



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ZOOLOGIA
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA ANIMAL

MARINA DE SOUZA SANTOS FALKOWSKI

**ELUCIDANDO A IDENTIDADE DAS GIRAFAS NO BRASIL: UMA ABORDAGEM
MOLECULAR MULTILOCI COMO FERRAMENTA NORTEADORA PARA A
CONSERVAÇÃO EX-SITU DAS ESPÉCIES**

Recife

2020

MARINA DE SOUZA SANTOS FALKOWSKI

**ELUCIDANDO A IDENTIDADE DAS GIRAFAS NO BRASIL: UMA ABORDAGEM
MOLECULAR MULTILOCI COMO FERRAMENTA NORTEADORA PARA A
CONSERVAÇÃO *EX-SITU* DAS ESPÉCIES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres

RECIFE
2020

Catálogo na Fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia, CRB-4/1788

Falkowski, Marina de Souza Santos

Elucidando a identidade das girafas no Brasil: uma abordagem molecular multiloci como ferramenta norteadora para a conservação ex-situ das espécies / Marina de Souza Santos Falkowski. – 2020.

100 f. : il.

Orientador: Rodrigo Augusto Torres.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Animal, Recife, 2020.

Inclui referências e anexos.

1. Animais de zoológico. 2. Genética animal. 3. Zoologia – Classificação. I. Torres, Rodrigo Augusto (orientador). II. Título.

599

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2020-094

MARINA DE SOUZA SANTOS FALKOWSKI

**ELUCIDANDO A IDENTIDADE DAS GIRAFAS NO BRASIL: UMA ABORDAGEM
MOLECULAR MULTILOCI COMO FERRAMENTA NORTEADORA PARA A
CONSERVAÇÃO *EX-SITU* DAS ESPÉCIES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, como pré-requisito obrigatório para a obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Aprovada em: 28/02/2020

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Augusto Torres (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jose Mauricio Barbanti Duarte (Examinador Externo)
Universidade Estadual Paulista

Prof. Dr. Enrico Bernard (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Diego Astúa de Moraes (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

AGRADECIMENTOS

Ao meu Orientador Dr. Rodrigo A. Torres. Agradeço por toda dedicação, confiança, ensinamentos, apoio quando nada parecia dar certo, aos puxões de orelha e palavras verdadeiras, principalmente, pela trajetória desde a graduação até este presente momento.

A minha família que me apoiaram e incentivaram a seguir os meus sonhos.

Ao Assessor de Conservação e Pesquisa Aplicada na Fundação Jardim Zoológico de Brasília, Igor Oliveira Braga de Moraes que foi um dos idealizadores do tema. Obrigada pela confiança.

Agradeço aos membros do Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA). Um agradecimento especial para Maria Clara e Larissa Ito que estiveram esses últimos tempo me aconselhando, aguentado os meus dramas e ensinando muito. Obrigada meninas.

Agradeço especialmente a Maria Clara, minha irmã de laboratório que tem sempre me auxiliado. Obrigada pelos sábios conselhos e por ter me escutado no momento que mais precisei.

Aos membros da Associação de Zoológicos e Aquários do Brasil (AZAB) pelo apoio a pesquisa, pelas informações valiosas e ensinamentos passados.

Agradeço ao corpo administrativo e técnico do Zoológico de Pomerode, Zoo Beto Carrero, Zoológico Municipal de Curitiba, Fundação Jardim Zoológico de Brasília, Zoo Parque Itatiba e Fundação Zoológico de São Paulo pelo auxílio na coleta das amostras.

Aos amigos e funcionários do Mestrado pela convivência, experiência e amizade das quais jamais esquecerei.

A Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal.

A Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE) pela bolsa concedida.

RESUMO

Inicialmente, apenas uma espécie de girafa (*Giraffa camelopardalis*) e até onze subespécies eram taxonomicamente reconhecidas. No entanto, um estudo genético recente evidenciou a existência de 4 espécies distintas – *G. camelopardalis*, *G. reticulata*, *G. giraffa* e *G. tippelskirchi* – e 5 subespécies. Incluídas na Lista Vermelha Internacional de espécies ameaçadas como vulneráveis devido ao seu crescente declínio populacional, estão entre os primeiros animais a serem mantidos em zoológicos. Uma vez que o principal objetivo do manejo das populações de animais em cativeiro é a manutenção da diversidade genética, existe a necessidade de os zoológicos adequarem seus planejamentos reprodutivos e programas de conservação a esta classificação, a fim de evitar hibridização e serem autossustentáveis, contribuindo futuramente para a conservação *in situ*. Desta maneira, o presente estudo teve como objetivo central a identificação das espécies de girafa residentes nos zoológicos brasileiros através de uma abordagem molecular e morfológica. Para isso, foram obtidos fragmentos dos marcadores mitocondriais Citocromo b (Ctyb), Região controle e Citocromo Oxidase subunidade I (COI). Sequências adicionais destes marcadores, disponíveis na plataforma NCBI/GenBank, foram adicionadas ao banco de dados. Para Ctyb e região controle, os dados foram concatenados e testados perante árvores bayesianas, redes haplotípicas e análises tradicionais de genética populacional. Para COI, uma abordagem moderna de delimitação molecular de espécies foi implementada. A análise morfológica foi feita a partir de fotos dos padrões de pelagem de cada indivíduo, comparando com os padrões encontrados na natureza. Os resultados para os dados concatenados e morfologia indicam a ocorrência de duas espécies nos zoológicos brasileiros, assim como os resultados de COI corroboram os achados dos outros marcadores. Além disso são observadas nas árvores bayesianas incongruências nos clados de *Giraffa giraffa* e *Giraffa camelopardalis* que podem estar relacionadas a diversidade escondida nessas duas espécies. Esses dados fornecem subsídios genéticos para a elaboração de planos de manejo para a população de girafa nos zoológicos brasileiros.

Palavras-chave: *Giraffa spp.* Zoológico. DNA mitocondrial. padrão de pelagem.

ABSTRACT

Initially, only one species of giraffe (*Giraffa camelopardalis*) and up to eleven subspecies were taxonomically recognized. However, a recent genetic study revealed the existence of 4 distinct species - *G. camelopardalis*, *G. reticulata*, *G. giraffa* and *G. tippelskirchi* - and 5 subspecies. Included in the International Union for Conservation of Nature, are among the first animals to be kept in zoos. Since the main objective of managing captive animal populations is to maintain genetic diversity, there is a need for zoos to adapt their reproductive planning and conservation programs to this classification, in order to avoid hybridization and be self-sustainable, contributing in the future to in situ conservation. Thus, the present study had as its main goal the identification of giraffe species residing in Brazilian zoos through a molecular and morphological approach. For this, mitochondrial fragments of the following markers were obtained: Cytochrome b (Ctyb), Control region and Cytochrome Oxidase subunit I (COI). Additional sequences of these markers, available on the NCBI / GenBank platform, were added to the database. For Ctyb and the control region, the data were concatenated and were tested using Bayesian trees, haplotypes networks and traditional population genetics analysis. For COI, a modern approach to molecular species delimitation has been implemented. The morphological analysis was made from photos of the coat patterns of each individual, comparing with the patterns found in nature. The results for concatenated data and morphology indicate the occurrence of two species in Brazilian zoos, as well as the COI results corroborate the findings of the other markers. Furthermore, inconsistencies in the clades of *Giraffa giraffa* and *Giraffa camelopardalis* are observed in the Bayesian trees, which may be related to the hidden diversity in these two species. These data provide genetic support for the development of management plans for the giraffe population in Brazilian zoos.

Key-words: *Giraffa* spp. Zoo. mitochondrial DNA. coat pattern.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Mapa da distribuição atual das girafas (Modificado O'CONNOR et al 2019)	19
Figura 2 - Padrões de pelagem das girafas (Modificado Giraffe Conservation Foundation,2019).....	20
Figura 3 - Ossicones (Modificado Giraffe Conservation Foundation, 2019).	20
Figura 4 - Exemplo da fonte das amostragens fecais (grumos escuros) realizadas em alguns zoológicos	37
Figura 5 - Exemplo da estratégia de armazenagem das amostras fecais (imersas em Etanol 100%, em tubos tipo falcon estéreis) até que as mesmas chegassem até o laboratório	37
Figura 6 - Seção analisada do padrão de pelagem. Em detalhe as formas das manchas analisadas.	38
Figura 7 - Síntese do padrão de pelagem correspondente a cada uma das espécies e sub espécies de girafa na África. Modificado <i>Giraffe Conservation Foundation</i> 2017).....	39
Figura 8 - Estrutura craniana adicional (terceiro occicone) encontrada em machos das espécies <i>Giraffa camelopardalis</i> e <i>Giraffa reticulata</i> . Modificado <i>Giraffe Conservation Foundation</i> (2017)	40
Figura 9 - Padrão de pelagem das espécies <i>Giraffa giraffa</i> [(a) e (b)] e <i>G. camelopardalis</i> [(c), (d) e (e)] de acordo com <i>Giraffe Conservation Foundation</i> (2017)	47
Figura 10 - Padrões de pelagem observados nos exemplares aqui analisados. (A) Leninha –Zoo Pomerode. (B) Etheta – Zoo Pomerode. (C) Bin –Zoo Beto Carrero. (D) Gigrande – Zoo Beto Carrero. (E) Catarina – Zoo Beto Carrero. (F) Savana – Zoo Beto Carrero. (G) Pandinha – Zoo Curitiba. (H) Yaza – Zoo Brasilia. (I) Ayanna –Zoo Itatiba. (J) Palito – Zoo São Paulo. (K) Bernardo – Zoo São Paulo. (L) Mel – Zoo São Paulo. (M) Malika – Zoo São Paulo. (N) Safira – Zoo São Paulo	48

Figura 11 - Estrutura craniana adicional (terceiro occicone) ausente nos exemplares machos dos zoológicos. (A) Gigante – Zoo Beto Carrero. (B) Bin – Zoo Beto Carrero. (C) Palito - Zoo São Paulo. (D) Bernardo - Zoo São Paulo	49
Figura 12 - Árvore bayesiana obtida a partir das sequências de citocromo b, mostrando as relações filogenéticas entre os indivíduos do Brasil e os exemplares do GenBank. Os valores sobre os ramos indicam o suporte de ramo das probabilidades posteriores maiores que 50%	51
Figura 13 - Árvore bayesiana obtida a partir das sequências da região controle, mostrando as relações filogenéticas entre os indivíduos do Brasil e os exemplares do GenBank. Os valores sobre os ramos indicam o suporte de ramo das probabilidades posteriores maiores que 50%	52
Figura 14 - Rede haplotípica obtida pelas sequências de Citocromo b de girafas, apresentando as relações genealógicas entre os haplótipos dos indivíduos amostrados e das espécies obtidas no GenBank. Cada cor representa a espécie do haplótipo encontrado. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos e os traços e números sobre as linhas que os conectam, representam o número de mutações presente entre eles	55
Figura 15 - Rede haplotípica obtida pelas sequências de região controle de girafas, apresentando as relações genealógicas entre os haplótipos dos indivíduos amostrados e das espécies obtidas no GenBank. Cada cor representa a espécie do haplótipo encontrado. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos e os traços e números sobre as linhas que os conectam, representam o número de mutações presente entre eles	56
Figura 16 - Análise de estruturação genética BAPS da variação genética observada nas sequências do gene mitocondrial Citocromo b. As cores representam os diferentes perfis genéticos obtidos	62
Figura 17 - Análise de estruturação populacional BAPS da variação genética observada nas sequências do marcador mitocondrial região controle. As cores representam os diferentes perfis genéticos obtidos	62
Figura 18 - Árvore bayesiana obtida a partir das sequências concatenadas de Citocromo b e região controle, demonstrando as relações filogenéticas entre os indivíduos do Brasil e os exemplares com dados no GenBank. Os valores sobre os ramos indicam o suporte de ramo das probabilidades posteriores maiores que	

50% 64

Figura 19 - Árvore bayesiana obtida a partir de 744 pb dos dados concatenados entre os indivíduos do Brasil e os dados das sub-espécies obtidos do GenBank. À direita na primeira coluna os padrões de pelagem propostos pela Giraffe Conservation Foundation (2017) na ordem encontrada na filogenia. Os outros representam os padrões encontrados em cada zoológico do estudo alinhados aos clados que pertencem cada espécie. Beto Carrero (Rosa), Pomerode (Azul claro), Brasília (Laranja claro), Itatiba (Laranja escuro), São Paulo (Azul) e Curitiba (Vermelho). Os valores sobre os ramos indicam o suporte de ramo das probabilidades posteriores acima de 50%..... 65

Figura 20 - Rede haplotípica obtida pelos dados concatenados de girafas, apresentando as relações genealógicas entre os haplótipos dos indivíduos amostrados e das espécies obtidas no GenBank. Cada cor representa a espécie do haplótipo encontrado. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos e os traços e números sobre as linhas que os conectam, representam o número de mutações presente entre eles.....67

Figura 21 - Análise de estruturação genética BAPS da variação genética observada nas sequências concatenadas Citocromo b e região controle. As cores representam os diferentes perfis genéticos obtidos..... 71

Figura 22 - Topologia bayesiana gerada no BEAST, demonstrando as relações evolutivas e as *MOTUs* identificadas pelas análises de delimitação de espécies baseadas em distância e coalescência (*GMYC* e *bPTP*) entre as amostras de *Giraffa sp* para o marcador mitocondrial COI..... 72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Informações sobre nome do espécime no zoológico, sexo, nomenclatura no estudo, local de coleta e origem de cada espécime.....	35
Tabela 2 - Sequencias utilizadas nas análises com seus respectivos marcadores e números de acesso no Genbank.	42
Tabela 3a - Síntese dos resultados de diversidade genética obtidos pelas sequências de Citocromo b.....	53
Tabela 3b - Síntese dos resultados de diversidade genética obtidos pelas sequências da região controle.....	54
Tabela 4a - Análise da variância molecular de todo o conjunto de dados do gene Citocromo b das girafas em cativeiro (Brasil) e da natureza. gl = graus de liberdade.....	57
Tabela 4b - Análise da variância molecular de todo o conjunto de dados da região controle gene das girafas em cativeiro (Brasil) e da natureza. gl = graus de liberdade.....	57
Tabela 5a - Desvios estatísticos (Φ_{ST}) entre os clados observados de <i>G. giraffa</i> e <i>G. camelopardalis</i> diante dos dados de Citocromo b (a) e CO1 (b) ($p < 0,1$)	58
Tabela 5b - Desvios estatísticos (Φ_{ST}) entre os clados observados diante dos dados da região controle <i>G. giraffa</i> e <i>G. camelopardalis</i> ($p < 0,1$).....	58
Tabela 6a - Valores de F_{ST} par-à-par entre obtidos dos dados de Citocromo b entre as quatro espécies de girafa e todos os indivíduos analisados dos Zoológicos do Brasil.....	60
Tabela 6b - Valores de F_{ST} par-à-par entre obtidos dos dados da região controle entre três subespécies de girafa e todos os indivíduos analisados dos Zoológicos do Brasil.....	61
Tabela 7 - Síntese dos resultados de diversidade genética obtidos pelas sequências concatenadas.....	66
Tabela 8 - Análise da variância molecular de todo o conjunto de dados concatenados das girafas em cativeiro (Brasil) e da natureza. gl = graus de liberdade.....	68

Tabela 9 - Desvios estatísticos (Φ_{ST}) entre os clados observados de <i>G. giraffa</i> e <i>G. camelopardalis</i> diante dos dados concatenados ($p < 0,1$)	69
Tabela 10 - Valores de F_{ST} par-à-par entre obtidos dos dados concatenados entre três subespécies de girafa e todos os indivíduos analisados dos Zoológicos do Brasil	70
Tabela 11 - Relações taxonômicas e genéticas entre machos e fêmeas dos zoológicos brasileiros analisados neste estudo. N = espécies diferentes; S = mesma espécie; Sx = mesma espécie consanguíneos; Sn = mesma espécie, mas diferente subespécie.....	74
Tabela 12 - Relações taxonômicas e genéticas entre as espécies e os animais dos zoológicos brasileiros analisados neste estudo. N = espécies diferentes; S = mesma espécie/subespécie.....	74
Tabela 13 - Recomendações de acasalamento entre machos e fêmeas dos zoológicos brasileiros analisados neste estudo. Vermelho = não recomendado, Verde = recomendado.....	75
Tabela 14 - Recomendações de acasalamento entre os espécimes dos zoológicos brasileiros analisados neste estudo com as subespécies de girafa na natureza. Vermelho = não recomendado, Verde = recomendado	75

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ctyb	- Citocromo b
CR.	- Região controle
COI.	- Citocromo oxidase subunidade 1
UFPE	- Universidade Federal de Pernambuco
PO1	- Pomerode 1
PO2	- Pomerode 2
BC1	- Beto Carrero 1
BC2	- Beto Carrero 2
BC3	- Beto Carrero 3
BC4	- Beto Carrero 4
CB	- Curitiba
BR1	- Brasília 1
BR2	- Brasília 2
IT	- Itatiba
SP1	- São Paulo 1
SP2	- São Paulo 2
SP3	- São Paulo 3
SP4	- São Paulo 4
SP5	- São Paulo 5
IUCN	- <i>The International Union for Conservation of Nature and Natural Resources</i>
NCBI	- <i>National Center for Biotechnology Information</i>
AMOVA	- Análise de Variância Molecular
PCR	- Reação em cadeia da polimerase
Pb	- Pares de bases
MOTUs	- Unidades Operacionais Taxonômicas Moleculares
WAZA	- <i>World Association of Zoos and Aquariums</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 OBJETIVOS.....	17
1.1.1 Objetivo geral	17
1.1.2 Objetivos específicos	17
2 REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1 AS GIRAFAS, TAXONOMIA E CONSERVAÇÃO.....	19
2.2 O ZOOLOGICO E A CONSERVAÇÃO <i>EX-SITU</i>	22
2.3 ANÁLISES GENÉTICA NÃO INVASIVAS	24
2.4 MARCADORES MOLECULARES.....	27
2.5 ESTUDOS REALIZADOS EM GIRAFAS COM MARCADORES DE DNA MITOCONDRIAL.....	32
3 METODOLOGIA	34
3.1 AMOSTRAGEM	34
3.2 COLETA DE AMOSTRAS.....	36
3.3 IDENTIFICAÇÃO POR PADRÃO DE PELAGEM.....	38
3.4 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA	40
3.5 ANÁLISES DE DADOS.....	41
4 RESULTADOS	47
5 DISCUSSÃO	76
5.1 TAXONOMIA INTEGRATIVA E A DIVERSIDADE ESCONDIDA E CONTROVERSA DAS GIRAFAS.....	76
5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE <i>Giraffa spp.</i> NOS ZOOLOGICOS DO BRASIL.....	81
6 CONCLUSÃO	85
REFERÊNCIAS	86
ANEXO A – RECOMENDAÇÕES PARA OS ZOOLOGICOS	98
ANEXO B - DECLARAÇÃO SOBRE PLÁGIO	100

Elucidando a identidade das girafas no Brasil: uma abordagem molecular *multiloci* como ferramenta norteadora para a conservação *ex-situ* das espécies

1 INTRODUÇÃO

As diferenças entre espécies podem surgir das relações históricas ou mais recentes envolvendo um conjunto de processos comportamentais, climáticos, ecológicos ou genéticos (GROSBERG & CUNNINGHAM, 2001). Esses processos podem potencializar a deriva genética, isolamento reprodutivo e a especiação (ARNEGARD et al., 2014). Uma abordagem integrativa aplicada à conservação, pode compreender vários componentes da informação biológica das espécies que, aliados à biogeografia e à genética, são essenciais para compreensão dos fatores que contribuem para a diversificação das populações, processos de especiação e padrões ecológicos (PADIAL et al., 2010). Apesar de ser relativamente recente, um número considerável de estudos científicos já tem utilizado esta nova abordagem tanto entre invertebrados (KONOPLEVA et al., 2017; PYRCZ et al., 2018; ARCHIDONA-YUSTE et al., 2019) quanto vertebrados (HRBEK et al., 2014; PUGEDO et al., 2016; ISARI et al., 2017; SOLARI et al., 2019; BOUBLI et al., 2019), incluindo girafa, (BROWN et al., 2007). A taxonomia integrativa tem caminhado para ser uma das mais poderosas abordagens para a descrição da biodiversidade e elucidar controvérsias taxonômicas (FRANKHAM et al. 2004), gerando informações mais consistentes do que aquelas sugeridas por cada um dos conjuntos de dados analisados individualmente. Dessa forma a integração de conjuntos de dados reforça o manejo de espécies e auxilia na delimitação e priorização de áreas para a conservação, tendo em vista a melhor detecção de uma maior ou menor riqueza de espécies (SHETH & THANKER, 2017; BARBOSA et al., 2018; ZEINALABEDINI et al., 2019).

A primeira descrição taxonômica da girafa foi realizada por Linnaeus em 1758, baseada na descrição anterior de uma girafa que estava em cativeiro, no Cairo (SEYMOUR, 2012). À medida que outros espécimes se tornaram disponíveis para descrição científica, novas classificações taxonômicas foram propostas (LYDEKKER, 1904; KRUMBIEGEL, 1939; SEYMOUR, 2012). As primeiras descrições de girafas como espécie foram baseadas principalmente em caracteres morfológicos, incluindo padrões de pelagem, tamanho do crânio, e medidas de ossicones (LYDEKKER, 1904; DAGG, 1971; GRUBB, 2005). Até algum tempo, a classificação de uma espécie,

dividida em nove subespécies era mais aceita (DAGG & FOSTER, 1976). Inclusive, já havia sido demonstrado que em cativeiro, algumas subespécies de girafas podiam hibridizar (LACKEY, 2011; LONNIG, 2011), o que pareceu corroborar o conceito tradicional de uma única espécie de girafa.

Porém, com o advento das técnicas moleculares alguns estudos foram desenvolvidos afim de testar a hipótese de uma única espécie de girafas com 9 subespecies. Nesse sentido, Hassanin et al. (2007) sequenciaram o DNA mitocondrial de 23 indivíduos de seis das nove subespécies anteriormente descritas, incluindo espécimes de zoológicos europeus. No entanto, os autores mantiveram o reconhecimento das subespécies descritas anteriormente, sugerindo redefinir a separação geográfica entre o *Giraffa camelopardalis peralta* e *G. c. antiquorum*. Ainda em 2007 foi sugerido que há pelo menos seis linhagens genealógicas distintas de *Giraffa camelopardalis* na África a partir de sequências de DNA mitocondrial e loci microssatélites, utilizando também evidências do padrão de pelagem sugerido por Dagg & Foster (1982) (Brown et al. 2007). A combinação entre diferenciação genética e fenotípica, com a ausência de hibridação, levou os autores a concluir que girafa pode representar mais de uma espécie. Os autores sugeriram o reconhecimento das seis subespécies amostradas como “Unidades Evolutivamente Significativas” ou espécies. Foi também sugerido que unidades taxonômicas adicionais podem ser reconhecidas se as demais subespécies descritas também forem amostradas.

Vários anos depois, o sequenciamento do DNA mitocondrial de 161 indivíduos de oito das nove subespécies descritas, revelou uma forte estruturação genética entre as subespécies. Apesar de não ter sido apontada uma nova resolução taxonômica, foi proposto o refinamento dos limites geográficos entre os *G. c. angolensis* e a *G. c. giraffa* (Bock et al. 2014). Subsequentemente, análises de sequências de íntrons nucleares e genes mitocondriais de girafas selvagens, identificaram a existência de quatro grupos monofiléticos. Tais grupos foram indicados como quatro espécies diferentes, com cinco subespécies (Fennessy et al. 2016). Já Winter et al. (2018) complementam o estudo logo anterior testando o fluxo gênico e eventual introgressão entre as espécies. Os autores identificaram menos de um migrante por geração, inclusive entre a girafa do norte e a girafa reticulada, que são geograficamente mais próximas. Esta análise, em conjunto com dados genético-populacionais, confirmam a existência de quatro clados que correspondem às quatro espécies de girafas atualmente reconhecidas.

Além destes aspectos relativos à elucidação das controvérsias taxonômicas nas girafas, as análises genéticas iniciadas nos anos 2000 contribuíram também com elementos sobre potencial evolutivo (variação genética) e a conservação *in-situ* das girafas (HASSANIN, et al., 2007; BROWN et al., 2007; BRENNEMANN et al. 2009; FENNESSY et al. 2013; BOCK et al., 2014; FENNESSY et al., 2016; WINTER et al., 2018). Como exemplo, foi detectada a heterozogozidade média entre 36-52% em exemplares da girafa Maasai (*G. c. tippelskirchi*) do Kenya e Tanzania. Estes dados atestaram a potencial vulnerabilidade da espécie em termos adaptativos naquela região devido à baixa heterozigozidade (HUEBINGER et al. 2002; CROWHURST et al. 2013).

Ainda nos termos da conservação das espécies recém evidenciadas, em 24 de setembro de 2019 a *Convention on Migratory Species*, em conjunto com diversos países Africanos, publicou uma serie de propostas para a ação de conservação das girafas na natureza. Utilizando como base a taxonomia sugerida por Fennessy et al. (2016), uma das propostas é a revisão taxonômica das girafas em toda a África para orientar e contribuir com as estratégias de conservação, já que as diferentes espécies possuem grandes diferenças no tamanho populacional e nos graus de ameaças à sua sobrevivência.

O declínio populacional de várias espécies, em especial as girafas (TRINKEL et al., 2016; CHASE et al., 2016; MULLER et al., 2019) reforça ainda mais a importância dos zoológicos como centros de conservação no cenário atual de vulnerabilidade na natureza. Nesse sentido, os zoológicos vêm mudando o seu foco com o passar dos anos, onde a prioridade em exibir os animais vem sendo gradativamente substituída pela reprodução em cativeiro, objetivando a manutenção das populações ameaçadas e conseqüentemente, uma futura reintegração ao habitat natural (BOWKETT, 2009).

O papel dos zoológicos nas últimas décadas como centros de conservação tem sido fundamental para o desenvolvimento bem sucedido de programas de conservação para várias espécies ameaçadas como: pantera da Flórida (*Puma concolor coryi*), lobo cinzento mexicano (*Canis lupus baileyi*) e o bisonte europeu (*Bison bonasus*) (KITCHENER 1997; OLECH & PERZANOWSKI, 2002; MORENO et al., 2006; HEDRICK & FREDRECKSON, 2008). Populações em cativeiro de espécies ameaçadas podem ser utilizadas como um reservatório genético, fonte de indivíduos

para reintroduções e para o resgate genético de populações já existentes (WOODWORTH et al., 2002; FRANKHAM, 2015). Alguns estudos já estão sendo realizados a fim de cumprir tais objetivos com espécies de antílopes (ODGEN et al., 2018), leões asiáticos (*Panthera leo leo*; ATKINSON et al., 2017), órix de cimitarra (*Oryx dammah*; ODGEN et al., 2019), bong da montanha (*Tragelaphus eurycerus isaaci*; KITCHENER et al., 2017), cão da pradaria (*Cynomys ludovicianus*; CASTELLANOS-MORALES et al., 2016), tartaruga Mary Rive (*Elusor macrurus*; SCHMIDT et al., 2017) e órix da arabia (*Oryx leucoryx*; OCHOA et al., 2016).

No Brasil, *Giraffa camelopardalis* spp. compreende um acervo importante da megafauna em ambientes cativos, segundo a Associação de Zoológicos e Aquários do Brasil (AZAB). Atualmente a população de girafas é composta por 14 animais vivos e parte disso é reprodutivamente ativa em Parques Zoológicos e instituições afins. Contudo, informações acerca da identidade genética e filogenética destes espécimes é inexistente. Devido às recentes descobertas sobre a ampla diversidade taxonômica das girafas em ambiente natural, aliada aos dados sobre a baixa diversidade genética e seu status de vulnerabilidades segundo a IUCN, reconhecer a quais linhagens evolutivas as girafas do Brasil pertencem é crucial para o sucesso de uma abordagem conservacionista *ex-situ* (Parques Zoológicos e Instituições afins no Brasil). Elucidar incertezas taxonômicas, bem como inspecionar eventual diversidade escondida, assim como a magnitude da variação genética destes animais, é crucial para qualificar os possíveis planos de manejo reprodutivo *ex-situ* e se possível *in-situ*. Além disso, os dados aqui produzidos permitirão incrementar as informações para o *Studbook* das girafas do mundo, cuja última atualização é datada de 2011 (LACKEY, 2011).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

A presente pesquisa objetivou identificar à quais espécies recentemente identificadas pertencem as girafas residentes nos Zoológicos e Instituições afins no Brasil.

1.1.2 Objetivos específicos

- (i) usar de métodos de sistemática molecular e alguns aspectos fenotípicos para esclarecer sobre a identidade taxonômica das girafas cativas do Brasil;
- (ii) avaliar as congruências e incongruências filogenéticas observadas perante a

análise conjunta dos dados moleculares e morfológicos aqui obtidos, com aqueles da literatura;

(iii) comparar a variação genética das girafas no Brasil em relação àquelas do ambiente natural;

(iv) recomendar o manejo reprodutivo de exemplares nos ambientes cativos do Brasil e estes com aqueles da natureza, visando a conservação *ex-situ* e eventualmente *in-situ*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 AS GIRAFAS, TAXONOMIA E CONSERVAÇÃO

As girafas estão espalhadas pela África ao sul do Saara, em florestas abertas e pastagens arborizadas. Embora tenham estado presentes em toda a África há cerca de anos, as girafas foram extintas na região norte e no Saara, na medida em que o clima mudou e a maior parte da região se tornou o deserto que hoje resta (OCONNOR et al 2019). No entanto, elas continuam ocupando a África Subsaariana e ainda são comuns na África Oriental e do Sul, embora sua distribuição na África Ocidental tenha sido fragmentada pela caça furtiva (PELLEW, 1984; OCONNOR et al 2019) (Figura 1).

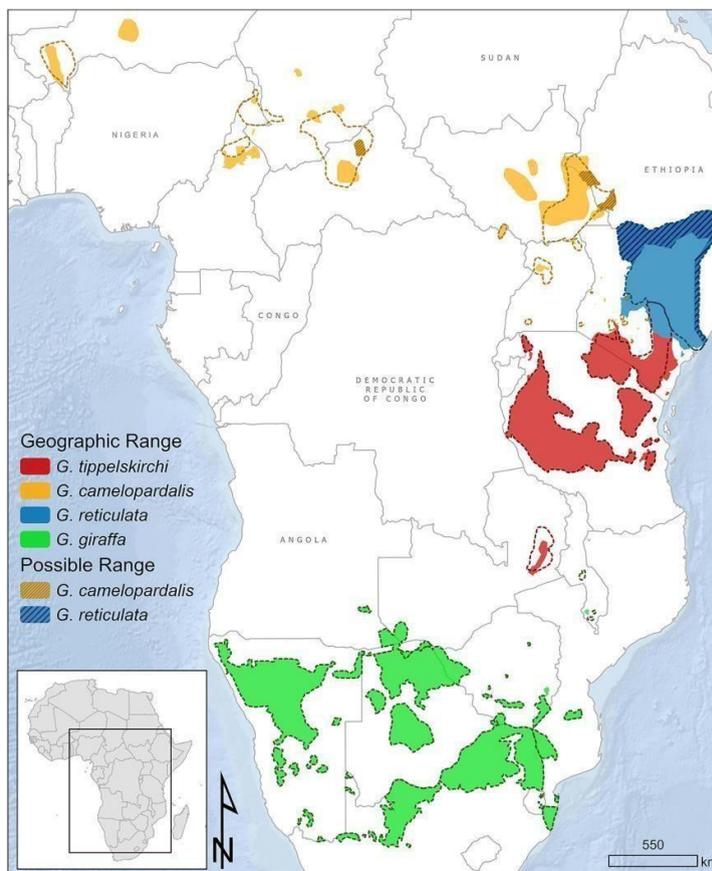


Figura 1. Mapa da distribuição atual das girafas (Modificado O'CONNOR et al 2019)

Outras informações importantes versam sobre os aspectos morfológicos desses animais. No que se refere ao padrão de pelagem, este consiste em manchas de tamanho e cor variáveis, indo de laranja muito claro a um marrom bem escuro, dispostas em um fundo de cor clara, que pode formar um padrão de rede no corpo (Figura 2). O padrão das manchas é único para cada indivíduo e pode escurecer com a idade (DAGG & FOSTER, 1976). Outro aspecto é aquele relativo aos apêndices cefálicos. As girafas possuem de duas a cinco dessas estruturas, feitas de ossos cobertos de pele, conhecidos como ossicones (Figura 3). Geralmente tais estruturas são finas e com pelos no topo em fêmeas. Nos machos esses ossicones são grossos e desprovidos de pelos no topo. Esta estrutura é utilizada durante brigas com outros machos (SIMMONS & SCHEEPERS, 1996).

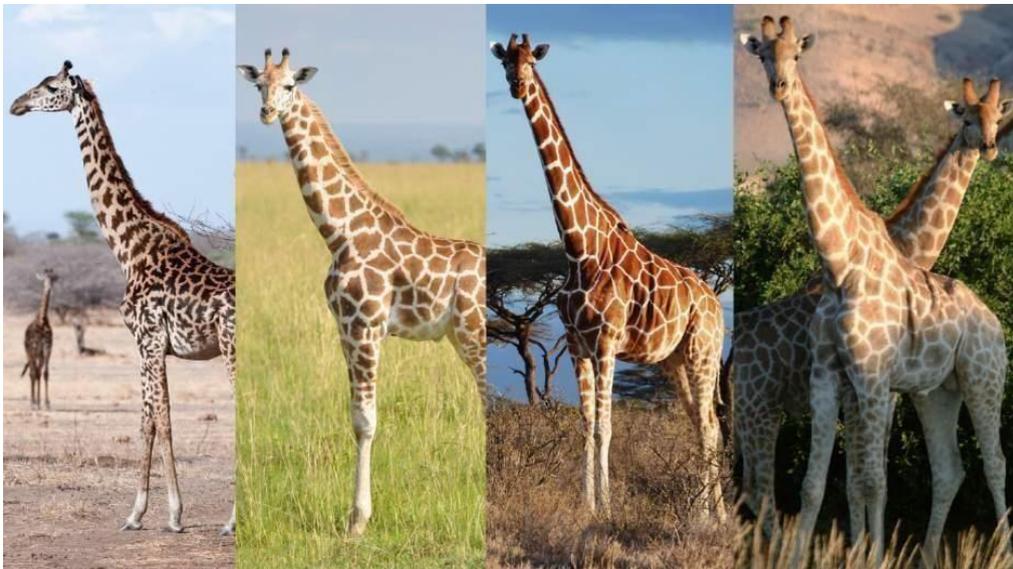


Figura 2. Padrões de pelagem das girafas (Modificado Giraffe Conservation Foundation, 2019)



Figura 3. Ossicones (Modificado Giraffe Conservation Foundation, 2019)

Além dos aspectos morfológicos mencionados acima, as girafas são animais que têm preferência por viver em grupos. Estes animais não são territoriais, mas há uma hierarquia absoluta entre os machos adultos dentro de suas áreas de vida (PENDU et al., 2000).

No que diz respeito a taxonomia das girafas, a primeira descrição foi feita por Linnaeus em 1758 no seu livro *Systema Naturae* (LINNAEUS, 1758). Esta foi baseado em descrições de mais de 200 anos da subespécie *Giraffa camelopardalis camelopardalis* (LYDEKKER, 1904; HARPER, 1940). Em seguida outras subespécies foram descritas baseadas apenas na morfologia, como padrão de pelagem, ossicones e na distribuição geográfica (LYDEKKER, 1904; DAGG & FOSTER, 1976). A classificação que era mais aceita pelos cientistas era de uma espécie e nove subespécies (DAGG & FOSTER, 1976). No entanto, análises genéticas e revisões morfológicas mais recentes apontaram que há possibilidade de existir mais de uma espécie de girafa (BROWN et al., 2007; GROVES & GRUBB, 2011; FENNESSY et al., 2016; WINTER et al., 2018).

Brown et al. (2007) sugeriram, com base em dados de DNA mitocondrial e loci microssatélites, que há pelo menos seis linhagens distintas de girafas na África. Além disso, encontraram uma quase ausência de híbridos mesmo entre subespécies parapátricas. Uma combinação de diferenciação fenotípica e genética com a ausência de hibridação, levou os autores a concluir que girafa pode representar mais de uma espécie. Os autores sugeriram o reconhecimento das seis subespécies amostradas como "unidades evolutivamente significativas" e também sugeriram que unidades taxonômicas adicionais poderiam ser reconhecidas se as demais subespécies fossem amostradas.

Já em 2016 Fennessy e colaboradores sugeriram uma nova taxonomia para as girafas, utilizando análises de genes mitocondriais e nucleares, que revelaram a existência de quatro espécies de girafas filogeneticamente distintas. Neste estudo, os dados de DNA nuclear foram analisados a partir das nove subespécies de girafas 'anteriormente' reconhecidas. Esses autores afirmaram que as novas descobertas sobre a taxonomia da girafa terão implicações de conservação, pois o tamanho populacional das girafas continua em declínio devido às ameaças humano-mediadas.

Winter et al. (2018) complementam o estudo de Fennessy et al. (2016), e realizaram um teste de introgressão genética entre os quatro clados, pela análise da magnitude do fluxo gênico entre eles. Estes autores observaram menos de um migrante por geração entre os clados, inclusive entre a girafa do norte e a girafa reticulada, que são geograficamente mais próximas, demonstrando que estas espécies não cruzam. Esta análise, em conjunto com dados genético-populacionais, confirmam a existência de quatro clados que correspondem, por sua vez às quatro espécies de girafas.

Dados de 1980 estimavam que existiam cerca de 150 mil girafas na África. Entretanto, dados atuais indicam um decréscimo de 40% nestas populações passando por um processo denominado de “extinção silenciosa” (MULLER et al., 2016). Esse declínio populacional vem sendo atribuído principalmente à perda e fragmentação de habitats e à caça de girafas, para consumo da carne, utilização de ossos e troféus (MULLER et al. 2018).

Em 2016, a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da IUCN atualizou sua avaliação de *Giraffa camelopardalis* para “Vulnerável” e listou duas subespécies (*Giraffa camelopardalis reticulata* e *Giraffa c. tippelskirchi*) como “Em perigo”, duas subespécies (*Giraffa c. camelopardalis* e *Giraffa c. antiquorum*) como “ criticamente ameaçada”, duas subespécies (*Giraffa c. peralta* e *Giraffa c. thornicrofti*) como “Vulnerável”, uma subespécie (*Giraffa c. rothschildi*) como “Quase ameaçada” e uma subespécie (*Giraffa c. angolensis*) é listada como “Menos preocupante”.

2.2 O ZOOLOGICO E A CONSERVAÇÃO EX-SITU

A Biologia da Conservação é descrita como uma “disciplina de crise” (FRANKHAM et al., 2014), uma vez que populações locais têm sido extintas, enquanto outras têm diminuído a sua distribuição e densidade, potencializando o risco de extinção na natureza (FRANKHAM et al., 2002). Neste cenário, a genética da conservação pode se tornar uma ferramenta útil na elaboração de programas adequados de conservação e manejo (JOHNSON et al., 2015; PEREZ-SWEENEY et al., 2006), uma vez que auxilia na (a) resolução de incertezas taxonômicas, (b) identificação de padrões de conectividade e fluxo gênico entre as populações, (c) estimativa do potencial evolutivo (variação genética) de espécies ameaçadas e não ameaçadas e (d) identificação de possíveis unidades de manejo para fins de resgate

do potencial evolutivo destas espécies (FRANKHAM et al., 2003). Por outro lado, nas populações mantidas em cativeiro a aplicação dos procedimentos genéticos tem auxiliado para a manutenção de populações viáveis para fins de reintrodução na natureza e identificação de espécies para evitar nascimento de híbridos.

Somado com o grande volume de dados obtidos através das abordagens moleculares, a genética de conservação nos permite examinar e/ou incrementar a manutenção e a criação de espécies em ambientes cativos. Essa abordagem pode orientar as melhores estratégias de reprodução assistida para fins de resgate genético *in-situ* e *ex-situ*. Apesar da conservação da diversidade genética ter sido muitas vezes negligenciada na implementação da política de conservação internacional (TRAILL et al., 2010) para a definição de metas de viabilidade populacional, alguns jardins zoológicos implementaram o gerenciamento genético e demográfico em seus programas cooperativos por décadas (FLESNESS, 1977; FOOSE et al., 1986; LACY et al., 1995; FRANKHAM et al., 2010).

Com o passar dos anos e com a crescente preocupação com a conservação da biodiversidade, alguns zoológicos iniciaram uma mudança de foco (BOWKETT, 2009). A prioridade em exibir os animais vem sendo gradativamente substituída pela reprodução em cativeiro, objetivando a manutenção das populações ameaçadas e conseqüentemente, uma futura reintegração ao habitat natural (BOWKETT, 2009). A reprodução e a manutenção de espécies em cativeiro têm como principal função garantir a sobrevivência de animais que não possuem mais capacidade de sobreviver na natureza. Uma vez que as espécies mantidas em cativeiro podem se tornar reservatórios genéticos para as populações nativas em risco, além de poderem fundar populações em áreas onde estariam extintas (CONDWAY, 1980), Bowkett (2009) e Dickie et al. (2007) reiteram que há uma necessidade de que os zoológicos se moldem em conjunto para equilibrar os esforços em conservação *ex-situ* com *in-situ*.

Em programas de conservação de espécies ameaçadas de extinção, o cuidado das populações geneticamente viáveis em cativeiro é uma etapa essencial. (BALLOU et al., 2010) A reprodução *ex-situ* é considerada uma medida temporária, visto que zoológicos não possuem espaço suficiente para a manutenção de populações em tamanhos adequados (FRANKHAM et al., 2002). A conservação *ex-situ* tem o seu

papel importante na manutenção das populações em períodos críticos, ou seja, enquanto ainda há riscos à viabilidade de exemplares e espécies, tornando-se uma fonte para projetos de reintrodução no habitat natural (SADAVA et al., 2009). Em um programa de conservação que conta com a cooperação de muitos zoológicos, as chances de sucesso para a conservação aumentam. Para que isso se efetive, é necessária a preocupação em evitar a reprodução entre animais aparentados, trocando os animais envolvidos no programa entre os parques zoológicos, além da disponibilização de informações sobre o manejo e identidade taxonômica desses animais (FRANCISCO & SILVEIRA, 2013).

2.3 ANÁLISES GENÉTICA NÃO INVASIVAS

Há décadas, animais eram frequentemente mortos para a realização dos estudos científicos (LEVAI, 2001). Tais atitudes fizeram com que fosse necessário o desenvolvimento de novas técnicas de amostragem que não fossem agressivas (TABERLET & LUIKART, 1999). Isso objetivou evitar a grande mortalidade dos espécimes durante os estudos, além de minimizar a dificuldade de observação e/ou captura de indivíduos (FORAN et al., 1997; TABERLET & LUIKART, 1999). Como alternativa, métodos de amostragem não invasivas foram surgindo, como a coleta de fezes, pêlos, ossos e muco, não havendo a necessidade de captura do animal para obtenção do material (MORIN et al., 2001; CREEL et al., 2003; LI et al., 2017). Além disso, tais métodos se tornaram mais atrativos por demandarem menos tempo, habilidade e dinheiro que as coletas tradicionais com tecido e sangue (TABERLET & LUIKART 1999; CREEL et al., 2003; GARCIA et al., 2010).

Amostras não invasivas e, principalmente, fezes, podem fornecer informações de presença, abundância, diversidade genética, filogeografia e dispersão (SCHWARTZ & MONFORT, 2008; BEJA-PEREIRA et al., 2009). O material fecal como fonte de DNA tem muitas vantagens tal como a sua disponibilidade, uma vez que as fezes são constantemente geradas por todos os indivíduos (FERNANDO et al., 2003). Além disso, existe a vantagem da não invasividade, ou seja, não há necessidade de manejar ou mesmo localizar os animais, e sua detecção é relativamente fácil (MCKAY et al., 2008).

Embora o DNA extraído de fezes geralmente possua baixa qualidade e pouca quantidade (GOOSSENS et al., 1998), ele pode ser utilizado como uma ferramenta importante para responder questões sobre a diversidade genética, parentesco e

relações populacionais (SUNNUCKS, 2000; MOWAT & PAETKAU, 2002). Nas últimas décadas, vários estudos populacionais, de distribuição e de identificação de espécies foram desenvolvidos utilizando técnicas moleculares a partir de amostras de fezes e pêlos, como é o caso do nosso estudo.

Miotto et al (2011) buscaram investigar a estrutura genética e níveis de variabilidade genética em *Puma concolor* no sudeste do Brasil, utilizando loci microsatélites. Para isso foram utilizadas amostras de fezes em estradas e trilhas dentro e ao redor de duas áreas protegidas e tecido de indivíduos mortos nas estradas do local de estudo. As análises de diversidade genética demonstraram altos níveis de heterozigosidade, além de indicar 10 alelos por locus, enquanto que na análise de estruturação genética não foi observado nenhum sinal de estruturação populacional. A partir destes resultados os autores recomendam que haja um manejo na área de estudo para aumentar a conectividade dos habitats, criando corredores que permitam o cruzamento de pumas em rodovias para manter a população e aumentar o fluxo gênico entre as populações adjacentes, em face da ausência de estruturação genética.

Faria et al (2011) objetivaram identificar a presença de *Tragelaphus eurycerus isaaci* (antílope bongo) em quatro florestas do Quênia e realizar uma análise preliminar da diversidade genética por meio do marcador da região controle. Foram utilizadas 212 amostras fecais que foram posteriormente identificadas para a espécie. A identificação pelo DNA revelou a maior presença (102) de *T. e. isaaci*, além da presença (63) de *Kobus ellipsiprymnus* (antílope waterbuck) nas áreas estudadas. Já a análise de variação genética demonstrou baixa diversidade em *T. e. isaaci*, uma vez que somente dois haplótipos foram observados nas amostras analisadas, quando comparada com a diversidade de *K. ellipsiprymnus* que apresentou 21 haplótipos para 63 amostras. Os autores sugeriram que seja realizado um estudo mais profundo utilizando marcadores microsatélites para observar a variação genética, além de entender a estrutura da população de *T. e. isaaci*. A baixa diversidade genética observada se tornou uma informação importante que sugeriu preocupação com a conservação desta espécie.

Já Ito et al (2016) investigaram a dieta de *Diphylla ecaudata* em um trecho da Caatinga Pernambucana, utilizando o gene mitocondrial citocromo b. Foram coletadas amostras fecais de vários indivíduos. As amostras amplificadas foram comparadas com amostras disponíveis em bancos de dados e os resultados revelaram a presença

de DNA de *Gallus gallus* e *Homo sapiens* nas amostras fecais. Os autores concluíram que a presença de humanos como presas pode demonstrar a baixa disponibilidade de aves no local, podendo reforçar o impacto que as práticas humanas tem nos processos ecológicos.

Mantellatto e colaboradores (2017) objetivaram investigar a variabilidade genética de uma população de *Ozotoceros bezoarticus leucogaster* na região do Pantanal brasileiro, através de marcadores microssatélites, utilizando amostras fecais frescas. Análise de identificação de amostras apontou para uma média de 74 indivíduos, onde desses 50 eram adultos. O resultado da variabilidade genética realizado com as 50 amostras de adultos indicou uma alta diversidade genética, onde a média de alelos por locus foi de 11,5. Os autores sugeriram que mais estudos devem ser feitos para comparar diferentes populações, além de serem necessários mais estudos com DNA mitocondrial para avaliar a estruturação já observada em outras populações. Por fim os autores concluíram que as técnicas utilizadas podem ser empregadas para outras espécies de Cervidae.

Kiptiyah et al (2019) objetivaram examinar as características genéticas de *Bos javanicus javanicus* através da região do citocromo b, utilizando amostras fecais de quatro parques nacionais em Java na Indonésia. Os resultados da distância genética entre três populações foi zero, diferente de quando essas populações são comparadas com a população do Parque Nacional Meru Betiri que apresentou distância de 0,005. A rede haplotípica evidenciou que a maioria dos haplótipos foi distribuída em três populações (UKNP, APNP e BNP), além disso as populações dos parques MBNP e UKNP possuem um haplótipo específico cada. Os autores concluíram que a população do MBNP pode servir como uma unidade separada para conservação em relação aos outros parques. Porém, se for observado um grande declínio nas populações, deverão ser realizados esforços para aumentar a diversidade, evitando a consanguinidade e a deriva genética.

De Oliveira et al (2019) buscando melhor entender a distribuição do cervídeo Neotropical *Mazama nana*, utilizaram amostras de DNA fecal e identificaram a ocorrência da espécie, por meio de marcadores PCR-RFLPs. A espécie se distribui amplamente pelos estados do Paraná e Santa Catarina. Fora do Brasil constatou-se a ocorrência da espécie na província de Misiones, Argentina.

2.4 MARCADORES MOLECULARES

O avanço da biologia molecular proporcionou o desenvolvimento de uma gama de ferramentas analíticas muito poderosas nas análises de biologia de populações (ZELENINA et al., 2011). A genética se tornou uma forte ferramenta para estudos de taxonomia, biogeografia, filogenia, evolução e conservação (CALDARA et al., 1996; SANTOS et al., 2006; CARVALHO et al., 2012). Existem inúmeras vantagens quando se utiliza a identificação molecular de espécies, como a possibilidade de se trabalhar apenas com uma pequena amostra da espécie a ser estudada. Tal estratégia otimiza os estudos de taxonomia que, de modo geral, só podem ser realizados com o indivíduo inteiro.

O DNA mitocondrial é herdado maternalmente pela maioria das espécies (ALLENDORF & LUIKART, 2007). Esse tipo de DNA é circular e contém 37 genes e uma região de controle. A análise de setores do mtDNA é útil para detectar polimorfismos, que são usados para resolver distâncias entre populações específicas e espécies intimamente relacionadas (LOEW 2000).

Um dos marcadores mitocondriais mais amplamente utilizado é o gene Citocromo b (LOEW, 2000). Esta região tem sido utilizada na identificação de espécies animais, em estudos sobre a biologia evolutiva das espécies, para entender melhor a diversidade genética, afim de melhorar o gerenciamento de conservação de espécies (COZZOUL et al. 2013; HRBEK et al. 2014; BOUBLI et al. 2019).

Algumas pesquisas podem ser destacadas sobre o uso do gene Citocromo b para os fins acima mencionados. Cozzoul e colaboradores (2013) descreveram uma nova espécie de anta (*Tapirus sp.*) vivendo na Amazônia. Os autores utilizaram sequências de 3 genes mitocondriais, incluindo citocromo b, de amostras coletadas na Amazônia e de amostras de *T. terrestris*, *T. indicus*, *T. bairdii*, *T. pinchaque*, que foram utilizadas para uma reconstrução filogenética. Além disso, os autores também utilizaram de análises morfológicas para reforçar os resultados. Ambos os métodos evidenciaram uma nova espécie de *Tapirus*, destacando também a biodiversidade oculta na Amazônia.

Já Hrbek et al (2014) utilizando os caracteres morfológicos e moleculares incluindo o citocromo b, descobriram uma nova espécie de boto rosa na bacia do rio Araguaia no Brasil. Foram obtidas amostras de *Inia boliviensis*, *I. geoffrensis*, *Inia sp.* (indivíduos do rio Araguaia) e as análises de estrutura populacional identificam três

grupos prováveis do gênero *Inia*, assim como a análise de componentes principais (PCA) com microssatélites. As análises morfológicas mostraram um número considerável de diferenças entre os indivíduos do rio Araguaia com os indivíduos das outras duas espécies. Baseado nos resultados encontrados os autores propuseram uma nova espécie (*I. araguaiaensis*). Esta hipótese foi sustentada pela forte evidência de que esses indivíduos são distintos das espécies *I. boliviensis* e *I. geoffrensis*. Além disso, os autores mostraram que as populações de *I. araguaiaensis* estão fragmentadas por seis barragens hidrelétricas e são afetadas pelo desenvolvimento agrícola e industrial. A recomendação oferecida pelos autores, perante os critérios da IUCN, é que esta espécie esteja alocada na categoria vulnerável.

Em Boubli et al. (2019) utilizando uma abordagem integrativa de caracteres de pelagem e análises genéticas usando os genes citocromo b e citocromo oxidase 1, descreveram uma nova espécie de macaco titi na Amazônia. As comparações morfológicas foram feitas com espécies de macaco titi mais filogeneticamente relacionadas, com a linhagem da Alta Floresta Amazônica (*Plecturocebus moloch*, *P. vieirai* e *P. bernhardi*) e com linhagens divergentes do grupo moloch (*P. hoffmannsi*, *P. miltoni*, *P. cinerascens* e *P. baptista*). As análises apontaram que *Plecturocebus grovesi* sp. nov. pertence ao grupo moloch e que a combinação dos caracteres morfológicos confere ela uma aparência única entre todas as espécies estudadas. Já as análises de filogenia molecular apontaram para a monofilia do táxon estudado (*Plecturocebus grovesi* sp. nov.), em comparação com os dados de *P. moloch*, *P. vieirai*, *P. bernhardi*, *P. cupreus*, *P. hoffmannsi*. A análise de estruturação bayesiana para um $k=5$, recuperou os resultados filogenéticos, apoiando a distinção entre *Plecturocebus grovesi* sp. nov., *P. bernhardi*, *P. vieirai* e *P. moloch*. Segundo os autores esta nova espécie é encontrada em uma das áreas onde as florestas estão desaparecendo muito rápido devido à agricultura, sendo necessárias medidas para a conservação desta nova espécie.

A região de controle mitocondrial (CR) está ligada a processos como replicação e transcrição, e compreende a região não-codificante do genoma mitocondrial, sendo altamente variável (MEYER, 1993; LOEW, 2000). Devido aos altos níveis de variabilidade encontrados, essa região é um dos marcadores mais adequados para comparações de sequências dentro e entre populações e espécies

intimamente relacionadas (LOEW, 2000). Além disso, tem sido amplamente utilizada para mensuração a diversidade genética e identificação de unidades de conservação, a fim de otimizar o manejo das espécies (VARGAS et al., 2008; RICHMOND et al., 2014; JOHNSON et al., 2015; POWER et al., 2015; CRAIG et al., 2016).

Em relação à região controle do mtDNA, alguns trabalhos também podem ser pontuados sobre o uso da variação genética para os fins de melhor entender a estrutura genética interpopulacional e usar destas informações para recomendações de conservação. Hernández-Romero et al (2017) utilizaram de amostras de *Lontra longicaudis* de toda a sua distribuição atualmente reconhecida para determinar os fatores genéticos, morfológicos e variação ecológica das populações, afim de avaliar o papel dos fatores geográficos e ambientais na formação da divergência entre as espécies. Para isso análises filogeográficas, morfométricas e de modelagem ambiental de nichos foram realizadas. Para as análises filogenéticas os autores utilizaram também os dados da região controle do DNA mitocondrial. A estrutura genética encontrada na espécie corresponde às três subespécies distribuídas em regiões geográficas distintas. Além disso, foi encontrada uma diferenciação genética nas duas subespécies do sul, correspondente à peculiaridades do perfil hidrográfico e barreiras geográficas da região. Na análise da morfologia os autores encontraram uma relação entre a forma do crânio e da mandíbula com a variação ambiental dos habitats das subespécies. A análise de modelagem histórica de nicho sugeriu que essas subespécies sofreram alterações significativas em seu nicho ambiental como resultado da disponibilidade de diferentes habitats ao da sua distribuição geográfica. Segundo os autores os resultados suportam a hipótese de que o que levou a divergência populacional da espécie foram a variação ambiental e as barreiras geográficas ao fluxo gênico.

da Silva Santos e colaboradores (2018) investigaram a história evolutiva de *Leopardus colocolo*, objetivando avaliar as relações genéticas entre populações ocidentais de *L. colocolo* e os do leste da América do Sul, estimar a origem geográfica e a idade de haplótipos de introgressão do DNA mitocondrial de *L. tigrinus*. Para as análises filogenéticas e de diversidade genética foram utilizadas uma série de regiões mitocondriais, incluindo a região controle. A análise de diversidade genética indicou um padrão de diversificação rápida e recente entre as espécies. As análises filogenéticas demonstraram vários agrupamentos monofiléticos, enquanto que as

análises de fluxo gênico incluindo os indivíduos de *L. tigrinus* mostraram uma falta de haplótipos compartilhados entre as espécies, indicando que sua hibridação pode ser antiga. Os autores também observaram uma robusta estrutura populacional que apoia a colonização oeste-leste na história dessa espécie. Além disso, foi notado uma íntima relação entre os haplótipos brasileiros/uruguaios de *L. colocola* e os de *L. tigrinus*, indicando que sua hibridação estava muito relacionada à expansão de *L. colocola* no leste da América do Sul. Os autores concluíram que *L. colocola* pode ser visto como uma espécie complexa com estrutura populacional marcada em toda a sua extensão. Estes ainda sugeriram que para fins de conservação, as populações regionais devem ser consideradas como unidades evolutivamente significativas distintas.

Já Plon et al (2019) buscaram investigar filogeografia de *Dugong dugon* em toda a sua distribuição original. Para isso foram utilizados DNAs provenientes de museus e da natureza. A partir da amplificação da região controle do DNA mitocondrial os autores encontraram através das análises filogenéticas e de redes haplotípicas uma variação considerável entre as sequências das espécies e uma significativa estruturação geográfica. Novas linhagens de DNA mitocondrial que não tinham sido observadas anteriormente foram encontradas nas amostras do Oceano Índico. As diversidades de haplótipos e nucleotídeos observadas nas amostras da população do Oceano Índico Ocidental foram mais baixas do que as amostras da Indonésia e da Austrália. Os autores concluíram que essas novas linhagens e a potencial perda de diversidade destacam a importância de conservação e a vulnerabilidade das populações de dugongos no Oceano Índico Ocidental.

O gene Citocromo Oxidase Subunidade 1 (COI), devido a sua variabilidade, tem sido considerada uma ferramenta útil na identificação de espécies animais. A sequência de um fragmento deste gene é chamada de *barcoding* ou código de barras de DNA (HEBERT et al., 2003). Uma vez que as sequências de COI tendem a ter uma maior variação interespecífica que intraespecífica, além de serem relativamente constantes entre os indivíduos de uma mesma espécie, uma amostra pode ser identificada comparando sua sequência com bancos de sequências já identificadas por especialistas, como a plataforma *Barcode Of Life Database* (BOLD).

Há vários trabalhos interessantes que merecem destaque sobre o uso do gene Citocromo Oxidase Subunidade 1 para os fins conservação. Dentre eles Mello et al (2018) objetivaram testar o desempenho de metodologias de delimitação de espécies baseadas em coalescência usando conjuntos de dados Citocromo Oxidase 1 e

Citocromo b, a partir de sequências de primatas Neotropicais. Os resultados apontaram o gene COI como o marcador molecular que melhor replica a taxonomia. A análise de GMYC apresentou o melhor desempenho geral para evitar relações filogenéticas inconclusivas. Os autores concluem que a implementação da automatização de delimitação de unidades evolutivas é um sistema valioso para as políticas de tomada de decisão, pois permite o refinamento de um procedimento inteiramente baseado na taxonomia essencialmente tradicional ou Linneana.

Em Feijó et al (2019) utilizando genes mitocondriais e nucleares investigaram as relações filogenéticas de todas as espécies do gênero *Dasypus* usando uma cobertura geográfica mais ampla. As análises filogenéticas apontaram três linhagens principais de tatus de nariz comprido que foram tratados como subgêneros e foi observado que a maioria de sua diversificação ocorreu durante o Plioceno. Já as análises de delimitação molecular de espécies apoiaram as evidências morfológicas na atribuição de *D. hybridus* como uma subespécie de *D. septemcinctus* e confirmou a divisão do complexo de *D. kappleri* em outras três espécies. Por fim, os autores reconheceram nove espécies vivas de tatus de nariz comprido e recomendam que sejam feitos mais estudos com *D. mazzai* e *sabanicola* a fim de esclarecer as relações filogenéticas dessas espécies que recentemente divergiram.

da Cruz et al. (2019) objetivaram criar um banco de dados do citocromo oxidase I para espécies do gênero *Oligoryzomys*, com base no material tipo e nas amostras cariotipadas de uma espécie de *Oligoryzomys*, *O. stramineus*. Para isso foram avaliadas as distâncias genéticas intra/interespecíficas das espécies, utilizado o método GMYC para delimitar as linhagens e identificar nucleotídeos diagnósticos para cada espécie. A análise filogenética apenas de COI apresentou o mesmo padrão de estrutura encontrado na árvore com genes concatenados onde todas as espécies morfológicamente definidas foram recuperadas, exceto *O. stramineus*, que formou um grupo irmão com *O. nigripes*. Na análise de nucleotídeos diagnósticos *O. mattogrossae* foi a espécie que apresentou o maior número de caracteres diagnósticos, diferente daquilo observado em *O. moojeni*, *O. stramineus* e *O. utiaritensis*, os quais não foram identificados nucleotídeos diagnósticos. As espécies *O. messorius* e *O. rupestris* apresentaram dois caracteres de diagnóstico cada. Por fim, os autores concluíram que são necessários mais estudos integrativos com dados moleculares, morfológicos e cariotípicos e uma amostragem adicional de *Oligoryzomys* para resolver os problemas taxonômicos.

2.5 ESTUDOS REALIZADOS EM GIRAFAS COM MARCADORES DE DNA MITOCONDRIAL

Brown et al. (2007) avaliaram a variação genética a partir de sequências mitocondriais de Citocromo b, objetivando apresentar uma análise filogeográfica e de genética populacional da girafa em grande parte das áreas geográficas remanescentes da espécie. Os dados mostraram que havia extensa estrutura genético-populacional entre os indivíduos amostrados. Além disso, indicaram que algumas das populações geneticamente distintas representam Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) que são altamente ameaçadas e não têm o reconhecimento necessário nos atuais planos de manejo. As Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), são populações que: (1) são reciprocamente monofiléticas para alelos mtDNA e (2) demonstram divergência significativa das frequências alélicas em loci nucleares (Moritz, 1994).

A fim de avaliar as relações populacionais de girafas, Hassanin et al. (2007) utilizaram fragmentos mitocondriais de Citocromo b e da região controle. Os resultados mostraram que as girafas da África ocidental e central pertencem a duas subespécies diferentes, *Giraffa camelopardalis peralta* e *G. c. antiquorum*. Além disso, os autores mostraram que as girafas no zoológico de Vincennes em Paris, que eram reconhecidas como *G. c. peralta*, pertencem à subespécie *G. c. antiquorum*. Os autores então concluem que como subespécie *G. c. peralta* está representada apenas no Níger, com uma pequena população e que não existe nenhum exemplar desta subespécie nos zoológicos Europeus. Assim os autores concluíram que não há a possibilidade de um programa para reintrodução caso fosse necessário. Desta maneira os autores recomendam fortemente medidas para proteger e conservar as girafas da África Ocidental.

Em um estudo mais recente, Bock et al. (2014) coletaram amostras de indivíduos de oito das nove subespécies de girafas ao longo de Botswana, Namíbia, DR Congo, Chad, África do Sul, Nigéria, Uganda, Zâmbia e Tanzânia, objetivando apresentar análises genéticas populacionais. A partir de fragmentos do gene do Citocromo b e da região de controle foi demonstrado que as faixas de distribuição das girafas angolana e sul-africana precisam ser redefinidas. Isso se baseou nos dados genéticos que mostraram uma acentuada delimitação leste-oeste entre as girafas

angolana e sul-africana, em uma área que não havia sido investigada anteriormente em termos genéticos. Por fim, os autores mencionaram que são necessárias informações mais precisas acerca da variação genética e filogenética dessas subespécies específicas, para que estratégias de manejo sejam desenvolvidas e implementadas com maior robustez.

Recentemente Fennessy et al (2016) e Winter et al (2018), utilizaram análises de genes mitocondriais concatenados e introns nucleares que revelaram a existência de quatro espécies de girafas filogeneticamente distintas. Os estudos foram realizados a partir das subespécies que eram anteriormente reconhecidas. As análises filogenéticas conseguiram separar as os indivíduos em quatro clados. A análise de estrutura genética recuperou esse resultado. Além disso, foi realizado um teste de introgressão genética entre os quatro clados encontrados, para verificar a magnitude do fluxo gênico entre eles. Os autores observaram menos de um migrante por geração entre os clados, inclusive entre a girafa do norte e a girafa reticulada, que são geograficamente mais próximas. Esta análise, em conjunto com dados genético-populacionais, confirmam a existência de quatro clados que correspondem, por sua vez, às quatro espécies de girafas.

Com o avanço da biologia e sistemática molecular foi possível a descoberta de que essa única espécie de girafa abriga em quatro novas espécies nominais com cinco subespécies (Fennessy *et al.*, 2016). Contudo, desde 1996 *Giraffa camelopardalis*, como um único táxon, está alocada na Lista Vermelha da IUCN e é categorizada como vulnerável devido ao declínio demográfico da espécie no geral (MULLER et al., 2018). Uma vez que os zoológicos começaram a mudar o foco para atuar principalmente com a conservação da biodiversidade (BOWKETT, 2009), se faz necessário re-categorizar os diferentes ramos evolutivos, antes abrigadas em uma única espécie, afim de evitar condutas conservacionistas equivocadas.

3 METODOLOGIA

3.1 AMOSTRAGEM

Com a colaboração da Associação de Zoológicos e Aquários do Brasil, foram identificadas 14 girafas vivas, sendo 10 fêmeas e quatro machos, em seis zoológicos brasileiros: Fundação Jardim Zoológico de Brasília, o Zoológico Municipal de Curitiba, o Zoológico de São Paulo, Zooparque de Itatiba, Zoo Beto Carrero e Zoo Pomerode (Tabela 1). Todos os 14 exemplares eram adultos. Destas, foram coletadas amostras fezes em cada instituição (realizada pelo próprio autor) e 1 amostra de tecido de um espécime já falecido da Fundação Jardim Zoológico de Brasília. Este espécime morto foi incluído no estudo, pois seus gametas estavam preservados, podendo no futuro ser usado em procedimentos de fertilização *in vitro*. Com exceção da girafa de Brasília que divide seu recinto com uma zebra, todos outros animais ficam em recintos separados. Nos Zoológicos que possuem mais de um animal, segundo os responsáveis técnicos de cada zoológico, todos são aparentados. No Zoo de Pomerode mãe e filha, no Zoo Beto Carrero mãe (Savanah) e filhos e no de São Paulo mãe (Mel), pai (Palito) e filhos. Cabe destacar que originalmente o Zoo de Itatiba tinha aprovado o acesso às fezes de todos os seus três exemplares. Porém, no momento da amostragem das fezes fomos impossibilitados de acessar as fezes de 2 desses exemplares. A justificativa mencionada é que tais exemplares já estariam sendo usados como material de outra pesquisa genética de girafas no exterior.

Tabela 1. Informações sobre nome do espécime no zoológico, sexo, nomenclatura no estudo, local de coleta e origem de cada espécime.

Nome do animal no zoológico	Sexo	Nomenclatura/ Sigla no estudo	Local de coleta	Origem
Leninha	F	PO 1	Zoo Pomerode/SC	África do Sul
Ethema	F	PO 2	Zoo Pomerode/SC	Nasceu no zoo
Bin	M	BC 1	Zoo Beto Carrero/SC	Nasceu no zoo
Gigrande	M	BC 2	Zoo Beto Carrero/SC	Nasceu no zoo
Catarina	F	BC 3	Zoo Beto Carrero/SC	Nasceu no zoo
Savanah	F	BC 4	Zoo Beto Carrero/SC	África do Sul
Pandinha	F	CB	Zoológico Municipal de Curitiba/PR	Nasceu no zoo
Yaza	F	BR 1	FJZB /DF	Nasceu no zoo
Yvelize*	F	BR 2	FJZB /DF	Nasceu no zoo
Ayanna	F	IT	Zooparque Itatiba/SP	Nasceu no zoo
Palito	M	SP 1	Zoológico São Paulo/SP	África do Sul
Bernardo	M	SP 2	Zoológico São Paulo/SP	Nasceu no zoo
Mel	F	SP 3	Zoológico São Paulo/SP	África do Sul
Agatha	F	SP 4	Zoológico São Paulo/SP	Nasceu no zoo
Safira	F	SP 5	Zoológico São Paulo/SP	Nasceu no zoo

F= Fêmea; M=Macho

* exemplar falecido

3.2 COLETA DE AMOSTRAS

Foram coletadas fezes frescas a fim de serem obtidos DNAs fecais mais íntegros, conforme já realizado em outras espécies de mamíferos (MANTELLATTO et al., 2017; LI et al., 2017; PELIZZON et al., 2017). Para identificar a qual indivíduo pertencia cada amostra fecal, cada o animal foi acompanhado visualmente até que o mesmo defecasse (Figura 4). As amostras foram recolhidas com auxílio de luvas e uma pinça, e transferidas para tubos falcon de 50 mL previamente esterilizados, contendo etanol 96% - 100% com a finalidade de evitar a degradação do DNA, e armazenadas à -20°C em laboratório (Figura 5).

A amostra de tecido do exemplar falecido foi coletada com o auxílio de um bisturi e uma pinça, e transferidas para um tubo plástico previamente autoclavado, contendo etanol 100%. Todas as amostras foram destinadas ao Laboratório de Genômica Evolutiva e Ambiental (LAGEA), na Universidade Federal de Pernambuco para a realização das análises genéticas. Durante o evento da amostragem fotos dos indivíduos foram tiradas utilizando uma câmera Sony Cyber-shot DSC-HX300 a fim de realizar a identificação dos indivíduos através do padrão de pelagem, conforme já utilizada por outros autores.



Figura 4. Exemplo da fonte das amostragens fecais (grumos escuros) realizadas em alguns zoológicos.



Figura 5. Exemplo da estratégia de armazenagem das amostras fecais (imersas em Etanol 100%, em tubos tipo falcon estéreis) até que as mesmas chegassem até o laboratório.

3.3 IDENTIFICAÇÃO POR PADRÃO DE PELAGEM

Para identificar o padrão de pelagem de cada animal, todas as imagens foram recortadas em um retângulo de análise que se ajusta horizontalmente entre a borda anterior do membro pélvico e o tórax, e verticalmente entre o dorso e a pele dobrada abaixo da borda posterior do membro torácico (Figura 6). A identificação foi feita de forma visual comparando com imagens referência das espécies de girafa presentes no *Africa's Giraffe: A Conservation Guide* (Giraffe Conservation Foundation, 2017) (Figura 7). Além disso foi observada a presença/ausência de um terceiro ossicone, típico de machos adultos das girafas da região do Norte da África (Figura 8), por meio de uma simples inspeção visual dos exemplares machos.

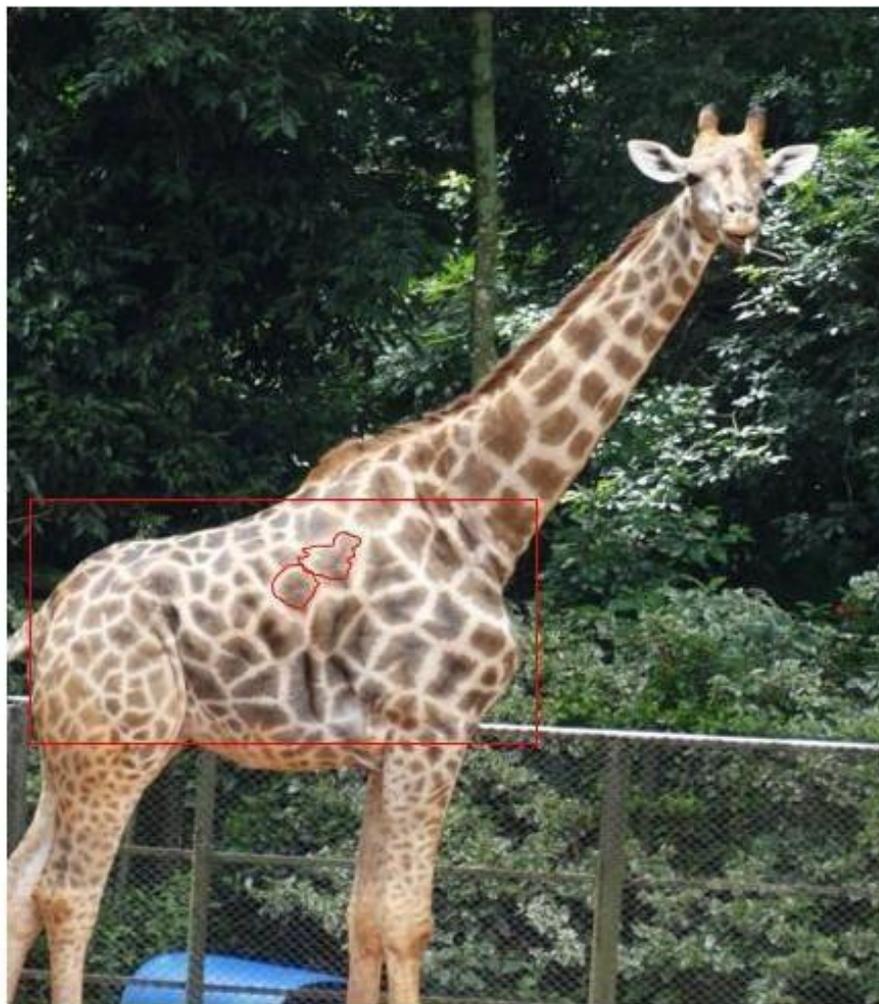


Figura 6: Seção analisada do padrão de pelagem. Em detalhe as formas das manchas analisadas.

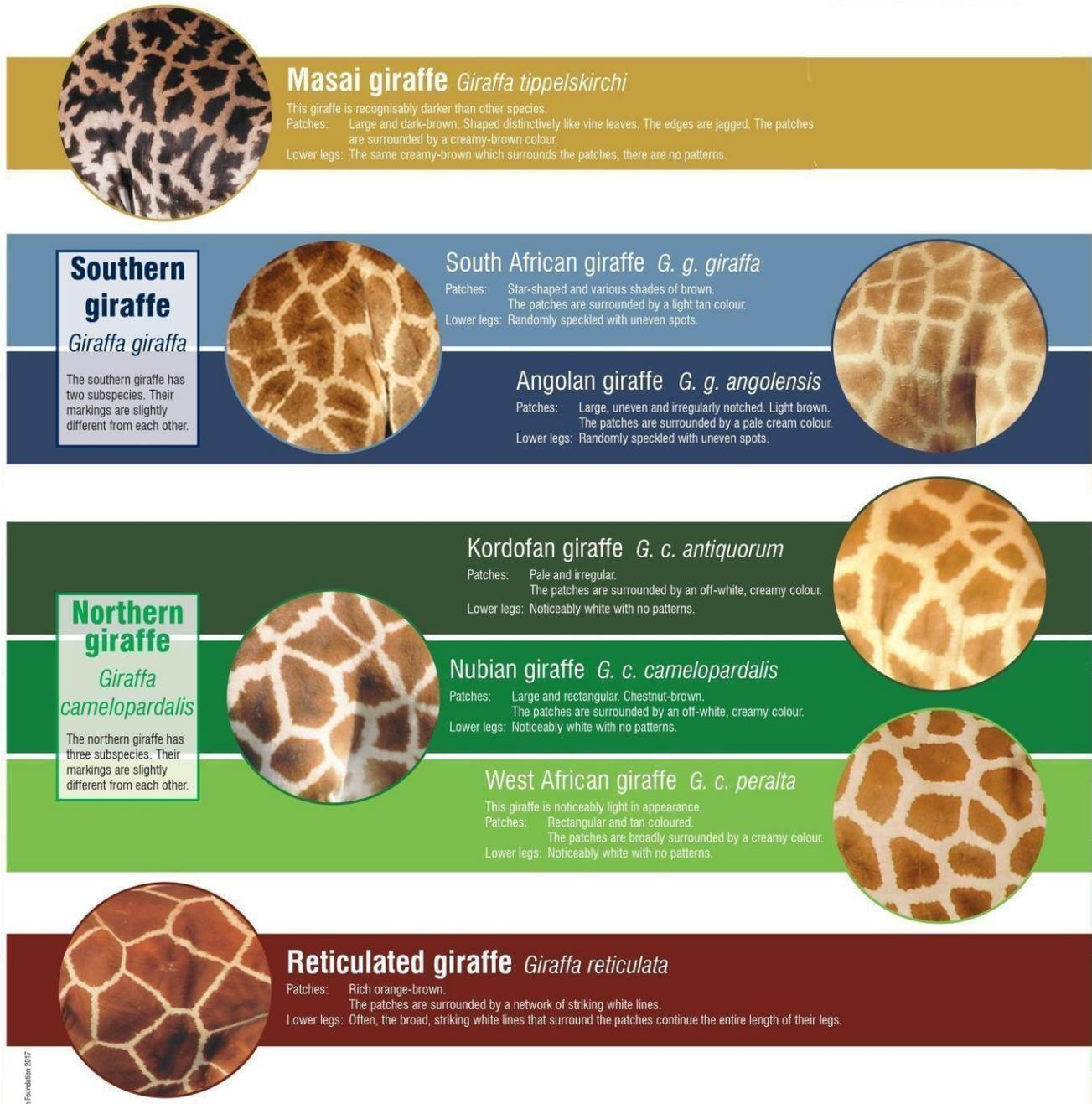


Figura 7: Síntese do padrão de pelagem correspondente a cada uma das espécies e sub-espécies de girafa na África. Modificado *Giraffe Conservation Foundation* (2017).

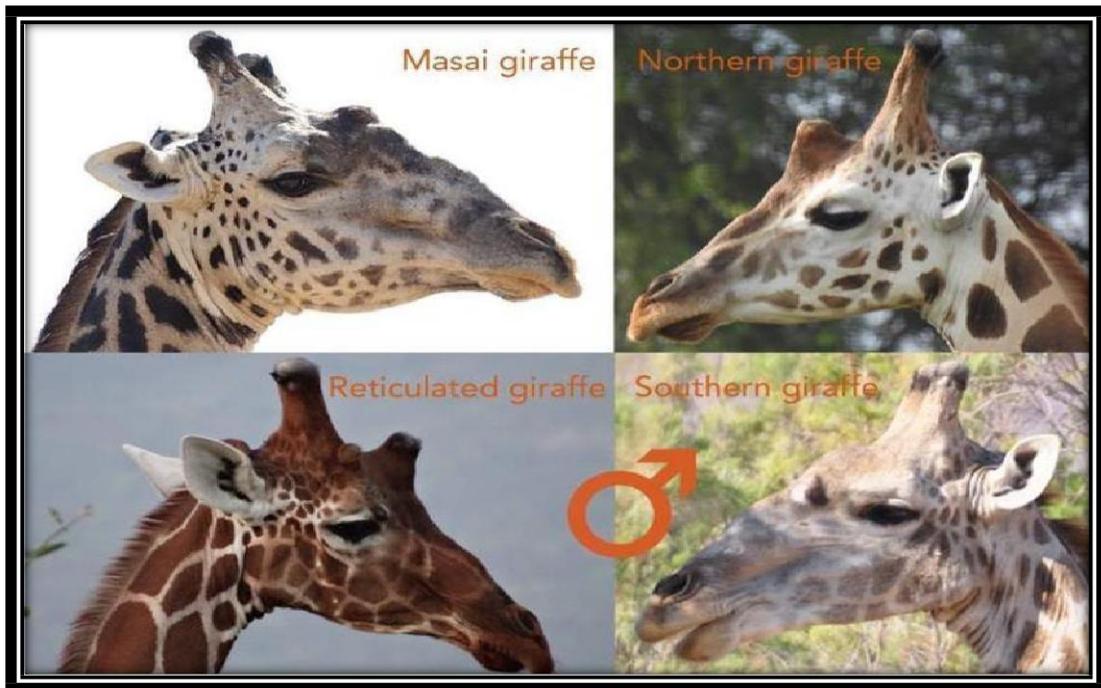


Figura 8: Estrutura craniana adicional (terceiro occicone) encontrada em machos das espécies *Giraffa camelopardalis* e *Giraffa reticulata*. Modificado Giraffe Conservation Foundation (2017).

3.4 EXTRAÇÃO, AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE DNA

O DNA genômico total foi extraído de 14 amostras fecais utilizando o kit *QIAmp DNA Stool Mini Kit – Qiagen*, com algumas modificações (após adicionar o tampão ASL, incubar a 65°C overnight, colocar 80 µL de tampão AE e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente) e a extração 1 uma amostra de tecido foi realizada com auxílio do kit de extração *Qiagen DNeasy Tissue and Blood*, seguindo as instruções do fabricante. A avaliação da qualidade e a quantificação do DNA extraído foram feitas, respectivamente, através de gel de integridade de agarose 1%, e mensuração em nanoespectrofotômetro *Nanodrop 2000 (Thermo Scientific)*.

Os genes Citocromo b foram amplificados em ambas as direções, utilizando o par de primers 5'-TGAAAACCATCGTTGTC GT-3' e 5'-GTGGAAGGCGAAGAATCG-3'. A Região de Controle (422 pb) foi amplificada com o par de primers 5'-TGAAAACCATCGTTGTCGT-3' e 5'-GTG GAAGGCGAAGAATCG-3'. Todos esses procedimentos seguiram as sugestões metodológicas oferecidas por Bock et al. (2014)

e aplicada por Fennessy et al. (2016). Além destas regiões, esta atual pesquisa inovou por complementar a abordagem multiloci ao amplificar a região do gene Citocromo Oxidase Subunidade I. Esta região foi amplificada utilizando um coquetel de *primers* para mamíferos desenvolvido por Ivanova et al. (2012). As amplificações foram realizadas através de reações de *PCR* (*Polymerase Chain Reaction*) em um volume final de 25 µL contendo 12,5 µL de *2X Taq Master Mix*, 0,5 µL de MgCl₂ (50 mM), 1U de Taq Polimerase (Cellco), 1 µL de cada *primer* (10 mM) e 50 ng de DNA extraído. A reação foi realizada em termociclador *Biocycler* (*Life Technologies*).

Em relação aos PCRs de Citocromo b e aqueles da região controle, a programação do termociclador seguiu os passos de 95°C por 5 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, e 72°C por 5 minutos para extensão final (Fennessy et al., 2016). As reações de PCR de Citocromo Oxidase 1 seguiu os passos de 95°C por 15 minutos, seguidos de 35 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 2 minutos e 72°C por 20 minutos para extensão final (Khedkar et al., 2016). Os produtos da *PCR* foram visualizados em gel de agarose 1,8% sob luz ultravioleta após eletroforese a 80V por 30 minutos, e quantificados por comparação com o marcador de peso conhecido *ladder* 1 Kb.

Todos os produtos das *PCRs* foram purificados utilizando-se a enzima *ExoSAP IT* (*Affymetrix – USB Corporation*) de acordo com protocolo fornecido pelo fabricante, e quantificados no nano espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (*Thermo Scientific*). As reações de sequenciamento foram realizadas com o kit de sequenciamento *Big Dye® Terminator v3.1* (*Life Technologies*), de acordo com protocolo fornecido, nas direções *forward* e *reverse*.

Além dos dados moleculares aqui produzidos, foi utilizado um banco de dados com toda a variação (haplótipos diferentes) de sequências de Citocromo b, da região controle e do gene Citocromo oxidase 1, disponíveis pela literatura, afim de atender ao objetivo geral deste trabalho.

3.5 ANÁLISES DE DADOS

Após a compilação de todas as sequências aqui produzidas do gene Citocromo b e da região controle, com aquelas disponíveis pela literatura para os mesmos marcadores, análise dos dados foi realizada de duas formas: os dados analisados

isoladamente e os dados analisados com sequências concatenadas.

No que se refere aos dados analisados isoladamente, Todas as sequências foram alinhadas e editadas visualmente utilizando o algoritmo *Clustalw* (THOMPSON et al., 1994) no software *BioEdit Sequence Alignment Editor v.7.0* (HALL, 1999), por meio do alinhamento múltiplo usando os valores de 15 e 0,3 para a abertura e extensão dos *gaps*, respectivamente (HALL, 2001), juntamente com sequências obtidas no Genbank (Tabela 2). Um grupo externo constituído por sequências *Okapi johnstoni* também foi utilizado para compor matriz de dados para fins comparativos. A escolha do grupo externo se deu por meio dos resultados apresentados por Chen et al. (2019). Após o alinhamento, as extremidades iniciais e terminais das sequências foram eliminadas a fim de se obter um bloco homogêneo de sítios comparáveis e evitar resultados controversos.

Tabela 2- Sequencias utilizadas nas analises com seus respectivos marcadores e números de acesso no Genbank.

Espécie	Marcador	Autor	Acesso GenBank
<i>Okapia johnstoni</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2013	HF571175.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2016	MG262282.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2016	LT628395.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2016	MG262292.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	MG262281.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2016	LT628417.1
<i>G.c.rothschildi</i>	Citocromo b	Bock et al. 2014	HG975137.1
<i>G.c.rothschildi</i>	Citocromo b	Bock et al. 2014	HG975138.1
<i>G.c. antiquorum</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	MG262283.1
<i>G.c.antiquorum</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	MG262284.1
<i>G.c.antiquorum</i>	Citocromo b	Bock et al. 2014	HG975179.1
<i>G.c.peralta</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	MG262301.1
<i>G.c.peralta</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	MG262298.1
<i>G.c.peralta</i>	Citocromo b	Bock et al. 2014	HG975188.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Bock et al. 2014	HG975118.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Bock et al. 2014	HG975125.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Bock et al. 2014	HG975126.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2016	LT628403.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2016	LT628408.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Fennessy et al. 2016	LT628415.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	KY865148.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	KY865145.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	KY865142.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	KY865149.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	KY865174.1
<i>G.g.angolensis</i>	Citocromo b	Winter et al. 2018	KY865163.1

<i>G.g.giraffa</i>	Citocromo b	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628421.1
<i>G.g.giraffa</i>	Citocromo b	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975103.1
<i>G.g.giraffa</i>	Citocromo b	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975104.1
<i>G.g.giraffa</i>	Citocromo b	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975170.1
<i>G.g.giraffa</i>	Citocromo b	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975157.1
<i>G.g.giraffa</i>	Citocromo b	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975093.1
<i>G.g.giraffa</i>	Citocromo b	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975150.1
<i>G. thornicrofti</i>	Citocromo b	Fennessy <i>et al.</i> 2013	HF571167.1
<i>G. tippelskirchi</i>	Citocromo b	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975163.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628410.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628412.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628413.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865165.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865164.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865166.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865167.1
<i>G. reticulata</i>	Citocromo b	Winter <i>et al.</i> 2018	MG262294.1
<i>Okapia johnstoni</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2013	HF571214.1
<i>G.c.antiquorum</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	MG257951.1
<i>G.c.antiquorum</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975281.1
<i>G.c.antiquorum</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	MG257950.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	MG257959.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	MG257948.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	MG257949.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628390.1
<i>G.c.camelopardalis</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628368.1
<i>G.c.peralta</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	MG257968.1
<i>G.c.peralta</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975290.1
<i>G.c.peralta</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	MG257965.1
<i>G.c.rothschildi</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975249.1
<i>G.c.rothschildi</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975240.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975227.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975228.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628376.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628381.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628388.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865105.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865108.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865111.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865112.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865126.1
<i>G.g.angolensis</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865137.1
<i>G.g.giraffa</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975205.1
<i>G.g.giraffa</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975206.1
<i>G.g.giraffa</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975259.1
<i>G.g.giraffa</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628394.1
<i>G.g.giraffa</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975272.1
<i>G.g.giraffa</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975195.1
<i>G.g.giraffa</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975252.1

<i>G. reticulata</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628383.1
<i>G. reticulata</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628385.1
<i>G. reticulata</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865128.1
<i>G. reticulata</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	MG257961.1
<i>G. reticulata</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2016	LT628386.1
<i>G. reticulata</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865127.1
<i>G. reticulata</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865129.1
<i>G. reticulata</i>	CR	Winter <i>et al.</i> 2018	KY865130.1
<i>G. tippelskirchi</i>	CR	Bock <i>et al.</i> 2014	HG975265.1
<i>G. thornicrofti</i>	CR	Fennessy <i>et al.</i> 2013	HF571209.1
Mammal environmental	COI	D'Amato <i>et al.</i> 2013	JX567123.1
<i>G. camelopardalis</i>	COI	Eger-tissue collection	JF444302.1
<i>G.c.rothschildi</i>	COI	Yasue <i>et al.</i>	FJ958342.1
<i>G. camelopardalis</i>	COI	Hassanin <i>et al.</i> 2012	JN632645.1
<i>G. camelopardalis</i>	COI	Hassanin <i>et al.</i> 2012	NC_024820.1
<i>G.c.angolensis</i>	COI	Yasue <i>et al.</i>	NC_012100.1

Os alinhamentos dos dados de Citocromo b e da região controle foram testados para o melhor modelo de evolução dos sítios nucleotídicos por meio do *software jModelTest* (POSADA, 2008), utilizando o critério de correção de Akaike (AIC) (AKAIKE, 1973, 1983). Para as análises pelo método de Inferência Bayesiana foi utilizado o *software BEAST v1.8.2* (DRUMMOND *et al.*, 2012). Para isso, foram utilizados os seguintes parâmetros: relógio molecular estrito, modelo de especiação *Yule Process*, modelo de evolução foi fornecido pelo *jModelTest* e 10.000.000 cadeias de Markov (MCMC). Um arquivo “.log” foi gerado e executado no *software Tracer v.1.7.1* (RAMBAUT *et al.*, 2018) para testar sobre o número de cadeias de Markov suficientes. A melhor topologia foi determinada com o *software TreeAnnotator v1.8.4* (DRUMMOND *et al.*, 2012). Esta topologia foi visualizada e editada com o *software Figtree v1.4.3.* (RAMBAUT, 2016), com a designação de apresentar apenas os suportes de ramos (probabilidades posteriores) acima de 50%.

A diversidade genética foi acessada a partir do número de haplótipos (h), índices de diversidade nucleotídica (π) e haplotípicas (Hd). Essas métricas foram obtidas pelo *Software DNAsp v.6* (ROZAS *et al.*, 2017). A análise da estruturação genética foi realizada através de uma análise bayesiana de agrupamento *Bayesia Analysis of Population Structure – BAPS v6* (CORANDER *et al.*, 2008), utilizando uma análise de mistura genética com as sequências, seguida por mistura de populações.

Para ambos os conjuntos de dados (Citocromo b e Região Controle) foram simulados o número de K populações de 2 à 9 em 10.000 gerações. A escolha da melhor clusterização foi determinada pelo cálculo da maior probabilidade em cada um das K populações simuladas.

A identificação dos haplótipos, suas frequências relativas e o número de sítios polimórficos foram realizadas no *Software DNAsp v.6* (ROZAS et al., 2017). As relações entre os haplótipos selvagens e em cativeiro foi visualizada através de uma rede parcimoniosa de haplótipos *TCS* no *software PopArt 1.7* (LEIGH et al., 2016).

Madiante os resultados das topologias foram realizadas análise de variância molecular (AMOVA). Tais análise foram realizadas de forma a testar a distância estatística da variação genética dos exemplares aqui estudados com a variação genética da natureza, assim como a distância estatística da variação genética entre os exemplares aqui estudados. Além disso, foram testados os desvios estatísticos da variação genética entre os clados observados de *G. giraffa* com os dados de Citocromo b e CO1. Diante dos dados de Citocromo b de *G. camelopardalis* foram testados os desvios estatísticos entre os clados observados e cada um deles com os dados de *G. reticulata*. Todas estas análises foram realizadas pelo uso do *software Arlequin 3.5.2.2* (EXCOFFIER and LISCHER, 2010).

Em uma segunda rodada de análises, os conjuntos de dados (Citocromo b e Região Controle) foram concatenados formando um alinhamento único através do *Software DNAsp v.6* (ROZAS et al., 2017). Perante as sequências concatenadas, todas as análises acerca do modelo de evolução que melhor explica a evolução dos sítios, índices de diversidade genética, estruturação genética, filogenia molecular e rede de haplótipos foram desenvolvidas conforme aquilo realizado com os dados analisados em separado.

Os dados de COI foram analisados utilizando os métodos de delimitação molecular de espécies. Estas análises identificam as Unidades Operacionais Taxonômicas Moleculares (*MOTUs*), que representam grupos monofiléticos que podem ou não corresponder a espécies distintas (BLAXTER et al., 2005; JONES et al.,

2011). Para as análises de delimitação de espécies, o grupo externo foi removido para não influenciar os resultados e melhorar a convergência das cadeias de Markov. A abordagem baseada em distância foi construída uma árvore de *Neighbor Joining* com o modelo evolutivo de Kimura 2 Parâmetros (K2P) através do *software* MEGA v.5 (TAMURA et al., 2011). Além disso, para definir o ponto de corte que delimitaria as espécies através da distância genética, foi calculado o valor ótimo de threshold (OT), que se baseia no conceito de *barcoding gap* (MEYER & PAULAY, 2005). A divergência molecular foi calculada diretamente a partir do nosso conjunto de dados, utilizando a função “localMinima” implementada no pacote SPIDER (Species Identity Evolution in R) (BROWN et al., 2012) para a plataforma R (<http://www.R-project.org>). Para a abordagem baseada em coalescência, dois métodos foram empregados: GMYC e bPTP. O GMYC utilizou uma árvore ultramétrica gerada no *BEAST* com os seguintes parâmetros: relógio molecular estrito, modelo de especiação *Birth and Death Process*, modelo de evolução fornecido pelo jModelTest, e 10.000.000 de cadeias de Markov (MCMC). Já o bPTP utilizou uma árvore não ultramétrica gerada no *software* MrBayes v.3.1.1 (RONQUIST & HUELSENBECK, 2003), e foi conduzida através de um servidor online, utilizando 100.000.000 gerações da MCMC, com *thinning value*=100, e *burn-in*=25%.

Mediante os resultados das topologias foram realizadas análise de variância molecular (AMOVA). Tais análises foram realizadas de forma a testar a distância estatística da variação genética dos exemplares aqui estudados com a variação genética da natureza, assim como a distância estatística da variação genética entre os exemplares aqui estudados. Além disso, foram testados os desvios estatísticos da variação genética entre os clados observados de *G. giraffa* com os dados concatenados e CO1. Diante dos dados concatenados de *G. camelopardalis* foram testados os desvios estatísticos entre os clados observados e cada um deles com os dados de *G. reticulata*. Todas estas análises foram realizadas pelo uso do *software* Arlequin 3.5.2.2 (EXCOFFIER and LISCHER, 2010).

4 RESULTADOS

Para identificação do padrão de pelagem foram analisadas imagens de 14 girafas. Com exceção de um indivíduo (Palito/São Paulo 1) do Zoológico de São Paulo e um indivíduo do Zoológico de Curitiba, todas apresentaram manchas em formato de estrela em vários tons de marrom rodeadas por uma cor castanha clara ou manchas grandes, desiguais e irregulares em um tom marrom claro rodeada por uma cor creme clara. Esta feição de manchas é similar àquelas apresentadas pela espécie *Giraffa giraffa* (Figuras 9a, b; Figura 10). O indivíduo de Curitiba apresentou manchas grandes e retangulares na cor marrom escuro e cercadas por uma cor esbranquiçada. Tal fenótipo se assemelhou mais àquilo que é particular da espécie *Giraffa camelopardalis* (Figuras 9c, d e e; Figura 10). Um indivíduo do Zoo de São Paulo (São Paulo 1/Palito) apresentou manchas em formato de estrela mais acentuada com tom marrom escuro mais ao meio e marrom claro nas bordas rodeadas por uma cor creme clara (Figura 10J). Já na identificação dos ossicones nos indivíduos machos não foi observada a presença de um terceiro par em nenhum dos exemplares (Figura 11).

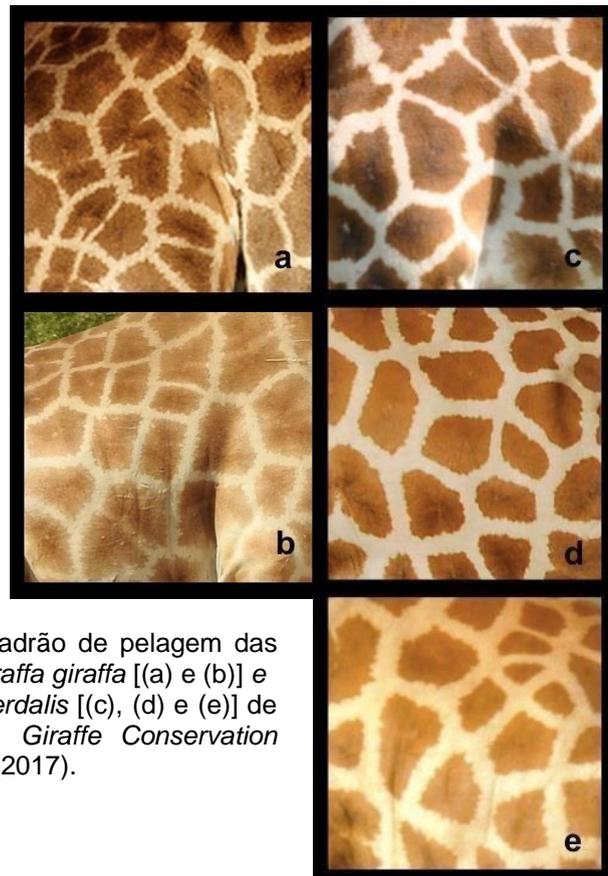


Figura 9: Padrão de pelagem das espécies *Giraffa giraffa* [(a) e (b)] e *G. camelopardalis* [(c), (d) e (e)] de acordo com *Giraffe Conservation Foundation* (2017).

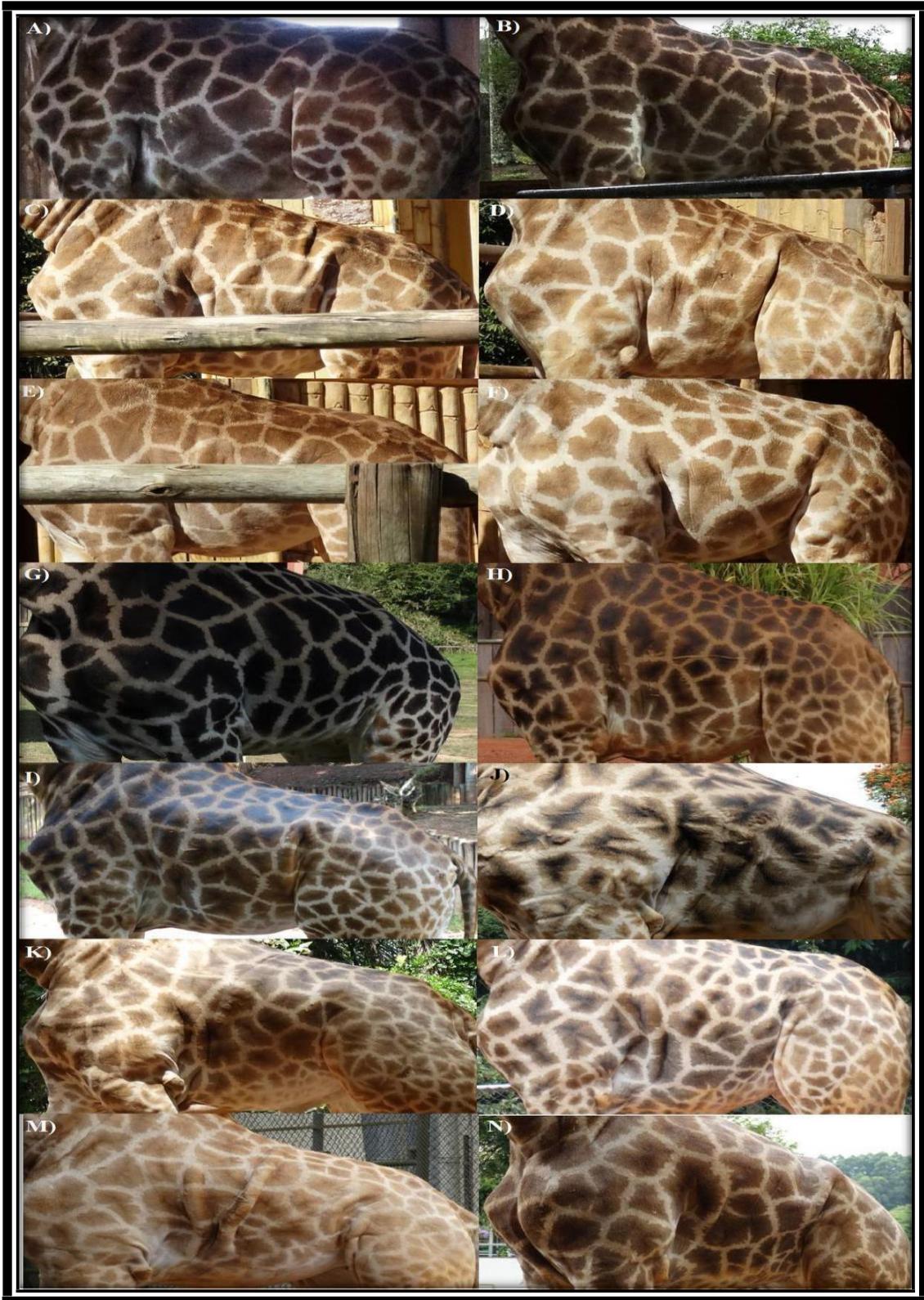


Figura 10. Padrões de pelagem observados nos exemplares aqui analisados. (A) Leninha – Zoo Pomerode. (B) Etheta – Zoo Pomerode. (C) Bin – Zoo Beto Carrero. (D) Gigante – Zoo Beto Carrero. (E) Catarina – Zoo Beto Carrero. (F) Savana – Zoo Beto Carrero. (G) Pandinha – Zoo Curitiba. (H) Yaza – Zoo Brasília. (I) Ayanna – Zoo Itatiba. (J) Palito – Zoo São Paulo. (K) Bernardo – Zoo São Paulo. (L) Mel – Zoo São Paulo. (M) Malika – Zoo São Paulo. (N) Safira – Zoo São Paulo.

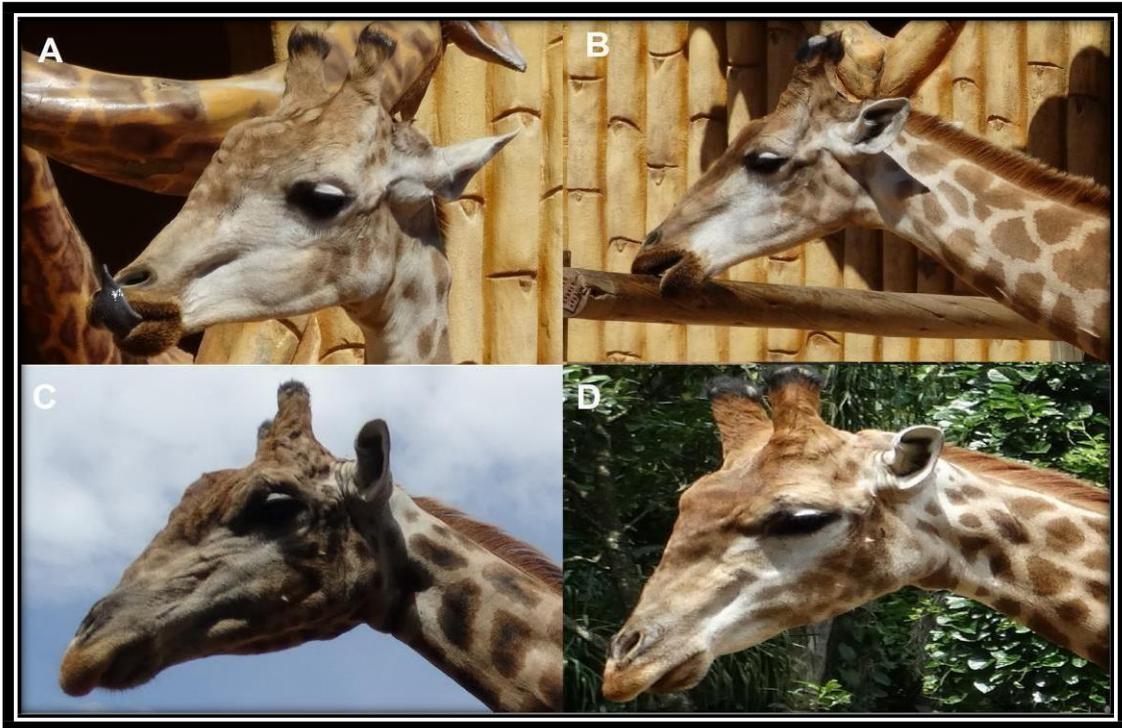


Figura 11. Estrutura craniana adicional (terceiro occipone) ausente nos exemplares machos dos zoológicos. (A) Gigrande – Zoo Beto Carrero. (B) Bin –Zoo Beto Carrero. (C) Palito - Zoo São Paulo. (D) Bernardo - Zoo São Paulo.

Foi possível extrair DNA em boa quantidade das amostras pelo kit *QIAmp DNA Stool Mini Kit* –Qiagen. Para o Citocromo b, foram obtidas 15 sequências de de 485 pb a partir de cada amostra de DNA de girafa, obtendo-se um alinhamento final com 58 sequências. Para a região controle, foram obtidas 15 sequências de 256 pb a partir de cada amostra de girafa, obtendo-se um alinhamento final com 58 sequências para análises. O alinhamento final dos dados concatenados de citocromo b e região controle obteve o tamanho de 744pb. Para o COI, foram obtidas 15 sequências 540 pb a partir de cada amostra de DNA de girafa, obtendo-se um alinhamento final de 23 sequências para análises posteriores.

No que se refere aos dados analisados isoladamente, O modelo TPM3uf + gamma foi indicado como o melhor modelo que explica a evolução dos sítios de Citocromo b analisados. Já para a região controle, o modelo TrN (Tamura-Nei model) + I + gamma foi selecionado como o melhor modelo que explica a evolução dos sítios desta região. Para o gene COI, o modelo TPM2uf foi selecionado como o melhor modelo que explica a evolução dos seus sítios perante as sequências obtidas.

As topologias bayesianas obtidas com os dados de Citocromo b e região controle, revelaram a presença de duas 2 espécies nos zoológicos brasileiros. Além

disso, não foi possível identificar nos animais analisados linhagens genéticas eventualmente perdidas ou de baixa frequência na natureza.

Na topologia com os dados de Citocromo b (Figura 12), o exemplar pertencente ao zoológico de Curitiba se agrupou com uma variante à espécie *G. camelopardalis*. Tal agrupamento se relacionou mais proximamente com uma variante da espécie *G. reticulata*, com suporte de ramo abaixo de 50%. Os demais exemplares aqui analisados, pertencentes às outras instituições, se agruparam com os dados referentes à espécie *G. giraffa*. A topologia com os dados da região controle (Figura 13) mostrou que o exemplar do Zoo de Curitiba é uma girafa núbica, da sub-espécie *G. camelopardalis camelopardalis* e seu sinônimo *G. c. rothschild*. Todas as outras girafas aqui estudadas se agruparam com as sub-espécies angolana (*Giraffa girafa angolensis*) e aquela do Sul da África (*G. g. giraffa*). Foi ainda possível observar na topologia bayesiana de região controle a separação das subespécies de *Giraffa giraffa*.

Ambas as topologias ainda mostraram sinais de divisões filogenéticas (não monofiletismo) em *G. giraffa* e *G. camelopardalis* (Figura 12). A topologia dos dados da região controle (Figura 13) recuperaram o sinal de divisão filogenética de *G. camelopardalis*.

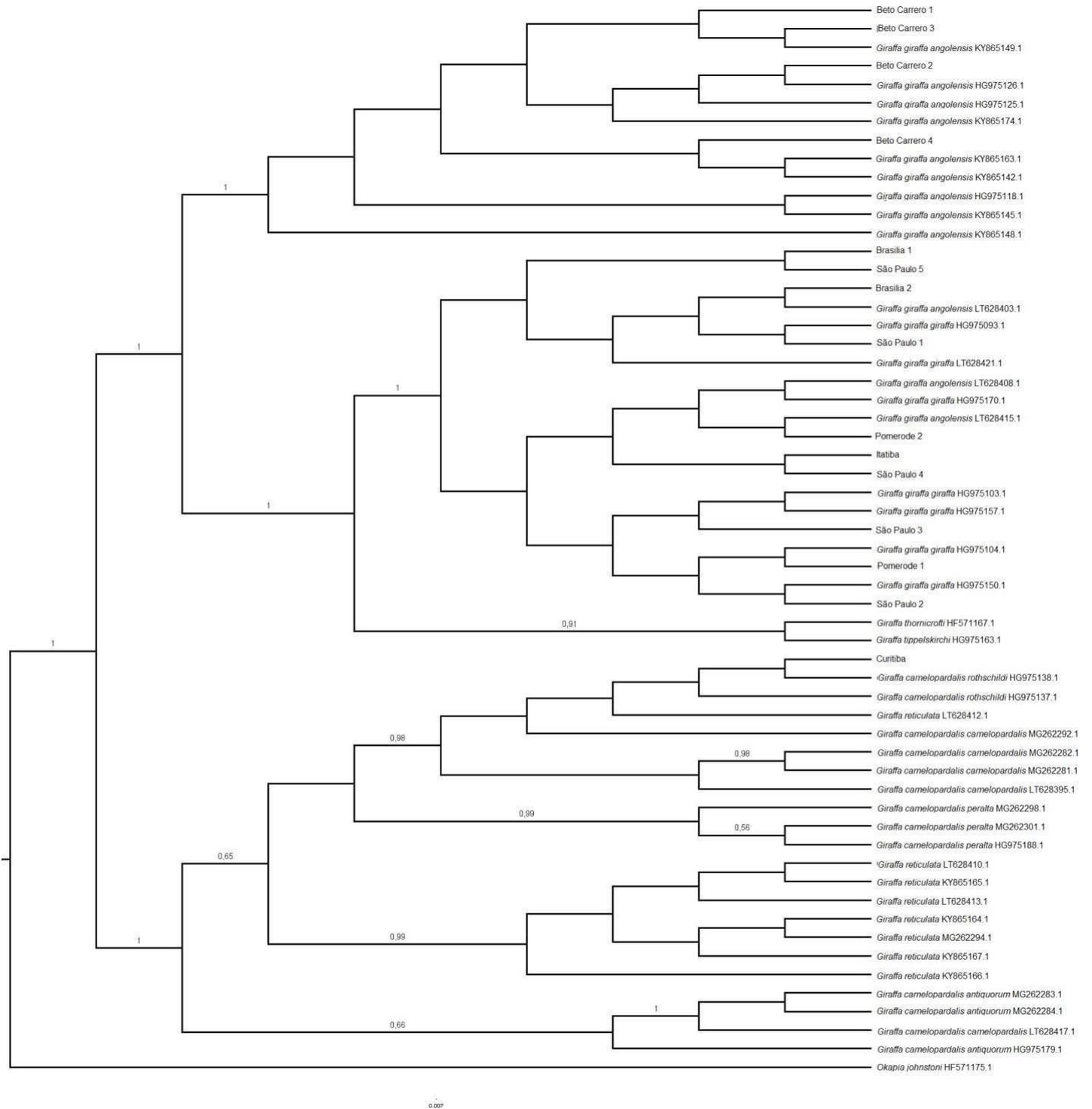


Figura 9. Árvore bayesiana obtida a partir das sequências de citocromo b, mostrando as relações filogenéticas entre os indivíduos do Brasil e os exemplares do GenBank. Os valores sobre os ramos indicam o suporte de ramo das probabilidades posteriores maiores que 50%.

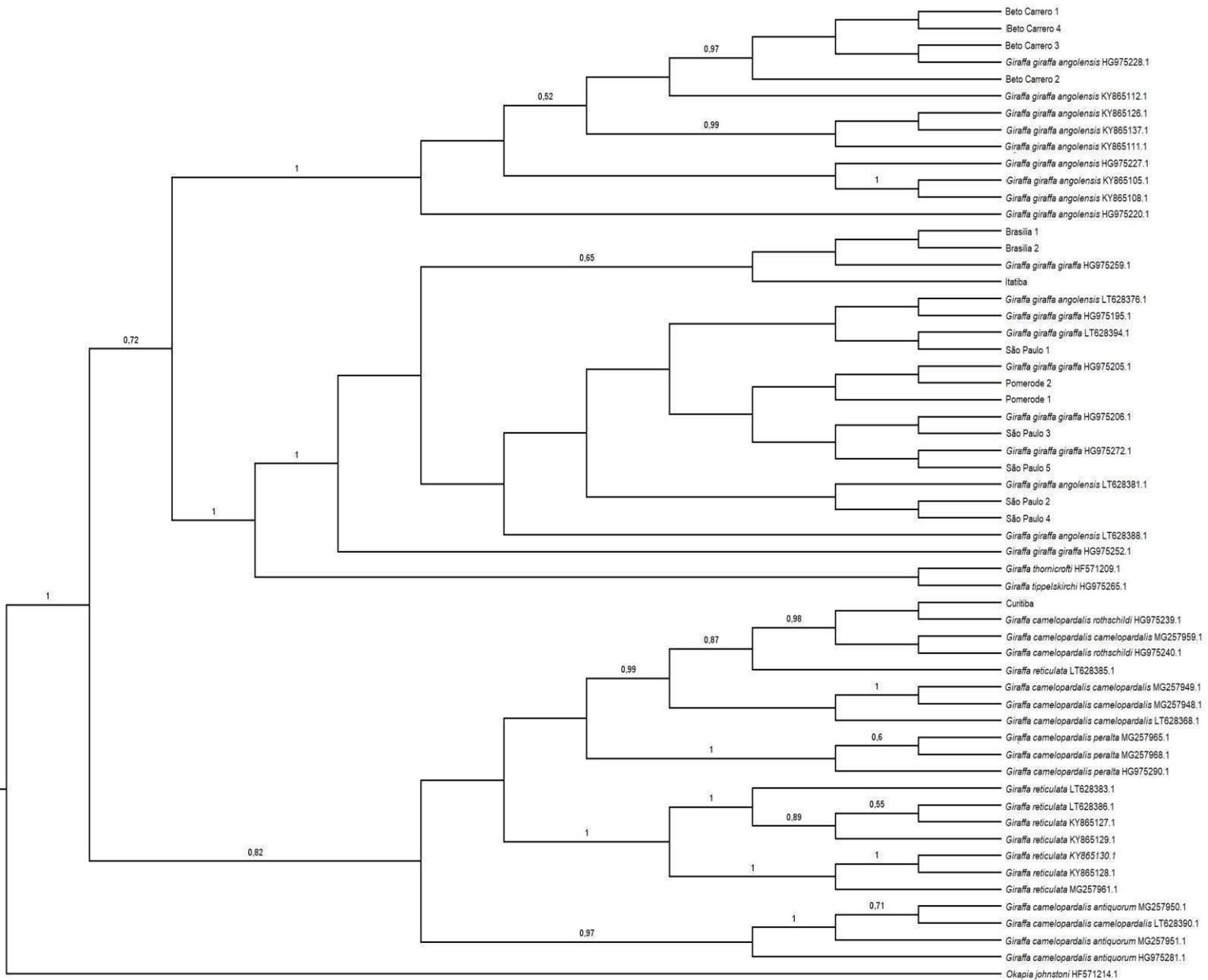


Figura 10. Árvore bayesiana obtida a das sequencias da região controle, mostrando as relações filogenéticas entre os indivíduos do Brasil e os exemplares do GenBank. Os valores sobre os ramos indicam o suporte de ramo das probabilidades posteriores maiores que 50%.

As sequências obtidas pelo marcador mitocondrial Citocromo b definiram 19 haplótipos, que apresentam níveis de diversidade genética globais de $H_d = 0,262$ e $\pi = 0,008$ (Tabela 3a). Pelos dados da região controle, foram identificados 28 haplótipos, com níveis de diversidades genéticas globais de $h = 0,16$ e $\pi = 0,023$ (Tabela 3b).

Tabela 3a. Síntese dos resultados de diversidade genética obtidos pelas sequências de Citocromo b.

	Variantes haplotípicas	Diversidade haplotípica (H_d)	Diversidade nucleotídica (π)
<i>Giraffa camelopardalis</i>	Hap1; Hap2; Hap3; Hap4 Hap5*; Hap6; Hap7	0,368	0,007
<i>Giraffa giraffa</i>	Hap13; Hap14; Hap15; Hap16; Hap17; Hap18; Hap19	0,368	0,018
<i>Giraffa tippelskirchi</i>	Hap11; Hap12	0,105	0,002
<i>Giraffa reticulata</i>	Hap5*; Hap8; Hap9; Hap10	0,210	0,005
Total spp.	19	H_d média= 0,262	π média= 0,008
Curitiba	Hap5	-	-
Itatiba	Hap15	-	-
Pomerode	Hap15	-	-
Beto Carreiro	Hap14	-	-
Brasília	Hap15	-	-
São Paulo	Hap15	-	-
Total Brasil	3		-

Tabela 3b. Síntese dos resultados de diversidade genética obtidos pelas sequências da região controle.

	Variante haplotípicas	Diversidade haplotípica (Hd)	Diversidade nucleotídica (π)
<i>Giraffa c. antiquorum</i>	Hap1; Hap2; Hap3	0,13	0,02
<i>Giraffa c. peralta</i>	Hap7; Hap8	0,0869	0,003
<i>Giraffa c. camelopardalis</i>	Hap1; Hap4; Hap5; Hap6	0,1739	0,034
<i>Giraffa g. angolensis</i>	Hap18; Hap19; Hap20; Hap21; Hap22; Hap23; Hap24	0,26	0,037
<i>Giraffa g. giraffa</i>	Hap21; Hap55; Hap26; Hap27; Hap28	0,217	0,006
<i>Giraffa tippelskirchi</i>	Hap16; Hap17	0,0434	-
<i>Giraffa reticulata</i>	Hap9; Hap10; Hap11; Hap12; Hap13; Hap14; Hap 15	0,217	0,043
Total spp.	28	Hd média= 0,16	π média= 0,023
Curitiba	Hap6	-	-
Itatiba	Hap26	-	-
Pomerode	Hap21	-	-
Beto Carreiro	Hap20	-	-
Brasília	Hap26	-	-
São Paulo	Hap21	-	-
Total Brasil	4	-	-

A rede haplotípica pelos dados de Citocromo b mostrou que as girafas dos Zoológicos de Pomerode, Brasília, Itatiba e São Paulo compartilham um haplótipo (Hap15) e os indivíduos do Beto Carrero compartilham um haplótipo (Hap14) com a espécie *Giraffa giraffa*. O exemplar de Curitiba compartilha seu haplótipo (Hap5) com a espécie *Giraffa camelopardalis* e uma das variantes de *Giraffa reticulata* (Figura 14). Já, a rede haplotípica perante os dados da região controle mostrou que os animais do Zoológico Beto Carrero compartilham um haplótipo (Hap20) com a sub-espécie *G. g. angolensis*. Os animais dos Zoológicos de Pomerode e São Paulo compartilham um haplótipo (Hap21) com as subespécies *G. g. giraffa* e *G.g. angolensis*. Os animais dos Zoológicos de Brasília e Itatiba compartilham um haplótipo (Hap26) com as subespécies *G. g. giraffa*. O exemplar de Curitiba compartilha um haplótipo (Hap6) com a subespécie *Giraffa camelopardalis camelopardalis* (Figura 15).

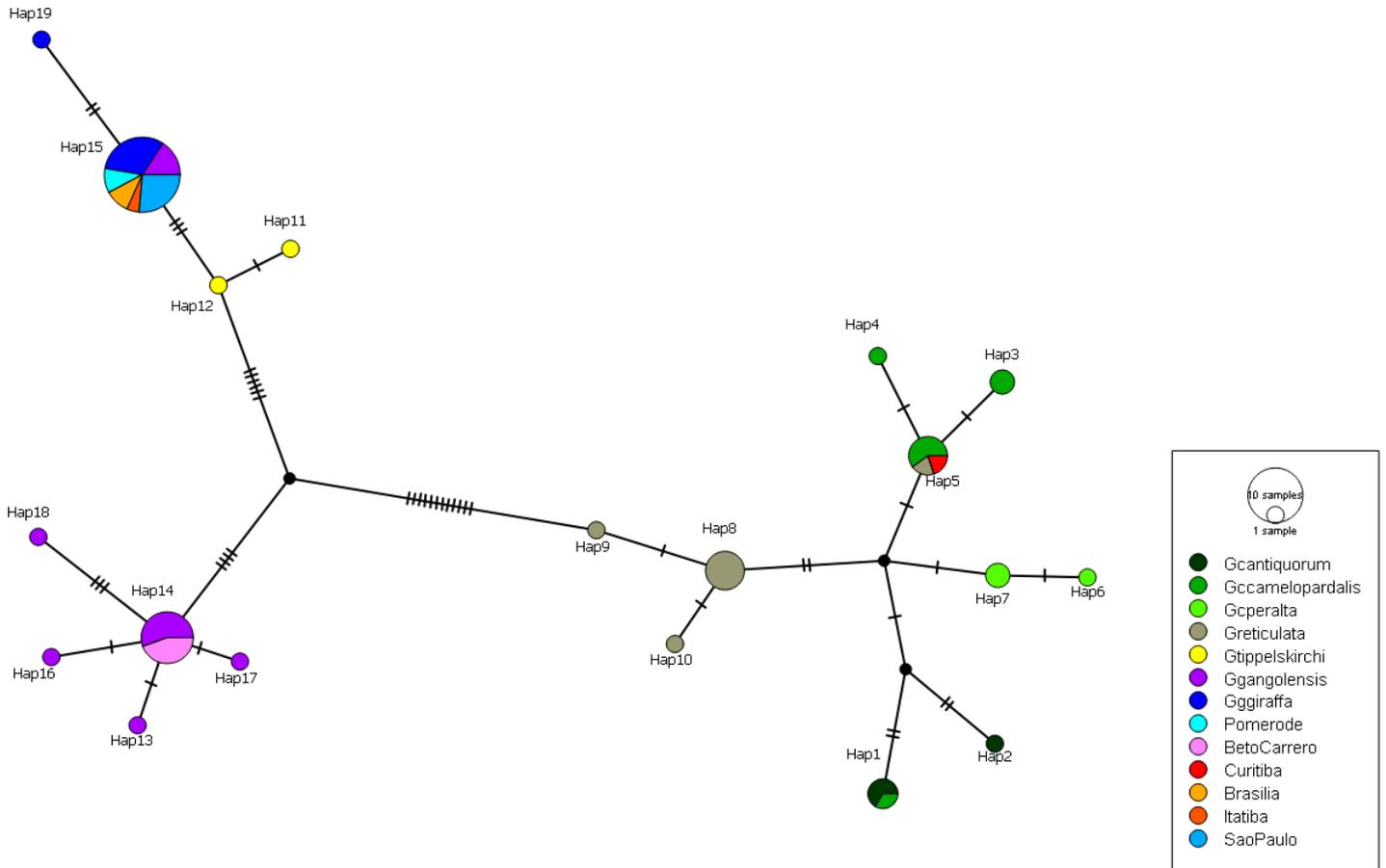


Figura 14. Rede haplotípica obtida pelas sequências de Citocromo b de girafas, apresentando as relações genealógicas entre os haplótipos dos indivíduos amostrados e das espécies obtidas no GenBank. Cada cor representa a espécie do haplótipo encontrado. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos e os traços e números sobre as linhas que os conectam, representam o número de mutações presente entre eles.

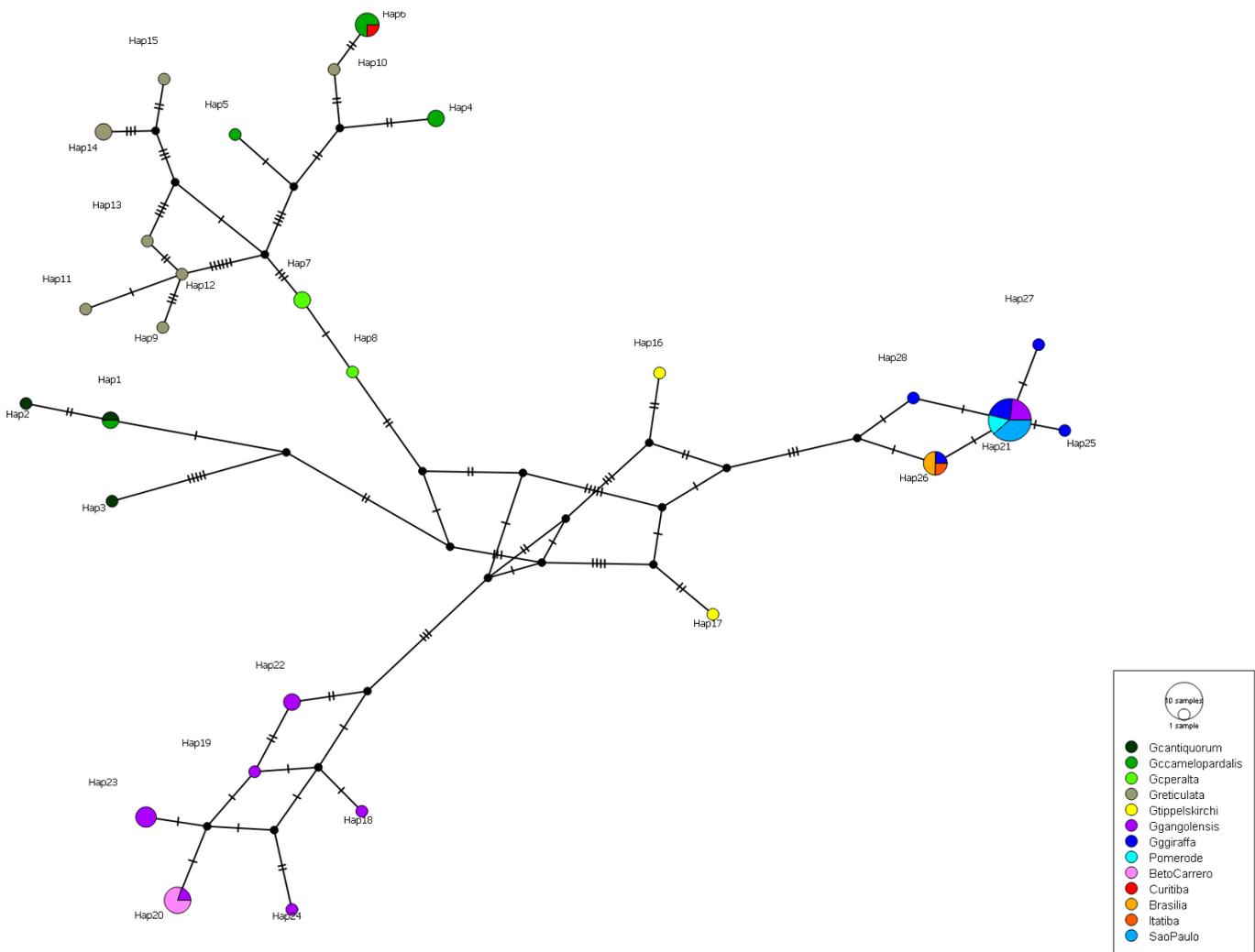


Figura 15. Rede haplotípica obtida pelas sequências de região controle de girafas, apresentando as relações genealógicas entre os haplótipos dos indivíduos amostrados e das espécies obtidas no GenBank. Cada cor representa a espécie do haplótipo encontrado. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos e os traços e números sobre as linhas que os conectam, representam o número de mutações presente entre eles.

A amova realizada para os marcadores Citocromo b e região controle, mostrou que o maior percentual de variância genética está entre as populações. Os índices de fixação (Φ_{ST}) foram de 0,804 e de 0,643, respectivamente. (Tabelas 4a e 4b).

Tabela 4a. Análise da variância molecular de todo o conjunto de dados do gene Citocromo b das girafas em cativeiro (Brasil) e da natureza. gl = graus de liberdade.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual da variação
Entre as populações	12	318.605	6.79024 Va	80.42
Dentro de populações	37	61.155	1.65285 Vb	19.58
Total	49	379.760	8.4409	
		$\Phi_{ST} =$	0.80424	

Tabela 4b. Análise da variância molecular de todo o conjunto de dados da região controle gene das girafas em cativeiro (Brasil) e da natureza. gl = graus de liberdade.

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual da variação
Entre populações	12	220.718	4.70540 Va	64.38
Dentro de populações	32	83.326	2.60394 Vb	35.62
Total	44	304.044	7.30935	
		$\Phi_{ST} =$	0.64375	

As tabelas 5a e 5b mostram as magnitudes das diferenças estatísticas (Φ_{ST}) observadas entre os clados de *G. giraffa*, entre os clados de *G. camelopardalis* e estes em relação à espécie *G. reticulata*, pelos dados de Citocromo b. Tais diferenças variaram de 0,54 (entre os clados 2 e 3 de *G. camelopardalis*) até 0,96 (entre os clados 1 e 2 de *G. girafa*). Pelos dados de CO1 foi observada uma diferença (Φ_{ST}) de 0,85 entre os clados de *G. giraffa* (Tabela 5a). Diante dos dados da região controle, foram observadas as diferenças estatísticas de 0,27 (entre o clado 1 de *G. camelopardalis* e *G. reticulata*) até 0,93 (entre os clados 1 e 2 de *G. giraffa*) (Tabela 5b).

Tabela 5a. Desvios estatísticos (Φ_{ST}) entre os cladogramas observados de *G. giraffa* e *G. camelopardalis* diante dos dados de Citocromo b (a) e CO1 (b) ($p < 0,1$).

(a)				
<i>G. giraffa</i>	Clado 1		Clado 2	Clado 3
Clado 1	-		0,96	-
<i>G. camelopardalis</i>				
Clado 1	-		0,745	0,723
Clado 2	-		-	0,540
<i>G. reticulata</i>	0,807		0,783	0,728
(b)				
<i>G. giraffa</i>	-		Clado 2	-
Clado 1	-		0,854	-

(a) *G. giraffa*

Clado 1: Beto carreiro 1, 2, 3 e 4; KY865149.1, HG975126.1, HG975125.1, KY 865174.1, KY865163.1, KY865142.1, HG975118.1, KY865145.1, KY865148.1

Clado 2: São Paulo 1, 2, 3, 4 e 5; Itatiba; Pomerode 1 e 2; Brasília 1 e 2, LT268403.1, HG975093.1, LT268421.1, LT628408.1, HG975170.1, HG975103.1, HG975157.1, HG975104.1, HG975150.1

G. camelopardalis

Clado 1: Curitiba, HG975138.1, HG975137.1, MG262292.1, MG262282.1, MG262281.1, LT628395.1

Clado 2: MG262301.1, MG262298.1, MG262298.1

Clado 3: MG262284.1, LT628417.1, HG975179.1, MG262283.1

(b) *G. giraffa*

Clado 1: Beto carreiro 1, 2, 3 e 4; São Paulo 1; JX567123.1; AP003424.1; NC012100.1

Clado 2: Brasília 1 e 2; São Paulo 2, 3, 4 e 5; Itatiba; Pomerode 1 e 2; JF444302.1

A estimativa das diferenças estatísticas (FST) par-à-par entre todos os exemplares de girafa analisados dos Zoológicos brasileiros e, entre estes e as espécies de girafa, mostrou o FST variando desde de -0,69 (entre os exemplares do Zoológico de Curitiba e a espécie *G. camelopardalis*) até 1,0 (p.ex. entre o exemplar do Zoológico de Pomerode e aquele de Curitiba) pelos dados de Citocromo b (Tabela 6a). Pelos dados da região controle, FST variou de -1,00 (p.ex. entre a sub-espécie *G. g. giraffa* e o exemplar do Zoológico de Itatiba) até 1,00 (p.ex. entre os Zoológicos Beto Carreiro e Zoológico Pomerode) (Tabela 6b).

Tabela 5b. Desvios estatísticos (Φ_{ST}) entre os clados observados diante dos dados da região controle *G. giraffa* e *G. camelopardalis* ($p < 0,1$).

<i>G. giraffa</i>	Clado 1	Clado 2
Clado 1	-	0,938
<i>G. camelopardalis</i>		
Clado 1	-	0,513
<i>G. reticulata</i>	0,276	0,427

G. giraffa

Clado 1: Beto carreiro 1, 2, 3 e 4; HG975228.1; KY865126.1, KY865112.1, KY865137.1, KY865111.1, HG975227.1, KY865105.1, KY865108.1, HG975220.1.

Clado 2: Brasília 1 e 2; São Paulo 1, 2, 3, 4 e 5; Itatiba; Pomerode 1 e 2; HG975259.1, LT628376.1, HG975195.1, LT628394.1, HG975206.1, HG975272.1, LT628381.1, LT628388.1, HG975252.1.

G. camelopardalis

Clado 1: Curitiba, MG257959.1, HG975240.1, HG975239.1, LT628385.1,

MG257949.1, LT628368.1, MG257968.1

Clado 2: MG257951.1, MG257950.1, LT628390.1, HG975281.1

Tabela 6a. Valores de F_{ST} par-à-par entre obtidos dos dados de Citocromo b entre as quatro espécies de girafa e todos os indivíduos analisados dos Zoológicos do Brasil.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
1	-									
2	0,38085	-								
3	0,75391	0,71443	-							
4	0,88496	0,92851	0,17957	-						
5	0,90015	0,94307	0,17808	0,85714	-					
6	0,91446	0,95713	0,28994	0,92661	0,00000	-				
7	-0,69091	0,41176	0,64809	0,95556	1,00000	1,00000	-			
8	0,90015	0,94307	0,17808	0,85714	0,00000	0,00000	1,00000	-		
9	0,88876	0,93103	-0,07143	0,71429	0,00000	0,00000	1,00000	0,00000	-	
10	0,91994	0,96178	0,31818	0,94083	0,00000	0,00000	1,00000	0,00000	0,00000	-

(1) *Giraffa camelopardalis*; (2) *G. reticulata*; (3) *G. giraffa*; (4) *G. tippelskirchi*; (5) Zoo Pomerode; (6) Zoo Beto Carneiro; (7) Zoo Curitiba; (8) Zoo Brasília; (9) Zoo Itatiba; (10) Zoo São Paulo.

Tabela 6b. Valores de F_{ST} par-à-par entre obtidos dos dados da região controle entre três subespécies de girafa e todos os indivíduos analisados dos Zoológicos do Brasil.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	0,69512	-							
3	0,80155	0,89199	-						
4	0,64365	0,82869	-0,32110	-					
5	0,78975	0,27928	0,96789	1,00000	-				
6	-0,48148	0,80198	0,94595	1,00000	1,00000	-			
7	0,64365	0,82869	-0,32110	0,00000	1,00000	1,00000	-		
8	0,52941	0,78022	-1,00000	0,00000	1,00000	1,00000	0,00000	-	
9	0,73256	0,85227	0,01487	-0,29032	0,96475	0,92593	-0,29032	-1,00000	-

(1) *G. c. camelopardalis*; (2) *G. g. angolensis*; (3) *G. g. giraffa*; (4) Zoo Pomerode; (5) Zoo Beto Carreiro; (6) Zoo Curitiba; (7) Zoo Brasília; (8) Zoo Itatiba; (9) Zoo São Paulo.

Pela análise de estruturação bayesiana (BAPS) foram identificados três perfis genéticos ($k=3$) para o Citocromo b. Um deles (em vermelho) é típico de *Giraffa giraffa*. Um outro perfil (em verde) caracterizou parte de *G. giraffa*, é típico de *Giraffa tippelskirchi* e parte dos exemplares do Brasil. Um último (em azul) é típico da espécie *Giraffa camelopardalis* e *G. reticulata*, e caracterizou o restante do Brasil (Figura 16). Perante os dados da região controle, foram definidos 6 perfis genéticos ($k=6$). Um deles (em vermelho) é típico *G. tippelskirchi*. Um outro (amarelo) é típico de *G. reticulata*. Esta espécie ainda apresentou um segundo perfil (lilás), também presente em parte de *G. camelopardalis* e uma parte dos exemplares do Brasil. Um outro perfil (azul claro) caracterizou parte da espécie *Giraffa giraffa*, além de uma parte dos exemplares do Brasil. Outro perfil genético (azul escuro) é típico de *G. camelopardalis*. Um último perfil (verde) é compartilhado entre parte de *Giraffa giraffa*, além de parte dos exemplares do Brasil (Figura 17).

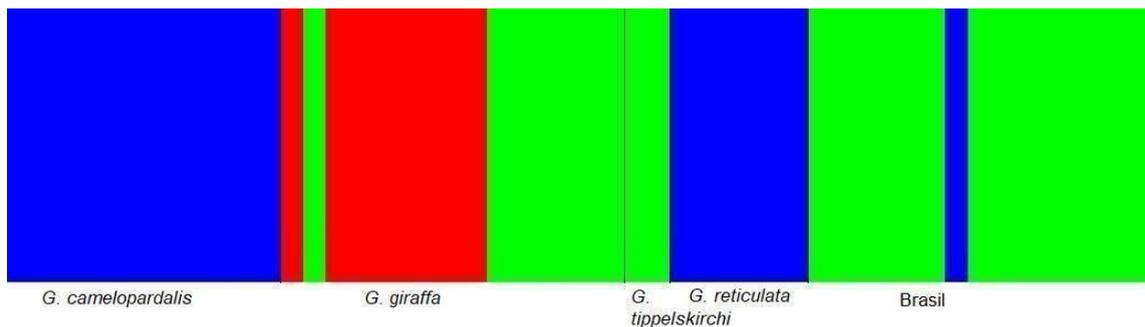


Figura 16. Análise de estruturação genética BAPS da variação genética observada nas sequências do gene mitocondrial Citocromo b. As cores representam os diferentes perfis genéticos obtidos

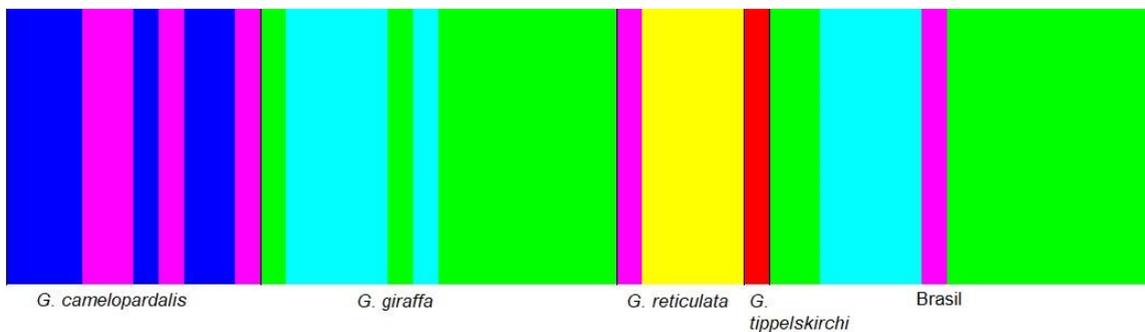


Figura 17. Análise de estruturação populacional BAPS da variação genética observada nas sequências do marcador mitocondrial região controle. As cores representam os diferentes perfis genéticos obtidos

No que se refere aos dados concatenados, o modelo HKY (Hasegawa- Kishino-Yano) + I + gamma foi selecionado como o melhor modelo que explica a evolução dos sítios. Para o gene COI, o modelo TPM2uf foi selecionado como o melhor modelo que explica a evolução dos seus sítios perante as sequências obtidas.

A topologia bayesiana obtida com os dados concatenados (Figura 18), revelaram também a presença de duas 2 espécies nos zoológicos brasileiros. Além disso, não foi possível identificar nos animais analisados linhagens genéticas eventualmente perdidas ou de baixa frequência na natureza. Na topologia o exemplar pertencente ao zoológico de Curitiba se agrupou com uma variante à espécie *G. camelopardalis* e seu sinônimo *G. c. rothschild*, mostrando que exemplar do Zoo de Curitiba é uma girafa núbica, da sub-espécie *G. camelopardalis camelopardalis*. Tal agrupamento se relacionou mais proximamente com uma variante da espécie *G. reticulata*, com suporte de ramo abaixo de 50%. Os demais exemplares aqui analisados, pertencentes às outras instituições, se agruparam com as sub-espécies angolana (*Giraffa girafa angolensis*) e aquela outra do Sul da África (*G. g. giraffa*). Além disso, é observado na topologia sinais de divisões filogenéticas (não monofiletismo) em *G. giraffa* e *G. camelopardalis* (Figura 18).

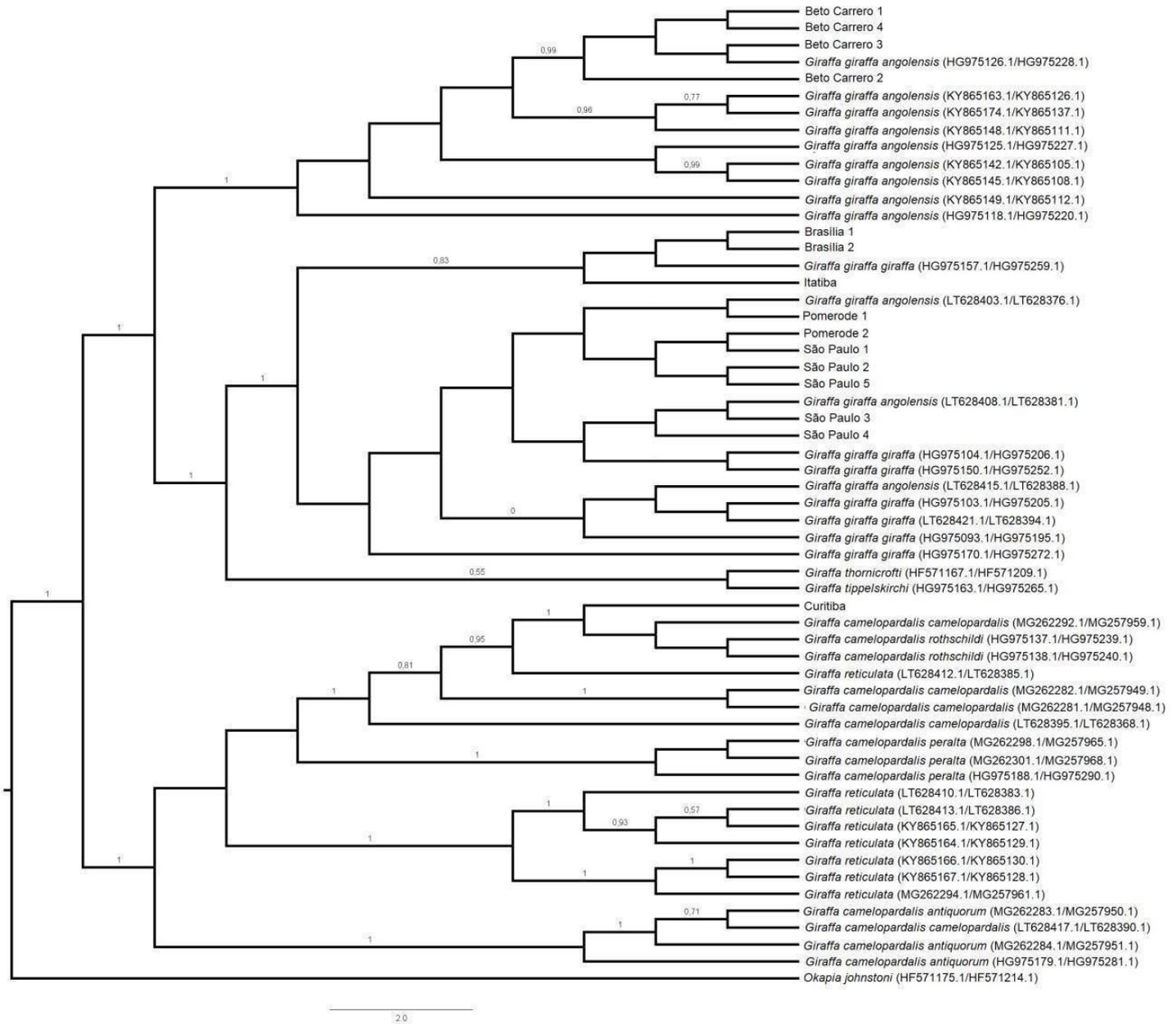


Figura 18. Árvore bayesiana obtida a partir das sequências concatenadas de Citocromo b e região controle, demonstrando as relações filogenética entre os indivíduos do Brasil e os exemplares com dados no GenBank. Os valores sobre os ramos indicam o suporte de ramo das probabilidades posteriores maiores que 50%.

As sequências obtidas pelos dados concatenados definiram 32 haplótipos, que apresentam níveis de diversidade genética globais de $H_d = 0,14$ e $\pi = 0,037$ (Tabela 7).

Tabela 7. Síntese dos resultados de diversidade genética obtidos pelas sequências concatenadas

	Variantes haplotípicas	Diversidade haplotípica (H_d)	Diversidade nucleotídica (π)
<i>Giraffa c. antiquorum</i>	Hap1; Hap2; Hap3	0,09	0,010
<i>Giraffa c. peralta</i>	Hap7; Hap8; Hap9	0,09	0,001
<i>Giraffa c. camelopardalis</i>	Hap1; Hap4; Hap5; Hap6	0,125	0,011
<i>Giraffa reticulata</i>	Hap10; Hap11; Hap12; Hap13; Hap14; Hap15; Hap16; Hap17	0,187	0,014
<i>Giraffa tippelskirchi</i>	Hap18; Hap19	0,06	0,012
<i>Giraffa g. angolensis</i>	Hap20; Hap21; Hap22; Hap23; Hap24; Hap25; Hap26; Hap27; Hap28	0,281	0,020
<i>Giraffa g. giraffa</i>	Hap23; Hap29; Hap30; Hap31; Hap32	0,156	0,002
Total spp.	32	H_d média= 0,14	π média= 0,03
Curitiba	Hap6	-	-
Itatiba	Hap30	-	-
Pomerode	Hap23	-	-
Beto Carreiro	Hap22	-	-
Brasília	Hap30	-	-
São Paulo	Hap23	-	-
Total Brasil	4	-	-

A rede haplotípica pelos dados concatenados mostrou que os animais do Zoológico Beto Carrero compartilham um haplótipo (Hap22) com a sub-espécie *G. g. angolensis*. Os animais dos Zoológicos de Pomerode e São Paulo compartilham um haplótipo (Hap23) com as subespécies *G. g. giraffa* e *G.g. angolensis* e os zoológicos de Brasília e Itatiba compartilham um haplótipo (Hap30) com as subespécies *G. g. giraffa*. O exemplar de Curitiba compartilha um haplótipo (Hap6) com a subespécie *Giraffa camelopardalis camelopardalis* (Figura 20).

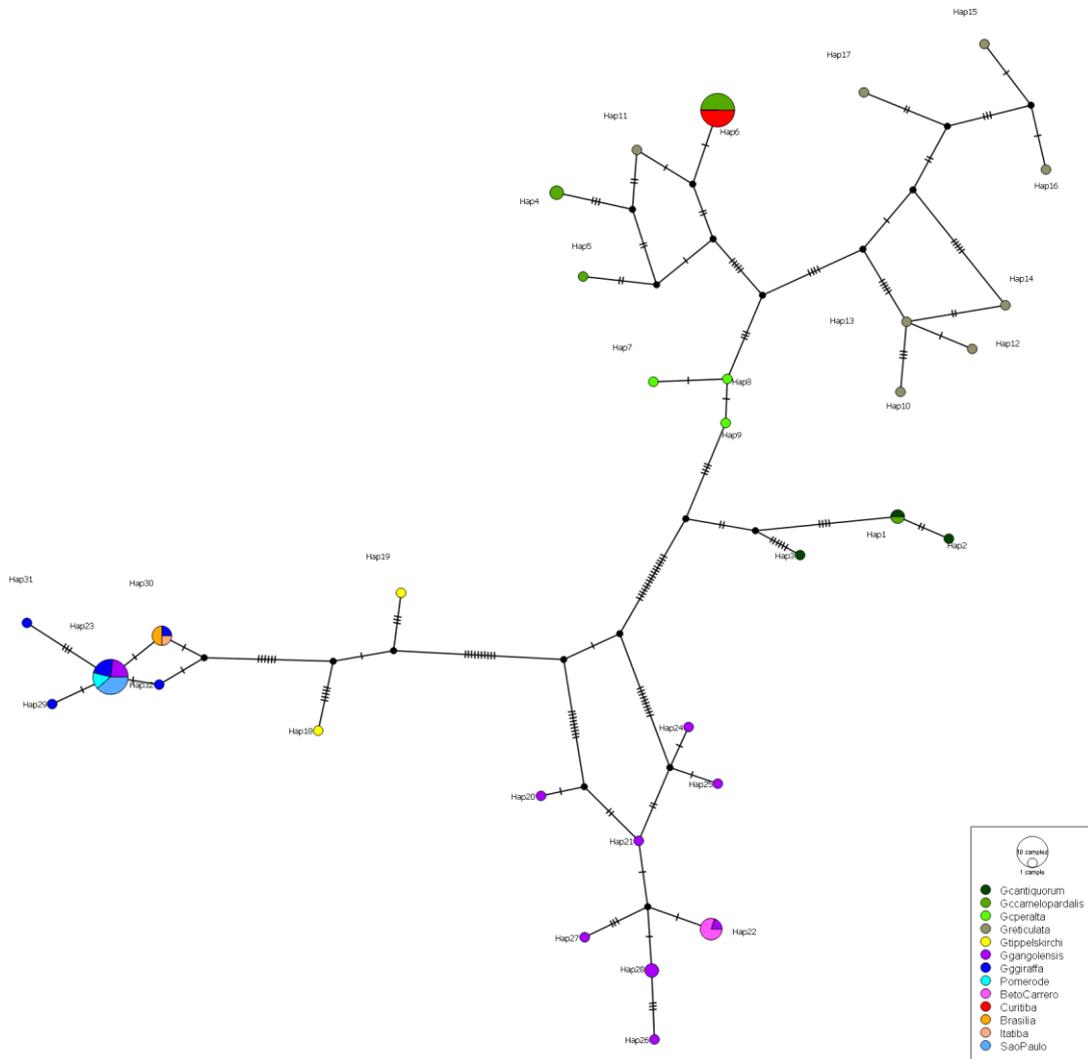


Figura 20. Rede haplotípica obtida pelos dados concatenados de girafas, apresentando as relações genealógicas entre os haplótipos dos indivíduos amostrados e das espécies obtidas no GenBank. Cada cor representa a espécie do haplótipo encontrado. O tamanho dos círculos é proporcional à frequência dos haplótipos e os traços e números sobre as linhas que os conectam, representam o número de mutações presente entre eles.

A amova realizada para os dados concatenados, mostrou que o maior percentual de variância genética está entre as populações. Os índices de fixação (Φ_{ST}) foram de 0,749. (Tabela 8).

Tabela 8. Análise da variância molecular de todo o conjunto de dados concatenados das girafas em cativeiro (Brasil) e da natureza. gl = graus de liberdade

Fontes de variação	gl	Soma dos quadrados	Componentes da variância	Percentual da variação
Entre as populações	12	626.815	11.53255 Va	75.00
Dentro de populações	44	169.185	3.84510 Vb	25.00
Total	56	796.000	15.37766	
		$\Phi_{ST} =$	0.74996	

Tabela 9. Desvios estatísticos (Φ_{ST}) entre os clados observados de *G. giraffa* e *G. camelopardalis* diante dos dados concatenados ($p < 0,1$).

	Clado 1	Clado 2	Clado 3
<i>G. giraffa</i>			
Clado 1	-	0,93	-
<i>G. camelopardalis</i>			
Clado 1	-	0,706	0,709
Clado 2	-	-	0,666
<i>G. reticulata</i>	0,658	0,593	0,638

(a) *G. giraffa*

Clado 1: Beto carreiro 1, 2, 3 e 4; KY865149.1, HG975126.1, HG975125.1, KY 865174.1, KY865163.1, KY865142.1, HG975118.1, KY865145.1, KY865148.1

Clado 2: São Paulo 1, 2, 3, 4 e 5; Itatiba; Pomerode 1 e 2; Brasília 1 e 2, LT268403.1, HG975093.1, LT268421.1, LT628408.1, HG975170.1, HG975103.1, HG975157.1, HG975104.1, HG975150.1

G. camelopardalis

Clado 1: Curitiba, HG975138.1, HG975137.1, MG262292.1, MG262282.1, MG262281.1, LT628395.1

Clado 2: MG262301.1, MG262298.1, MG262298.1

Clado 3: MG262284.1, LT628417.1, HG975179.1, MG262283.1

A tabela 9 mostra as magnitudes das diferenças estatísticas (Φ_{ST}) observadas entre os clados de *G. giraffa*, entre os clados de *G. camelopardalis* e estes em relação à espécie *G. reticulata*, pelos dados concatenados. Tais diferenças variaram de 0,66 (entre os clados 2 e 3 de *G. camelopardalis*) até 0,93 (entre os clados 1 e 2 de *G. girafa*). Pelos dados de CO1 foi observada uma diferença (Φ_{ST}) de 0,85 entre os clados de *G. giraffa* (Tabela 9).

A estimativa das diferenças estatísticas (F_{ST}) par-à-par entre todos os exemplares de girafa analisados dos Zoolos brasileiros e, entre estes e as três subespécies de girafa, mostrou o F_{ST} variando desde de -0,51 (entre os exemplar do Zoo de Curitiba e a espécie *G. camelopardalis*) até 1,0 (p.ex. entre o exemplar do Zoo de Pomerode e aquele de Curitiba) pelos dados concatenados (Tabela 10).

Tabela 10. Valores de F_{ST} par-à-par entre obtidos dos dados concatenados entre três subespécies de girafa e todos os indivíduos analisados dos Zoológicos do Brasil.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-								
2	0.83981	-							
3	0.89823	0.91332	-						
4	0.82625	0.87693	-0.32353	-					
5	0.85981	0.19328	0.97222	1,00000	-				
6	-0.51667	0.88571	0.97030	1,00000	1,00000	-			
7	0.82911	0.87298	0.33168	1,00000	1,00000	1,00000	-		
8	0.79435	0.85348	0.14286	1,00000	1,00000	1,00000	0,00000	-	
9	0.87626	0.90700	-0.08434	0,00000	1,00000	1,00000	1,00000	1,00000	-

(1) *G. c. camelopardalis*; (2) *G. g. angolensis*; (3) *G. g. giraffa*; (4) Zoo Pomerode; (5) Zoo Beto Carreiro; (6) Zoo Curitiba; (7) Zoo Brasília; (8) Zoo Itatiba; (9) Zoo São Paulo.

Pela análise de estruturação bayesiana (BAPS) foram identificados quatro perfis genéticos ($k=4$) para os dados concatenados. Um deles (em amarelo) é típico de *Giraffa giraffa* e uma parte dos exemplares do Brasil. Um outro perfil (em vermelho) caracterizou parte de *G. giraffa*, é típico de *Giraffa tippelskirchi* e parte dos exemplares do Brasil. Outro perfil (em azul) é típico de *G. reticulata*. Um último perfil (verde) é compartilhado entre parte de *Giraffa reticulata*, *G. camelopardalis*, além de uma parte nos exemplares do Brasil (Figura 21).

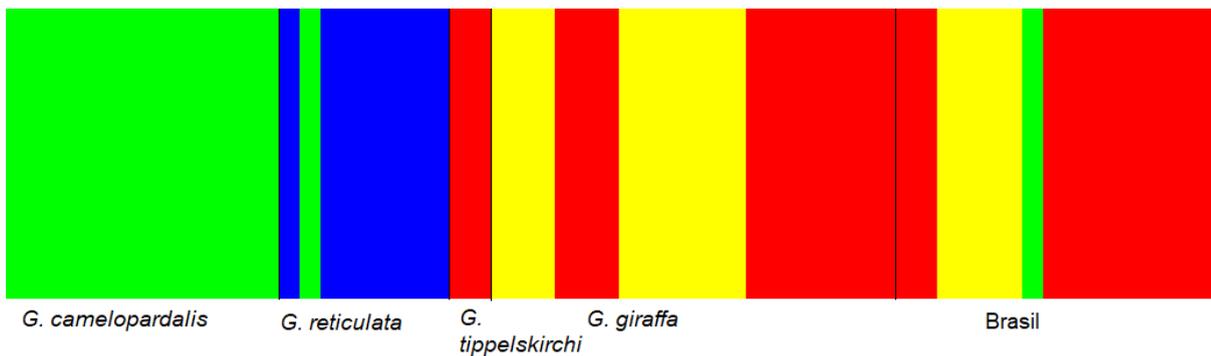


Figura 21 Análise de estruturação genética BAPS da variação genética observada nas sequências concatenadas Citocromo b e região controle. As cores representam os diferentes perfis genéticos obtidos.

Pelos métodos de delimitação molecular de espécies para o gene COI, a função *localMinima* do pacote propôs um valor de ótimo *threshold* (OT) de 0.007951 (0.79%), equivalente a 4 pb para este conjunto de dados. Quatro *MOTUs* foram identificadas a partir deste valor pela abordagem de distância (Figura 22). Uma das *MOTUs* representa a espécie *G. giraffa* e inclui os exemplares do Zoo Beto Carrero e um exemplar do Zoo de São Paulo. A outra *MOTU* representa a espécie *G. camelopardalis* (Voucher) e inclui os exemplares dos Zoolos de Brasília e Itatiba, um exemplar dos Zoolos de São Paulo e um exemplar do Zoo de Pomerode. A terceira *MOTU* representa um exemplar do Zoo de Pomerode e a quarta inclui a espécie *G. camelopardalis*, exemplares de *G. camelopardalis* da WAZA e o exemplar do Zoo de Curitiba. Já as análises baseadas nos modelos de coalescência apresentaram resultados distintos. A análise *GMYC* identificou a presença de seis *MOTUs* (Figura 22). A primeira *MOTU* representa a espécie *G. giraffa* e inclui os exemplares do Zoo Beto Carrero e um exemplar do Zoo de São Paulo. A segunda *MOTU* representa a

os exemplares dos Zoolos de Brasília e Itatiba, além de um exemplar do Zoo de São Paulo. Já a terceira *MOTU* representa a espécie *G. camelopardalis* (Voucher), a quarta e a quinta representam um exemplar dos animais do Zoo de Pomerode em cada. A sexta *MOTU* inclui a espécie *G. camelopardalis*, exemplares de *G. cameloparda* da WAZA e o exemplar de Curitiba. Já a análise de *bPTP* identificou sete *MOTUs* (Figura 22). A primeira *MOTU* compreende a espécie *G. giraffa* e inclui os exemplares do Zoo Beto Carrero e um exemplar do Zoo de São Paulo. A segunda *MOTU* representa a os exemplares de Brasília, Itatiba, e os restantes do Zoo de São Paulo. Já a terceira *MOTU* representa a espécie *G. camelopardalis* (Voucher), a quarta e a quinta representam um exemplar dos animais de Pomerode em cada. A sexta *MOTU* inclui a espécie *G. camelopardalis* e o exemplar do Zoo de Curitiba. A sétima *MOTU* inclui exemplares de *G. cameloparda* da WAZA.

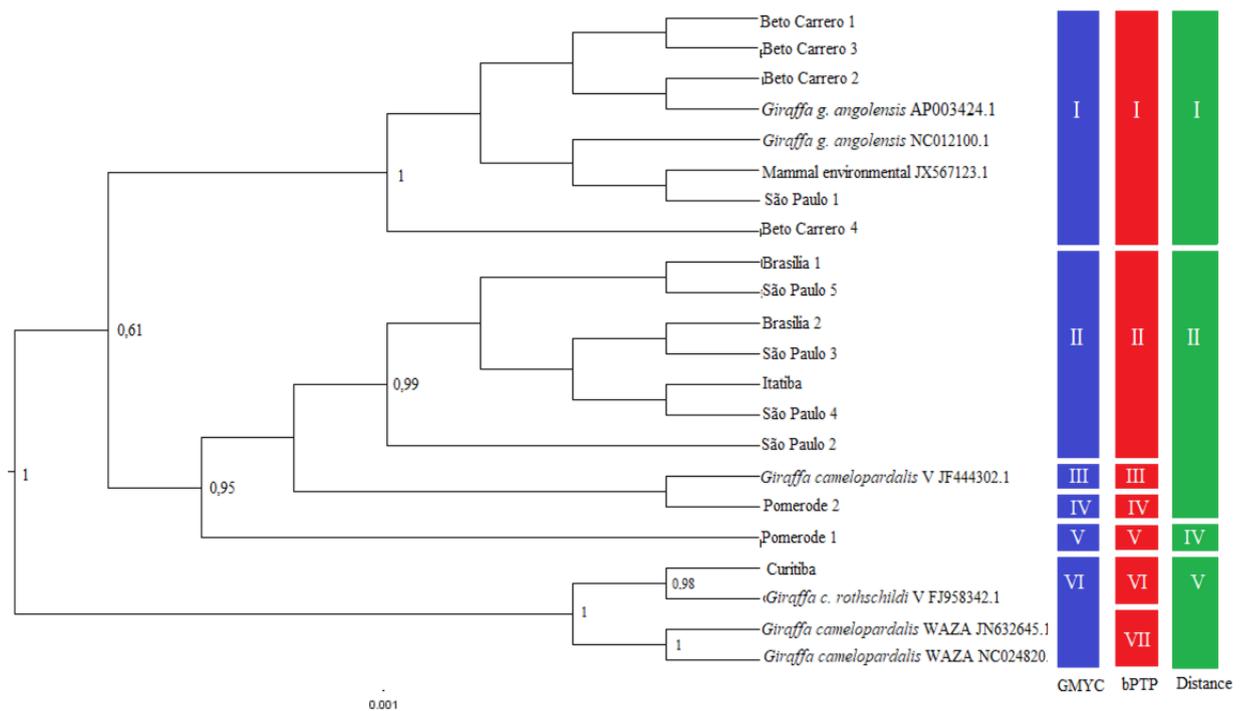


Figura 22. Topologia bayesiana gerada no BEAST, demonstrando as relações evolutivas e as *MOTUs* identificadas pelas análises de delimitação de espécies baseadas em distância e coalescência (*GMYC* e *bPTP*) entre as amostras de *Giraffa sp* para o marcador mitocondrial COI.

Com base em todo o conjunto de informações obtidas neste estudo, foram estabelecidas relações taxonômicas e genéticas entre os exemplares dos Zoos brasileiros (Tabela 11) e estes com as espécies e sub-espécies identificadas na natureza (Tabela 12). Em síntese, estes quadros mostraram que a girafa Pandinha (Curitiba) pertence a uma espécie diferente das demais girafas do Brasil, os indivíduos do Zoo do Beto Carrero (Gigande, Bin, Savannah e Catarina) pertencem a mesma subespécie e tem parentesco, assim como os indivíduos do Zoológico de São Paulo (Palito, Bernardo, Mel, Safira e Agatha). Os exemplares do Zoológico de Pomerode (Leninha e Ethemba), Brasília (Yaza e Yvelise) e Itatiba (Ayanna) pertencem a mesma subespécie que os exemplares do Zoológico de São Paulo. As tabelas 9 e 10 oferecem uma orientação sobre as melhores estratégias de acasalamentos, com base nas relações taxonômicas (específicas e sub-específicas) e genéticas aqui reconhecidas. No geral, foram recomendados os 10 melhores acasalamentos entre machos e fêmeas do plantel brasileiro de girafas (Tabela 13) e os 15 melhores acasalamentos entre os exemplares do plantel brasileiro e as espécies e sub-espécies na natureza (Tabela 14).

5 DISCUSSÃO

5.1 TAXONOMIA INTEGRATIVA E A DIVERSIDADE ESCONDIDA E ONTROVERSA DAS GIRAFAS

A taxonomia integrativa representa uma das melhores inovações na ciência taxonômica tradicional, onde por congruência ou acumulação de conjuntos diferentes de dados, permitem a formulação de hipóteses mais consistentes sobre a diversidade biológica (PADIAL et al. 2010). Além disso e, mediante a estratégia da interação entre diferentes conjuntos de dados, a taxonomia integrativa passa a ser fundamental na tomada de decisões sobre a conservação das linhagens doravante identificadas (JOHNSON et al. 2018).

Existe um esforço mundial para o incremento da magnitude dos dados moleculares em termos genômicos, objetivando a recuperação de relações filogenéticas e o uso disso como ferramenta taxonômica. Contudo, evidências também têm mostrado que um esforço laborial incrementado nem sempre é necessário, já que evidências mitocondriais *singlelocus* refletem a mesma hipótese de um conjunto de dados genômicos de grande magnitude (VENKATRAMAN et al. 2019). Como exemplo, A girafa Massai (*G. tippelskirchi*) é grupo irmão das girafas da África do Sul e angolana (*G. girafa*) (BOCK et al. 2014; FENNESSY et al. 2016). As topologias bayesianas para os marcadores Citocromo b e região controle, quando analisados isolados e de forma concatenada recuperaram essa relação, mesmo com a adição dos dados dos exemplares estudados do Brasil. O DNA mitocondrial como ferramenta taxonômica tem sido amplamente utilizado para este fim em vários grupos de vertebrados como aves (SAIOTH et al., 2014; MENDONZA & GONZALEZ, 2016), répteis e anfíbios (MURPHY et al., 2013; CHAMBERS & HEBERT, 2016; CORREIA et al. 2018), peixes (CUTARELLI et al., 2014; GUIMARÃES et al. 2019) e mamíferos (AGRIZZI et al., 2012; SILVA-NETO et al., 2016; FENNESSY et al., 2016; SOLARI et al. 2019). Assim, os resultados do presente estudo reforçaram a eficácia no uso das regiões mitocondriais como técnicas moleculares de identificação das espécies, como o atual caso das girafas.

As análises genéticas e a morfológicas já sugeriram que há mais de uma espécie de girafa na natureza (BOCK et al. 2014; FENNESSY et al. 2016; WINTER et al. 2018). As topologias bayesianas obtidas à partir dos conjuntos de dados analisados isoladamente e também quando concatenados, juntamente com a identificação por

padrão de pelagem, apontam para a existência de duas espécies nos zoológicos brasileiros. As probabilidades posteriores observadas nas filogenias bayesianas pelos três marcadores sustentam tal hipótese, já que os suportes dos clados foram bem altos (94 e 100%). Portanto, exceto o exemplar do Zoo de Curitiba cujos resultados mostraram que o mesmo pertence a espécie *Giraffa camelopardalis* (CO1) e da sub-espécie *G. c. camelopardalis* (topologias de dados isolados e concatenados), o plantel de animais dos demais Zoos pertencem à espécie *Giraffa girafa* (topologia CO1), da sub-espécies *G. g. angolensis* (Zoo Beto Carreiro; topologias de dados isolados e concatenados) e *G. g. girafa* (demais Zoos). A rede haplotípica suporta essas hipóteses devido ao compartilhamento dos haplótipos observados nos animais aqui estudados com aqueles das espécies na natureza. Além disso, a comparação do padrão de pelagem e da presença/ausência do terceiro ossicone nos animais estudados, com aqueles que são típicos de cada espécie (*Giraffe Conservation Foundation* 2017), confirma a hipótese das espécies e sub-espécies aqui apresentada (Figura 19).

Apesar de ser identificado como pertencente a espécie *Giraffa giraffa*, no que diz respeito a comparação de pelagem de um exemplar de São Paulo (Figura 10F), foi observado um padrão diferenciado dos demais exemplares. Lee et al (2018) observou uma variação do formato de machas em uma população de *Giraffa tippelskirchi*. Além disso é apontado diferenças no padrão de pelagem dentro das populações de girafas (Dagg, 2014). Isso pode ser mais uma evidencia de variações individuais dentro de uma espécie. Além de demonstrar a importância de uma análise integrativa para identificação de espécies.

O código de barras de DNA é uma abordagem padronizada e é utilizada para identificar espécies a partir de sequências de DNA (de CARVALHO, 2014). Essa técnica utiliza a região mitocondrial Citocromo Oxidase Subunidade I (CO1) para fornecer uma forte resolução em nível de espécie para diversas espécies selvagens (CAI et al., 2016). Uma das abordagens mais recentes é a Delimitação Molecular de Espécie, que visa identificar as MOTUs (Unidades Operacionais Taxonômicas Moleculares). Os dados de COI aqui obtidos, juntamente com os dados disponíveis nos bancos de dados permitiram a identificação de seis unidades pelo método GMYC, sete pelo método o bPTP e quatro pela análise de distância.

A unidade I, sustentada pelas três análises de delimitação molecular de espécies apontou que todos os indivíduos do Zoo Beto Carrero e um indivíduo do Zoo

de São Paulo (São Paulo 1) pertencem à espécie *Giraffa giraffa*. Tal resultado recupera aquele obtido pelas topologias de Citocromo b e aquelas dos dados concatenados, assim como a análise morfológica da pelagem e dos ossicones, que também mostrou uma maior semelhança destes exemplares com a referida espécie. Portanto, pela congruência entre todos os conjuntos de dados é reforçada a identidade destes exemplares.

A unidade II, à rigor sustentada pelos métodos GMYC e bPTP, não agrupou com nenhuma espécie já identificada pelos bancos de dados. Tal unidade também se faz presente pela análise de distância, mas com a inclusão de exemplares do Zoo de Pomerode e uma sequência CO1 de um espécime voucher de *Giraffa camelopardalis* obtida no genbank (JF444302.1). A combinação dos três métodos de delimitação, acrescido da sequência CO1 de referência sugeriria que esse clado representasse elementos da espécie *G. camelopardalis*. Contudo, tal hipótese faria com que *G. camelopardalis* fosse não-monofilético, uma vez que outro clado composto por sequências CO1 de exemplares diferentes e o exemplar do Zoo de Curitiba mostrou um suporte de ramo de 100% de probabilidade posterior. Além disso, não há evidência anterior de que *G. camelopardalis* não seja um grupo natural. Ao analisar as informações da sequência CO1 voucher de *G. camelopardalis* no genbank, seu depósito foi feito em 2011, cerca de cinco anos antes da primeira forte evidência da existência das quatro espécies (FENNESSY et al. 2016). Assim, é consistente concluir que tal designação para esta sequência voucher seja por simples adoção do nome original das girafas. Por outro lado, ao confrontar as três filogenias obtidas, as topologias são muito congruentes, onde cada qual ilumina reciprocamente as outras duas. Comparando todos os resultados é possível melhor concluir então que os indivíduos Brasília 1 e 2, Itatiba, São Paulo 2, 3, 4 e 5 e Pomerode 1 e 2 pertençam à espécie *Giraffa giraffa*. Tal evidência é apoiada pelas topologias obtidas pelos dados analisados isoladamente e aqueles analisados de forma concatenada. Além disso, o padrão de pelagem reforçou essa hipótese, dado que a região geográfica africana onde ocorre *G. giraffa* apresenta o padrão de pelagem bem similar aos exemplares dos Zoos estudados (Figuras 6 e 7).

A unidade VI (GMYC e bPTP) e V (Distancia) permite concluir que o indivíduo do Zoológico de Curitiba pertença à subespécie *G. c. rothschild*, sinônima da subespécie *G. c. camelopardalis* com 98% de probabilidade posterior. Isso foi também apoiado pelos marcadores citocromo b, região controle (isolados e concatenados) e o

padrão de pelagem. Desta maneira, os dados aqui obtidos pelas diferentes análises de delimitação de espécies, diante dos dados de COI, é mais uma ferramenta que pode ser utilizada para delimitar espécies de girafa. Tal abordagem vem sendo praticada para espécies mamíferos, incluindo espécies da ordem Artiodactyla (ECHI et al. 2013; KUMAR et al. 2017; BHASKAR et al. 2020).

Apesar da resolução obtida para identificar as espécies das girafas abrigadas nos Zoológicos do Brasil, alguns resultados controversos puderam ser observados ao analisar as filogenias obtidas. Um destes resultados, como mencionado acima, é aquele relativo à sequência CO1 voucher capturada do genbank. Um outro é a inclusão de um elemento de *G. reticulata* (LT628412.1/LT628385.1) dentro do clado de essencialmente *G. camelopardalis*, o que parece ser um caso de erro de nomenclatura deste exemplar. Esta hipótese se sustenta pela existência de um outro clado bem resolvido de *G. reticulata* (95% de probabilidade posterior) nas topologias dos dados analisados isoladamente, bem como aqueles concatenados. As redes haplotípicas se mostraram como evidências que reforçam a nossa hipótese de erro de nomenclatura, uma vez que recuperaram o compartilhamento das sequências desse exemplar com a espécie *G. camelopardalis*. Adotar a hipótese de compartilhamento de haplótipos entre duas espécies é considerar introgressão entre as espécies ou heteroplasmia mitocondrial. Devido a falta de evidências que apoiariam introgressão ou heteroplasmia, a hipótese do erro de nomenclatura é reforçada pelos resultados obtidos aqui.

Outros dois casos de incongruência são (1) a divisão de *G. giraffa* e (2) a divisão de *G. camelopardalis*. De acordo com todas as topologias obtidas, *G. giraffa* mostrou ser composta por duas linhagens com excelente suporte de ramo, uma delas sendo clado irmão de *G. tippelskirchi*. A divisão de *G. giraffa* já tinha sido demonstrada na literatura com conjuntos de dados maiores em termos de pares de bases (BOCK et al. 2014; FENNESSY et al. 2016) do que aqueles obtidos aqui. Cabe mencionar que mesmo com a adição dos dados das girafas do Brasil a divisão se manteve, o que reforça a hipótese. *Giraffa giraffa* é uma espécie cuja distribuição geográfica abrange a região mais à Sul do continente africano (O'CONNOR et al 2019). A associação dos dados aqui obtidos com aqueles da literatura, bem como da distribuição geográfica revela que a divisão de *G. giraffa* é claramente no nível das duas sub-espécies: *G. g. angolensis* de distribuição centro-oeste e *G. g. giraffa* de distribuição centro-leste, ambas na região mais a Sul da África.

A região centro-oeste do Sul da África é tipicamente de clima semi-árido à desértico, com taxas de precipitação anual menores do que 500mm/ano (BOTAI et al. 2018). Em alguns lugares a precipitação é menor do que 20mm/ano (WHITE 1983; SAYRE et al. 2013) e de composição florística herbáceo-arbustiva (IVORY et al. 2018). Já a região centro-leste é de clima úmido tendendo à tropical, com taxas de precipitação anual entre 500 e 1400mm/ano (WHITE 1983; SAYRE et al. 2013), de composição florística caracterizada pela presença de árvores e denominada de *woodlands*, que representam paisagens portadoras de árvores entre 40 à 80% de dossel (WHITE 1983; IVORY et al. 2018). Alguns estudos têm demonstrado uma associação entre dados climáticos e da influência da transição da paisagem sobre o fluxo gênico dentro das espécies. Um caso recente é o do roedor Neotropical *Hylaeamys megacephalus* que revelou ser composto por três clados, um deles exclusivo da área de Cerrado, tipicamente mais seco do que a Amazônia que abriga os outros dois clados (MACHADO et al. 2019).

Em *Tropidurus semitaeniatus* foi também observado uma clado com variações genéticas exclusivas da Caatinga, quando comparado às outras áreas de distribuição da espécie de maior umidade como a Floresta Atlântica do Sudeste do Brasil (WERNECK et al. 2015). Na região Sul da África um lagarto (*Trachylepis varia*) cuja distribuição geográfica sobrepõe aquela observada nas sub-espécies de *G. giraffa*, mostrou ser composto por pelo menos dois clados: um delas restrito à área árida de Angola e outro plenamente distribuído pela área úmida de Moçambique, Zimbábue e África do Sul (WEINELL & BAUER 2018). Os dados obtidos no presente estudo mostraram desvios estatísticos (FST) bastante elevados entre a variação genética da sub-espécie da zona árida (*G. g. angolensis*) em relação aquela da zona úmida do Sul da África (*G. g. giraffa*), da ordem de 0,93 pelos dados concatenados (Tabela 9). Desvios FST similares, mais baixos ou mais altos já foram considerados como evidências de linhagens crípticas de diversos grupos de vertebrados (CRAIG et al. 2009; FAZOLATO et al. 2017; SAUVE et al. 2019), especialmente em mamíferos (SILVA et al. 2018; ROCHA et al. 2018; NASCIMENTO et al. 2019). Portanto a integração de todos os dados permite sugerir que na região Sul da África pode existir mais diversidade escondida em *G. giraffa* do que aquela supostamente existente. Os resultados referentes aos três métodos de delimitação molecular de espécies obtidos aqui mostraram, com significativos suportes de ramos a existência de dois clados de *Giraffa giraffa*, um deles com elementos da subespécie *G. g. angolensis*. Assim, a

topologia com sequencias CO1 aparece como evidência aditiva que reforça a hipótese de diversidade críptica das girafas na região Sul da África.

Considerações similares podem ser mencionadas sobre a divisão filogenética observada em *G. camelopardalis*. Diante dos resultados filogenéticos com os dados concatenados, dois clados não reciprocamente monofiléticos puderam ser observados. Isso implica em dois episódios evolutivos associados a essa diversidade ainda mal explicada e abrigada no nome *G. camelopardalis*. De acordo com a datação molecular de Bock et al. (2014) o primeiro episódio teria ocorrido por volta 780 mil anos atrás. Isso dividiu a linhagem ancestral de *G. camelopardalis*, originando a sub-especie *G. c. antiquorum* e a linhagem ancestral comum de *G. reticulata* + *G. c. camelopardalis*. Este último grupo teria se originado por volta de 650mya (BOCK et al. 2014). Os dados mais atuais sobre a distribuição geográfica destas linhagens (O'CONNOR et al. 2019) indicam que tal divisão está associada à fenda principal do Rift Valley do Leste Africano, entre Sudoeste da Etiópia e o Sul do Sudão. Os dados aqui obtidos revelaram uma diferença estatística (Φ_{ST}) entre estes clados de ordem de 65%, o que sugere uma história de separação muito antiga. Portanto, a união de todos estes elementos sugere uma possível origem vicariante entre *G. reticulata* + *G. c. camelopardalis*.

Tendo em vista os fenômenos descritos sobre a diversidade escondida em *Giraffa giraffa* e *G. camelopardalis*, associadas às paisagens adaptativas descontínuas por descontinuidade climática ou feições geomorfológicas particulares, é importante tratar tais linhagens descontínuas como unidades evolutivas independentes. A detecção de unidades evolutivas independentes exige que as mesmas sejam manejadas de forma independente em termos conservacionistas.

5.2 DIVERSIDADE GENÉTICA DE *Giraffa spp.* NOS ZOOLOGICOS DO BRASIL

A diversidade genética é considerada o principal componente a ser preservado em uma perspectiva de conservação da biodiversidade (MORTIZ 2002; FRANKHAM et al. 2008). Na perspectiva do manejo genético, os objetivos de qualquer programa de conservação em zoológicos podem ser alcançados evitando a redução da diversidade genética. Os resultados do atual estudo identificaram um baixo número de haplótipos, onde as 15 amostras definiram apenas 4 haplótipos. Isso mostra que a população de girafas no Brasil poderia contribuir geneticamente com as populações

naturais em 12,5% do total de 32 haplótipos conhecidos na natureza. Em face dos dados obtidos se sugere que a importação de exemplares da natureza deve privilegiar fêmeas das 32 linhagens genéticas observadas, relativas às espécies atualmente reconhecidas. Tal sugestão permitiria além de aumentar o tamanho efetivo da população e manter sob os cuidados do cativeiro o mesmo repertório genético da natureza, potencializando a conservação.

Analisando cada Zoológico individualmente, os dados permitem recomendar que os Zoos com maior plantel (São Paulo e Beto Carreiro) recebam contribuição genética da natureza de uma das quatro espécies somente: *Giraffa giraffa*. É importante recomendar que os exemplares do Zoo de São Paulo recebam contribuição de apenas um dos grupos evolutivos de *G. giraffa*, tendo em vista o relacionamento filogenético mais estreito destes com este grupo, diante de todas as topologias obtidas. Já o exemplar do Zoo de Curitiba pode receber contribuição de apenas um dos grupos evolutivos de *G. camelopardalis*. Todas as topologias obtidas aqui, além das redes haplotípicas apoiam tal recomendação. Isso é crítico porque a girafa Masai (*G. tippelskirchi*) é considerada ameaçada e os dados aqui reunidos apoiam isso, uma vez que apresentou índices de diversidade haplotípica muito baixos e perfil genético único pela análise de estruturação bayesiana. Além destas sugestões, é recomendável a importação de fêmeas prioritariamente de *G. tippelskirchi*, afim de assegurar em ambiente cativo a diversidade genética da girafa Masai que está na natureza. Tais dados permitem sugerir estratégias de resgate genético, afim de introduzir no futuro potencial evolutivo nesta espécie, preferencialmente oriundo da linhagem evolutiva mais próxima; neste caso vindo de *G. giraffa* se for o caso. As redes haplotípicas obtidas aqui sustentam tal recomendação, dado que a variante genética da girafa Masai difere menos do haplogrupo de *G. giraffa*.

Classificadas como “Menos Preocupante” segundo a IUCN, as subespécies *G. g. angolensis* e *G. g. giraffa* compreendem as únicas subespécies que já possuem tal classificação. Apesar do seu aparente sucesso na questão da conservação (DEACON & TUTCHINGS, 2019), ainda é necessário manter indivíduos/populações backups para qualquer situação mais crítica na natureza. Nossos estudos apontam que 90% da população de girafas nos zoos brasileiros pertencem à espécie *Giraffa giraffa*, que pode servir como uma possível fonte de resgate genético para eventuais situações.

No entanto, as instituições precisam evitar a reprodução entre animais aparentados, devendo realizar trocas de animais entre os parques zoológicos. Manter a diversidade genética quando possível no maior patamar preserva as opções futuras de manejo, uma estratégia que se tornará cada vez mais importante à medida que o conhecimento dos requisitos genéticos e demográficos das populações silvestres e cativas se expandirem (BALLOU et al., 2010). Caso clássicos e emblemáticos de resgate genético, com resultados positivos em poucas gerações em termos de incremento do potencial evolutivo na natureza, foram aqueles desenvolvidos com o puma da Flórida, dos rinocerontes de Sumatra e dos lobos na Escandinávia (O'BRIEN et al. 1993; PIMM et al. 2006; GOOSSENS et al. 2013; AKESSON et al. 2016).

Por outro lado, tomando como base as relações genético-evolutivas observadas no presente estudo no nível sub-específico, recomenda-se que os exemplares do Zoo Beto Carreiro devem receber contribuição apenas com da população de giraffas do Sul da África, na sua região mais árida (Sudoeste), já que aqueles exemplares pertencem à sub-espécie *G. g. angolensis*. Na mesma linha de orientações, todos os outros exemplares, exceto aquele do Zoo de Curitiba, devem receber contribuição apenas da outra população de giraffas do Sul da África, porém na sua região mais úmida (Sudeste), já que aqueles exemplares pertencem à sub-espécie *G. g. giraffa*. No que se refere à estratégia de conservação ex-situ entre as Instituições do Brasil, seria muito recomendável uma maior homogeneização da variação genética observada entre todas as Instituições, afim de ampliar a representação quantitativa da diversidade atualmente constatada. Neste sentido, as tabelas 11 e 13 oferecem uma proposta de orientação das formações de casais e potenciais famílias de girafas nos Zoológicos do Brasil.

A hibridização pode ser um problema de conservação muito importante (ALLENDORF et al. 2001), uma vez que pode diminuir o sucesso reprodutivo de uma espécie. Desta forma para fins de manutenção da população brasileira de girafas, perante o conjunto de dados aqui obtido, não seria recomendado o acasalamento do exemplar de Curitiba (Pandinha) com nenhum macho das demais instituições, uma vez que se trata de uma espécie diferente. Os indivíduos do Zoo Beto Carrero, apesar de pertencerem a mesma subespécie, são todos aparentados, sendo Savannah mãe dos outros três indivíduos. Acasalamentos consanguíneos podem trazer problemas

como perda de diversidade genética e sucessibilidade a doenças (FRANKHAM et al. 2010). Em contrapartida os indivíduos machos do Zoológico de São Paulo, podem acasalar com as fêmeas do Zoo Pomerode, Fundação Jardim Zoológico de Brasília e Zoo Parque Itatiba, uma vez que são indivíduos da mesma subespécie.

6 CONCLUSÃO

Este estudo revela a existência de duas espécies de girafas nos zoológicos do Brasil. O zoológico de Curitiba possui a espécie *Giraffa camelopardalis*, enquanto os demais indivíduos dos outros zoológicos são da espécie *Giraffa giraffa*. Apesar da limitada quantidade de dados das espécies de girafa na natureza a utilização de análises de delimitação de espécies com o gene COI demonstrou ser uma boa metodologia para a identificação de espécies. Além disso, é demonstrado um erro de nomeação em um exemplar de *G reticulata* depositado no banco de dado (GenBank). Este estudo permitiu observar uma incongruência na divisão das espécies *G. giraffae* e *G. camelopardalis* sugerindo que há diversidade críptica ainda não explorada nestas espécies.

Os resultados deste estudo fornecem dados genéticos que podem em conjunto a considerações logísticas elaborar planos de manejo para a população de girafa nos zoológicos brasileiros. Este trabalho firma um primeiro passo para o estabelecimento de uma população apropriada para possíveis planos de trocas entre zoológicos, reintrodução e recuperação na natureza. Por fim este tipo de abordagem com algumas modificações pode ser utilizado para estudos posteriores com a fauna *ex-situ* no Brasil.

REFERÊNCIAS

- AGRIZZI, J., et al. Molecular diagnosis of Atlantic Forest mammals using mitochondrial DNA Sequences: *Didelphid Marsupials*. **The Open Zoology Journal**, 5, Suppl 1-M2: 2-9. 2012.
- ÅKESSON, Mikael et al. Genetic rescue in a severely inbred wolf population. **Molecular ecology**, v. 25, n. 19, p. 4745-4756, 2016.
- ALLENDORF, Fred W. et al. The problems with hybrids: setting conservation guidelines. **Trends in ecology & evolution**, v. 16, n. 11, p. 613-622, 2001.
- ALLENDORF, Frederick William; LUIKART, Gordon; AITKEN, Sally N. Conservation and the genetics of populations. **mammalia**, v. 2007, n. 2007, p. 189-197, 2007.
- ARCHIDONA-YUSTE, Antonio et al. Molecular phylogenetic analysis and comparative morphology reveals the diversity and distribution of needle nematodes of the genus *Longidorus* (Dorylaimida: Longidoridae) from Spain. **Contributions to Zoology**, v. 88, n. 1, p. 1-41, 2019.
- ARIF, I. A.; KHAN, H. A. Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. **Animal biodiversity and conservation**, v. 32, n. 1, p. 9-17, 2009.
- ARNEGARD, Matthew E. et al. Genetics of ecological divergence during speciation. **Nature**, v. 511, n. 7509, p. 307-311, 2014.
- ATKINSON, Kirsty E. et al. An assessment of the genetic diversity of the founders of the European captive population of Asian lion (*Panthera leo leo*), using microsatellite markers and studbook analysis. **Mammalian Biology**, v. 88, n. 1, p. 138-143, 2018.
- BALLOU, Jonathan D. et al. Demographic and genetic management of captive populations. **Wild mammals in captivity: principles and techniques for zoo management**, v. 219, 2010.
- BEJA-PEREIRA, ALBANO et al. Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 5, p. 1279-1301, 2009.
- BARBOSA, Soraia et al. Integrative approaches to guide conservation decisions: Using genomics to define conservation units and functional corridors. **Molecular Ecology**, v. 27, n. 17, p. 3452-3465, 2018.
- BHASKAR, Ranjana; KANAPARTHI, Praveen; SAKTHIVEL, Rengasamy. DNA barcode approaches to reveal interspecies genetic variation of Indian ungulates. **Mitochondrial DNA Part B**, v. 5, n. 1, p. 938-944, 2020.
- BLAXTER, Mark et al. Defining operational taxonomic units using DNA barcode data. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 360, n. 1462, p. 1935-1943, 2005.
- BOCK, Friederike et al. Mitochondrial sequences reveal a clear separation between Angolan and South African giraffe along a cryptic rift valley. **BMC evolutionary biology**, v. 14, n. 1, p. 219, 2014.

BOTAI, Christina M.; BOTAI, Joel O.; ADEOLA, Abiodun M. Spatial distribution of temporal precipitation contrasts in South Africa. **South African Journal of Science**, v. 114, n. 7-8, p. 70-78, 2018.

BOUBLI, Jean P. et al. On a new species of titi monkey (Primates: *Plecturocebus* Byrne et al., 2016), from Alta Floresta, southern Amazon, Brazil. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 132, p. 117-137, 2019.

BOWKETT, Andrew E. Recent captive-breeding proposals and the return of the ark concept to global species conservation. **Conservation Biology**, v. 23, n. 3, p. 773-776, 2009.

BRENNEMAN, Rick A.; LOUIS JR, Edward E.; FENNESSY, Julian. Genetic structure of two populations of the Namibian giraffe, *Giraffa camelopardalis angolensis*. **African journal of ecology**, v. 47, n. 4, p. 720-728, 2009.

BROWN, David M. et al. Extensive population genetic structure in the giraffe. **BMC biology**, v. 5, n. 1, p. 57, 2007.

CAI, Yansen et al. Identification of deer species (Cervidae, Cetartiodactyla) in China using mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I (mtDNA COI). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, n. 6, p. 4240-4243, 2016.

CALDARA, Fabrizio et al. Molecular phylogeny of grey mullets based on mitochondrial DNA sequence analysis: evidence of a differential rate of evolution at the intrafamily level. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 6, n. 3, p. 416-424, 1996.

CARVALHO, Daniel C. et al. Hidden genetic diversity and distinct evolutionarily significant units in an commercially important Neotropical apex predator, the catfish *Pseudoplatystoma corruscans*. **Conservation Genetics**, v. 13, n. 6, p. 1671-1675, 2012.

CASTELLANOS-MORALES, Gabriela et al. Use of molecular and environmental analyses for integrated in situ and ex situ conservation: the case of the Mexican prairie dog. **Biological conservation**, v. 204, p. 284-295, 2016.

CHAMBERS, E. Anne; HEBERT, Paul DN. Assessing DNA barcodes for species identification in North American reptiles and amphibians in natural history collections. **PLoS One**, v. 11, n. 4, 2016.

CHASE, Michael J. et al. Continent-wide survey reveals massive decline in African savannah elephants. **PeerJ**, v. 4, p. e2354, 2016.

CHEN, Lei et al. Large-scale ruminant genome sequencing provides insights into their evolution and distinct traits. **Science**, v. 364, n. 6446, p. eaav6202, 2019.

COLBERT, Edwin Harris. **Distributional and phylogenetic studies of Indian fossil mammals**. 1935. Tese de Doutorado. Columbia University.

CONWAY, William G. Buying time for wild animals with zoos. **Zoo biology**, v. 30, n. 1, p. 1- 8, 2011.

- CORANDER, Jukka; SIRÉN, Jukka; ARJAS, Elja. Bayesian spatial modeling of genetic population structure. **Computational Statistics**, v. 23, n. 1, p. 111-129, 2008.
- CORREIA, Larissa Lima et al. A new species of *Brasilotyphlus* (Gymnophiona: Siphonopidae) and a contribution to the knowledge of the relationship between *Microcaecilia* and *Brasilotyphlus*. **Zootaxa**, v. 4527, n. 2, p. 186-196, 2018.
- COZZUOL, Mario A. et al. A new species of tapir from the Amazon. **Journal of Mammalogy**, v. 94, n. 6, p. 1331-1345, 2013.
- CRAIG, Matthew T. et al. How many species of goliath grouper are there? Cryptic genetic divergence in a threatened marine fish and the resurrection of a geopolitical species. **Endangered Species Research**, v. 7, n. 3, p. 167-174, 2009.
- CRAIG, Erica H. et al. Nuclear and mitochondrial DNA analyses of golden eagles (*Aquila chrysaetos canadensis*) from three areas in western North America; initial results and conservation implications. **PloS one**, v. 11, n. 10, 2016.
- CREEL, Scott et al. Population size estimation in Yellowstone wolves with error-prone noninvasive microsatellite genotypes. **Molecular ecology**, v. 12, n. 7, p. 2003-2009, 2003.
- CROWHURST, Rachel S. et al. Characterization of eight polymorphic loci for Maasai giraffe (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi*) using non-invasive genetic samples. **Conservation genetics resources**, v. 5, n. 1, p. 85-87, 2013.
- CUTARELLI, Anna et al. Italian market fish species identification and commercial frauds revealing by DNA sequencing. **Food Control**, v. 37, p. 46-50, 2014.
- DA CRUZ, Marcos OR et al. DNA barcoding of the rodent genus *Oligoryzomys* (Cricetidae: Sigmodontinae): mitogenomic-anchored database and identification of nuclear mitochondrial translocations (Numts). **Mitochondrial DNA Part A**, v. 30, n. 5, p. 702-712, 2019
- DAGG, Anne Innis. The distribution of the giraffe in Africa. **Mammalia**, v. 26, n. 4, p. 497- 505, 1962.
- DAGG, Anne Innis. *Giraffa camelopardalis*. **Mammalian Species**, n. 5, p. 1-8, 1971.
- DAGG, A. I.; FOSTER, J. B. The giraffe: its biology, behavior, and reproduction. 1976.
- DAGG, Anne Innis; FOSTER, J. Bristol. **The giraffe: its biology, behavior, and ecology**. Krieger Publishing Company, 1982.
- DAGG, Anne Innis. **Giraffe: biology, behaviour and conservation**. Cambridge University Press, 2014.
- DA SILVA SANTOS, Anelise et al. Phylogeographic analyses of the pampas cat (*Leopardus colocola*; Carnivora, Felidae) reveal a complex demographic history. **Genetics and molecular biology**, v. 41, n. 1, p. 273-287, 2018.
- DEACON, Francois; TUTCHINGS, Andy. The South African giraffe *Giraffa*

camelopardalis giraffa: a conservation success story. **Oryx**, v. 53, n. 1, p. 45-48, 2019.

DE CARVALHO, Carlos Benigno Vieira. DNA Barcoding in Forensic Vertebrate Species Identification. **Brazilian Journal of Forensic Sciences, Medical Law and Bioethics**, v. 4, n. 1, p. 12-23, 2014.

DRUMMOND, Alexei J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST1.7. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969-1973, 2012.

DE OLIVEIRA, Márcio Leite; DO COUTO, Hilton Thadeu Zarate; DUARTE, José Maurício Barbanti. Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. **European journal of wildlife research**, v. 65, n. 2, p. 21, 2019.

DICKIE, Lesley A.; BONNER, Jeffrey P.; WEST, Christopher David. In situ and ex situ conservation: blurring the boundaries between zoos and the wild. Cambridge University Press, 2007.

ECHI, P. C. et al. Contribution towards the development of a DNA barcode reference library for West African mammals. **African Journal of Biotechnology**, v. 12, n. 48, p. 6704-6708, 2013.

EXCOFFIER, Laurent; LISCHER, Heidi EL. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FARIA, P. J. et al. The use of non-invasive molecular techniques to confirm the presence of mountain bongo *Tragelaphus eurycerus isaaci* populations in Kenya and preliminary inference of their mitochondrial genetic variation. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 3, p. 745-751, 2011.

FAZOLATO, Cecil; FERNANDES, Flora; BATALHA-FILHO, Henrique. The effects of Quaternary sea-level fluctuations on the evolutionary history of an endemic ground lizard (*Tropidurus hygomi*). **Zoologischer Anzeiger**, v. 270, p. 1-8, 2017.

FEIJÓ, Anderson et al. Phylogeny and molecular species delimitation of long-nosed armadillos (Dasypus: Cingulata) supports morphology-based taxonomy. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 186, n. 3, p. 813-825, 2019.

FENNESSY, Julian et al. Mitochondrial DNA analyses show that Zambia's South Luangwa Valley giraffe (*Giraffa camelopardalis thornicrofti*) are genetically isolated. **African Journal of Ecology**, v. 51, n. 4, p. 635-640, 2013.

FENNESSY, Julian et al. Multi-locus analyses reveal four giraffe species instead of one. **Current Biology**, v. 26, n. 18, p. 2543-2549, 2016.

FERNANDO, P. et al. Reliable noninvasive genotyping: fantasy or reality?. **Journal of Heredity**, v. 94, n. 2, p. 115-123, 2003.

FLESNES, NATHAN R. Gene pool conservation and computer analysis. **International zoo yearbook**, v. 17, n. 1, p. 77-81, 1977.

FOOSE, Thomas J. et al. Propagation plans. **Zoo Biology**, v. 5, n. 2, p. 139-146, 1986.

FORAN, David R.; CROOKS, Kevin R.; MINTA, Steven C. Species identification from scat: an unambiguous genetic method. **Wildlife Society Bulletin (1973-2006)**, v. 25, n. 4, p. 835-839, 1997.

FORGACS, David et al. Evaluation of fecal samples as a valid source of DNA by comparing paired blood and fecal samples from American bison (*Bison bison*). **BMC genetics**, v. 20, n. 1, p. 22, 2019.

FRANCISCO MR, SILVEIRA LF. In: Piratelli AJ, Francisco MR. Conservação da biodiversidade. Rio de Janeiro: Technical Books Editora. Pg 117-130. 2013.

FRANKHAM, Richard; BRISCOE, David A.; BALLOU, Jonathan D. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge university press, 2002.

FRANKHAM, Richard. Genetics and conservation biology. **Comptes Rendus Biologies**, v. 326, p. 22-29, 2003.

FRANKHAM, Richard; BALLOU, Jonathan D.; BRISCOE, David A. **A primer of conservation genetics**. Cambridge University Press, 2004.

FRANKHAM, Richard. Genetic adaptation to captivity in species conservation programs. **Molecular ecology**, v. 17, n. 1, p. 325-333, 2008.

FRANKHAM, Richard. Where are we in conservation genetics and where do we need to go? **Conservation Genetics**, v. 11, n. 2, p. 661-663, 2010.

FRANKHAM, Richard. Genetic rescue of small inbred populations: Meta-analysis reveals large and consistent benefits of gene flow. **Molecular ecology**, v. 24, n. 11, p. 2610-2618, 2015..

GARCÍA-ALANÍZ, Nashieli; NARANJO, Eduardo J.; MALLORY, Frank F. Hair-snares: A non-invasive method for monitoring felid populations in the Selva Lacandona, Mexico. **Tropical Conservation Science**, v. 3, n. 4, p. 403-411, 2010.

Giraffe Conservation Foundation. (2017). *Africa's Giraffe: A Conservation Guide*. Black Eagle Media.

GOOSSENS, Benoît; WAITS, Lisette P.; TABERLET, Pierre. Plucked hair samples as a source of DNA: reliability of dinucleotide microsatellite genotyping. **Molecular Ecology**, v. 7, n. 9, p. 1237-1241, 1998.

GOOSSENS, Benoît et al. Genetics and the last stand of the Sumatran rhinoceros *Dicerorhinus sumatrensis*. **Oryx**, v. 47, n. 3, p. 340-344, 2013.

GROSBURG, Rick; CUNNINGHAM, C. W. Genetic structure in the sea. **Marine community ecology**, p. 61-84, 2001..

GROVES, Colin; GRUBB, Peter. **Ungulate taxonomy**. JHU Press, 2011.

GRUBB, P. Artiodactyla. In *Mammal Species of the World. A Taxonomic and Geographic Reference. Third Edition* (eds D. E. Wilson and D. M. Reeder), pp. 637–722 Smithsonian Institution, Washington, The Johns Hopkins University Press,

Baltimore. 2005

HALL, Tom A. et al. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In: **Nucleic acids symposium series**. [London]: Information Retrieval Ltd., c1979-c2000., 1999. p. 95-98.

HARPER, Francis. The nomenclature and type localities of certain Old World mammals. **Journal of Mammalogy**, v. 21, n. 2, p. 191-203, 1940.

HASSANIN, Alexandre et al. Mitochondrial DNA variability in *Giraffa camelopardalis*: consequences for taxonomy, phylogeography and conservation of giraffes in West and central Africa. **Comptes rendus biologies**, v. 330, n. 3, p. 265-274, 2007.

HEBERT, Paul DN; RATNASINGHAM, Sujeevan; DE WAARD, Jeremy R. Barcoding animal life: cytochrome c oxidase subunit 1 divergences among closely related species. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 270, n. suppl_1, p. S96-S99, 2003.

HEDRICK, Philip W.; FREDRICKSON, R. J. Captive breeding and the reintroduction of Mexican and red wolves. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 1, p. 344-350, 2008.

HERNÁNDEZ-ROMERO, Pablo C. et al. The Role of Geographical and Ecological Factors on Population Divergence of the Neotropical otter *Lontra longicaudis* (Carnivora, Mustelidae). **Evolutionary Biology**, v. 45, n. 1, p. 37-55, 2018.

HRBEK, Tomas et al. A new species of river dolphin from Brazil or: how little do we know our biodiversity. **PLoS one**, v. 9, n. 1, 2014.

HUEBINGER, Ryan M. et al. Characterization of 16 microsatellite marker loci in the Maasai giraffe (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi*). **Molecular Ecology Notes**, v. 2, n. 4, p. 531-533, 2002.

ISARI, Stamatina et al. Exploring the larval fish community of the central Red Sea with an integrated morphological and molecular approach. **PloS one**, v. 12, n. 8, 2017.

ITO, Fernanda; BERNARD, Enrico; TORRES, Rodrigo A. What is for dinner? First report of human blood in the diet of the hairy-legged vampire bat *Diphylla ecaudata*. **Acta Chiropterologica**, v. 18, n. 2, p. 509-515, 2016.

IVORY, Sarah J. et al. Waxing and waning of forests: Late Quaternary biogeography of southeast Africa. **Global change biology**, v. 24, n. 7, p. 2939-2951, 2018.

JOHNSON, Laura NL et al. Population genetic structure within and among seasonal site types in the little brown bat (*Myotis lucifugus*) and the northern long-eared bat (*M. septentrionalis*). **PloS one**, v. 10, n. 5, 2015.

JOHNSON, Nathan A. et al. Integrative taxonomy resolves taxonomic uncertainty for freshwater mussels being considered for protection under the US Endangered Species Act. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2018.

JONES, Martin; GHOORAH, Anisah; BLAXTER, Mark. jMOTU and taxonator:

turning DNA barcode sequences into annotated operational taxonomic units. **PLoS one**, v. 6, n. 4, 2011.

KHEDKAR, Gulab D. et al. DNA barcode based wildlife forensics for resolving the origin of claw samples using a novel primer cocktail. **Mitochondrial DNA Part A**, v. 27, n. 6, p. 3932-3935, 2016.

KINGDON, Jonathan. **East African Mammals: Large mammals**. Academic Press, pp. 313-337. 1979.

KITCHENER, ANDREW C. The role of museums and zoos in conservation biology. **International Zoo Yearbook**, v. 35, n. 1, p. 325-336, 1997.

KITCHENER, Andrew et al. Saving the mountain bongo (*Tragelaphus eurycerus isaaci*): Assessment of the genetic status of captive bongos as a source for genetic reinforcement of wild populations. **Journal of Zoo and Aquarium Research**, v. 5, n. 3, p. 123-130, 2017..

KONOPLEVA, Ekaterina S. et al. An integrative approach underscores the taxonomic status of *Lamellidens exolecens*, a freshwater mussel from the Oriental tropics (Bivalvia: Unionidae). **Systematics and Biodiversity**, v. 15, n. 3, p. 204-217, 2017.

KRUMBIEGEL, Ingo. Die Giraffe: Unter bes. Berücks. d. Rassen; Mit 49 Abb. Ausgef. mit Mitteln d. Dt. Forschungsgemeinschaft. 1939. Tese de Doutorado. Schöps.

KUMAR, Vikas; SHARMA, Neelkamal; SHARMA, Arun. DNA barcoding of the Indian blackbuck (*Antelope cervicapra*) and their correlation with other closely related species. **Egyptian Journal of Forensic Sciences**, v. 7, n. 1, p. 31, 2017.

LACKEY, Laurie Bingaman. 2011 Giraffe Studbook.

LACY, Robert C. et al. Pedigree analysis for population management. **Population management for survival and recovery**, Columbia university Press, New York, p. 57- 75, 1995.

LAIKRE, Linda et al. Neglect of genetic diversity in implementation of the convention on biological diversity. **Conservation Biology**, v. 24, n. 1, p. 86-88, 2010.

LEIGH, Jessica W.; BRYANT, David. popart: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110-1116, 2015.

LI, Jing et al. Applying DNA barcoding to conservation practice: a case study of endangered birds and large mammals in China. **Biodiversity and conservation**, v. 26, n. 3, p. 653-668, 2017.

LINNAEUS, Carl von. Systema Naturae per Regna Tria Naturae, Secundum Classes, Ordines, Genera, Species, cum Characteribus, Differentiis, Synonymis, Locis (Tomus I, Editio Decima) (Laurentius Salvius). 1758.

LE PENDU, Yvonnick; CIOFOLO, Isabelle; GOSSER, Allen. The social organization of giraffes in Niger. **African Journal of Ecology**, v. 38, n. 1, p. 78-85, 2000.

LEVAL, Tamara Bauab. Vítimas da ciência: limites éticos da experimentação animal. **Campos do Jordão: Mantiqueira**, 2001.

LÖNNIG, Wolf-Ekkehard. **The evolution of the long-necked Giraffe (*Giraffa Camelopardalis* L.): What do we really know?; Testing the theories of gradualism, macromutation, and intelligent design; a scientific treatise**. MV- Verlag, 2011.

LOEW, Sabine S. Role of genetics in conservation biology. In: **Quantitative methods for conservation biology**. Springer, New York, NY, 2000. p. 226-258.

LYDEKKER, R. On the Subspecies of *Giraffa camelopardalis*. In: **Proceedings of the Zoological Society of London**. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 1904. p. 202-229.

MACHADO, Arielli Fabrício et al. Integrating phylogeography and ecological niche modelling to test diversification hypotheses using a Neotropical rodent. **Evolutionary ecology**, v. 33, n. 1, p. 111-148, 2019.

MANTELLATTO, Aline Meira Bonfim et al. Genetic diversity of the pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*) population in the Brazilian Pantanal assessed by combining fresh fecal DNA analysis and a set of heterologous microsatellite loci. **Genetics and molecular biology**, v. 40, n. 4, p. 774-780, 2017.

MENDOZA, Ángela María et al. Cryptic diversity revealed by DNA barcoding in Colombian illegally traded bird species. **Molecular ecology resources**, v. 16, n. 4, p. 862-873, 2016.

MELLO, Beatriz; VILELA, Júlio F.; SCHRAGO, Carlos G. Conservation phylogenetics and computational species delimitation of Neotropical primates. **Biological Conservation**, v. 217, p. 397-406, 2018.

MEYER, A1. Evolution in mitochondrial DNA in fishes. **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, 2. Molecular Biology Frontier**, 1993.

MIOTTO, R. A. et al. Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. **Conservation Genetics**, v. 12, n. 6, p. 1447-1455, 2011.

MORENO, Vanessa Roma et al. Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. **Genetics and Molecular Biology**, v. 29, n. 2, p. 290-293, 2006.

MORIN, Phillip A. et al. Quantitative polymerase chain reaction analysis of DNA from noninvasive samples for accurate microsatellite genotyping of wild chimpanzees (*Pan troglodytes verus*). **Molecular ecology**, v. 10, n. 7, p. 1835-1844, 2001.

MORITZ, Craig. Defining „evolutionarily significant units“ for conservation. **Trends in**

ecology & evolution, v. 9, n. 10, p. 373-375, 1994.

MORITZ, Craig. Strategies to protect biological diversity and the evolutionary processes that sustain it. **Systematic biology**, v. 51, n. 2, p. 238-254, 2002.

MOWAT, Garth; PAETKAU, David. Estimating marten *Martes americana* population size using hair capture and genetic tagging. **Wildlife Biology**, v. 8, n. 1, p. 201-209, 2002.

MULLER, Z. et al. *Giraffa camelopardalis*. The IUCN Red List of Threatened Species 2016. e. T9194A51140239. 2016.

MULLER, Z. et al. *Giraffa camelopardalis* (amended version of 2016 assessment). The IUCN Red List of Threatened Species 2018: e. T9194A136266699. 2018

MURPHY, Robert W. et al. Cold Code: the global initiative to DNA barcode amphibians and nonavian reptiles. **Molecular Ecology Resources**, v. 13, n. 2, p. 161-167, 2013.

NASCIMENTO, D. C. et al. Variabilidade genética de populações de gambá de orelha branca, *Didelphis albiventris* Lund 1840 (Didelphimorphia; Didelphidae) no Brasil. **Brazilian Journal of Biology**, v. 79, n. 4, p. 594-602, 2019.

OCHOA, Alexander et al. Can captive populations function as sources of genetic variation for reintroductions into the wild? A case study of the Arabian oryx from the Phoenix Zoo and the Shaumari Wildlife Reserve, Jordan. **Conservation genetics**, v. 17, n. 5, p. 1145-1155, 2016.

O'CONNOR, David et al. Updated geographic range maps for giraffe, *Giraffa spp.*, throughout sub-Saharan Africa, and implications of changing distributions for conservation. **Mammal Review**, v. 49, n. 4, p. 285-299, 2019.

OGDEN, Rob et al. Genetic assessments for antelope reintroduction planning in four European breeding programmes. **Journal of Zoo and Aquarium Research**, v. 6, n. 3, p. 79-84, 2018.

OGDEN, Rob et al. Benefits and pitfalls of captive conservation genetic management: Evaluating diversity in scimitar-horned oryx to support reintroduction planning. **Biological Conservation**, v. 241, p. 108244, 2020.

OLECH, Wanda; PERZANOWSKI, Kajetan. A genetic background for reintroduction program of the European bison (*Bison bonasus*) in the Carpathians. **Biological Conservation**, v. 108, n. 2, p. 221-228, 2002.

PADIAL, José M. et al. The integrative future of taxonomy. **Frontiers in zoology**, v. 7, n. 1, p. 16, 2010.

PELLIZZON, Cristiane et al. Sex identification of the extant mega mammal, the lowland tapir, *Tapirus terrestris* (Tapiridae, Mammalia), by means of molecular markers: new outlook for non-invasive samples. **Conservation genetics resources**, v. 9, n. 1, p. 17-19, 2017.

PELLEW, Robin A. The feeding ecology of a selective browser, the giraffe (*Giraffa camelopardalis tippelskirchi*). **Journal of Zoology**, v. 202, n. 1, p. 57-81, 1984.

PEREZ-SWEENEY, B. M.; RODRIGUES, F. P.; MELNICK, D. J. Metodologias moleculares utilizadas em genética da conservação. **Métodos de estudos em biologia da conservação e manejo da vida silvestre**. Editora UFPR, Fundação O Boticário de Proteção à Natureza, Curitiba, Paraná, Brasil, p. 343-380, 2003.

PIMM, Stuart L.; DOLLAR, Luke; BASS JR, Oron L. The genetic rescue of the Florida panther. **Animal Conservation**, v. 9, n. 2, p. 115-122, 2006.

PLÖN, Stephanie et al. Phylogeography of the dugong (*Dugong dugon*) based on historical samples identifies vulnerable Indian Ocean populations. **PloS one**, v. 14, n. 9, p. e0219350, 2019.

POSADA, David. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-1256, 2008.

POWER, Jason WB et al. Spatial Genetic and Body-Size Trends in Atlantic Canada *Canis latrans* (Coyote) Populations. **Northeastern Naturalist**, v. 22, n. 3, p. 598-612, 2015.

PUGEDO, Marina Lages et al. Integrative taxonomy supports new candidate fish species in a poorly studied neotropical region: the Jequitinhonha River Basin. **Genetica**, v. 144, n. 3, p. 341-349, 2016.

PYRCZ, Tomasz et al. Discovery of a remarkable new species of Lymanopoda (Lepidoptera: Nymphalidae: Satyrinae) and considerations of its phylogenetic position: An integrative taxonomic approach. **European Journal of Entomology**, v. 115, 2018.

QIPTIYAH, MARYATUL et al. Cytochrome b mitochondrial DNA characteristic from non-invasive samples of wild population Javan Banteng (*Bos javanicus* d'Alton, 1823). **Biodiversitas Journal of Biological Diversity**, v. 20, n. 2, p. 350-355, 2019.

RAMBAUT, A. et al. Tracer v1. 6. 2014. 2015.

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. FigTree v1. 4.3; 2016. 2019.

RICHMOND, Jonathan Q. et al. Population declines lead to replicate patterns of internal range structure at the tips of the distribution of the California red-legged frog (*Rana draytonii*). **Biological conservation**, v. 172, p. 128-137, 2014.

ROCHA, Rita G. et al. Cryptic diversity in the *Oecomys roberti* complex: revalidation of *Oecomys tapajinus* (Rodentia, Cricetidae). **Journal of Mammalogy**, v. 99, n. 1, p. 174-186, 2018.

ROELKE, Melody E.; MARTENSON, Janice S.; O'BRIEN, Stephen J. The consequences of demographic reduction and genetic depletion in the endangered

Florida panther. **Current Biology**, v. 3, n. 6, p. 340-350, 1993.

RONQUIST, Fredrik; HUELSENBECK, John P. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v. 19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.

ROZAS, Julio et al. DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. **Molecular biology and evolution**, v. 34, n. 12, p. 3299-3302, 2017.

SADAVA, David; PURVES, William H. **Vida/Life: La ciencia de la biología/The Science of Biology**. Ed. Médica Panamericana, 2009.

SAITOH, Takema et al. DNA barcoding reveals 24 distinct lineages as cryptic bird species candidates in and around the Japanese Archipelago. **Molecular Ecology Resources**, v. 15, n. 1, p. 177-186, 2015.

SANTOS, Simoni et al. Population genetic structuring of the king weakfish, *Macrodon ancylodon* (Sciaenidae), in Atlantic coastal waters of South America: deep genetic divergence without morphological change. **Molecular Ecology**, v. 15, n. 14, p. 4361-4373, 2006.

SAYRE, Roger G. et al. A new map of standardized terrestrial ecosystems of Africa. **African Geographical Review**, 2013.

SCHWARTZ, Michael K. et al. Genetic and endocrine tools for carnivore surveys. **Noninvasive survey methods for carnivores**, v. 2, p. 238-262, 2008.

SEYMOUR, Russell. **Patterns of subspecies diversity in the giraffe, *Giraffa camelopardalis* (L. 1758): Comparison of systematic methods and their implications for conservation policy**. 2001. Tese de Doutorado. University of Kent at Canterbury.

SEYMOUR, R. The taxonomic history of giraffe—a brief review. **Giraffa**, v. 6, n. 1, p. 5-9, 2012.

SHETH, Bhavisha P.; THAKER, Vrinda S. DNA barcoding and traditional taxonomy: an integrated approach for biodiversity conservation. **Genome**, v. 60, n. 7, p. 618-628, 2017.

SILVA-NETO, A. A. et al. Diagnostic Cytochrome b gene profiles for the identification of paca (*Cuniculus paca*) bushmeat: implications for the monitoring of illegal hunting and wildlife trade. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, n. 1, p. 55-58, 2016.

SIMMONS, Robert E.; SCHEEPERS, Lue. Winning by a neck: sexual selection in the evolution of giraffe. **The American Naturalist**, v. 148, n. 5, p. 771-786, 1996.

SOLARI, Sergio; SOTERO-CAIO, Cibele G.; BAKER, Robert J. Advances in systematics of bats: towards a consensus on species delimitation and classifications through integrative taxonomy. **Journal of Mammalogy**, v. 100, n. 3, p. 838-851, 2019.

SPINAGE, Clive A. **The book of the giraffe**. London: Collins, 1968.

SUNNUCKS, Paul. Efficient genetic markers for population biology. **Trends in ecology & evolution**, v. 15, n. 5, p. 199-203, 2000. TABERLET, PIERRE; LUIKART,

THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G.; GIBSON, T. J. CLUSTALW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence through weighing, position-specific gap penalties and weight matrix choice. **Nucleic Acids Research**, v. 22, p. 4673-4680, 1994.

TRAILL, Lochran W. et al. Pragmatic population viability targets in a rapidly changing world. **Biological Conservation**, v. 143, n. 1, p. 28-34, 2010.

TRINKEL, Martina; ANGELICI, Francesco Maria. The decline in the lion population in Africa and possible mitigation measures. In: **Problematic Wildlife**. Springer, Cham, 2016. p. 45-68.

VARGAS, Sarah M. et al. Genetic diversity and origin of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) from the Brazilian coast. **Journal of heredity**, v. 99, n. 2, p. 215-220, 2008.

VENKATRAMAN, Madhvi X. et al. Cloudy with a chance of speciation: integrative taxonomy reveals extraordinary divergence within a Mesoamerican cloud forest bird. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 126, n. 1, p. 1-15, 2019.

WEINELL, Jeffrey L.; BAUER, Aaron M. Systematics and phylogeography of the widely distributed African skink *Trachylepis varia* species complex. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 120, p. 103-117, 2018.

WERNECK, Fernanda P. et al. Biogeographic history and cryptic diversity of saxicolous Tropicuridae lizards endemic to the semiarid Caatinga. **BMC Evolutionary Biology**, v. 15, n. 1, p. 94, 2015.

WHITE, Frank et al. **The vegetation of Africa**. 1983.

WINTER, Sven; FENNESSY, Julian; JANKE, Axel. Limited introgression supports division of giraffe into four species. **Ecology and evolution**, v. 8, n. 20, p. 10156-10165, 2018.

WOODWORTH, Lynn M. et al. Rapid genetic deterioration in captive populations: causes and conservation implications. **Conservation Genetics**, v. 3, n. 3, p. 277- 288, 2002.

ZEINALABEDINI, Mehrshad et al. Integration of molecular and geographical data analysis of Iranian *Prunus scoparia* populations in order to assess genetic diversity and conservation planning. **Scientia horticultrae**, v. 247, p. 49-57, 2019.

ZELENINA, D. A. et al. Advanced approaches to studying the population diversity of marine fishes: new opportunities for fisheries control and management. **Russian Journal of Genetics**, v. 47, n. 12, p. 1444-1455, 2011.

ANEXO A – RECOMENDAÇÕES PARA OS ZOOLOGICOS

Enriquecimento conservacionista da população e do manejo reprodutivo de girafas no Brasil: O DNA como informação norteadora.

Nós obtivemos o perfil genético de 15 exemplares de girafas abrigadas nos Zoológicos de Pomerode, Beto Carrero, Curitiba, Brasília, Itatiba e São Paulo e os comparamos com aqueles das quatro espécies conhecidas na África. Nosso estudo mostrou que o zoológico de Curitiba possui a espécie *Giraffa camelopardalis*, enquanto os demais indivíduos dos outros zoológicos são da espécie *Giraffa giraffa*. Além disso, o exemplar do Zoo de Curitiba pertence à subespécie *G. c. camelopardalis*. Já os demais exemplares pertencem às subespécies *G. g. angolensis* (Zoo Beto Carrero) e subespécies *G. g. giraffa* (Zoos de Pomerode, Brasília, Itatiba e São Paulo). Tais informações podem enriquecer a formação da população brasileira de girafas, assim como orientar o seu manejo reprodutivo, evitando hibridização e consanguinidade. A análise dos dados concatenados nos permitiu de forma geral concluir que o Brasil possui somente 12,5% da variedade genética observada na natureza. Em termos mais específicos é observado que os zoológicos do Brasil possuem 40% da variante da subespécie *G. g. giraffa* e 11,1% da subespécie *G. g. angolensis*. Com base nessas informações obtidas nós recomendamos a importação de animais de outras variantes genéticas para aumentar a diversidade do plantel brasileiro, uma vez que foi observado uma baixa diversidade genética nos Zoos. Além disso, é recomendável preservar a diversidade que já ocorre nos zoológicos através de técnicas de preservação de gametas de machos e fêmeas para futuro enriquecimento e renovação da população de girafas no Brasil.

No que diz respeito ao manejo reprodutivo entre os exemplares estudados é recomendável acasalar indivíduos da mesma subespécie afim de evitar hibridização. Desta forma para fins de manutenção da população brasileira de girafas, perante o conjunto de dados aqui obtido, não seria recomendado o acasalamento do exemplar de Curitiba (Pandinha) com nenhum macho das demais instituições, uma vez que se trata de uma espécie diferente. Os indivíduos do Zoo Beto Carrero, apesar de pertencerem a mesma subespécie, são todos aparentados, sendo Savannah mãe dos outros três indivíduos, dessa maneira também não é recomendável o acasalamento entre eles. Em contrapartida os indivíduos machos do Zoológico de São Paulo, podem

acasalar com as fêmeas do Zoo Pomerode, Fundação Jardim Zoológico de Brasília e Zoo Parque Itatiba, uma vez que são indivíduos da mesma subespécie.

ANEXO B - DECLARAÇÃO SOBRE PLÁGIO

Eu, Marina de Souza Santos Falkowski, autora da dissertação intitulada " Elucidando a identidade das girafas no Brasil: uma abordagem molecular *multiloci* como ferramenta norteadora para a conservação *ex-situ* das espécies" a ser defendida 28 de fevereiro de 2020, através do Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade Federal de Pernambuco, declaro que:

1. A pesquisa apresentada nesta dissertação, exceto onde especificado, representa minha pesquisa original.
2. Esta dissertação não foi submetida anteriormente para obtenção de nenhum grau em nenhuma outra instituição de ensino e pesquisa do país ou do exterior.
3. Esta dissertação não contém dados de terceiros, nem figuras, gráficos ou outras informações, a menos que devidamente especificado e devidamente creditado como sendo fornecido por outra pessoa.
4. Esta dissertação não contém material escrito por terceiros, a menos que devidamente especificado e creditado como sendo fornecido por outros pesquisadores. Onde material escrito por terceiros foi usado, eu:
 - 4.1. Re-escrevi o texto, mas a informação passada foi devidamente referenciada.
 - 4.2. Onde palavras exatas escritas por terceiros foram usadas, as mesmas foram marcadas no texto em itálico ou entre aspas e devidamente referenciadas.
5. Esta dissertação não contém texto, gráficos ou tabelas copiadas e coladas da internet, a menos que especificamente creditado, e a fonte original devidamente referenciada e datada na sessão de Referências Bibliográficas.

Recife 18 de fevereiro de 2020.

Marina de Souza Santos Falkowski