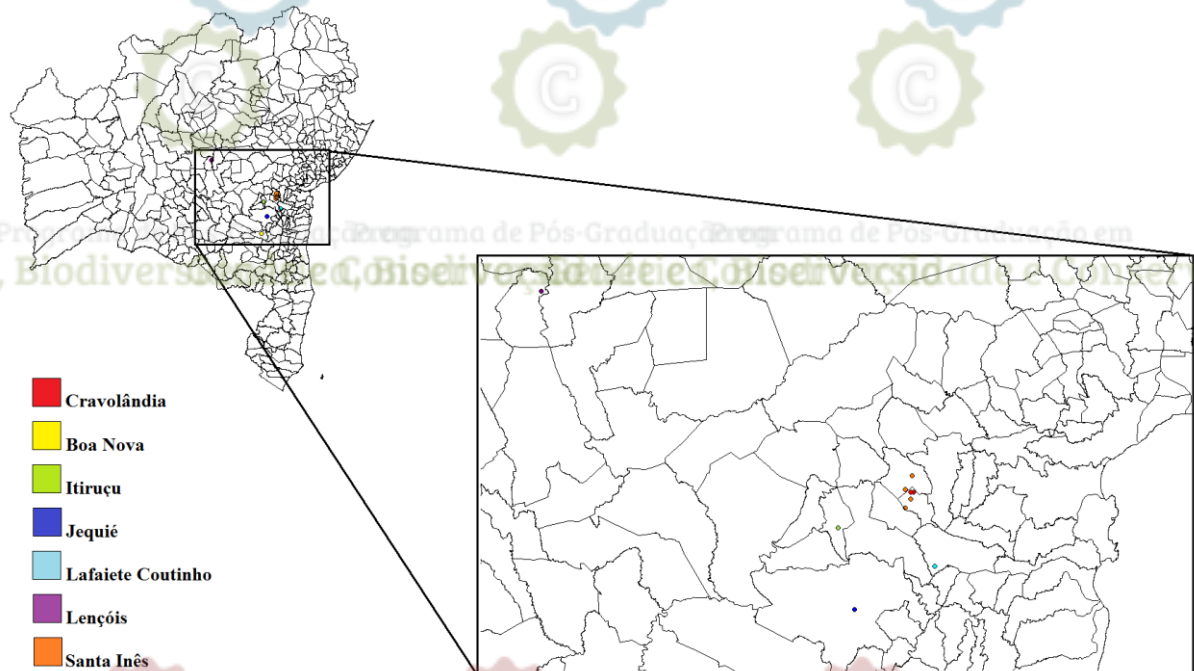


Figura 6. Mapa do Estado da Bahia, com destaque para os locais amostrados. As cores representam as diferentes cidades (legenda a esquerda do mapa).

No município de Santa Inês foi coletado o maior número de amostras fecais (54,3%). Isso pode ser explicado pelo maior conhecimento da região, visto que moradores locais conhecedores da área auxiliaram na coleta dessas amostras. A inserção de conhecedores locais é fundamental para o maior sucesso na obtenção de amostras biológicas das espécies de interesse.

No Parque Nacional de Boa Nova e em seu entorno foi possível realizar coletas com maior frequência (1 a 2 vezes por mês) e em diferentes trilhas onde já havia sido registrado a presença do veado-catingueiro. Apesar da maior frequência de busca por amostras, apenas 6 amostras de fezes foram coletadas (10,5%). O Parque possui mais de 12 mil hectares de áreas protegidas, permitindo uma grande locomoção dos animais pelas diferentes paisagens da região. Como as trilhas percorridas são pouco representativas da área total do parque, esse fator pode explicar as baixas quantidades de amostras obtidas.

Nessa mesma área foi encontrada uma carcaça de veado, sendo possível identificar parte da ossada do tórax e uma orelha, ainda com pelos (Figura 7). Segundo relatos de moradores próximos e de funcionários do parque esse animal foi abatido por uma onça-parda (*Puma concolor*) que percorre a área. Não foi possível verificar o padrão esperado em animais

abatidos por onças, visto o alto grau de decomposição do animal. Mesmo assim, esse fato mostra a importância na definição de áreas de proteção ambiental na região, permitindo a dinâmica ecológica dos animais que ali habitam.



Figura 7. Registro fotográfico de uma carcaça de veado localizada no Parque Nacional de Boa Nova, BA. Segundo relatos de funcionários do Parque, o animal foi abatido por uma onça-parda (*Puma concolor*).

Em Lençóis as amostras foram provenientes de um filhote de veado-catingueiro (Figura 8) que está sendo mantido em cativeiro por moradores locais, após o atropelamento e morte da mãe desse animal na rodovia BA144. Apesar de ser ilegal existem inúmeros registros de animais silvestres, em particular o veado-catingueiro, sendo criado por moradores como animais de estimação. Na maioria das vezes esses animais são adquiridos na natureza após a caça de animais maiores, provavelmente pais do filhote capturado. Fatos similares foram verificados em Santa Inês e Cravolândia, tanto com veado-catingueiro quanto com a Raposinha-do-Campo (*Lycalopex vetulus*) (dados pessoais).





Figura 8. Indivíduo macho de *Mazama gouazoubira* (veado-catingueiro) cativo, no município de Lençóis-BA.

Das amostras encontradas em Santa Inês, 67,74% foram coletadas na época de calor (entre os meses de Setembro a Abril). A época de chuva é durante o inverno, onde encontramos 31,26% das amostras. Em Cravolândia o padrão é o mesmo. Maior número de amostras encontradas durante o verão. O que pode explicar ter maior número de amostras em Santa Inês (apesar de serem municípios vizinhos Santa Inês e Cravolândia) é pelo os pontos de coletas em Santa Inês e Cravolândia tem paisagens diferentes. Em Santa Inês os pontos de coletas têm maior altitude, o que implica em temperaturas mais amenas.

Das amostras de tecido coletados, duas foram obtido de veados abatido na caça ilegal e comercializados para o consumo (Cravolândia e Jequié, respectivamente). A caça de veados é comum e cultural na Bahia, sendo comercializado como carne exótica em feiras e bares. Além da degradação ambiental de toda a região para a criação de bovinos e caprinos, a caça é um dos principais fatores que afetam a conservação das espécies. Diferentemente de outras espécies, os veados são caçados principalmente para o consumo, sendo uma iguaria em festas regionais e demais encontros sociais. Nesse contexto, faz-se necessário a divulgação de informações ecológicas e ambientais da com ênfase na importância da conservação das espécies e das consequências legais da caça nas áreas de ocorrência dessa atividade e do comércio da carne e derivados.

A coleta de amostras biológicas de animais que vivem em grandes áreas é um dos fatores limitantes nos estudos de conservação das espécies. Algumas metodologias alternativas a busca direta de amostras não-invasivas podem ser utilizadas para algumas espécies, como a utilização de armadilhas de pelo (útil para inúmeras espécies de carnívoros que ‘marcam’ o território com urina e fezes) e o auxílio de cães treinados na identificação de amostras fecais de determinadas espécies ou grupos (Oliveira, 2010; Olivera *et al.*, 2012; Vynne *et al.*, 2010; Dahlgren *et al.*, 2012; Smith *et al.*, 2003).

A utilização de cães na obtenção de fezes das espécies de interesse potencializou a obtenção de amostras. Essa abordagem foi utilizada em estudos com lobo-guará, onças pintada, suçuarana, tamanduá-bandeira, raposas e diferentes espécies de veados (Smith *et al.*, 2003; Vynne *et al.*, 2010; Oliveira *et al.*, 2012; DeMatteo *et al.*, 2014; Oliveira, 2015). Outra vantagem dessa metodologia é a obtenção de amostras fecais recentes. O tempo de exposição das amostras influencia na qualidade dos resultados moleculares posteriores, sendo mais eficientes dependendo de inúmeras características ambientais (Smith *et al.*, 2003; Olivera, 2010).

Deve-se ressaltar que as amostras fecais coletadas não devem ser consideradas do veado-catingueiro antes da identificação da espécie. Sendo assim, o banco de amostras deve ser totalmente avaliado para possíveis conclusões sobre a quantidade de animais nas regiões amostradas e demais conclusões genéticas e ecológicas.

Em um trabalho realizado em um fragmento de mata em São Paulo foram amostradas 59 fezes em dois meses de coletas. Porém o diferencial do trabalho foi que eles tiveram o auxílio de um cão farejador (Granada), com treinamento específico para farejar fezes de *Mazama* (Oliveira, 2010). O autor relata que o cão encontrou a maior parte das fezes (89%), em comparação com um técnico (com experiência). Das fezes encontradas pelo cão, 88,46% pertenciam à Cervídeos, sendo 35% das fezes eram frescas.

## 5.2 Estimativas de eficiência: Amplificação por PCR

### 5.2.1 Amelogenina, COI e IL-16

Apesar das inúmeras modificações nos protocolos de amplificação dos fragmentos dos genes COI e IL-16, não foram observados a amplificação desses fragmentos nas amostras de DNA extraídas. Para o gene da Amelogenina (Figura 9) três amostras de pelos foram amplificadas. Nos três casos foram identificados como machos.

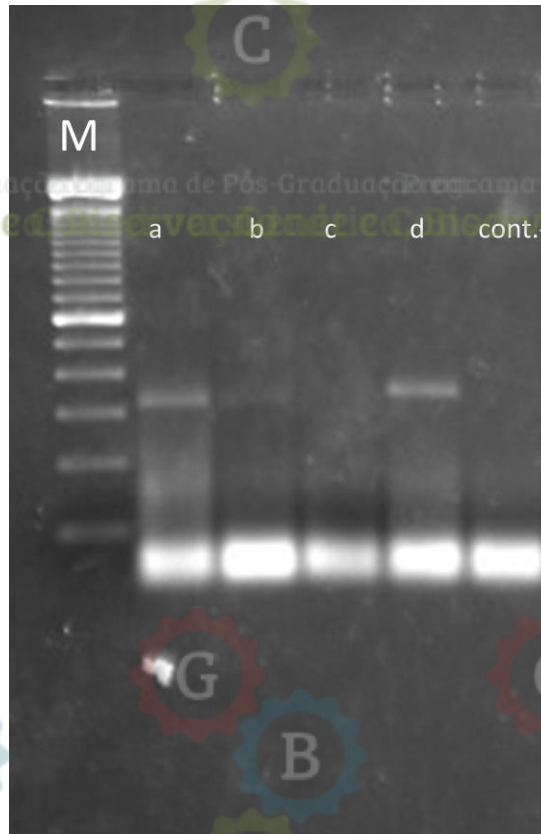


Figura 9. Fotografia do gel de agarose, evidenciando o padrão de amplificação para o gene Amelogenina. M: marcador molecular 100pb; a-d: amostras de pelos; cont.-: controle negativo.

### 5.2.2 Fragmento IDMAZ

A amplificação do fragmento IDMAZ foi descrito por González e colaboradores (2009) como uma metodologia intermediária na identificação de 4 espécies simpátricas de veados. O conjunto de iniciadores IDMAZ amplificam uma fragmento de aproximadamente 224pb.

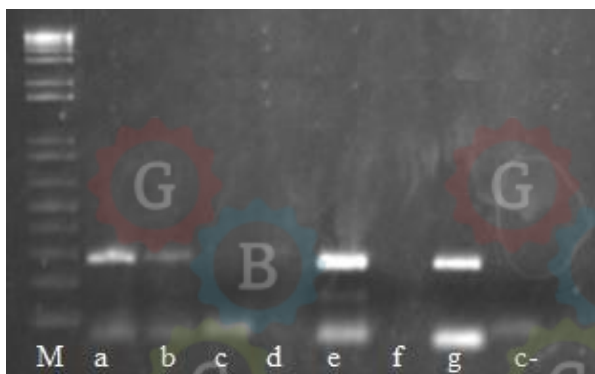


Figura 10. Fotografia do gel de agarose, evidenciando o padrão de amplificação. M: marcador molecular 1kb *plus*; a-g: amostras de fezes; c-: controle negativo.



Considerando todos os genes amplificados, o Citocromo C subunidade I (CoI - IDMAZ) foi o que apresentou maior eficiência na amplificação - 92,63% do total dos fragmentos eficientes. Entretanto, a amplificação desse fragmento foi baixa, quando calculado o valor de eficiência, somente para esse gene - somente 10% das reações foram eficientes.

O sucesso de amplificação de amostras fecais esta relacionado com fatores ambientais, inibidores presentes nas amostras e por limitações experimentais. A grande maioria dos fragmentos (marcadores mitocondriais e nucleares) utilizados nas análises genéticas devem apresentar tamanhos abaixo de 300pb. Fragmentos menores apresentam uma maior porcentagem de eficiência de amplificação que fragmentos maiores. Dentre os marcadores utilizados, todos apresentam tamanhos de amplificação esperados abaixo ou próximo do desejando, não sendo esse o fator limitante nos baixos valores de eficiência observados nesse estudo.

As principais causas da baixa eficiência nas amplificações das amostras fecais devem-se principalmente ao tempo de exposição das mesmas as condições ambientais das áreas coletadas. Quanto mais fresca, melhor a qualidade da amplificação. O DNA presente nas fezes é de baixa quantidade e qualidade, degradando ao longo do tempo (Beja-Pereira *et al*, 2009; Reddy *et al.*, 2012).

Oliveira (2010) obteve 100% de aproveitamento em amplificações de fragmentos do *CytB* em fezes frescas de *M. americana*, com taxas bem inferiores quando as amostras utilizadas ficaram expostas por mais tempo nas áreas estudadas.

Com a finalidade de construir a árvore de *Neighbor-Joining* (Figura 11), foram adicionadas sequências de *Mazama gouazoubira* depositadas no *GeneBank*, além de sequências de outras espécies relacionadas (*Mazama nemorivaga*, *Ozotoceros bezoarticu*, *Blastoceros dichotomus*) e sequências de espécies como grupo externo (*Cervus elaphus* e *Cervus canadensis*).

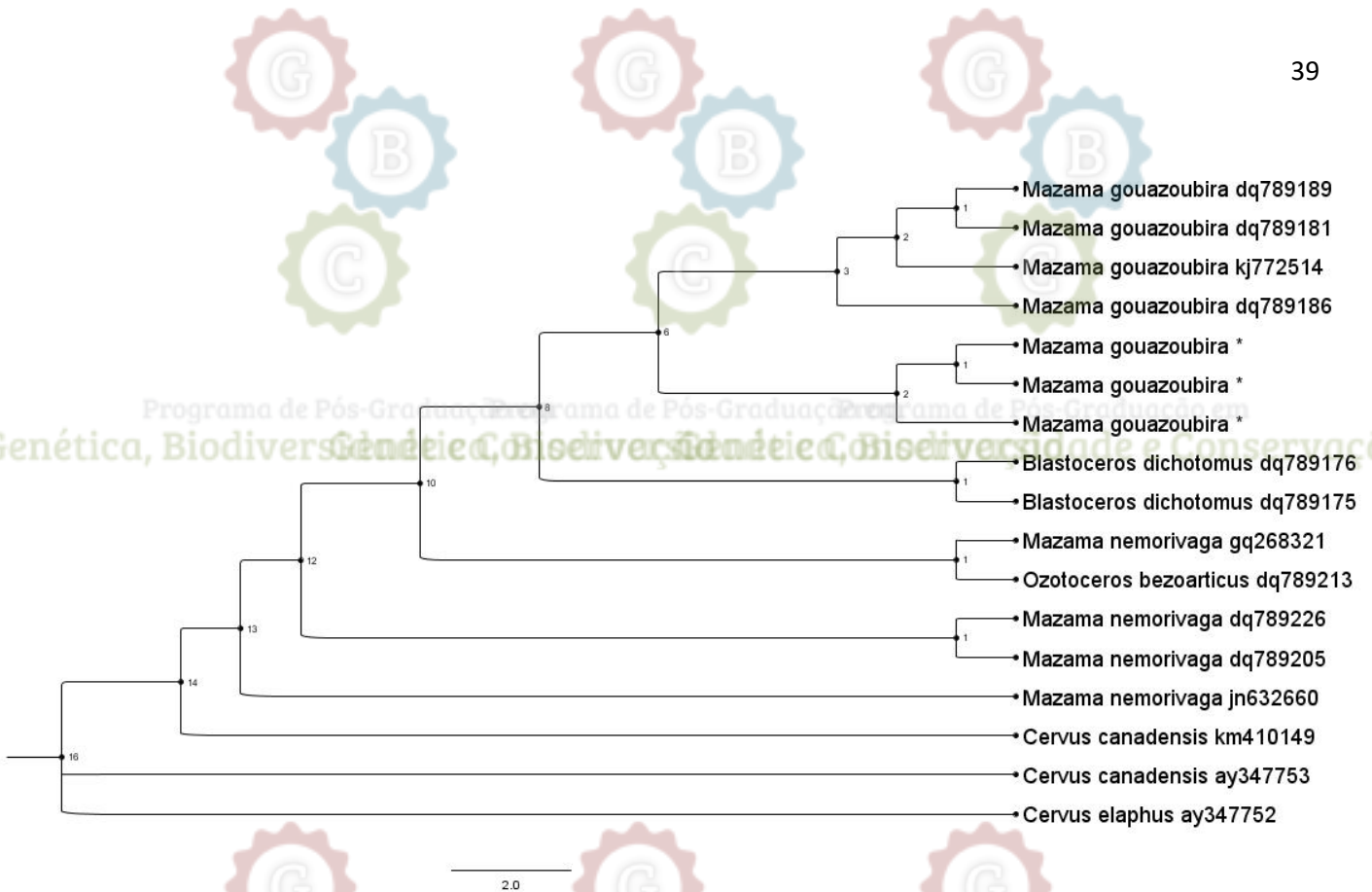


Figura 11. Árvore de *Neighbor-Joining* baseada nas seqüências de CytB de *Mazama gouazoubira* das amostras analisadas e seqüências de referência obtidas do *GeneBank*. Os valores de *bootstrap* são mostrados acima dos ramos. As amostras de *M. gouazoubira* que possuem um \* ao lado indica que são amostras coletadas pela autora. Os códigos ao lado do nome da espécie corresponde ao seu acesso no *GeneBank*.

As amostras de *M. gouazoubira* amostradas se agruparam dentro do mesmo clado e essas seqüências foram agrupadas com amostras de *M. gouazoubira* provenientes do *GeneBank*, e separadas de outra espécie do mesmo gênero (*M. nemorivaga*). Ao contrário do esperado, todas as seqüências de *M. gouazoubira* se agruparam com amostras de outro gênero (*Blastoceros dichotomus*), indicando a necessidade de revisar a sistemática dos veados.

### 5.3 Estimativas de eficiência: Sequenciamento dos fragmentos

Após a visualização em gel dos amplificadores, as amostras que resultaram em banda do tamanho esperado e sem bandas expúrias foram sequenciadas, com o objetivo de realizar a identificação molecular da espécie. Foram enviados para sequenciamento 208 fragmentos, sendo 111 de fezes, 27 de tecido e 70 de pelos. Como sugerido por Taberlet *et al.* (1996) as amostras foram enviadas em duplicata, e algumas vezes, em triplicata.

A maior parte das sequências (96%) exibiu baixa qualidade nos eletroferogramas, não sendo possível interpretar as sequências devido as sobreposições dos picogramas, além de amostras sem a presença de sequências.

Das sequências que ficaram viáveis após a edição (04%), quatro amostras foram comparadas as sequências disponíveis no NCBI, utilizando a ferramenta BLAST. Uma amostra de pelo coletado em Cravolândia apresentou homologia de 100% com *Mazama gouazoubira*. Essa amostra foi proveniente de um animal criado em cativeiro (espécie já conhecida). Duas amostras de pelo e uma amostra de fezes apresentaram 97% de homologia com *M. gouazoubira*. Essas amostras são proveniente de Santa Inês, local onde foi obtido o maior número de amostras coletadas.

A obtenção de sequências viáveis para a utilização em análises genéticas, utilizando de amostras não-invasivas é menor do que para outros tipos de amostras biológicas. Oliveira (2010) conseguiu apenas quatro sequências viáveis (com número amostral de 59) em estudos com veado-mateiro (*Mazama americana*).

### **5.5 Divulgação da importância da biodiversidade em áreas de caça ilegal**

A conscientização dos moradores de áreas rurais sobre a importância de questões ambientais é de fundamental importância para a viabilidade de programas de conservação da biodiversidade. A degradação do ambiente, a caça ilegal e a utilização não sustentável dos recursos naturais são alguns dos principais problemas que dificultam ações conservacionistas em todo o mundo.

Nesse contexto amplo, faz-se necessário divulgar, de forma menos técnica, resultados e pesquisas desenvolvidas em universidades ou demais instituições de pesquisa para os habitantes das áreas impactadas. Dessa forma é possível atingir as pessoas que interagem de maneira mais complexa na áreas sobre influência antrópica.

Uma das ações para a conservação do *Mazama gouazoubira* é justamente trabalhos de educação ambiental que foquem nos fatores de impacto (como caça) nas populações dessa espécie, com medidas mitigadoras para sua conservação (Duarte *et al.*, 2012). A transferência de conhecimento das instituições de pesquisa com a sociedade em geral são determinantes em ações concretas na conservação da biodiversidade.

Sendo assim, foi planejado uma atividade de extensão para estudantes que vivem em áreas onde a ação do homem influencia diretamente na sobrevivência de inúmeras espécies.

Como ação inicial, foi realizada uma palestra (Figura 12) sobre aspectos da Biodiversidade, com posterior aplicação de um questionário (Anexo 1) para verificar o papel da caça na vida desses estudantes em sua vida cotidiana.



Figura 12. Palestra sobre Biodiversidade, realizada na Escola Estadual de Cravolândia.

De acordo com as respostas apresentadas, 53,57% afirmaram já ter se alimentado de carne proveniente de caça. Apesar de essa atividade ser comum nessa região, todos os 28 alunos distinguiram sobre qual carne é proveniente de caça (como paca, tatu e raposa), e quais podem ser consumidas normalmente (como frango e carne bovina). Porém, dois alunos (7%) não associaram a carne de veado com a atividade de caça.

Com o intuito de compreender o histórico de caça na região e como essa atividade é cultural e comum para esses estudantes, foi observado que 89,29% dos alunos responderam que o ato de caçar é uma atividade comum no seu município. 35,71% dos estudantes possuem algum familiar que tem o hábito de caçar, e 17,86 deles já participou dessa atividade. Apesar disso, 92,86% dos alunos concordam a caça é ilegal, havendo leis que proíbem essa atividade.

A partir das respostas obtidas pelo questionário é possível observar que a caça é hábito comum no município de Cravolândia e seu entorno. Sendo uma prática histórica e familiar na

região. Porém, os jovens são os modificadores do meio, e o questionário mostrou também que muitos não são completamente de acordo com o ato da caça, concordando na ilegalidade desta. Aqui abrimos os olhos deles, de forma simples e clara, que a caça traz prejuízo ao meio e essa é a primeira etapa para uma mudança mais ampla, mesmo se a mudança ocorre localmente (no município).



## 6. Conclusões

- Foi possível coletar amostras não-invasivas (fezes) nas diferentes áreas amostradas.
- A eficiência das metodologias moleculares foi baixa na utilização das amostras, dificultando análises genéticas específicas;
- A padronização dos procedimentos de coleta e laboratoriais deve ser revistos, para que a metodologia torne viável nas condições climáticas locais;
- Foi possível realizar identificação molecular da espécie *Mazama gouazoubira* com alta confiabilidade a partir de amostras não invasivas. Porém, a eficiência dessa abordagem foi baixa, apesar de estar dentro do esperado;
- A atividade de educação ambiental junto com a pesquisa de conservação é de fundamental importância por levar a comunidade as informações e resultados das atividades de pesquisa realizadas;
- Com atividade de educação ambiental também foi possível verificar que os alunos presentes em sala ainda não possuem muita noção dos problemas relacionados a caça, mas estão começando a enxergar que esta atividade considerada cultural na sua região não é correta na sua totalidade e precisa ser repensada.

## 7. Referencias

ABRIL, V.V.; CARNELOSSI, E.A.G.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J.M.B. 2010. Elucidating the evolution of the Red Brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). *Cytogenetic and Genome Research*, vol. 128, p. 177-187.

ALBERTS, CC; RIBEIRO-PAES, JT; ARANDA-SELVERIO, G; CURSINO-SANTOS, JR; MORENO-COTULIO, VR; OLIVEIRA, ALD; PORCHIA, BFMM; SANTOS, WF & SOUZA, EB. 2010. DNA extraction from hair shafts of wild Brazilian felids and canids. *Genetics and Molecular Research*, vol. 9, no. 4, p. 2429-2435.

ARIF, IA. & KHAN, HA. 2009. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal Biodiversity and Conservation*, vol. 32, no.1, pag.9-17.

BEJA-PEREIRA, A.; OLIVEIRA, R.; ALVES, PC.; SCHWARTZ, MK. & LUIKART, G. 2009. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. *Molecular Ecology Resources*, vol. 9, p. 1279-1301.

BELL, JR. 2008. A simple way to treat PCR products prior to sequencing using ExoSAP-IT. *BioTechniques*, vol. 44, no. 6, p. 834.

BLACK-DÉCIMA, P. 2000. Home range, social structure, and scent marking behavior in Brown Brocket deer (*Mazama gouazoubira*) in a large enclosure. *Mastozoología Neotropical/J. Neotrop. Mammal*, vol. 7(1), p. 5-14.

BLACK-DÉCIMA,P; ROSSI,RV; VOGLIOTTI,A; CARTES,JL; MAFFEI,L; DUARTE,JMB; GONZÁLEZ,S & JULIÁ,JP. 2010. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814). In: Duarte JMB and González S (eds) *Neotropical Cervidology*. Funep, Jaboticabal, p. 119-132.

BODMER, R. Ecologia e conservação dos veados mateiro e catingueiro na Amazônia. In: *Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP. p. 70-77.

BROWN, W.M.; PRAGER, A.W. & WILSON, A.C. 1982. Mitochondrial DNA sequences of primates: tempo and mode of evolution. *Journal of Molecular Evolution*, vol. 18, p. 225-239.

BRUFORD, MW. & WAYNE, RK. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current opinion in Genetics and Development*, vol. 3, p. 939-943.

BUENO-SILVA, M. 2012. Molecular genetics and animal systematics: A brief history, contributions and challenges. *Estud. Biol., Ambiente Divers.* vol. 34, no. 83, pag. 157-163.

CALLEGARO, AR; GIOVELLI, J; DALL'AQUA, M; SANTOS, MZM; SANTOS, N; SOARES, BM & HANNEL, DM. 2013. Trilhas ecológicas como ferramenta nas aulas de ciências. In: VI Encontro regional sul de ensino de biologia.

CAPARROZ, R; MANTELLATTO, AMB; BERTIOLI, DJ; FIGUEIREDO, MG & DUARTE, JMB. 2015. Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 38; no. 3, p. 228-345.

CARMO, R. R. 2011. Identificação de animais silvestres de interesse criminal da fauna mato-grossense por meio de DNA mitocondrial. Guarapuava: Universidade do Centro-Oeste. Dissertação de Mestrado em Biologia Evolutiva. 86 p.

CASTILHO, CS.; MARINS-SÁ, LG.; BENEDET, RC. & FREITAS, TO. 2011. Landscape genetic of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. *Mammalian Biology*, vol. 76, p. 476-483.

CHIARAVALLOTI, RM.; TOMÁS, WM.; CAMILO, AR.; TOMAS, MA.; SANTOS, LGO.; MOZERLE, HB.; BOLZAN, A. & BODMER, R. 2010. Separação de nichos entre duas espécies simpátricas de veados do gênero *Mazama* em uma paisagem complexa no Pantanal. In: Anais do 5º Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do Pantanal. Corumbá, MS, Brasil. p. 1-5.

CHISTOFOLETTI, MD; PEREIRA, RJG & DUARTE, JMB. 2010. Influence of husbandry systems on physiological stress reactions of captive brown brocket (*Mazama gouazoubira*) and marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) noninvasive analysis of fecal cortisol metabolites. *European Journal of Wildlife Research*, v. 56, p. 561-568.



DAHLGRE, DK; ELMORE, RD; SMITH, DA; HURT, A; ARNETT, ED & CONNELLY, JW. 2012. Use of dogs in wildlife research and management. *In: Wildlife Techniques Manual*, 7ª edição, vol. 1, p. 140-153.

DeMATTEO, KE; RINAS, MA; ARGÜELLES, CF; HOLMAN, BE; BITETTI, MS; DAVENPORT, B; PARKER, PG & EGGERT, LS. 2014. Using detection dogs and genetics analyses of scat expand knowledge and assist felid conservation in Misiones, Argentina. Vol. Nov: 9, vol 5, p. 623-639.

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

DUARTE, JMB. & MERINO, ML. 1997. Taxonomia e Evolução. *In: Biologia e Conservação de Cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP. p. 2-21.

DUARTE, JMB.; VOGLIOTTI, A.; ZANETTI, E.; de OLIVEIRA, ML;TIEPOLO, LM; RODRIGUES, LF & de ALMEIDA, LB. 2012. Avaliação do risco de extinção do veado-catingueiro *Mazama gouazoubira* G. Fischer [von Waldhein], 1814, no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, vol. 1, p. 50-58.

DUARTE, JMB; BRAGA, FG; VOGLIOTTI, A; ABRIL, VV; PIOVEZAN, U; REIS, ML; RAMOS, HGC & ZANETTI, ES. 2012. Plano de ação nacional para a conservação dos cervídeos ameaçados de extinção. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, Icmbio. 128 p. b

FIGUEIREDO, MG. 2014. Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*). Universidade do Estado Paulista. Tese de Doutorado em Genética e Melhoramento Animal. 57 p.

FRANKHAM, R. 2003. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, vol. 326, p. S22-S29.

FRANKHAM, R. 2008. Fundamentos de Genética da Conservação, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 280 p.

FRANKHAM, R. 2010. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? *Conservation Genetics*, vol. 11, p. 661-663.

GALTIER, N; NABHOLZ, B; GLEMIN, S. & HURST, G. D. D. 2009. Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. *Molecular Ecology*, vol. 18, p. 4541–4550.

GAYOT, M.; HENRY, O.; DUBOST, G. & SABATIER, D. 2004. Comparative diet of the two forest cervids of the genus *Mazama* in French Guiana. *Journal of Tropical Ecology*, vol. 20(1), p. 31-43.

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

GISSI, C.; IANNELLI, F. & PESOLE G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, vol. 101, p. 301–320.

GOMPPER, ME.; KAYS, RW.; RAY, JC; LAPOINT, SD; BOGAN, DA & CRYAN, JR. 2006. A comparison of noninvasive techniques to survey carnivore communities in northeastern North America. *Wildlife Society Bulletin*, vol. 34, no 4, p. 1142-1151.

GONZÁLEZ, S & DUARTE, J.M.B. 2007. Non invasive methods for genetic analysis applied to ecological and behavioral studies in Latino-America. *Revista Brasileira de Zootecnia*, vol. 36, p. 89-92.

GRIFFITHS, AJF.; MILLER, JH. & SUZUKI, DT. 2008. *Introdução à genética*. 8ª. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 743p.

HALL, TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *NucleicAcidsSymposium Series*, vol. 41, p. 95-98.

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

HASSANIN, A.; DELSUC, F.; ROPIQUET, A.; HAMMER, C.; VUUREN, B.J.; MATTHEE, C.; RUIZ-GARCIA, M.; CATZEFLIS, F.; ARESKOU, V.; NGUYEN, T.T. & COULOUX, A. 2012. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia,

Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies*, vol. 335, p. 32-50.

HEDRICK, PW. 2004. Recent developments in conservation genetics. *Forest Ecology and Management*. vol. 197, pag.3–19.

HERBERT, PDN.; CYWINSKA, A.; Ball, SL. & de WAARD, JR. 2003. Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London B*, vol. 270, no. 1512, p. 313-321.

HORVÁTH, M.B., MARTÍNEZ-CRUZ, B.; NEGRO, J.J.; KALMÁR, L. & GODOY, J.A. 2005. An overlooked DNA source for non-invasive genetic analysis in birds. *Journal of Avian Biology*, vol. 36, p. 84-88.

Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/visitacao1/unidades-abertas-a-visitacao/2587-parque-nacional-de-boa-nova>>. Acesso em 10 de Agosto de 2016.

JOHNS, G.C. & AVISE, J.C. 1998. A comparative summary of genetic distances in the vertebrates from the mitochondrial cytochrome b gene. *Molecular Genetics and Evolution*, vol. 15, n. 11, p. 1481-1490.

KREPSCHI, VG; POLEGATO, BF; ZANETTI, ES & DUARTE, JMB. 2012. Fecal progesterins during pregnancy and postpartum periods of captive red brocket deer (*Mazama americana*). *Animal Reproduction Science*, p. 1-7.

KUROSE, N; MASUDA, R & TATARA, M. 2005. Fecal DNA analysis for identifying species and sex of sympatric carnivores: a noninvasive method for conservation on the Tsushima Islands, Japan. *Journal of Heredity*, vol. 96, no. 6, p. 688-697.

MANEL, S. & HOLDEREGGER, R. Ten years of landscape genetics. *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 28, n. 10, p. 614-621.

MERINO, M.L.; ROSSI, R.V. 2010. Origin, systematics and morphological radiation. *Neotropical Cervidology. Biology and medicine of Latin American deer*, p. 2-11.

MORIN, PA; WALLIS, J; MOORE, JJ; CHAKRABORTY, R & WOODRUFF, D. 1993. Non-invasive sampling and DNA amplification for paternity exclusion, community structure, and phylogeography in wild chimpanzees. *Primates*, vol. 34, no. 3, p. 347-356.

MORITZ, C.; DOWLING, TE. & BROWN, WM. 1987. Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, vol. 18, p. 269-292.

OLIVEIRA, ML. & DUARTE, JMB. 2013. Amplifiability of mitochondrial, microsatellite and amelogenin DNA loci from fecal samples of red brocket deer *Mazama Americana* (Cetartiodactyla, Cervidae). *Genetics and Molecular Research*, vol 12, no 1, pag 44-52.

OLIVEIRA, ML. 2010. Análise molecular de amostras fecais de uma população de veado-mateiro (*Mazama americana*) para a obtenção de informações genéticas e ecológicas. Universidade do Estado de São Paulo. Dissertação de Mestrado em Ciências.

OLIVEIRA, ML; NORRIS, D; RAMÍREZ, JFM; PERES, PHF; GALETTI, M & DUARTE, JMB. 2012. Dogs can detect scat samples more efficiently than humans: an experiment in a continuous Atlantic Forest remnant. *Zoologia*, vol. 29, no. 2, p. 183-186.

PERES, P.H.F.; GROTA-NETO, F.; PIOVEZAN, U. & DUARTE, J.M.B. Área de vida do veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*; FISHER, 1814) no Pantanal da Nhecolândia-MS. XI Congresso de Ecologia do Brasil, p. 1-3.

PIDANCIER, N; JORDAN, S; LUIKART, G & TABERLET, P. 2006. Evolutionary history of the genus *Capra* (Mammalia, Artiodactyla): Discordance between mitochondrial DNA and Y-chromosome phylogenies. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, vol. 40, p. 739-749.

PILGRIM, KL.; MCKELVEY, KS.; RIDDLE, AE & SCHWARTZ, MK. 2005. Felid sex identification based on noninvas genetic samples. *Molecular Ecology Notes*, vol. 5, p. 60-61.

PINDER, L. & LEEUWENBERG, F. 1997. Veado-catingueiro (*Mazamagouazoubira*, Fisher 1814). In: *Biologia e conservação de cervídeos Sul-Americanos: Blastocerus, Ozoceros e Mazama*. Jaboticabal. FUNEP. p. 60-66.

PITRA, C.; FICKEL, J. MEIJAARD, E & GROVES, PC. 2004. Molecular Phylogenetics and Evolution, vol. 33, p. 880-895.

POUGH, FH; JANIS, CM & HEISER, JB.2006. A vida dos vertebrados. 4ª edição: Atheneu Editora. 718 p.

RANDI, E., MUCCI, N.; PIERPAOLI, M., DOUZERY, E.J.P., 1998. New phylogenetic perspectives on the Cervidae (Artiodactyla) are provided by the mitochondrial cytochrome b gene. Proc. R. Soc. Lond, vol. 265, p. 793–801.

RESENDE, JPA. Comparação cariotípica entre *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* (artiodactyla; cervidae) por meio de marcadores citogenéticos clássicos, fish telomérica e pintura cromossômica. Universidade Estadual Paulista. Dissertação de Mestrado em Genética e Melhoramento animal. 60 p.

ROBINSON, JG & BODMER, R. 1999. Towards wildlife management intropical forests. Journal of Wildlife Management, vol. 63, no. 1, p. 1-13.

RODRIGUES, TF; CERVEIRA, JF & DUARTE, JMB. 2014. Uso de áreas agrícolas por *Mazama gouazoubira* (Mammalia, Cervidae) no Estado de São Paulo. Série Zoologia, v. 104, no. 4, p. 439-445.

ROSA, AJM. & PAIVA, SR. 2009. Marcadores moleculares e suas aplicações em estudos populacionais de espécies de interesse zootécnico. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. 35p

RUDNICK, JÁ; KATZNER, TE; BRAGIN, A & DeWOODY, JA. Species identification of birds through genetic analysis of naturally shed feathers. Molecular Ecology Notes, vol. 7, p. 757-762.

SAITOU, N. e NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Molecular Biology Evolution, vol. 4, no. 4, p. 406– 425.

SEGELBACHER,G. 2002. Noninvasive genetic analysis in birds: testing reliability of feather samples. Molecular Ecology, vol. 2, p. 367-369.

SMITH, DA.; RALLS, K.; HURT, A.; ADAMS, B.; PARKER, M.; DAVENPORT, B. SMITH, MC. & MALDONADO, JE. 2003. Animal Conservation, vol. 6, p. 339-346.

SOLÉ-CAVA, AM. & MATIOLI, SR. 2001. Biodiversidade molecular e genética da conservação. *Biologia Molecular e Evolução*. Ribeirão Preto: Holos, p. 172-192.

TABERLET, P.; WAITS, L. P. & LUIKART, G. 1999. Noninvasive genetic sampling: look before you leap. *Tree*, vol. 14, no. 8, p 323-327.

TABERLET, P; CAMARRA, JJ; GRIFFIN, S; UHRÈS, E; HANOTTE, O; WAITS, LP; DUBOIS-PAGANON, C; BURKE, T & BOUVET, F. 1997. Noninvasive genetic tracking of the endangered Pyrenean brown bear population. *Molecular Ecology*, vol. 6, p. 869-876.

TABERLET, P; GRIFFIN, S; GOOSSENS, B; QUESTIAU, S; MANCEAU, V; ESCARAVAGE, N; WAITS, LP & BOUVET, J. 1996. Reliable genotyping samples with very low DNA quantities using PCR. *Nuclei Acids Research*, vol. 24, no. 16, p. 3189-3194.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. e KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, p. 2731-2739.

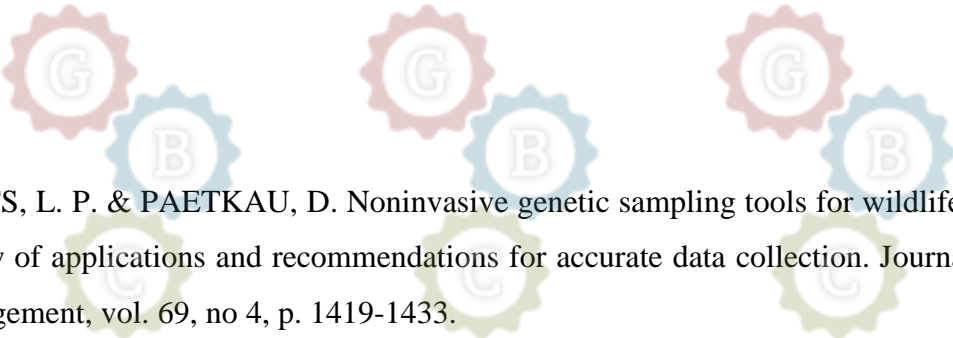
TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M. e KUMAR, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, vol. 28, p. 2731-2739.

The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Acesso em 14 de Dezembro de 2015.

TOMAZELLA, IM. 2012. Identificação dos cromossomos de *Mazama gouazoubira* (artiodactyla; cervidae) envolvidos em rearranjos induzidos pela doxorubicina. Universidade Estadual Paulista. Dissertação de Mestrado. 58p.

VALSECCHI, J & AMARAL, PV. 2009. Perfil da caça e dos caçadores na reserva de desenvolvimento sustentável Amanã, Amazonas-Brasil. *Uakari*, vol. 5, no. 2, p. 33-48.

VYNNE, C; SKALSKI, JR; MACHADO, RB; GROOM, MJ; JÀCOMO, ATA; MARINHO-FILHO, J; RAMOS-NETO, MB; POMILLA, C; SILVEIRA, L; SMITH, H & WASSER, SK. *Conservation Biology*, p. 1-9.

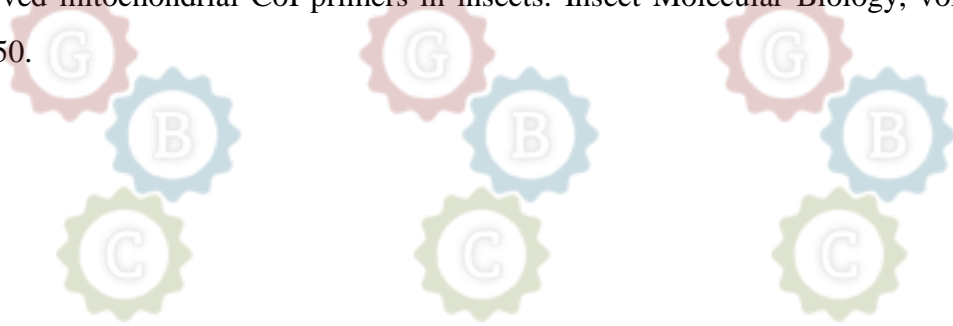


WAITS, L. P. & PAETKAU, D. Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *Journal of Wildlife Management*, vol. 69, no 4, p. 1419-1433.

WASSER, SK; HOUSTON, CS; KOEHLER, GM; CADD, GG & FAIN, SR. 1997.. *Molecular Ecology*, vol. 6, p. 1091-1097.

WILSON, AC.; CANN, RL.; CARRI, SM.; GEORGE, M; GYLLENSTENI, ULFB.; HELMBYCHOWSKI, KM.; HIGUCHI, RG.; PALUMBIL, SR.; PRAGER, EM.; SAGE, RD. & STONEKING, M. 1985. Mitochondrial DNA and two perspectives on evolutionary genetics. *Biological journal of the Linnean Society*, vol. 26, p. 375-400.

ZHANG, DX. & HEWITT, GM. 1996. Assessment of the universality and utility of a set of conserved mitochondrial CoI primers in insects. *Insect Molecular Biology*, vol. 6, no. 2, p. 143-150.



## 8. Anexo 1

1. Você já comeu carne de caça?

Sim

Não

2. Se sim, qual a frequência come carne de caça?

---

3. Qual dessas espécies são consideradas caça?

Frango

Tatu

Boi

Bode

Veado

Raposa

Paca

Carneiro

4. Alguém da sua família tem o hábito de caçar?

Sim

Não

5. Caçar é comum na sua cidade?

Sim

Não

6. Você já acompanhou alguma caça?

Sim

Não

7. Você vê algum problema em comer carne de caça?

Sim

Não

8. Caçar deveria ser proibido?

Sim

Não