

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,  
CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama  
gouazoubira medemi* BARRIGA-BONILLA, 1966 A  
PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL**

**Liss Maryori García Moreno**

Bióloga

**2022**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS**  
**CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA,  
CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama*  
*gouazoubira medemi* BARRIGA-BONILLA, 1966 A  
PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL**

**Discente: Liss Maryori García Moreno**

**Orientador: Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte**

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal

**2022**

M843c Moreno, Liss Maryori García  
Caracterização morfológica, citogenética e molecular de  
Mazama gouazoubira medemi Barriga-Bonilla; 1966 a partir de  
um topótipo atual / Liss Maryori García Moreno. -- Jaboticabal,  
2022  
65 p.  
  
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista  
(Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias,  
Jaboticabal  
Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte  
  
1. Taxonomia. 2. Genética. 3. Filogenia. 4. Mazama. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da  
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo  
autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



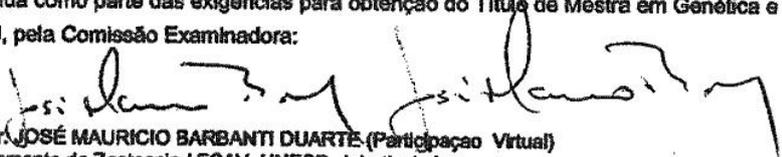
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:** CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama medemi* Barriga-Bonilla, 1966 A PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL

**AUTORA:** LISS MARYORI GARCIA MORENO

**ORIENTADOR:** JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em Genética e Melhoramento Animal, pela Comissão Examinadora:

  
Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE (Participação Virtual)  
Departamento de Zootecnia / FCAV UNESP Jaboticabal

Prof. Dra. ANA CAROLINA D OLIVEIRA PAVAN (Participação Virtual)  
Instituto de Biociências / Universidade de São Paulo - SP

Documento assinado digitalmente

ANA CAROLINA D OLIVEIRA PAVAN  
Data: 07/11/2022 22:35:02-0300  
Verifique em <https://verificador.id.br>

Prof. Dr. ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI (Participação Virtual)  
Universidade Federal de Sergipe - Campus do Sertão / Nossa Senhora da Glória/SE

Documento assinado digitalmente

ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI  
Data: 06/11/2022 09:04:29-0300  
Verifique em <https://verificador.id.br>

Jaboticabal, 04 de novembro de 2022

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**Liss Maryori García Moreno** – Nascida em Bogotá, Colômbia, no dia 11 de março de 1998. Graduada em Biologia em fevereiro de 2020, pelo Programa de Biologia, Faculdade de Ciências da Universidade El Bosque-Câmpus de Usaquén, Bogotá D.C., Colômbia. Ingressou no mestrado no Programa de Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista- Câmpus Jaboticabal sob orientação do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte. A aluna recebeu financiamento para o mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

En esta tierra yo crecí  
Vibran en mí  
Milenios indios  
Y centurias de español  
Mestizo corazón que late en su extensión  
Hambriento de justicia, paz y libertad  
No canta usted, ni canto yo  
Es Sudamérica mi voz  
Otra emancipación  
Les digo que hay que conquistar  
Y entonces sí mi continente acunará  
Una felicidad,  
Con esa gente chica como usted y yo.

**Ariel Ramírez / Félix Luna**

Ao Matriarcado da minha casa,  
em especial à minha irmã **Kelly**, minha inspiração de mulher inteligente,  
exemplo de perseverança e tenacidade.

**Dedico.**

## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, pela oportunidade de desenvolver meu trabalho sob sua orientação.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelos recursos investidos neste trabalho.

Ao grupo de grandes pesquisadores e pessoas que fazem parte do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (Nupecce). Agradeço aos amigos e colegas Valdir, Thaylanne, Isabel, Eluzai, Agda, Laís, Dolores, Bianca, Eduard, Jeferson, Pedro e Vinicius.

Ao técnico de laboratório João Airton Bôer pela sua valiosa colaboração durante o desenvolvimento da fase laboratorial, pelos ensinamentos e conselhos.

À Dra. Clara Santafé, Victor Saavedra e demais parceiros da Universidad El Bosque, que foram essenciais na realização deste estudo.

Ao Biólogo Douglas Knapp, Analorena Cifuentes e Camilo Ortiz pelas ajudas e contribuições durante o trabalho em campo.

Ao Don Álvaro e Dona Yency, pelo recebimento e ajuda na coleta de campo, por permitirem realizar o estudo na sua propriedade.

Às minhas amigas da vida Daniela, Juliana e Patrícia, pela parceria e amor demonstrado nos nossos diferentes caminhos.

À minha família perfeita, minha mãe Angélica e minhas irmãs Kelly e Sofia pelo constante apoio e demonstrações de amor e cuidado. Mesmo na distância sua presença foi fundamental para tornar a jornada mais leve.

Ao meu pai Wilson, pelas constantes palavras de apoio, por me incentivar a perseguir sonhos, abrir caminhos e possibilitar meus objetivos.

Ao Camilo Andrés meu porto seguro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO .....</b>	<b>1</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>3</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA .....</b>	<b>4</b>
2.1 A Família Cervidae e a tribo Odocoileini .....	4
2.2 O gênero <i>Mazama</i> Rafinesque, 1817 .....	6
2.3 <i>Mazama</i> na Colômbia.....	9
2.4 <i>Mazama gouazoubira medemi</i> Barriga-Bonilla, 1966 .....	10
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>12</b>
3.1 Obtenção do exemplar .....	12
3.2 Procedimento após a coleta do exemplar .....	13
3.2.1 Biopsia de pele.....	13
3.2.2 Retirada e processamento da pele completa .....	14
3.2.3 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo.....	14
3.2.4 Preparação do crânio e pós-crânio .....	14
3.3 Análise morfológica .....	14
3.3.1. Morfologia do topótipo.....	14
3.3.2 Morfometria Comparativa.....	14
3.4 Análises citogenéticas .....	17
3.4.1 Cultivo de fibroblastos .....	17
3.4.2 Biometria cromossômica .....	18
3.4.3 Coloração convencional Giemsa.....	19
3.4.4 Bandas G .....	19
3.4.5 Bandas C (Heterocromatina Constitutiva) .....	19
3.4.6 Bandas Ag-NOR .....	19
3.4.7 FISH (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization).....	20

3.4.7.1	Preparação das lâminas.....	20
3.4.7.2	Detecção .....	21
3.5	Análises moleculares.....	21
3.5.1	Extração, amplificação e sequenciamento .....	21
3.5.2	Análises filogenéticas.....	22
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>24</b>
4.1	Análise morfológica .....	28
4.1.2	Biometria corporal .....	28
4.1.2	Craniometria.....	32
4.2	Análise citogenética.....	36
4.3	Análise molecular .....	40
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>43</b>
5.1	Análise morfológica .....	43
5.2	Análise citogenética .....	45
5.3	Análise molecular .....	46
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

**CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**
**CERTIFICADO**

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "O uso de topótipos atuais para produção de genótipos e citótipos na revisão taxonômica do gênero *Mazama*: a base para a conservação das espécies", protocolo nº 005433/19, sob a responsabilidade do Prof. Dr. José Mauricio Barbanti Duarte, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 16 de maio de 2019.

Vigência do Projeto	01/06/2019 a 30/05/2024
Espécie / Linhagem	Todas as espécies do Gênero <i>Mazama</i>
Nº de animais	45 espécies
Peso / Idade	Entre 8 e 40 kgs. Exemplares adultos (> 2 anos de idade)
Sexo	Animais adultos de qualquer sexo, preferivelmente machos
Origem	Natureza: Vida livre

Jaboticabal, 16 de maio de 2019.



**Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski**  
 Coordenadora – CEUA

## **CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla; 1966 A PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL**

**RESUMO** – A classificação taxonômica do gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 é bastante controversa, devido à convergência morfológica e alta variação cariotípica intraespecífica. Por efeito do complexo processo evolutivo e os polimorfismos cromossômicos que as espécies do grupo apresentam, sua taxonomia vem sendo estudada com auxílio de ferramentas citogenéticas e moleculares, que se mostraram como informações essenciais no esclarecimento da classificação do grupo e sua consequente implicação nos programas de conservação de cervídeos na região Neotropical. O táxon *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966 foi alocado dentro da sinonímia de *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817) por padrões morfológicos e distribuição geográfica, sem consenso sobre a validade deste táxon ou sua correta classificação. Desta forma, o presente trabalho buscou avaliar o posicionamento e o status de *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966 através da coleta de um espécime na localidade tipo na Colômbia. O exemplar foi caracterizado por técnicas morfológicas tradicionais (medidas cranianas, medidas biométricas e coloração da pele), análises citogenéticas (coloração convencional, banda G, banda C, coloração Ag-NOR e FISH), e por ferramentas moleculares (análise filogenética dos genes *Cytb*, *ND5* e *Dloop*). Os resultados morfológicos e citogenéticos mostraram padrões consistentes com o descrito para a espécie *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817). A caracterização molecular recuperou o topótipo num agrupamento com exemplares de *M. nemorivaga* do norte da Amazônia, se posicionando de forma externa às outras amostras do grupo, mas comprovando sua ligação filogenética, sugerindo o posicionamento de *M. g. medemi* como sinônimo júnior de *M. nemorivaga*.

**Palavras-chave:** Blastocerina, evolução cromossômica, filogenia, *Mazama*, taxonomia

**MORPHOLOGICAL, CYTOGENETIC AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla;  
1966 FROM A CURRENT TOPOTYPE**

**ABSTRACT** - The taxonomic classification of the genus *Mazama* Rafinesque, 1817 is quite controversial, owing to the morphological convergence and high intraspecific karyotypic variation. Due to the complex evolutionary process and the chromosomal polymorphisms that the group presents, its taxonomy has been studied with the help of cytogenetic and molecular tools, which have proven to be essential information in clarifying the classification of the group and its consequent implication in conservation programs of cervids in the Neotropical region. The taxon *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966 was allocated within the synonymy of *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817) by morphological patterns and geographical distribution, without consensus on the validity of this taxon or its correct classification. Thus, the present work sought to evaluate the position and status of *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966 by collecting a specimen in the type locality in Colombia. The specimen was characterized by traditional morphological techniques (cranial measurements, biometric measurements, and skin coloration), cytogenetic analyses (conventional staining, G-band, C-band, Ag-NOR staining and FISH), and by molecular tools (phylogenetic analysis of Cytb, ND5 and Dloop genes). The morphological and cytogenetic results showed patterns consistent with that described for the species *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817). Molecular characterization recovered the topotype in a grouping with *M. nemorivaga* specimens from northern Amazonia, positioning itself externally to the other samples of the group, but proving its phylogenetic relationship, suggesting the positioning of *M. g. medemi* as a junior synonym of *M. nemorivaga*.

**Keywords:** Blastocerina, chromosomal evolution, phylogeny, *Mazama*, taxonomy

## 1. INTRODUÇÃO

A família Cervidae é um táxon amplamente conhecido pelo grande número de espécies que o compõe. Apresenta ampla diversidade genética e cariotípica, sendo esta última característica um atributo extensamente estudado, devido à detecção de rearranjos e polimorfismos cromossômicos entre seus membros (Bonnet-Garnier et al., 2003; Duarte & González, 2010; Fontana & Rubini, 1990). Dentro da família, a classificação taxonômica das espécies do gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 é a mais controversa (Cifuentes-Rincón et al., 2020), sendo atualmente reconhecido como um gênero polifilético e cuja revisão taxonômica trará a descrição de novos gêneros e espécies (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020).

A espécie *Mazama americana* (Erxleben, 1777) é um táxon amplamente distribuído e estudado dentro do gênero, sendo considerado como um complexo de espécies crípticas, devido a detecção de polimorfismos cromossômicos intra e interpopulacionais, o que levou a proposição de citótipos com correspondência geográfica (Abril et al., 2010) e isolados reprodutivamente devido a diferença cromossômica elevada (Galindo et al., 2021; Salviano et al., 2017). Existe a suposição de um cenário semelhante para os táxon *M. gouazoubira* (Valeri et al., 2018), *M. nana* (Abril & Duarte, 2008) e *M. nemorivaga* (Figueiredo, 2014; Fiorillo et al., 2013).

Neste contexto, os processos de revisão taxonômica tornaram-se cada vez mais necessários. As pesquisas atuais para o entendimento do gênero tiveram como resultado a validação de espécies que haviam sido sinonimizadas com táxons amplamente distribuídos. No caso, *Mazama rufa* (Illiger, 1815) e *Mazama jucunda* (Thomas, 1913) (Mantellatto et al., 2022; Peres et al., 2021) a revalidação foi possível com auxílio de dados morfológicos, moleculares e de citogenética clássica e molecular. Desta forma, foi possível comparar estas espécies pela combinação de investigações dos padrões cariotípicos e com auxílio de ferramentas moleculares (Cifuentes-Rincón et al., 2020).

Diante as perspectivas a respeito da composição do gênero *Mazama*, informações que auxiliem no esclarecimento taxonômico dos complexos de espécies descritos, e ainda não conhecidos, são de grande relevância para a

resolução do grupo. A revisão das espécies descritas nos diferentes países da região neotropical, deve incluir dados citogenéticos, já que, para este grupo de cervídeos, o estudo dos cromossomos pode ser uma ferramenta taxonômica importante. Assim com a utilização de exemplares coletados nas localidades tipo, pela possibilidade de ligar espécimes e seus padrões cariotípicos com os nomes descritos originalmente.

Nesse contexto, a Colômbia tem importante destaque, por ser um país que abriga diferentes nomes originais e veados morfológicamente diferenciados (Sarria-Perea, 2012). Por isso, torna-se um território particularmente importante para a resolução da taxonomia do grupo e pela sua história geológica, climática e biológica (Richardson et al., 2018).

Ante o panorama supracitado, o presente trabalho propôs o estudo de um espécime coletado na localidade tipo de *Mazama gouazoubira medemi* (Barriga-Bonilla, 1966), um pequeno cervídeo que habita a região da Orinoquia colombiana, mediante sua caracterização morfológica (medidas craniométricas e corporais), ferramentas de citogenética clássica (bandeamentos cromossômicos), citogenética molecular (FISH), e de filogenia molecular. Essa caracterização é fundamental para que seja possível seu correto posicionamento perante as espécies do gênero na América Latina e a avaliação do seu status taxonômico.

## **2. REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 A Família Cervidae e a tribo Odocoileini**

A família Cervidae, classificada atualmente dentro da ordem Artiodactyla, é a segunda família (dentro das 23 pertencente a ordem) mais abundante e amplamente distribuída no mundo, compondo 18 gêneros e 55 espécies (Burgin et al., 2018; Zurano et al., 2019). Sua diversidade decorre da grande radiação adaptativa e do sucesso na ocupação de diferentes ambientes, na expansão pela América do Sul, advindo da América do Norte, através da formação do Istmo do Panamá no Mioceno tardio (Bacon et al., 2015; Cassini et al., 2016; Eisenberg, 2000; Zurano et al., 2019). Aqui alcançou maior diversidade (12 gêneros) pelo fenômeno conhecido como o Grande Intercâmbio Biológico Americano, um dos

principais eventos biogeográficos que modelaram a composição da fauna moderna na América (GABI; O'Dea et al., 2016).

A sistemática da família Cervidae tem sido controversa. As particularidades do seu processo de especiação, caracterizado por radiações adaptativas rápidas e sucessivas (Heckeberg, 2020), dificultou a classificação do grupo, tendo atualmente várias incertezas taxonômicas (Duarte et al., 2008; Gilbert et al., 2006; Grubb, 1993; Merino & Rossi, 2010). Na tentativa de organizar a classificação, tem sido proposta a subclassificação em duas subfamílias: Cervinae e Capreolinae, sendo posicionados nesta última subfamília os cervídeos americanos classificados dentro da tribo Odocoileini (Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg et al., 2016; Heckeberg, 2020).

A tribo Odocoileini inclui os gêneros *Rangifer* Smith, 1827, *Odocoileus* Rafinesque, 1832, *Blastocerus* Wagner, 1844, *Ozotoceros* Ameghino, 1891, *Hippocamelus* Leuckart, 1816, *Pudu* Gray, 1852 e *Mazama* Rafinesque, 1817 (Duarte & González, 2010). Devido à divisão tradicional desta tribo de acordo com características morfológicas (coloração, comprimento do corpo e forma de ramificação dos chifres) (Ruiz-García et al., 2009), foram originalmente descritos táxons que hoje são considerados polifiléticos (ex. *Mazama*). Este achado levou à proposição de relações evolutivas inadequadas (Duarte et al., 2008; Eisenberg, 2000; Merino & Rossi, 2010), devido à convergência morfológica e ao alto grau de homoplasia exibida pelos caracteres morfológicos no grupo (Abril et al., 2010; Duarte et al., 2008). Atualmente a tribo é considerada como o táxon mais problemático dentro da família, com relações intergenéricas controversas (Gilbert et al., 2006; Heckeberg, 2020).

Duarte, Gonzáles e Maldonado (2008), caracterizaram essas incertezas, e por meio de uma abordagem abrangente, descreveram as polifilias encontradas e dividiram o grupo em dois clados: O clado vermelho, que agrupa as espécies de *Odocoileus*, *Mazama americana*, *Mazama juncunda* e *Mazama nana* e o clado cinza que inclui *Hippocamelus*, *Ozotoceros*, *Blastocerus*, *Mazama nemorivaga* e *Mazama gouazoubira*. Posteriormente, para distinção desses clados, foi adotada uma divisão em duas subtribos: Odocoileina e Blastocerina (Heckeberg et al., 2016) (Figura 1).

## 2.2 O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817

A polifilia mais evidente na classificação das subtribos propostas por Heckerberg (2016), é a do gênero *Mazama*. Esse táxon é vastamente reconhecido por apresentar uma grande variabilidade cariotípica, com espécies que exibem um número diploide desde  $2n=32$  (*Mazama jucunda*) até  $2n=70$  (*M. nemorivaga*) (Duarte & González, 2010). E ainda, há extenso polimorfismo cromossômico dentro das espécies que compõem o gênero (Abril et al., 2010; Abril & Duarte, 2008; Cifuentes-Rincón et al., 2020; Peres et al., 2021; Valeri et al., 2018). Uma vez que a variação cariotípica intraespecífica tem um limite imposto pela estabilidade meiótica na produção de gametas, a presença de polimorfismos cromossômicos gera formação de eficientes barreiras reprodutivas entre as variantes (Cursino et al., 2014; Dobigny et al., 2017; Galindo et al., 2021; Salviano et al., 2017). Esta condição, elevou a proposição da existência de complexos de espécies dentro das atualmente reconhecidas (Abril et al., 2010).

O número de espécies que compõem o gênero tem sido bastante debatido. Desde revisões que incluem 18 espécies e 24 subespécies (Allen, 1915), até abordagens que agrupam em 4 espécies (*Mazama americana*, *M. gouazoubira*, *M. chunyi* e *M. rufina*) todos os táxons descritos para o gênero (Cabrera, 1961). Porém, hoje são reconhecidas como espécies válidas *M. americana* (Erxleben, 1777), *M. jucunda* Thomas, 1913, *M. nana* (Hensel, 1872), *M. temama* (Kerr, 1792), *M. rufina* (Pucheran, 1851), *M. chunyi* Hershkovitz, 1959, *M. gouazoubira* (Fischer, 1814) e *M. nemorivaga* (Cuvier, 1817) (Mammal Diversity Database, 2022).

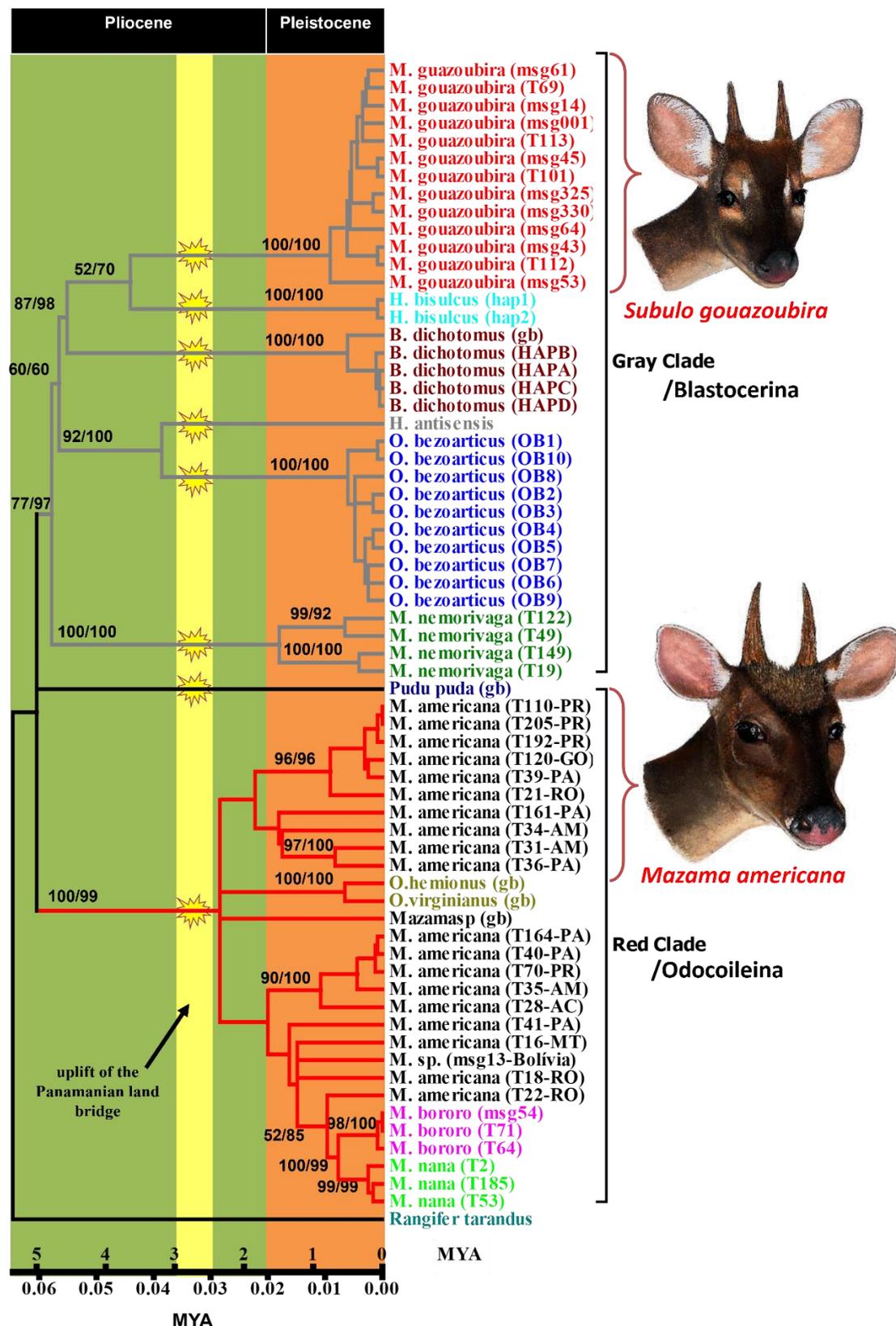
Nos últimos anos, diante da necessidade de fazer revisões criteriosas, com trabalhos que incluam dados morfológicos, citogenéticos, moleculares e com origens geográficas confiáveis, tem sido revisadas e revalidadas algumas espécies do gênero. Cifuentes-Rincón e colaboradores (2020), coletaram um exemplar de *Mazama americana* (Erxleben, 1777) na sua localidade tipo, em consequência da inexistência de um holótipo e da necessidade de obter um padrão molecular e cariotípico para a espécie. Por tanto, foi designado o espécimen coletado como neótipo para o táxon. Esta delimitação permitiu a

revalidação de *Mazama rufa* (Illiger 1815), que por muitos anos foi mantida como sinônimo júnior de *Mazama americana* (Cifuentes-Rincón et al., 2020; Peres et al., 2021).

Sob essa mesma abordagem integrativa, foi caracterizada a espécie *Mazama temama* (Kerr, 1792), a forma de veado-mateiro típica da América Central, e que também foi considerada sinônimo de *M. americana* por um período, mesmo tendo uma grande diferença cariotípica, com um número fundamental NF=70 em contraste com o NF=50 de *M. americana* (Sandoval et al., 2022).

Posteriormente foi revisada a espécie *Mazama bororo* descrita por Duarte em 1996, a qual foi discriminada de *M. americana* contrastando seus padrões cariotípicos (Duarte e Jorge, 2003). Porém, após a revisão molecular do holótipo designado para uma subespécie de *M. americana* descrita por Thomas (1913), foi revalidada a espécie *Mazama jucunda*, passando a *M. bororo* como seu sinônimo júnior (Mantellatto et al., 2022).

Perante a polifilia exibida no gênero *Mazama* (Figura 1), o veado catingueiro *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814) e o veado-roxo, *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), precisariam de mudança de gênero. Isso já foi proposto para *M. gouazoubira* e em consequência da inexistência de um holótipo, foi designado um neótipo para a espécie, que recebeu nova combinação genérica *Subulo gouazoubira* (G. Fischer, 1814) (Bernegossi, Borges, et al., 2022). Da mesma forma, com o uso de técnicas de citogenética molecular, foi estudada sua conformação cariotípica, possibilitando a comparação deste táxon com o resto dos membros do grupo (Bernegossi, Vozdova, et al., 2022).



**Figura 1.** Relações filogenéticas dos cervídeos neotrópicos da tribo Odocoileini. Em destaque, se exibe a polifilia do gênero *Mazama*, com espécies recuperadas tanto na subtribo Blastocerina (antigo Gray Clade), como na subtribo Odocoileina (antigo Red Clade), ilustrando as semelhanças morfológicas de *Mazama americana* e o novo gênero *Subulo*, justificativa do seu antigo agrupamento. (Árvore adaptada de: Duarte, Gonzáles e Maldonado, 2008; Fonte das ilustrações: Azevedo et al., 2021).

### 2.3 *Mazama* na Colômbia

A Colômbia é um território importante para os estudos dos processos evolutivos e a dispersão da mastofauna como os cervídeos neotropicais. Devido a sua posição ao norte da América do Sul, o país apresenta áreas nas quais aconteceram eventos geológicos excepcionais. Sua localização representa o ponto de encontro entre Laurásia e Gondwana, a elevação mais recente dos Andes, com sua divisão em três cordilheiras e o fechamento do istmo do Panamá, que permitiu não apenas a ocupação de América do sul mas o intercâmbio de fauna entre os continentes (Gregory-Wodzicki, 2000; Richardson et al., 2018). Estas características fazem com que os processos filogenéticos e biogeográficos deste país sejam particularmente interessantes.

Atualmente o Sistema de Informação sobre Biodiversidade da Colômbia (SiB) e a Lista de mamíferos da Colômbia (García-Herrera et al., 2015; Morales-Martinez, 2021; Ramírez-Chaves et al., 2016; Solari et al., 2013) reconhecem oito espécies do gênero *Mazama* com distribuição no país: *Mazama americana* (Erxleben, 1777), *Mazama temama* (Kerr, 1792), *Mazama rufina* (Pucheran, 1851), *Mazama zetta* Thomas, 1913, *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), *Mazama cita sanctaemartae* Allen, 1915, *Mazama zamora* Allen, 1915 e *Mazama murelia* Allen, 1915. No entanto, os inventários de espécies internacionais como a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), o Mammal Species of the World (MSW) e o Mammal Diversity Database (MDD) reconhecem apenas quatro delas; *M. americana*, *M. temama*, *M. rufina* e *M. nemorivaga* (Groves & Grubb, 2011; Mammal Diversity Database, 2022; Wilson et al., 2011). É importante ressaltar que, *M. zetta*, *M. murelia* e *M. c. sanctaemartae*, foram descritas a partir de espécimes coletados em Antioquia, Florência e La Bonda respectivamente, sendo suas localidades típicas do território colombiano (Allen, 1915; Thomas, 1913).

Além das espécies reportadas com distribuição na Colômbia, foram descritas duas subespécies que tem como localidade tipo território colombiano e que não são consideradas na lista de espécies, pela ampla sinonimização dos nomes disponíveis para o grupo. Dentre delas, são incluídas *M. americana carrikeri* Herskovitz, 1959 e *M. gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966.

Perante a problemática apresentada, Martínez-Aguero e Ruiz-García (2001) estudaram os níveis de variabilidade genética de diferentes amostras pertencentes à atual tribo Odocoileini, por meio de microssatélites. Os autores conseguiram avaliar amostras de *S. gouazoubira* de Venezuela, Bolívia e Colômbia, nas quais encontraram diferenças significativas a nível molecular, o que suportou a hipótese da diferenciação desta espécie nos táxons *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966 e *M. g. cita* Osgood, 1912. Da mesma forma, na comparação de amostras da subtribo Odocoileina do Peru e de duas regiões da Colômbia, apontando com seus resultados a possível distinção das formas colombianas de *M. americana* nos táxons *M. zetta* Thomas, 1913 e *M. a. carrikeri* Allen, 1915 (Ruiz-García et al., 2006, 2009).

A fim de esclarecer essas controversas, é evidente a necessidade da obtenção dos padrões citogenéticos e o posicionamento filogenético dos animais da Colômbia, como uma ferramenta particularmente importante para o entendimento e classificação do grupo dos *Mazama/Subulo*. Sarria-Perea (2012) fez um estudo com animais de cativeiro de 5 zoológicos na Colômbia. Partindo do uso de análises morfológicas, citogenética clássica (cariótipo básico) e de análises filogenéticas construídas com o gene *Cytb*, apontou com seus resultados a validade taxonômica de *M. zetta* e *M. c. sanctaemarteeae*. Entretanto, a origem cativa dos animais utilizados, ausência de espécimes tipo que ancoram os nomes e as poucas abordagens genéticas e citogenéticas utilizadas, foram inviabilizadas maiores conclusões acerca da taxonomia do grupo (Sarria-Perea, 2012). Porém, a partir deste estudo, pode-se obter uma ideia da forma e número cromossômico dos cariótipos dos animais presentes na Colômbia, os quais diferiram bastante em relação a cariótipos já estudados na região Neotropical.

#### **2.4 *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966**

O *Mazama gouazoubira medemi* foi descrito por Barriga-Bonilla (1966), a partir de dois exemplares coletados na região da Orinoquia colombiana, no Departamento<sup>1</sup> de Meta, e depositados na Coleção de Mamíferos “Alberto Cadena García” do Instituto de Ciências Naturais (ICN) da Universidad Nacional

---

<sup>1</sup> Departamento: Divisão política-administrativa equivalente a um Estado no Brasil.

de Colômbia. O holótipo da espécie foi designado para o exemplar juvenil (ICN-812-♀) coletado em 1950 (Figura 2), sendo que, foi utilizado o parátipo (ICN-780-♂) coletado na margem no Rio Guayabero em 1959, para as descrições morfológicas e caracteres diagnósticos da espécie por ser um macho adulto (López-Arévalo et al., 2020). Foi definida como localidade típica de *M. g. medemi* a região da Orinoquia, caracterizada pela predominância de planícies de inundação com formações abertas e dossel descontínuo (Mora-Fernández et al., 2015), sendo substituída na região da Amazônia por *Mazama murelia* Allen, 1915; a outra espécie de *Mazama* pertencente à subtribo Blastocerina descrita na Colômbia (Barriga-Bonilla, 1966).



**Figura 2.** Crânio do Holótipo de *Mazama gouazoubira medemi* depositado na coleção de referência do Instituto de Ciências Naturais (ICN-812-♀) da Universidad Nacional de Colômbia. Escala apresentada em centímetros.

A primeira descrição de *M. g. medemi* estabeleceu que o novo táxon do gênero, caracterizava-se por ter uma coloração dos membros posteriores ocráceos escuros e os membros anteriores comparativamente mais claros; uma mancha ocular definida, pintas supraorbitária e infraorbitária difusas, e um osso lacrimal proporcionalmente maior. *M. g. medemi*, foi diferenciada de *M. murelia* Allen, 1915 por apresentar uma coloração em geral muito mais clara e ocrácea,

uma mancha ocular definida e o lacrimal de um tamanho maior em sentido anteroposterior (Barriga-Bonilla, 1966).

Dentre os caracteres diagnósticos que diferenciaram a *M. g. medemi*, estão os que discriminaram o novo táxon de *M. nemorivaga* da Guiana (*Cervus nemorivagus* Cuvier, 1817; *loc. typ.* Cayena). São eles: a cor dos membros anteriores exteriormente mais claros, ausência de uma mancha esbranquiçada sobre o rinário, uma banda infraorbitária mais clara e a mancha ocular mais branca que parda (Barriga-Bonilla, 1966). Além da comparação com *Cervus nemorivagus* Cuvier, 1817 e *M. murelia* Allen, 1915, Barriga-Bonilla fez distinções do novo táxon com *Mazama americana citus* Osgood, 1912 e *Mazama cita santaemartae* Allen, 1915, unicamente por diferenças de coloração, nas quais *M. g. medemi* apresentou padrões comparativamente mais escuros.

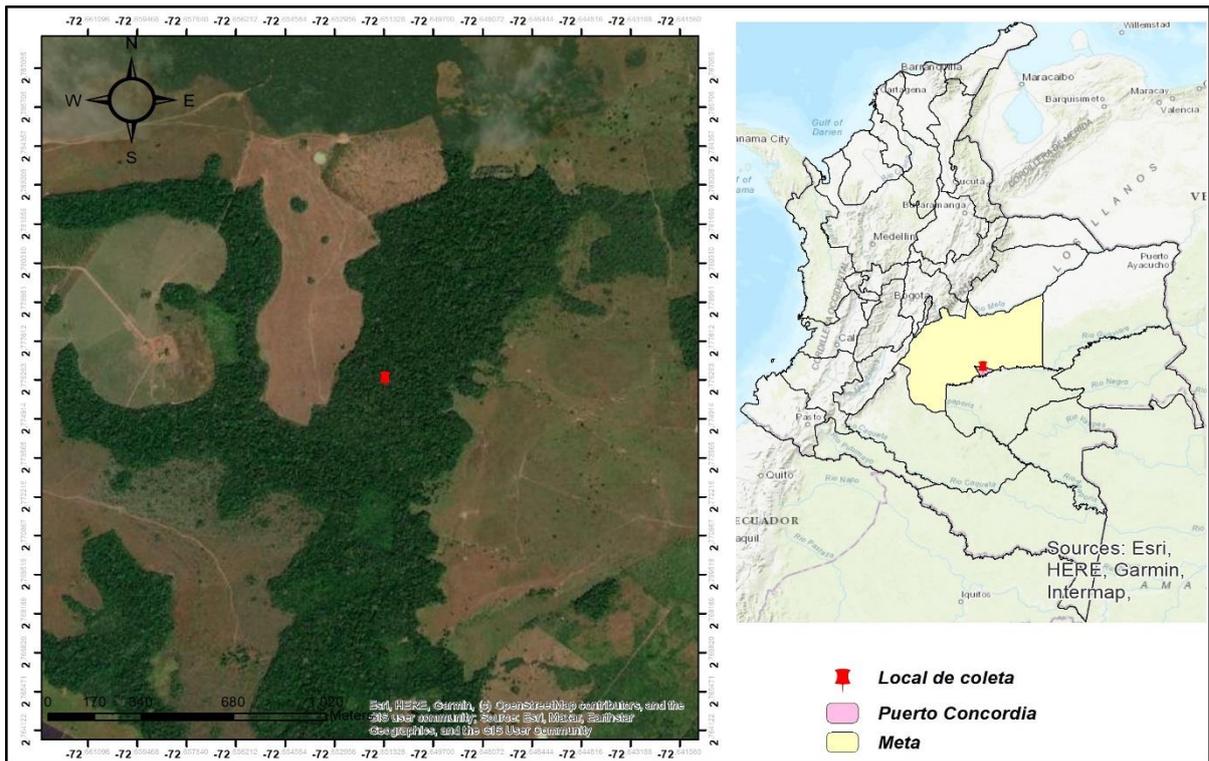
Após as revisões taxonômicas do grupo e baseando-se nas características morfológicas e distribuição, *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966 foi alocado dentro da sinonímia de *M. nemorivaga*, assim como as espécies descritas dos “veados cinzas” do grupo dos *Mazama* que se distribuem ao norte e na Amazônia (Duarte & González, 2010; Morales-Donoso, 2017; Rossi et al., 2010).

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Obtenção do exemplar**

A partir de levantamento bibliográfico, a localidade tipo foi selecionada para a coleta de um exemplar macho de *Mazama gouazoubira medemi*, próxima da cidade de San Juan de Arama, no departamento do Meta, na Colômbia. Conforme as informações publicadas por Barriga-Bonilla em 1966.

A coleta foi realizada por caçadores locais com o uso de arma de fogo, perto da localidade tipo, na Municipalidade de Puerto Concordia, Meta, Colômbia, coordenadas 02 46 39.5N; 72 39 31.4W (Figura 3).



**Figura 3.** Local de coleta do topótipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966.

### 3.2 Procedimento após a coleta do exemplar

Como passo inicial do processamento completo do exemplar, iniciou-se a documentação fotográfica posicionando o animal em decúbito lateral, em cima de um pano azul com a identificação do número da coleta, posteriormente foram tomadas fotos em posição lateral, ventral, dorsal e lateral da cabeça.

#### 3.2.1 Biopsia de pele

Após a antissepsia de uma região da parte interna do membro posterior direito, foi coletado um fragmento de pele de 5x2 cm, depositando a amostra em um tubo contendo meio de transporte (20mL de meio McCoy's + 0,2mL de gentamicina + 0,4mL de anfotericina) sob refrigeração durante 1 hora. Posteriormente, o fragmento de pele foi dividido em 10 fragmentos que foram depositados em tubos criogênicos contendo meio de congelamento de pele com criopreservantes (15mL de meio McCoy's + 5mL de Soro Equino + 1,5mL de DMSO + 3g de PVP + 0,063mL de gentamicina + 0,126mL de Anfotericina) (J. M. D. Duarte & Jorge, 1998). Estes fragmentos, permaneceram por 3,5 horas sob refrigeração e por 30 minutos no vapor de nitrogênio líquido, a fim de

assegurar o congelamento lento. Em seguida, foi estocado por imersão no nitrogênio líquido (-196°C), conservando-se dessa forma para melhor conservação e garantia da viabilidade das amostras para os cultivos celulares.

### **3.2.2 Retirada e processamento da pele completa**

A pele completa do animal foi retirada e processada. Foram removidos restos musculares, gorduras e fâscias. Posteriormente, mergulhou-se a pele em 25ml de Ácido Acético + 3L de água. Após 30 minutos, a pele foi lavada com água comum e logo foi mergulhada em solução curtume (500g de Sulfato de Alumínio + 500g de Cloreto de Sódio + 3L de água) durante 3 dias, sendo esticada durante esse tempo 2 vezes por dia. Posteriormente, a pele foi esticada e aberta para sua secagem e posteriores análises morfológicas.

### **3.2.3 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo**

Foram coletados fragmentos de 1cm<sup>3</sup> de pulmão, fígado, rim, baço, testículo e coração, estocados em tubos com solução de formol 10% para futuros estudos histológicos, e em etanol absoluto para as análises moleculares sob temperatura ambiente.

### **3.2.4 Preparação do crânio e pós-crânio**

Foi retirado o esqueleto completo, sendo removidos os restos musculares dos ossos e mergulhados em água durante duas semanas até sua limpeza total. No final, o crânio e pós-crânio limpos foram estocados em caixas plásticas para as análises morfológicas para o posterior estocagem na coleção de referência.

## **3.3 Análise morfológica**

### **3.3.1. Morfologia do topótipo**

Para o espécime coletado, foi realizada a descrição dos padrões de coloração da pele taxidermizada e das fotos tomadas em campo em diferentes posições do animal, seguindo os critérios de análise para morfologia propostos por Rossi (2000).

### **3.3.2 Morfometria**

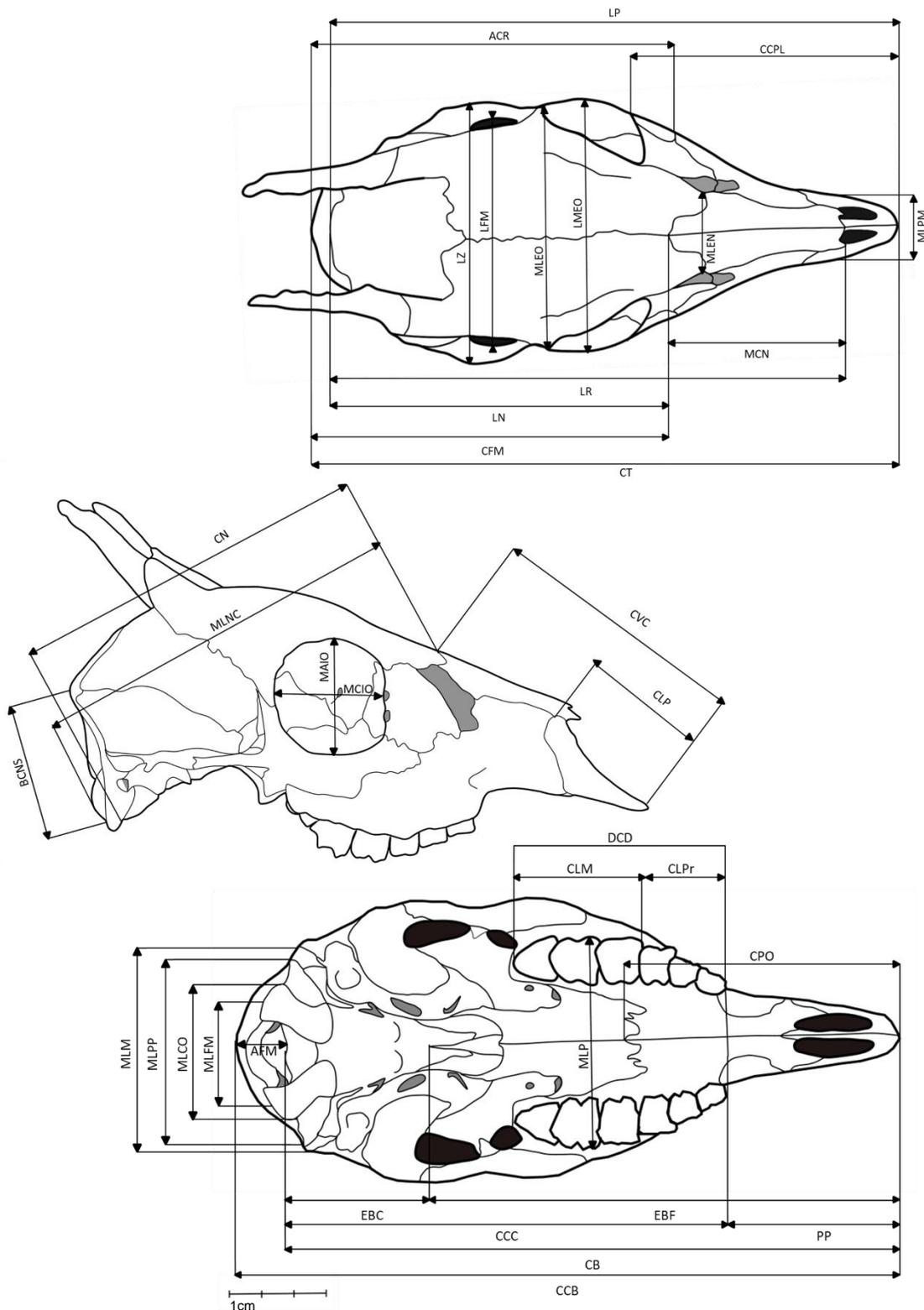
Com o uso de fita métrica e paquímetro, foram tomadas 18 medidas corporais do animal: comprimento e largura da cabeça, mandíbula, distância

entre olhos, orelha, altura, metacarpo, tórax, metatarso, comprimento e largura dos chifres e dos testículos e corpo, assim como também foi aferido o peso.

Além destas, 36 medidas cranianas padrão para cervídeos propostas por Von den Driesch (1978) (Figura 5) foram utilizadas para a descrição do crânio do exemplar coletado. Foram incluídas também nas matrizes de análise, as medições tomadas do parátipo (Figura 4), depositado na coleção de mamíferos do Instituto de Ciências Naturais da Universidad Nacional de Colômbia.



**Figura 4.** Crânio do Parátipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966 depositado na coleção de referência do Instituto de Ciências Naturais (ICN-780-♂) da Universidad Nacional de Colômbia. Escala apresentada em centímetros.



CT= comprimento total; CCB= comprimento condilobasal; CB= eixo basecranial; CCC= comprimento curto do crânio; PP= pré-molar prosthion; EBC= eixo basecranial; EBF= eixo basefacial; CVC= comprimento vicerocraniano; CFM= comprimento frontal mediano; LN= Lambda-nasal; LR= lambda-região mais distal do osso nasal; LP= lambda-prosthion; ACR= acrocânio; MCN= maior comprimento dos nasais; CCFL= comprimento curto facial-lateral; CPO= comprimento palatal oral; CLP= comprimento lateral do premaxilar; DCD= distancia corrida de dentes; CLM= comprimento da linha do molar; CLPr= comprimento da linha pré-molar; MCIO= maior comprimento interno da órbita; MAIO= maior altura interna da órbita; MLM= maior largura do mastoide; MLCO= maior largura dos côndilos oxipitais; MLPP= maior largura das bases do processo paraoccipital; MLFM= maior largura do forâmen magno; AFM= altura do foramen magno; MLNC= maior largura neurocraniana; LFM= largura frontal menor; MLEO= maior largura entre as órbitas; LMEO= largura mínima entre as órbitas; LZ= largura zigomática; MLEN= maior largura entre os nasais; MLPM= maior largura entre o pré-maxilar; MLP= maior largura do palatal; BCNS= basion-ponto mais alto das crista nuchal superior.

**Figura 5.** Medidas cranianas padrão propostas por Von den Driesch (1978) para Cervidae, ilustradas no crânio de *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966.

Para avaliar a posição e a possível discriminação do topótipo de *M. g. medemi* dos demais membros do grupo, as medidas morfométricas foram divididas em dois grupos de dados; biometria corporal e craniometria. As medidas foram avaliadas mediante uma análise de componentes principais (PCA) no Software RStudio 4.2.0 (R Core Team, 2022), utilizando os pacotes estatísticos FactoMineR e FactoExtra (Kassambara e Mundt, 2020) sobre uma matriz de correlação para a correção do tamanho das medidas utilizadas. A matriz foi avaliada também por uma análise de Cluster pelo método de distância euclidiana e 1000 bootstrap utilizando a função IPAK, incluindo na matriz tanto fêmeas como machos. A seleção do número ótimo de clusters foi realizada pelo método de gaps estatísticos, que encontra a maior distancia existente entre as variáveis para representá-las no dendrograma se baseando na hipótese da não existência de subagrupamentos (Oliva, 2015).

Foram avaliadas 61 amostras de espécies pertencentes tanto à subtribo Odocoileina como à subtribo Blastocerina. A matriz da biometria corporal foi constituída por *M. americana* (n=8), *M. rufa* (n=5), *M. jucunda* (n=4), *M. temama* (n=3), *M. nana* (n=4), *M. nemorivaga* (n=8), *Subulo gouazoubira* (n=10) e *M. g. medemi* (n=1), totalizando 43 indivíduos e 14 medidas corporais. A matriz da craniometria foi constituída por *M. americana* (n=6), *M. rufa* (n=3), *M. jucunda* (n=2), *M. temama* (n=2), *M. nana* (n=3), *M. nemorivaga* (n=10), *Subulo gouazoubira* (n=10) e *M. g. medemi* (n=2), totalizando 38 indivíduos, foram utilizadas 20 medidas cranianas propostas por Gonzáles e colaboradores (2018) como as efetivas para discriminar as espécies da subtribo Blastocerina. Sendo superpostos entre as duas matrizes (biometria corporal e craniometria) 20 indivíduos.

### **3.4 Análises citogenéticas**

#### **3.4.1 Cultivo de fibroblastos**

A amostra de pele estocada em nitrogênio líquido, foi descongelada em banho-maria a 37°C, e colocada em placas de Petri sendo lavada três vezes com tampão fosfato (PBS) para posterior divisão mecânica em fragmentos finos menores. Em seguida, esses fragmentos foram transferidos para frascos de cultivo T25, adicionando 2mL de meio de cultura DMEM Sigma® (Meio Essencial

Mínimo Modificado de Dulbecco – alto em glucose), enriquecido com 30% de soro fetal bovino (SFB) e encaminhados para uma estufa de incubação a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Após a aderência das células no frasco de cultivo, o meio foi trocado por 2mL de DMEM com 15% de soro fetal bovino a cada dois dias. O cultivo celular primário foi supervisionado em microscópio invertido a cada 24h e quando observou-se um crescimento adequado da primeira capa de fibroblastos, o meio foi retirado, as células lavadas duas vezes com PBS e adicionou-se 1mL de solução de Tripsina ATV durante três minutos. Após a lavagem, as células foram transferidas para novos frascos de cultivo onde foram suplementados da mesma maneira, até obter um número suficiente de cultivos secundários.

Quando os cultivos apresentaram crescimento celular adequado, agregou-se 60µL de Colchicina 0,016% durante 45 minutos e mais 2mL de Tripsina. Após a lavagem do frasco de cultivo, as células foram transferidas para um tubo de fundo cônico contendo 10mL de meio enriquecido com SFB. O tubo foi centrifugado a 1.600rpm durante 5 minutos, o sobrenadante descartado, o material ressuspendido em 10mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e encaminhado para incubação em banho-maria a 37,5°C por 20 minutos. Posteriormente, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado e o sedimento restituído a 6mL de solução fixadora de metanol e ácido acético 3:1, procedimento repetido três vezes até restituir a 2mL com solução fixadora.

### **3.4.2 Biometria cromossômica**

Foram utilizadas 10 metáfases do exemplar para a classificação cromossômica. As medidas foram feitas a partir do centrômero até o telômero, utilizando o programa computacional “ImageJ” e, de acordo com a razão de braços (RB), foram classificados como metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos ou acrocêntricos (Levan et al., 1964). De acordo com o comprimento relativo (CR), os cromossomos autossomos serão classificados como sendo do grupo A (grandes cromossomos de dois braços = CR>6%), no grupo C (pequenos cromossomos de dois braços = CR<6%), D (grandes cromossomos acrocêntricos = CR>5%), E (pequenos cromossomos acrocêntricos = CR<5%) e no grupo B (microcromossomos ou cromossomos B = CR<1,5%) (Tomazella et al., 2017; Cifuentes-Rincón, 2020).

### **3.4.3 Coloração convencional Giemsa**

As lâminas foram preparadas pelo método de choque térmico (material gelado x superfície quente) e coradas pela metodologia convencional Giemsa (7mL de Tampão fosfato 0,001M + 1mL de corante Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol)) durante 5 minutos.

### **3.4.4 Bandas G**

Seguindo a metodologia de Seabright (1971), foram preparadas lâminas por choque térmico, as quais foram envelhecidas na estufa a 37°C por 7 dias. Logo, as lâminas foram mergulhadas em solução de Tripsina 0,5% a 37°C em banho-maria durante 3 segundos, sendo posteriormente lavadas duas vezes com água destilada. Após a secagem das lâminas, foram coradas com solução Wright-Giemsa em tampão fosfato 2:1 pH 6,8 durante 10 minutos.

### **3.4.5 Bandas C (Heterocromatina Constitutiva)**

Seguindo a metodologia de Summer (1972) foram preparadas lâminas por choque térmico (material gelado x superfície quente). Logo, as lâminas foram mergulhadas em solução de HCl (0,02N) por 20 minutos, sendo em seguida lavadas com água destilada, mergulhando-se em solução de Ba (OH)<sub>2</sub> (0,07N) a 40°C por 20 a 25 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com água destilada e depois mergulhadas em solução 2xSSC por 1,5 horas. Após a secagem, as lâminas foram coradas com Giemsa a 2% em tampão fosfato 2:1 por 25 minutos.

### **3.4.6 Coloração Ag-NOR**

Foram preparadas lâminas pelo método de choque térmico (material gelado x superfície quente). Logo, foram pingadas duas gotas de AgNO<sub>3</sub> a 50% e uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina P.A. + 50mL de água deionizada + 0,5mL de ácido fórmico), colocando-se uma lamínula sobre a preparação. A lâmina foi colocada em uma placa de Petri com papel molhado, sendo aquecida a 56°C em estufa, por 3 minutos até obter uma cor dourada. Depois, a lâmina foi mergulhada em água deionizada para retirar a lamínula, foi lavada com água destilada e analisada ao microscópio após a secagem (Howell & Black, 1980).

### 3.4.7 FISH (Fluorescence *in situ* hybridization)

Foram utilizadas sondas BACs, relacionadas na *Tabela 1*, selecionadas da biblioteca CHORI-BAC bovina CH240 para detecção dos cromossomos de interesse X e 4 de *Subulo gouazoubira* no cariótipo de *M. g. medemi*, sendo que o veado catingueiro é considerado como a espécie que reteve o cariótipo ancestral hipotético comum da família Cervidae (Bernegossi, Vozdova, et al., 2022; Fontana & Rubini, 1990).

**Tabela 1.** Marcadores BACs selecionados para o cromossomo X e 4 de *Subulo gouazoubira* (SGO) e sua homologia com os cromossomos de *Bos taurus* (BTA).

Cromossomo	Clone BAC	Região BTA
SGOX	40H2	Xqd
	159O16	Xp
	311B9	Xqp
	67P21	Xp
	453C5	PAR
	326C13	
SGO4	69G2	1qp
	273F5	1qt

#### 3.4.7.1 Preparação das lâminas

As lâminas foram preparadas pelo método de choque térmico (material gelado x superfície quente) e incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos em solução 2xSSC, logo foram deixadas para esfriar a temperatura ambiente durante 20 minutos e em seguida foram transferidas para uma solução 0,1xSSC durante 1 minuto, posteriormente, as preparações foram desnaturadas em solução NaOH (0,07N) a temperatura ambiente por 1 minuto, logo foram incubadas em solução 0,1xSSC a 4°C por 1 minuto e em solução 2xSSC a 4°C pelo mesmo tempo. Conseqüentemente, as preparações foram lavadas em serie alcoólica 70%, 85% e 96% a temperatura ambiente por um minuto cada.

Conjuntamente, o mix de hibridização foi preparado, utilizando-se um volume final de 7µL (MasterMix +sonda) por cada lâmina. Foram utilizados 1µL de DNA Cot bovino (Hybloc™ Competitor DNA, Applied Genetics Laboratories Inc. Melbourne, USA) e 0,6µL de DNA de esperma de salmão (Ultrapure™ Salmon Sperm DNA Solution, Invitrogen®) como DNA supressores a fim de se inibir a hibridização de sequências repetitivas (Bernegossi, 2021).

Posteriormente, o mix de hibridização foi desnaturado por 10 minutos a 92°C e incubado a 37°C durante 30 minutos. No final, o mix desnaturado foi adicionado na lâmina também desnaturada e coberto com uma lamínula, e incubada em câmara úmida até completar 34 horas de hibridização.

#### **3.4.7.2 Detecção**

Após a hibridização, as preparações foram lavadas por 2 minutos em solução 2xSSC a temperatura ambiente, em solução 0,7xSSC a 72°C por 2 minutos e de novo em solução 2xSSC por dois minutos sob agitação. Posteriormente, se adicionaram 100µL de solução de bloqueio (TNB), cobrindo-se a lâmina com parafilm durante 10 minutos, para logo adicionar 100µL de TNB +0,25µL do anticorpo; para as sondas marcadas com Biotina-16-dUT foi realizada a detecção com Streptavidine-Cy5 e para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUT foi utilizado o anticorpo antidigoxigenina-rodamina. As preparações foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 45 minutos. Após a detecção foram realizadas três lavagens com TNT a temperatura ambiente por 5 minutos cada sob agitação, para logo realizar a contracoloração cromossômica adicionando 15 µL de DAPI (4',6-Diamidino-2-Phenylindole) (Vozdova et al., 2019).

### **3.5 Análises moleculares**

#### **3.5.1 Extração, amplificação e sequenciamento**

A DNA dos fragmentos de órgãos coletados foi extraído utilizando o protocolo de fenol-clorofórmio (Sambrook, 1989) com adaptação para o tempo de digestão com a proteinase K de 2h com agitação para 18h a 60°C. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria através do NanoDrop® (Thermo Fisher Scientific) e diluído para uma concentração final de 50ng/µL para cada reação de PCR.

Foram amplificados parte de três genes mitocondriais, utilizando cinco fragmentos relacionados na Tabela 2: dois para Citocromo-B (Cytb), um para a região de controle (Dloop) e dois para NADH desidrogenase subunidade 5 (ND5). Foi padronizada cada reação da PCR para um volume final de 30µL, contendo 1x de tampão e 1 U de Taq DNA polimerase (Platinum™, Thermo Scientific), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,6 mM de dNTP, 1 mg/ml de BSA, 0,6 pM de cada

iniciador. As condições da PCR consistiram em uma etapa inicial de desnaturação a 94°C por dois minutos, seguida de 36 ciclos a 94°C durante um minuto, anelamento a 57°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final foi realizada a 72°C por 10 minutos.

**Tabela 2.** Iniciadores utilizados para a amplificação dos fragmentos de genes de DNA mitocondrial.

Gene	Primers	Sequências (Forward e Reverse)	Tamanho (pb)	Fonte
Cytb	L14724	5'CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTGE3'	480	Irwin et al. (1991)
	H15149	5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGCCTCA3'		
Cytb	FARH	5'TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTTCA3'	660	Duarte et al. (2008)
	FARL	5'CCATGAGGACAAATATCATTCTGAT3'		
D-loop	ThrL15926 DLH16340	5'GGTCCCCGGTCTTGTAAACC3' 5'CCTGAAGTAGGAACCAGATG3'	660	Vilà et al., (1999)
ND5	Leu11775	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3'	691	Caparroz et al. (2015)
	ND512427	5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'		
ND5	ND512326	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3'	688	Caparroz et al. (2015)
	ND512988	5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'		

Os produtos da PCR foram corados com SYRB (Invitrogen) e submetidos para confirmação da amplificação por eletroforese em gel de agarose 2%, posteriormente foram purificados usando o Kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega).

O DNA foi sequenciado em ambas as direções (Forward e Reverse) pelo método de Sanger no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

### 3.5.2 Análises filogenéticas

As sequências foram exportadas para o programa BioEdit 7.2.6 (Hall, 2004) para a verificação visual da qualidade, edição e montagem da sequência consenso.

Para a montagem da matriz foram selecionadas sequências pertencentes ao banco de dados do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (Nupecce) da Universidade Estadual Paulista (UNESP, Jaboticabal, Brasil) e ao banco de dados do GenBank, apresentados na Tabela 3, foi utilizado o *Rangifer tarandus* (Linnaeus, 1758) como outgroup. A matriz de cada fragmento foi revisada e alinhada no servidor online MAFFT 7.5 (Kato et al., 2018). Posteriormente, foram concatenadas as matrizes de cada fragmento no software MEGA X (Kumar et al., 2018). Foi construída uma árvore filogenética pelo método de Inferência Bayesiana (IB) através do software MrBayes 3.2.7

(Ronquist et al., 2012) na plataforma online CIPRES (Miller et al., 2010), também foi feita a seleção do melhor modelo evolutivo seguindo os critérios de AIC pelo Software jModelTest2 2.1.6 (Darriba et al., 2012; Guindon & Gascuel, 2003) na mesma plataforma. Para estimar os valores da probabilidade posterior foram incluídas 4 cadeias de MCMC, com cinco milhões de gerações, tendo uma amostragem cada 1000 gerações em duas corridas distintas. Foi recuperada a melhor árvore da análise, a qual foi visualizada e editada no aplicativo FigTree 1.4.

**Tabela 3.** Sequências e espécies utilizadas na matriz para as análises moleculares, a identificação refere-se ao número de aceso no GenBank com a fonte do trabalho de origem e as amostras do banco do Nupecece identificadas com o número T####.

Espécie	Identificação	Origem	Sequências			Fonte
			Cytb	Dloop	ND5	
<i>M. g. medemi</i>	T433	Puerto Concordia, Meta, Colômbia	x	x	x	atual
<i>M. nemorivaga</i>	JN632659	Perú_OriAmaz	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>M. nemorivaga</i>	T024	Rondonia, Brasil_OciAmaz	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. nemorivaga</i>	JN632660	Guiana Francesa_NortAmaz	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>M. nemorivaga</i>	T346	Pará, Brasil_OriAmaz	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. nemorivaga</i>	MT008227	Hair_03_MataAtla	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008226	Hair_01_MataAtla	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008224	T321_Amapá_NorteAmaz	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008225	T359_Guiana_NorteAmaz	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008223	T309_Amapá_NortAmaz	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008218	T019_Rondonia_OciAmazon	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008222	T149_Rondonia_OciAmazon	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008221	T122_Pará_OriAmazon	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>M. nemorivaga</i>	MT008220	T049_Pará_OriAmazon	x	-	-	Oliveira et al., 2020
<i>S. gouazoubira</i>	NC020720	Colômbia	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>S. gouazoubira</i>	KJ772514	Pantanal, Brasil	x	x	x	Caparroz et al., 2015
<i>S. gouazoubira*</i>	T377	Paraguay	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>S. gouazoubira</i>	T386	Sao Paulo, Brasil	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>S. gouazoubira</i>	T389	Paraguay	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. americana</i>	NC020719	Guiana Francesa	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>M. americana*</i>	T358	Neótipo	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. rufa*</i>	T385	Neótipo	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. rufa</i>	T297	Carajás, Brasil	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. jucunda</i>	T373	Bocauva, Brasil	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. jucunda</i>	T215	Intervales, Brasil	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. nana</i>	T089	Rio Grande do Sul, Brasil	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. nana</i>	T185	Paraná, Brasil	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. temama</i>	T362	México	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. temama</i>	T366	México	x	x	x	Voucher Nupecece
<i>M. temama</i>	JN632673	Colômbia	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>M.sp</i>	COL01	Antioquia, Colômbia	x	-	-	atual
<i>O. virginianus</i>	T432	Meta, Colômbia	x	-	-	atual
<i>O. virginianus</i>	JN632671	Guiana Francesa	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>B. dichotomus</i>	NC020682	Bolívia	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>O. bezoarticus</i>	NC020766	Bolívia	x	x	x	Hassanin et al., 2012
<i>R. tarandus</i>	MT753444	Rússia	x	x	x	Artyushin et al., 2021

#### 4. RESULTADOS

No trabalho de campo para a obtenção do topótipo de *M. g. medemi* foi coletado um macho adulto (Figura 6 e 7), que seguiu o padrão da descrição morfológica feita por Barriga-Bonilla para a espécie.

**Descrição emendada de *Mazama gouazoubira medemi* BARRIGA-BONILLA, 1966 (MAMMALIA; CERVIDAE):** O espécime coletado teve porte pequeno, cor geral da pelagem marrom acinzentado escuro, uma banda comparativamente mais escura na região média-dorsal, se prologando desde a região do pescoço, passando pelo dorso e terminando na cauda. A banda escura decresce lateral e paulatinamente no corpo até os membros passando por um marrom acinzentado até chegar ventralmente a uma cor branca forte, comparativamente mais clara, tanto na região do abdômen como na parte lateral interna dos membros anteriores e posteriores, sendo mais escura nos posteriores. Membros anteriores comparativamente mais curtos que os posteriores. Cauda da mesma cor que o dorso e branca na região ventral. Linha de pelos esbranquiçados e antevertidos na linha média dorsal do pescoço. Orelhas conspicuamente mais escuras dorsalmente, esbranquiçadas na base até se misturar com pelos acinzentados na cabeça. Região orbitária mais clara, com uma faixa supraorbitária castanha-alaranjada e uma faixa infraorbitária comparativamente mais clara. Faixa esbranquiçada na região mentoniana e nos lábios superiores. Tufo de pelos longos na região frontal da cabeça até a base dos chifres. Chifres simples não curvados e pontiagudos.

**Localização do registro:** Puerto Concordia, Meta, Colômbia.

**Coordenadas geográficas do ponto de coleta:** 02 46 39.5N; 72 39 31.4W.

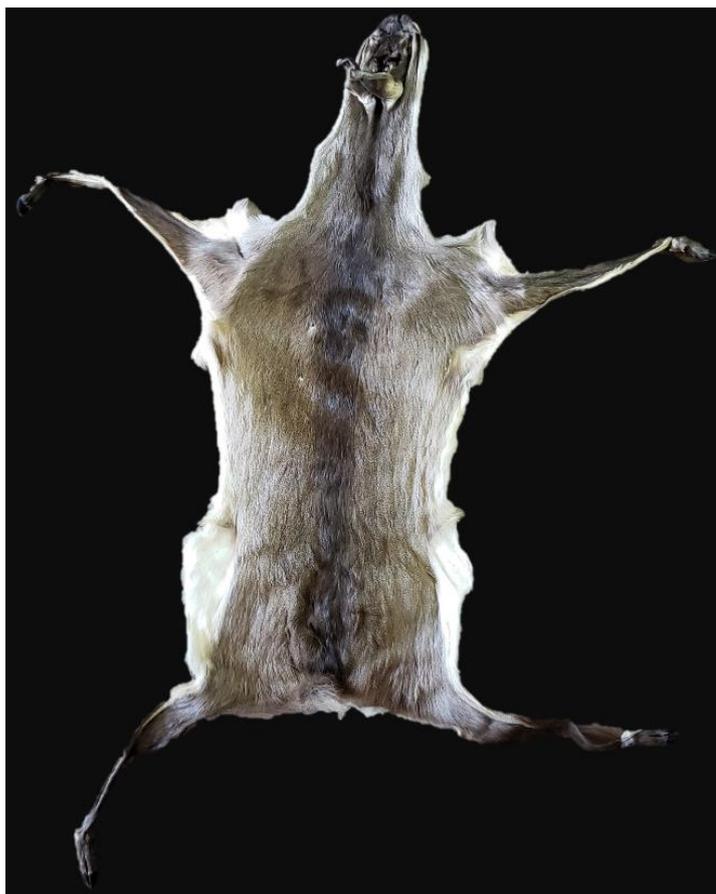
**Depositado em:** Museo de Ciências, Programa de Biología, Faculdade de Ciências, Universidade El Bosque-Câmpus Usaquén.

**No. coleção:** MUEB 1280-2.

**Cariótipo:**  $2n=70$ ;  $NF= 71 + 1-5Bs$ .



**Figura 6.** Espécime coletado na localidade tipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966 (Voucher: MUEB 1280-2). (A) Vista lateral. (B) Lateral da cabeça. (C) Ventral. (D) Região inguinal. (E) Dorsal da cabeça.



**Figura 7.** Pele aberta taxidermizada do topótipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966 (Voucher: MUEB 1280-2).

As medidas da biometria corporal e a massa do topótipo de *M. g. medemi*, apresentadas na Tabela 4, foram avaliadas e utilizadas para a análise de componentes principais (PCA) e para a análise de cluster, com exceção das medidas dos chifres e testículos.

**Tabela 4.** Medidas biométricas (mm) e massa (kg) do topótipo de *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966.

Caracter	Tamanho	Caracter	Tamanho
Comprimento da cabeça	155	Comprimento do corpo	670
Largura da cabeça	75,5	Abdômen	620
Comprimento da orelha	99	Tórax	515
Distância entre olhos	41,2	Diâmetro do testículo direito	32
Mandíbula	63,7	Diâmetro do testículo esquerdo	25,5
Perímetro do pescoço	238	Comprimento do testículo direito	67
Altura	420	Comprimento do testículo esquerdo	56
Metacarpo	127	Comprimento da cauda	79
Metatarso	192	Massa	13,9

O crânio limpo do topótipo de *M. g. medemi* (Figura 8), foi utilizado para as medidas cranianas sugeridas por Von den Driesch (1978), e apresentadas na Tabela 5.



**Figura 8.** Crânio do topótipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966. (Voucher: MUEB 1280-2). (A) Vista lateral direita, (B) lateral esquerda, (C) dorsal e (D) ventral. Escala apresentada em centímetros.

**Tabela 5.** Medidas cranianas (mm) do topótipo de *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966.

Caracter	Tamanho	Caracter	Tamanho	Caracter	Tamanho
CT	176,27	ACR	120,28	MLPP	49,61
CCB	160,12	MCN	52,14	MLFM	14,47
CB	145,49	CCFL	81,2	AFM	16,7
CCC	96,28	CPO	77,45	MLNC	51,94
PP	49,2	CLP	37,36	LFM	52,65
EBC	30,17	DCD	52,24	MLEO	67,02
EBF	115,32	CLM	30,17	LMEO	35,43
CVC	80,08	CLP	22,07	LZ	70,36
CFM	97,2	MCIO	28,24	MLEN	20,14
LN	87,07	MAIO	27,43	MLPM	15,99
LR	140,73	MLM	44,85	MLP	51,63
LP	168,07	MLCO	30,27	BCNS	36,75

CT= comprimento total; CCB= comprimento condilobasal; CB= eixo basecranial; CCC= comprimento curto do crânio; PP= pré-molar prosthion; EBC= eixo basecranial; EBF= eixo basefacial; CVC= comprimento vicerocraniano; CFM= comprimento frontal mediano; LN= Lambda-nasal; LR= lambda-região mais distal do osso nasal; LP= lambda-prosthion; ACR= acrocânio; MCN= maior comprimento dos nasais; CCFL= comprimento curto facial-lateral; CPO= comprimento palatal oral; CLP= comprimento lateral do premaxilar; DCD= distancia corrida de dentes; CLM= comprimento da linha do molar; CLP= comprimento da linha pré-molar; MCIO= maior comprimento interno da órbita; MAIO= maior altura interna da órbita; MLM= maior largura do mastoide; MLCO= maior largura dos côndilos oxipitais; MLPP= maior largura das bases do processo paraoccipital; MLFM= maior largura do forâmen magno; AFM= altura do foramen magno; MLNC= maior largura neurocraniana; LFM= largura frontal menor; MLEO= maior largura entre as órbitas; LMEO= largura mínima entre as órbitas; LZ= largura zigomática; MLEN= maior largura do palatal; MLPM= maior largura entre o pré-maxilar; MLP= maior largura do palatal; BCNS= basion-ponto mais alto das crista nugal superior.

## 4.1 Análise morfológica

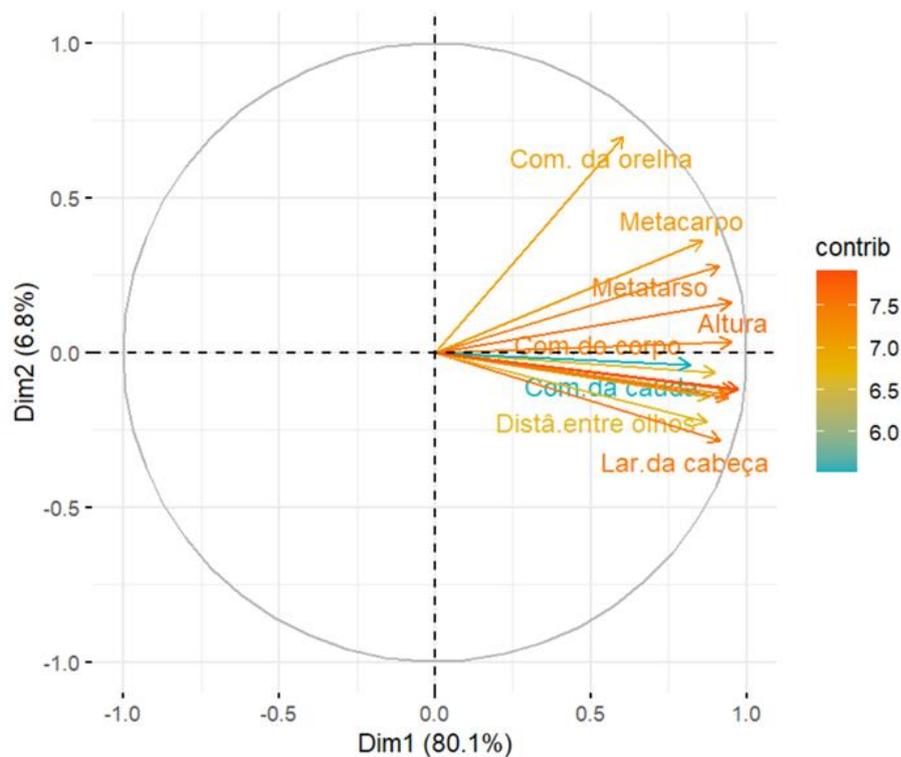
### 4.1.2 Biometria corporal

Para a análise de PCA, foram selecionados o PC1 e o PC2, os quais explicam o 86,89% da variância total, sendo 80,13% e 6,76% respectivamente. Comprovou-se a importância da PCA, avaliando as correlações de cada variável com os componentes principais utilizados (Tabela 6). Os valores mostraram que houve uma correlação positiva significativa ( $p > 0.85$ ) do PC1 com a maioria das variáveis, sendo menor, mas não baixa, para o comprimento da cauda e o comprimento da orelha com  $p = 0.81$  e  $p = 0.60$  respectivamente. O comprimento do corpo, a massa e o tórax, foram as variáveis com maior correlação com o PC1 com um  $p > 0.95$ .

**Tabela 6.** Correlação de cada variável com os componentes principais e a variância total explicada de cada um.

Variável	PC1	PC2
Comprimento da cabeça	0.9376036	-0.1367800
Largura da cabeça	0.9153338	-0.2839251
Comprimento da orelha	0.6040825	0.6982013
Distância entre olhos	0.8720665	-0.2248852
Mandíbula	0.89767388	-0.06522174
Perímetro do pescoço	0.881264	-0.143636
Altura	0.9494597	0.1611302
Metacarpo	0.8582059	0.3602925
Metatarso	0.9121973	0.2774745
Comprimento do corpo	0.95101519	0.03367749
Abdômen	0.9413154	-0.1448617
Tórax	0.9570420	-0.1227411
Comprimento da cauda	0.81821968	-0.03940101
Massa	0.9735263	-0.1177129
Variância	0.8013	0.06767

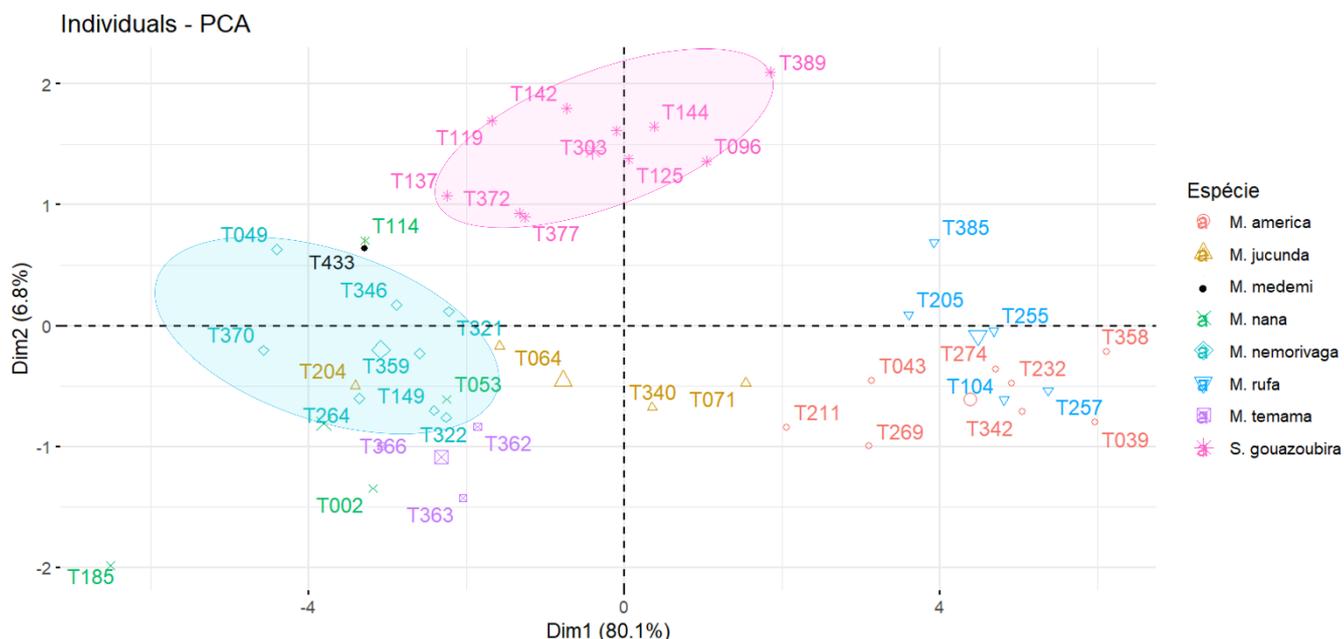
Foram avaliadas também as contribuições (cargas) de cada medida à PCA (Figura 9), sendo a variável do comprimento da cauda a que menos contribuiu à análise, e o comprimento do corpo e a altura, as variáveis que mais contribuíram tanto no PC1 como no PC2.



**Figura 9.** Contribuições dos vetores das 14 medidas corporais utilizadas para o PCA.

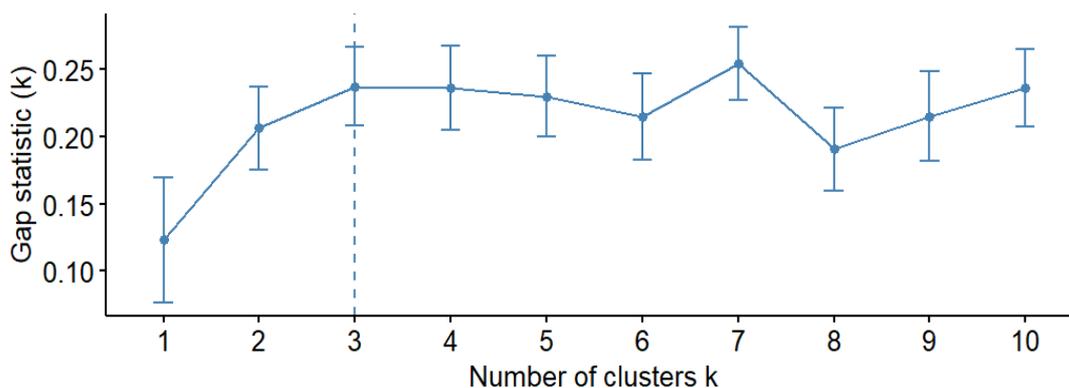
A análise de componentes principais (PCA) construída com os 43 indivíduos e agrupados por espécie nas dimensões 1 e 2 (Figura 10), mostrou que ao projetar as coordenadas dos indivíduos no plano dos componentes, houve uma diferenciação clara das espécies de maior porte (*M. americana* e *M. rufa*) das outras espécies consideradas de menor tamanho dentro do grupo. Os indivíduos pertencentes a espécie *S. gouazoubira*, diferenciaram-se claramente do resto das espécies analisadas, se distribuindo num grupo só, sem nenhuma sobreposição. Os indivíduos das espécies *M. nana* e *M. jucunda* apresentaram a maior sobreposição com as outras espécies, se dispersando amplamente nas dimensões da análise.

Os indivíduos pertencentes a *M. temama* mostraram uma dispersão consistente, mas com sobreposição de indivíduos pertencentes a espécie *M. nemorivaga*. O topótipo de *M. g. medemi* mostrou-se distribuído próximo de um indivíduo de *M. nana* e perto das dispersão das amostras pertencentes a *S. gouazoubira* e *M. nemorivaga*, do que com o resto das espécies, sendo mais próximo ao padrão de aglomeração de *M. nemorivaga*.



**Figura 10.** Gráfico de dispersão de 14 medidas corporais para diferentes indivíduos agrupados por espécies (cores). Os eixos representam as cargas nos componentes PC1 e PC2. Em destaque com elipses o agrupamento das amostras das espécies *M. nemorivaga* (azul) e *S. gouazoubira* (rosa) e *M. g. medemi* (preto).

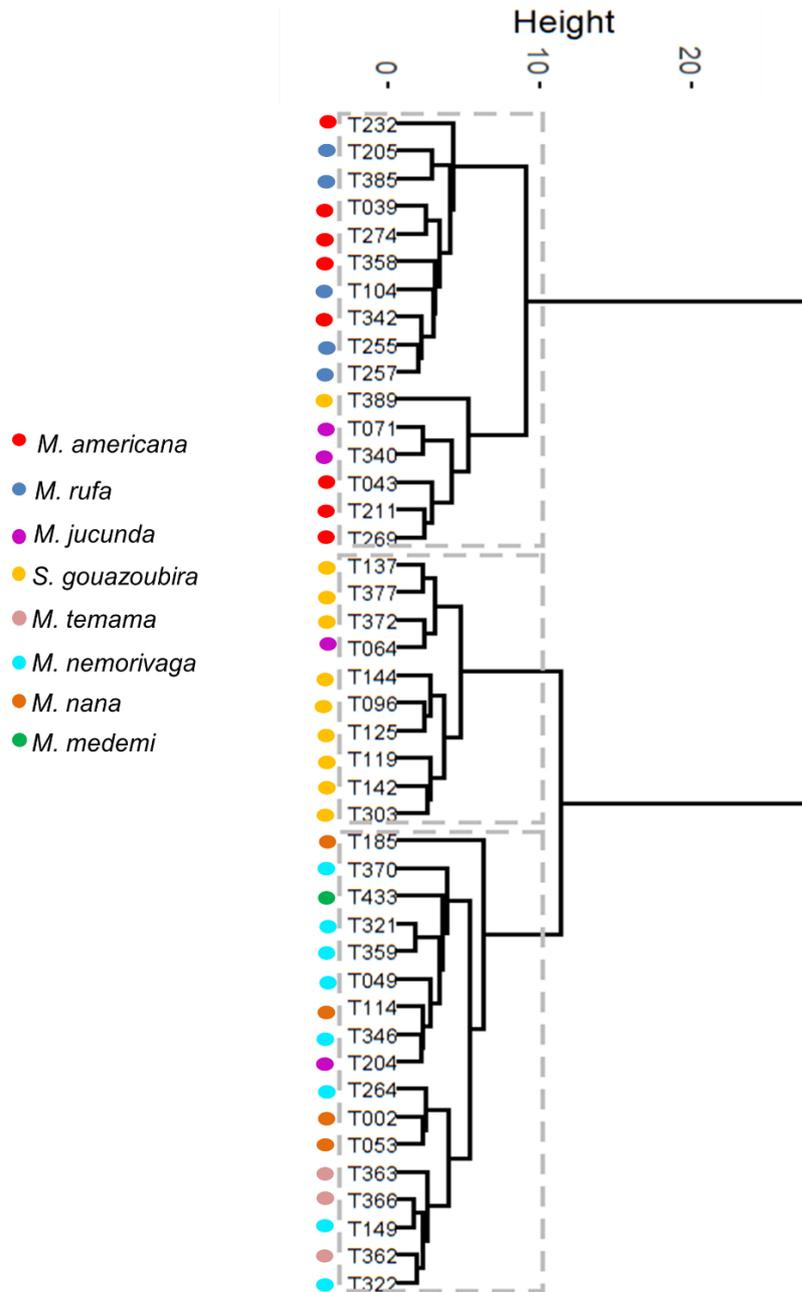
A análise de cluster por distância euclidiana, foi composta pelas mesmas variáveis utilizadas na Análise de Componentes Principais, foi feita a seleção do número de cluster pela análise de intervalos de estatística (gaps), otimizando a matriz de distância em três clusters (Figura 11).



**Figura 11.** Número ótimo de clusters para a matriz de distância euclidiana dos dados de biometria corporal.

Foi gerado um dendrograma construído com a matriz de distância (Figura 12). O conjunto de dados foi subdividido em 3 grupos (clusters). O primeiro

cluster agrupou os indivíduos das espécies *Mazama americana*, *M. rufa* e *M. jucunda*, sendo que *Mazama jucunda* teve sobreposição de um indivíduo nos outros dois clusters. Neste mesmo cluster, houve sobreposição de um indivíduo de *Subulo gouazoubira* (T389). Já o segundo cluster agrupou o resto dos indivíduos de *S. gouazoubira* e uma amostra de *M. jucunda* (T064). O terceiro cluster agrupou o topótipo de *M. g. medemi* e os indivíduos pertencentes as espécies *Mazama temama*, *M. nemorivaga* e *M. nana*.



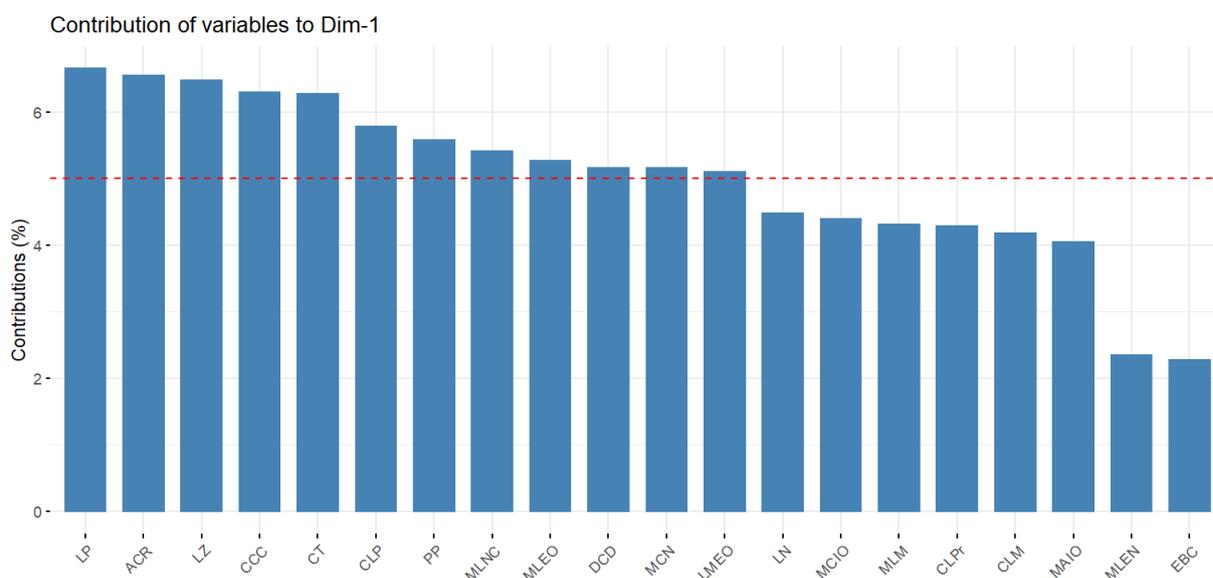
**Figura 12.** Dendrograma gerado com a matriz de distâncias das medidas de biometria corporal. Linha cinza: otimização de cluster.

Tanto na análise de PCA como na análise de cluster com a matriz de distancias foram obtidos resultados similares. O topótipo de *M. g. medemi*, distribui-se junto com os indivíduos pertencentes a *M. nemorivaga* e se distanciou de *S. gouazoubira*. Essa diferenciação foi mais evidente no dendrograma construído com a matriz de distâncias, devido à discriminação por clusters dessa análise.

#### 4.1.2 Craniometria

Na matriz final para a análise das medidas craniométricas, foi possível incluir as medidas tanto do topótipo como do crânio do Paratipo de *M. g. medemi* Barriga-Bonilla, 1966.

Como passo inicial para avaliar as medidas utilizadas, foram analisadas as contribuições destas para o PC1 (Figura 13). Sendo 18 medidas as que realmente contribuíram ao PC1, com uma contribuição maior ao 4%, sendo a Maior Largura entre os nasais (MLEN) e o Eixo Base Cranial (EBC) as duas medidas menos representadas no PCA.



**Figura 13.** Contribuição das variáveis ao PC1 com as 20 medidas cranianas. Linha vermelha indica uma correlação forte ( $p \geq 0.85$ )

Para a análise de PCA, foram selecionados o PC1 e PC2, os quais explicam o 75,83% da variância total, sendo 70.41% e 5.42% respectivamente.

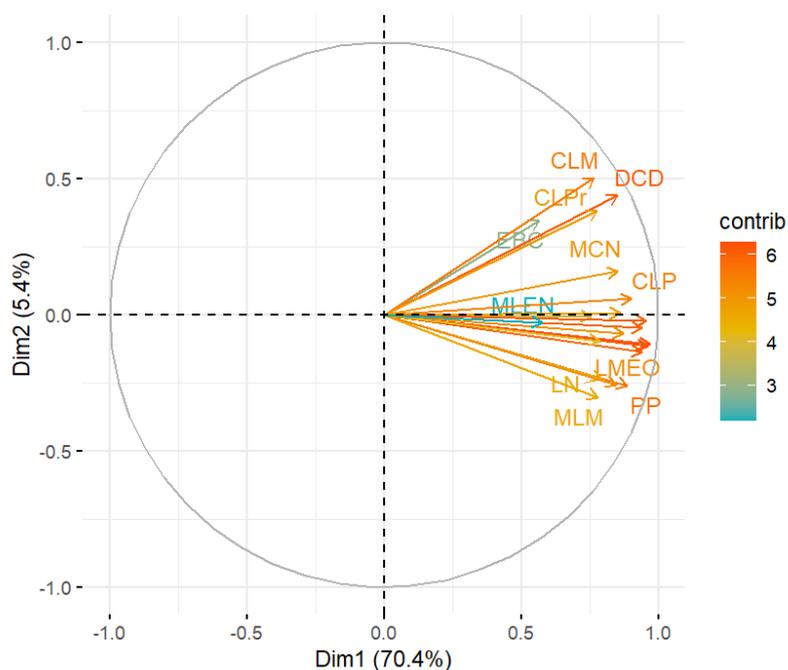
Comprovou-se a importância do PC1, avaliando a correlação das 20 variáveis com o componente e seu autovalor (Tabela 7). Em geral, todas as

variáveis apresentaram uma correlação positiva forte com um  $p \geq 0,75$ . As variáveis com maior correlação  $p > 0,95$  foram a Largura Zigomática (LZ), o lambda-prostion (LP) e Acrocânio (ACR). As variáveis com menor correlação  $p < 0,60$  foram o Eixo basecranial (EBC) e a Maior largura entre os nasais (MLEN).

**Tabela 7.** Correlação de cada variável com o primer componente principal (PC1), seu autovalor e a variância explicada.

Caracter	PC1	Caracter	PC1	Caracter	PC1
CT	0.9394982	LN	0.7944024	DCD	0.8526872
CCC	0.94114409	LP	0.9683622	CLM	0.7667617
PP	0.8865275	ACR	0.9601421	CLPr	0.7771278
EBC	0.5657037	MCN	0.8525027	MCIO	0.78668611
LZ	0.95502207	CLP	0.90216863	MLM	0.7793694
MLEO	0.861046357	MAIO	0.754490377	MLNC	0.87320993
LMEO	0.8468625	MLEN	0.57488595	Autovalor	14,0838

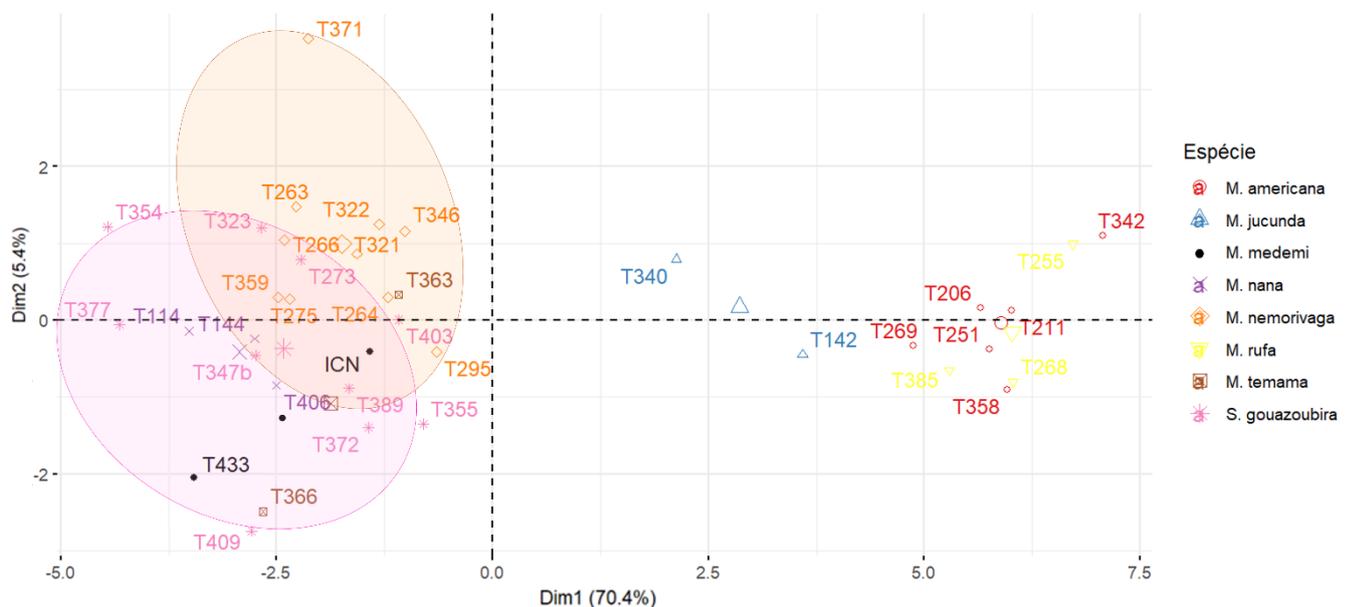
Foram também avaliadas as contribuições (cargas) de cada variável à PCA (Figura 14). As variáveis que menos contribuíram na PCA foram a Maior largura entre os nasais (MLEN) e o Eixo basecranial (EBC).



**Figura 14.** Contribuições dos vetores das 20 medidas craneanas ao PCA.

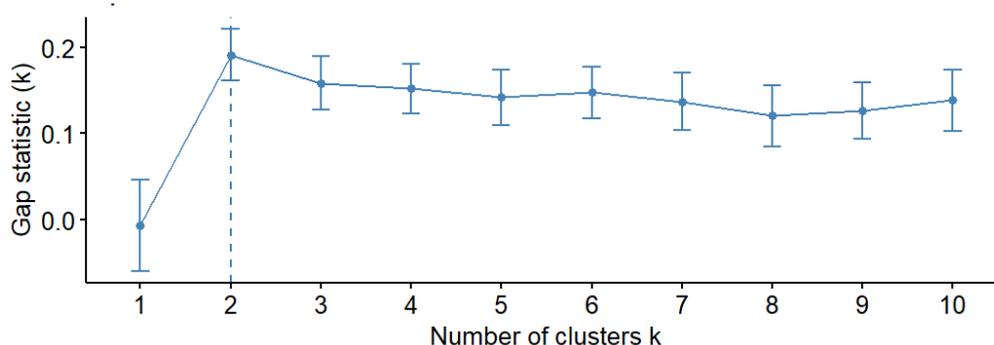
A análise de componentes principais (PCA) com as medidas cranianas, são amostrados agrupados por espécie nas dimensões 1 e 2 (Figura 15). Assim, foi demonstrado que ao projetar as coordenadas dos indivíduos no plano dos

componentes houve uma diferenciação clara dos indivíduos pertencentes as espécies *M. americana*, *M. rufa* e *M. jucunda*. Estas espécies formaram agrupados nos quadrantes positivos do eixo do PC2 apresentando superposição entre as duas primeiras espécies, e a última (*M. jucunda*) em grupo isolado. Houve uma aglomeração dos demais indivíduos utilizados, impedindo a discriminação do resto das espécies avaliadas. O topótipo e o parátipo de *M. g. medemi* apresentaram uma dispersão próxima no quadrante 3. O topótipo se localizou na agrupação dos indivíduos de *S. gouazoubira* e o parátipo na superposição das duas espécies avaliadas da subtribo Blastocerina (*S. gouazoubira* e *M. nemorivaga*)



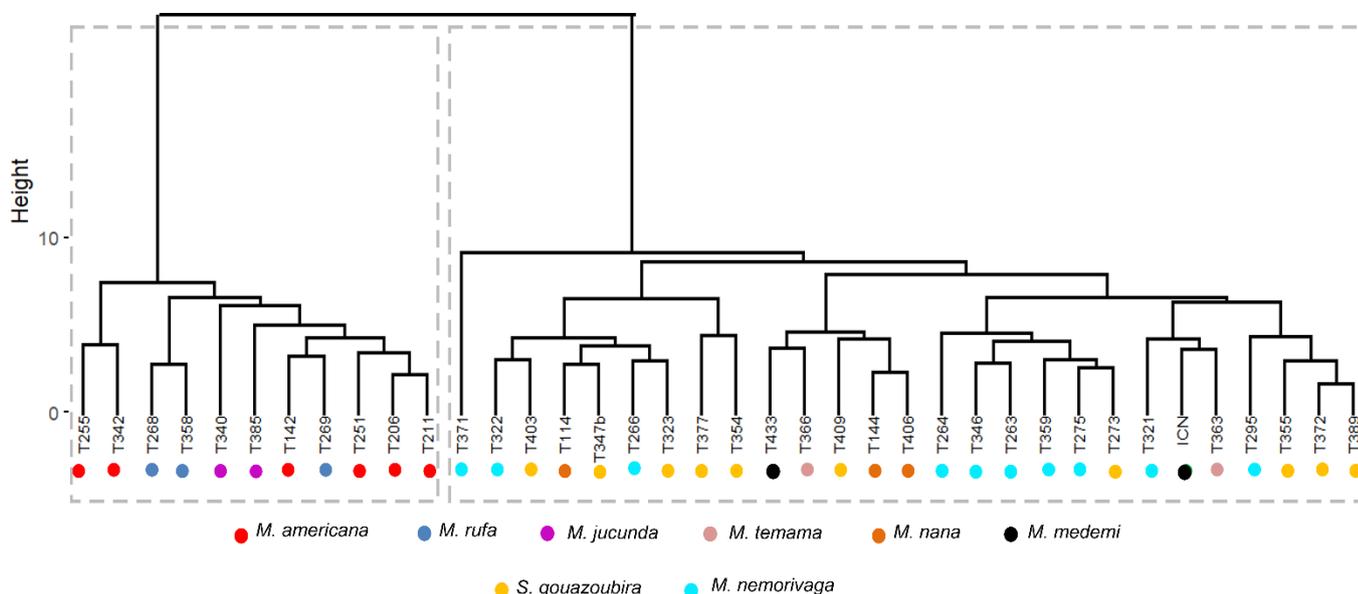
**Figura 15.** Gráfico de dispersão de 20 medidas craneanas para diferentes indivíduos agrupados por espécies (cores). Os eixos representam as cargas nos componentes PC1 e PC2. Em destaque com elipses o agrupamento das amostras das espécies *M. nemorivaga* (laranja) e *S. gouazoubira* (rosa) e *M. g. medemi* (preto).

A análise de cluster por distância euclidiana, foi composta pelas mesmas variáveis utilizadas na Análise de Componentes Principais final. Foi feita a seleção do número de cluster pela análise de intervalos de estatística (gaps), otimizando a matriz de dados em dois clusters (Figura 16).



**Figura 16.** Número ótimo de clusters para a matriz de distância dos dados craniométricos.

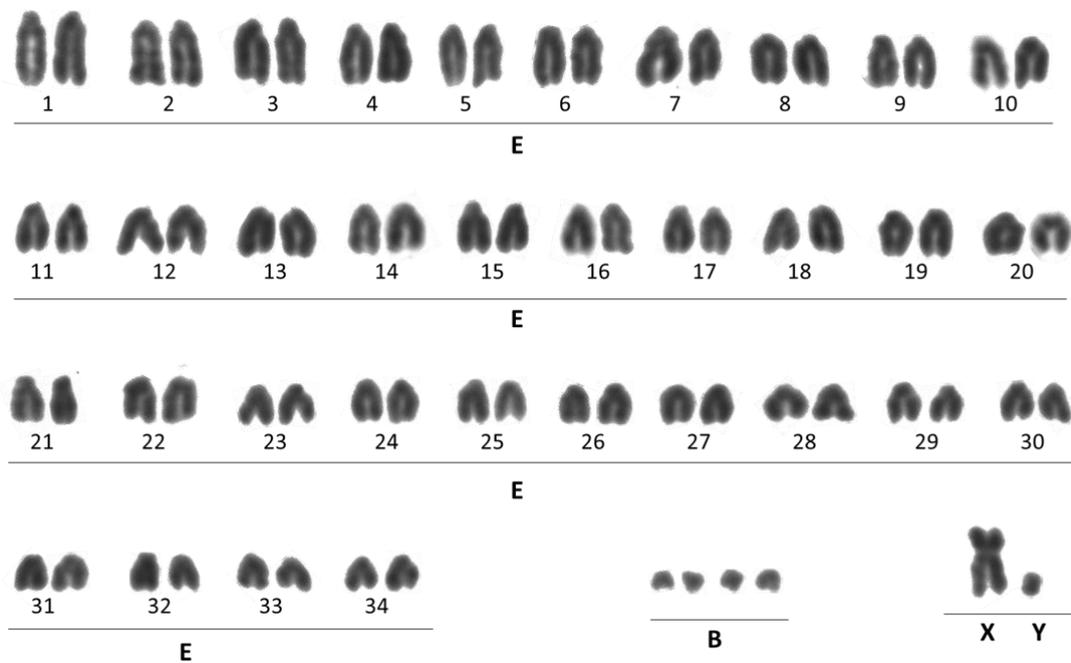
O dendrograma gerado com a matriz de distância analisada para as medidas craniométricas (Figura 17) dividiu o conjunto de dados em dois grupos (clusters). O grupo menor corresponde aos indivíduos pertencentes às espécies *Mazama americana*, *M. rufa* e *M. jucunda*. O grupo maior corresponde às espécies *M. temama*, *M. nana*, *M. nemorivaga* e *Subulo gouazoubira*. Nesse cluster se recuperaram tanto o topótipo como o parátipo de *M. g. medemi*, formando subgrupos ambas as amostras com indivíduos de *M. temama*.



**Figura 17.** Dendrograma gerado pela matriz de distância das medidas craniométricas. Linha cinza: otimização por clusters.

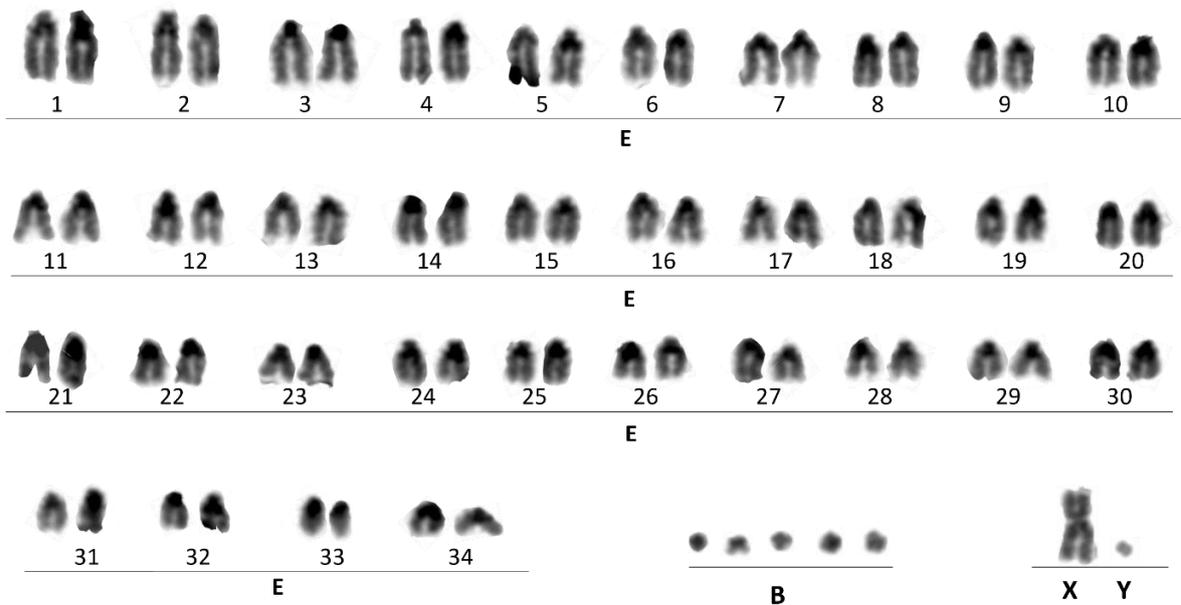
## 4.2 Análise citogenética

O cariótipo do exemplar coletado (Figura 18), exibiu um número diploide ( $2n$ ) de 70 e um número fundamental (NF) de 71. Foi composto por 34 pares autossômicos acrocêntricos, classificados dentro do grupo E, e o par sexual composto pelo cromossomo X submetacêntrico e o Y acrocêntrico pequeno. Das 35 metáfases analisadas, houve uma variação no número de cromossomos Bs de 1 até 5.



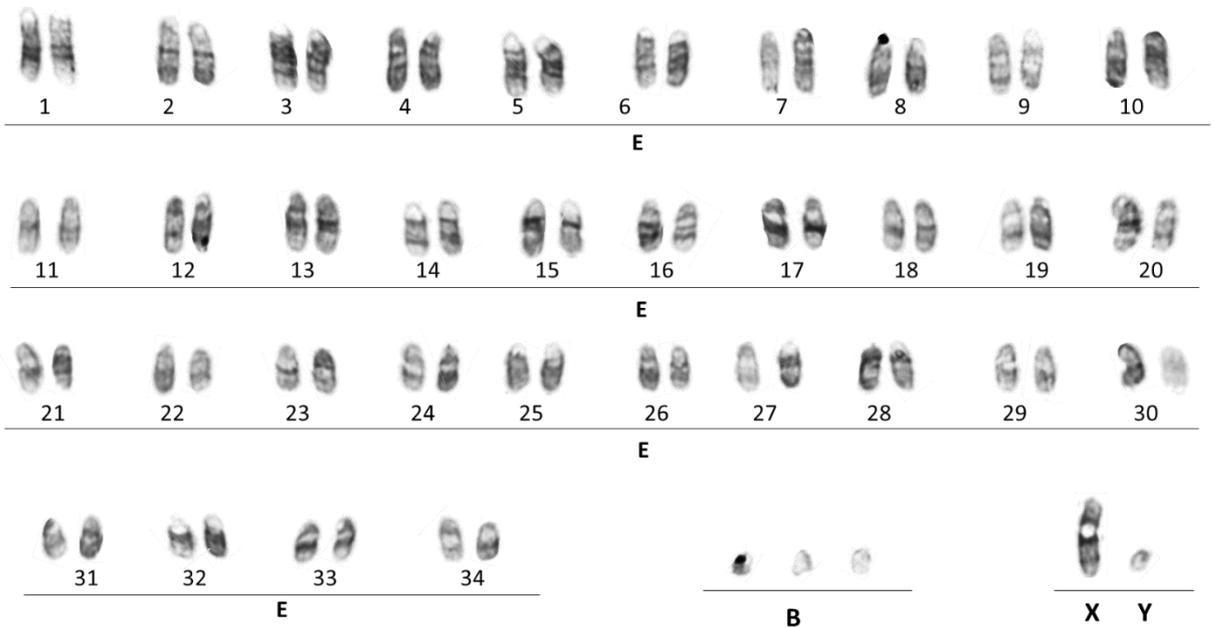
**Figura 18.** Cariótipo  $2n=70$ ; NF= 71+04Bs do topótipo de *M. g. medemi* (T433) sob coloração convencional Giemsa.

Na análise cromossômica de Bandas C (Figura 19), foi possível identificar os blocos de Heterocromatina Constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos. O cromossomo X mostrou-se eucromático e sem marcação de heterocromatina na região centromérica, bem como o cromossomo Y. Os cromossomos B, variam desde basicamente eucromáticos como quase totalmente heterocromáticos.



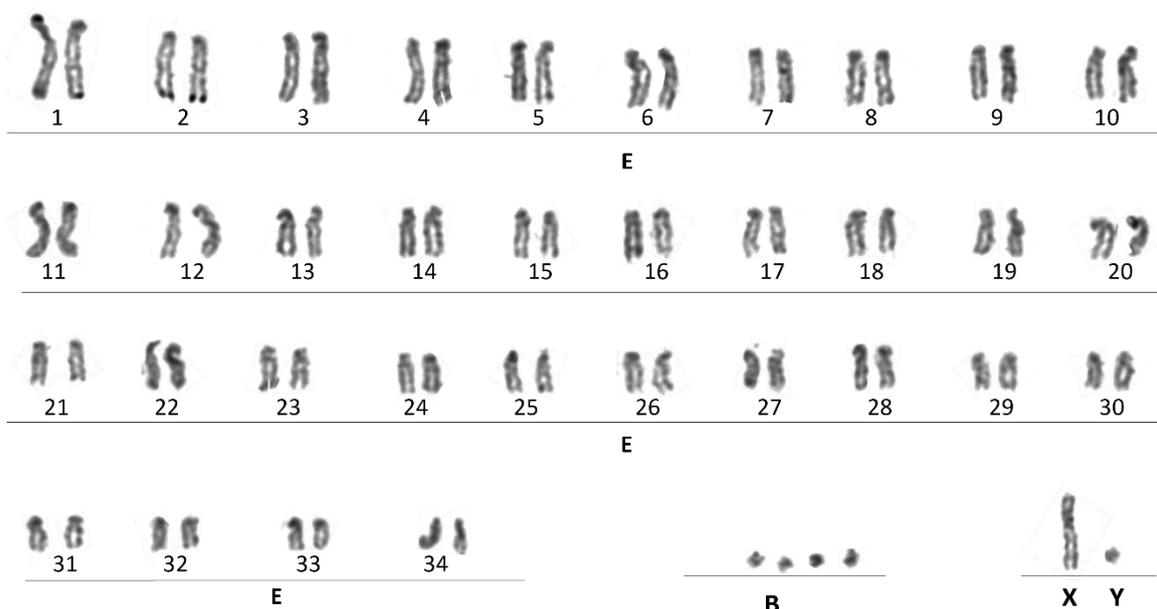
**Figura 19.** Cariótipo  $2n=70$ ;  $NF=71+05Bs$  do topótipo de *M. g. medemi* (T433) sob Bandeamento C.

A análise do cariótipo de *M. g. medemi* sob Bandeamento G (Figura 20), permitiu o pareamento correto dos cromossomos homólogos, descartando a possibilidade de rearranjos cromossômicos no topótipo analisado.



**Figura 20.** Cariótipo  $2n=70$ ;  $NF= 71+03Bs$  do topótipo de *M. g. medemi* (T433) sob Bandeamento G

Na análise do cariótipo de *M. g. medemi* sob coloração Ag-NOR (Figura 21), foi observado que as regiões organizadoras de nucléolo estão localizadas na região telomérica nos dois primeiros pares de cromossomo acrocêntricos do lote A.

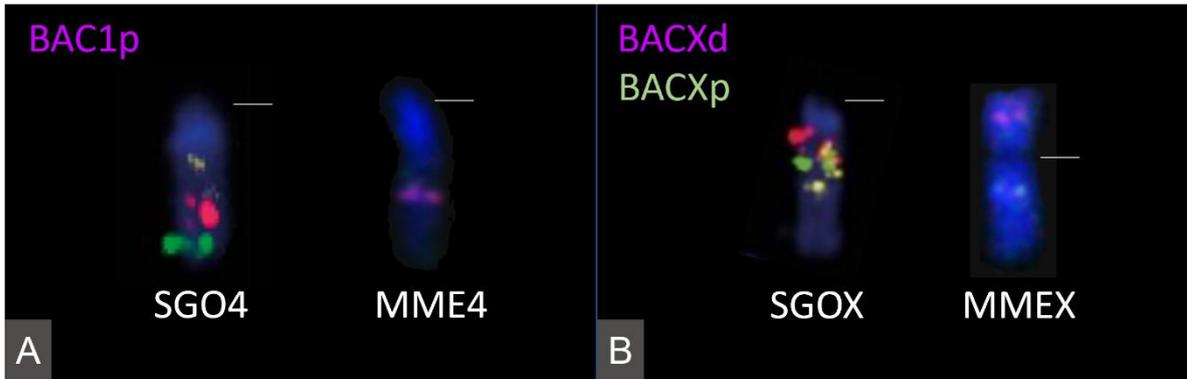


**Figura 21.** Cariótipo  $2n=70$ ;  $NF= 71+04Bs$  do topótipo de *M. g. medemi* (T433) sob coloração Ag-NOR.

A efetividade das BACs para a marcação dos cromossomos de interesse dos animais pertencentes à subtribo Blastocerina, mostrou-se eficaz. A detecção dos cromossomos X e 4 de *Subulo gouazoubira* no cariótipo de *M. g. medemi*, confirmaram a similaridade dos cariótipos destas duas espécies. Uma vez que a marcação da sonda utilizada da região proximal do cromossomo 1 de *Bos taurus* (BAC1p) demonstrou sinal de hibridização no cromossomo 4 de ambas as espécies na mesma região. O cromossomo 4 de *M. g. medemi* (MME4), apresentou um bloco de heterocromatina maior na região pericentromérica do que o SGO4 (Figura 22a).

Na detecção das homologias do cromossomo X de *Subulo gouazoubira* (SGOX) com o cromossomo X de *M. g. medemi* (MMEX), corroborou-se acuradamente o sistema sexual simples já visto com os bandeamentos de citogenética clássica no cariótipo do topótipo. O sinal de hibridização com as sondas da região distal do cromossomo X de *Bos taurus* (BACXd), mostraram

marcação no braço p do cromossomo X submetacêntricos de *M. g. medemi* (MMEpX). A sonda da região proximal (BACXp) exibiu sinal de hibridização no braço q do cromossomo X (MMEqX), na mesma ordem que o SGOX (Figura 22b).



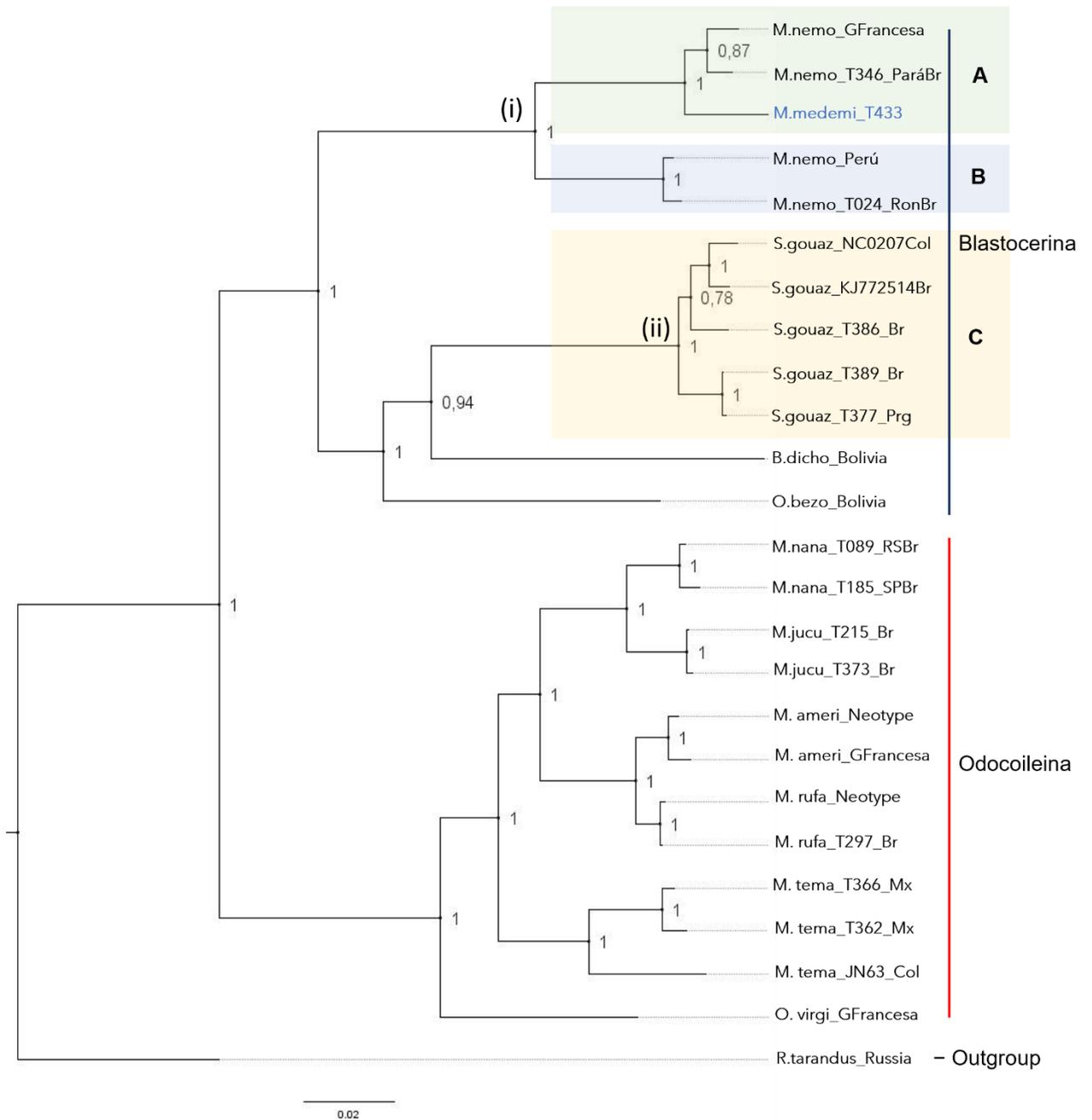
**Figura 22.** FISH mostrando a hibridização de sondas BAC derivadas do genoma de *Bos taurus*. (A) Homologia da sonda da região BAC1p nos cromossomos 4 de *S. gouazoubira* e *M. g. medemi*. (B) Homologia das sondas da região BACXd e BACXp nos cromossomos X de *S. gouazoubira* e *M. g. medemi*. Cromossomos SGO4 e SGOX tomados de (Bernegossi, Vozdova, et al., 2022).

### 4.3 Análise molecular

Foram amplificados e sequenciados os cinco fragmentos propostos para a recuperação e localização filogenética do topótipo de *M. g. medemi* dentro da tribo Odocoileini. Portanto, a matriz final foi elaborada com cinco fragmentos concatenados dos genes Cytb, Dloop e ND5 de 25 animais, formando um bloco de 2287pb. O modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike Information Criterion (AIC) no jModelTest e incluso na matriz foi o TrN+I+G.

A hipótese filogenética obtida pela concatenação dos três genes, exposta na Figura 23, em geral, se obtiveram valores de probabilidade posterior de  $PP \geq 0,95$ . As amostras pertencentes às espécies *Mazama nana*, *M. jucunda*, *M. americana*, *M. rufa*, *M. temama* e *Odocoileus virginianus* estão agrupadas num clado monofilético, correspondente à subtribo Odocoileina, sendo bem recuperada com uma  $PP=1$ . As amostras pertencentes às espécies *Blastocerus dichotomus*, *Ozotoceros bezoarticus*, *Subulo gouazoubira*, *Mazama nemorivaga* e o topótipo de *M. g. medemi*, foram recuperadas num clado correspondente à subtribo Blastocerina.

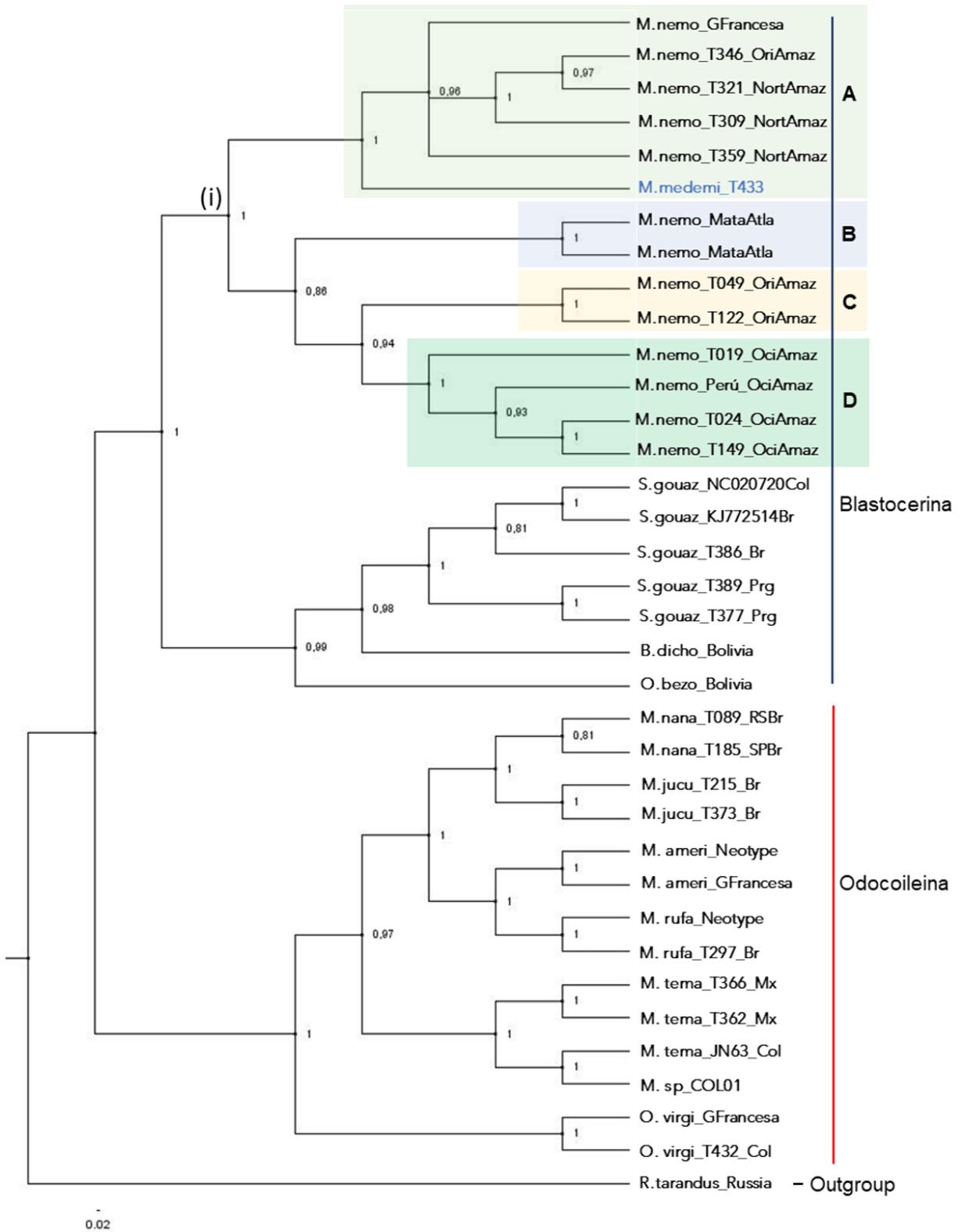
Assim, o topótipo de *M. g. medemi* foi recuperado num clado monofilético (i), com amostras pertencentes à espécie *M. nemorivaga*, e um alto suporte de  $PP=1$ , se diferenciando completamente das amostras pertencentes a espécie *S. gouazoubira* (clado ii). Houve uma separação das amostras de *M. nemorivaga* em dois clados bem suportados ( $PP=1$ ), encontrando-se uma correspondência geográfica: sendo a amostra proveniente de Peru (ocidente amazônico) e do estado de Rondônia dentro do Grupo A; e o *M. nemorivaga* da Guiana Francesa e do estado do Pará junto com o topótipo de *M. g. medemi* (Grupo B), este último separado das outras amostras do grupo (norte amazônico) com um alto suporte ( $PP=1$ ).



**Figura 23.** Filogenia baseada em fragmentos de genes mitocondriais concatenados Cytb, Dloop e ND5 (2287pb); gerada por Inferência Bayesiana (IB). Os números nos nós representam a probabilidade posterior.

A fim de diferenciar com maior resolução essa correspondência geográfica, foi feita também uma matriz com o gene Citocromo B (cytb) devido a maior disponibilidade de sequencias deste gene para diferentes animais com origem variada. Assim a matriz foi composta por 36 animais, com um bloco de 1083pb, sendo o GTR+I+G o modelo evolutivo selecionado pelo critério Akaike

Information Criterion (AIC) no jModelTest, sendo exposta a hipótese filogenética na Figura 24.



**Figura 24.** Filogenia baseada no gene mitocondrial Cytb (1083pb) gerada por Inferência Bayesiana (IB). Os números nos nós representam a probabilidade posterior.

A topologia da árvore filogenética só com Cytb foi congruente com a hipótese filogenética da matriz concatenada dos cinco fragmentos utilizados. É apresentado em geral, valores menores de suporte tanto no clado correspondente as amostras agrupadas na subtribo Odocoileina como do clado que agrupa as amostras de *S. gouazoubira*, *Blastocerus dichotomus* e *Ozotoceros bezoarticus* na subtribo Blastocerina.

O clado (i) composto pelas amostras pertencentes a *M. nemorivaga*, ratificaram uma correspondência geográfica, com um suporte de PP=1. O grupo A agrupou as sequências provenientes do norte da Amazônia incluindo a Guiana Francesa e o topótipo de *M. g. medemi*, sendo discrepante apenas a amostra do animal T346, procedente do Pará, se separando das outras duas amostras do Grupo C provenientes do oriente da Amazônia.

As amostras de *M. nemorivaga*, provenientes da Mata Atlântica também se agruparam num clado separado (Grupo B) do resto das amostras com ocorrência na Amazônia, e dentro do Grupo D se recuperaram as sequências provenientes do ocidente da Amazonia, incluindo a amostra com origem no Peru.

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Análise morfológica

O topótipo coletado na localidade tipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966, apresentou as características morfológicas e a distribuição geográfica apontadas para o táxon. O local de coleta do topótipo encontra-se entre as localidades dos exemplares da série tipo, visto que o holótipo foi coletado perto da cidade de San Juan de Arama, e o Parátipo na margem norte do Rio Guayabero, se distanciando entre eles por 137km aprox. Ambas as localidades da série tipo sendo do Departamento do Meta. O local de coleta do topótipo para o táxon *M. g. medemi* aqui estudado, foi a 45km do Rio Guayabero no mesmo tipo de ambiente característico da região Orinoquia, confirmando a validade do exemplar coletado para o táxon.

Dentre as características morfológicas distinguíveis descritas por Barriga-Bonilla na diferenciação de *M. g. medemi* de *Subulo gouazoubira* (Fischer, 1814)

e de *Mazama murelia* Allen, 1915, o topótipo apresentou uma banda infraorbitária mais clara em comparação com a banda supraorbitária, e a ausência de uma mancha esbranquiçada sobre o rinário. O que sugere a validade do exemplar coletado como um topótipo atual para a subespécie *M. g. medemi*. Porém, essas características não são caracteres diagnósticos para o táxon, uma vez que as distinções baseadas em caracteres morfológicos não são consistentes, pela variação intraespecífica e porque são propensos à convergência devido a adaptação (Duarte et al., 2008; Rossi, 2000).

A partir dos resultados da morfologia externa e dos padrões de coloração foi possível a comparação do topótipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966 com outros espécimes do grupo. Em geral, a coloração, o comprimento do corpo, o comprimento da orelha e a coloração ventral esbranquiçada podem indicar uma semelhança maior do topótipo com *M. nemorivaga* do que com as outras espécies do grupo (Azevedo et al., 2021; Rossi, 2000). Um caráter distintivo foi o comprimento das extremidades anteriores, que são visivelmente mais curtas no animal aqui coletado que no topótipo de *M. nemorivaga* coletado na Guiana Francesa (Morales-Donoso, 2017).

Os resultados da PCA e de distância pela análise de cluster das medidas corporais, mostraram uma diferenciação clara entre os indivíduos de *S. gouazoubira* e as amostras pertencentes a espécie *M. nemorivaga*, em que o topótipo de *M. g. medemi* está agrupado dentre os indivíduos desta última espécie. O que contrasta com alguns estudos anteriores nos quais não tinha sido possível esta distinção apenas com medidas corporais (Borges, 2017; Morales-Donoso, 2017; Vacari, 2021), e que pode ser explicado pelo maior número de amostras utilizadas no presente estudo. Esta constatação demonstra a importância da utilização de um maior número de indivíduos, como no caso da PCA e do dendrograma das medidas corporais apresentado com 43 animais, o que já tinha sido sugerido por estudos que retrataram essa distinção (Bernegossi, Borges et al., 2022; Rossi, 2000).

A discriminação por medidas cranianas das espécies discutidas anteriormente não foi consistente como nas análises de biometria corporal.

Entretanto conseguiu-se diferenciar o topótipo do agrupamento formado por indivíduos de *M. nemorivaga* e *S. gouazoubira*. A distribuição do parátipo de *M. g. medemi* mostrou-se próxima dos outros táxons de pequeno porte do grupo. A separação do topótipo e o parátipo é consistente com reportes das diferenças intraespecíficas reportadas para as espécies do grupo (González et al., 2018). O mesmo ocorreu no estudo realizado por Rossi (2000), que indica a baixa resolução que os caracteres cranianos oferecem para esta distinção, já que não exibem um padrão consistente entre espécies e sexos, quando são utilizadas espécies das duas subtribos de Odocoileini (Merino et al., 2005).

Entretanto, González e colaboradores (2018), demonstraram a importância da utilização de um *n* amostral amplo, apontando que é possível distinguir crâniometricamente *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira* e incluso apresentam dimorfismo sexual. Porém, no presente trabalho, a utilização de dois exemplares de *M. g. medemi* e o universo amostral utilizado para posicionar o topótipo aqui estudado, permitiu essa distinção unicamente com as análises da biometria corporal, se agrupando no mesmo clúster o parátipo e o topótipo aqui estudado.

## 5.2 Análise citogenética

A caracterização citogenética do topótipo de *M. g. medemi* mostrou que o cariótipo observado composto por  $2n=70$ ;  $NF=71$ , é consistente com o padrão descrito para a espécie *M. nemorivaga*. O qual apresenta 34 pares de cromossomos autossomos e o característico cromossomo X submetacêntrico (Rossi et al., 2010). A localização das regiões organizadoras de nucléolo nos primeiros dois pares de cromossomos autossomos, concorda com o reportado para indivíduos de *M. nemorivaga* (Fiorillo et al., 2013) e com o topótipo da Guiana Francesa (Morales-Donoso, 2017).

Foram relatados indivíduos de *M. nemorivaga* com uma variação cariotípica de  $2n=67-69$  e  $NF=70-72$  (Fiorillo et al., 2013; Morales-Donoso, 2017; Resende, 2012), devido à presença de rearranjos cromossômicos, como a ocorrência de sistema sexual múltiplo  $XX/XY_1Y_2$  ou de uma fusão robertsoniana  $4;32$  (Fiorillo et al., 2013), e confirmando o polimorfismo cromossômico descrito para *M. nemorivaga*. Porém, o topótipo de *M. g. medemi* não apresentou nenhum tipo de rearranjo cromossômico, e o mapeamento do cromossomo X com a

utilização de sondas BACs conseguiu caracterizar acuradamente esse cromossomo sexual, descartando a possibilidade da existência de sistema sexual múltiplo já relatado para à espécie (Fiorillo et al., 2013; Resende, 2012).

Uma característica a ressaltar do cromossomo X submetacêntrico do topótipo é a ausência de heterocromatina constitutiva pericentromérica, uma vez que os estudos focados na caracterização cariotípica dos animais pertencentes a *M. nemorivaga* utilizados não relataram essa particularidade. Os 6 animais utilizados por Fiorillo e colaboradores (2013), os 8 indivíduos estudados por Resende (2012), e o topótipo atual coletado na Guiana Francesa (Morales-Donoso, 2017), apresentaram marcação da região pericentromérica no cromossomo X sob bandeamento C. Além disso, nenhum dos animais avaliados por estes autores apresentou um cariótipo  $2n=70$  e  $NF=71$  como apresentado aqui por *M. g. medemi*.

Não obstante, a diferença cariotípica do topótipo ao respeito dos outros animais avaliados por esses autores, não representaria uma barreira reprodutiva, como apontado por Galindo e colaboradores (2021), onde ao ser avaliado o papel dos polimorfismos cromossômicos, foi demonstrado que com até duas fusões cêntricas pode-se obter descendência fértil (Cursino et al., 2014; Galindo et al., 2021; Salviano et al., 2017).

### **5.3 Análise molecular**

Os resultados observados reforçam a polifilia do gênero *Mazama* e o agrupamento das espécies *S. gouazoubira* e *M. nemorivaga* dentro da subtribo Blastocerina, como relatado anteriormente (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017b; Hassanin et al., 2012; Heckeberg, 2020). Estes dados reforçam também a necessidade da formalização de um novo gênero para *M. nemorivaga*, como apontado primeiramente por Duarte e colaboradores (2008) e cujo nome genérico potencialmente disponível seria *Passalites* Gloger, 1841, segundo a sugestão de Gutierrez e colaboradores em 2017.

Na análise filogenética, a partir da concatenação dos genes Cytb, Dloop e ND5, o topótipo analisado agrupa-se dentro do clado conformado pelas amostras pertencentes à espécie *M. nemorivaga*. Isso corrobora pela primeira vez, que filogeneticamente o *M. g. medemi*, é uma subespécie relacionada com

*M. nemorivaga* e não com *S. gouazoubira*, concordando com os apontamentos feitos por distribuição e morfologia para a sinonimização desses táxons (Duarte & González, 2010; Rossi, 2000). Ademais, o topótipo formou um clado com as amostras do Pará e da Guiana Francesa, separando-se do grupo irmão composto pelas amostras de *M. nemorivaga* proveniente de Rondônia e Peru, concordando com o apontado por Figueiredo (2014), que analisou a existência de linhagens evolutivas diferenciadas correlacionadas com distribuições geográficas.

As análises das relações filogenéticas feitas a partir do Cytb, mostraram uma diferenciação clara, com um alto suporte, da discriminação deste animal, do resto dos animais pertencentes ao clado que agrupa os animais do norte da Amazônia. O agrupamento de *M. g. medemi* com amostras do Norte e se diferenciando dos clados da mata atlântica e do oriente e ocidente da Amazônia, corroboram a hipótese filogenética proposta por Oliveira e colaboradores (2020). Desta maneira, é denotada a correspondência genética-geográfica e a existência de linhagens evolutivas dentro o clado que agrupa as amostras de *M. nemorivaga*. Devido ao agrupamento do topótipo de *M. g. medemi* com as amostras pertencentes ao norte da Amazônia num clado bem suportado PP=1, comprovou-se que o topótipo pertence à mesma linhagem da amostra proveniente da localidade tipo de *M. nemorivaga* (Cuvier, 1817), na Guiana Francesa.

## 6. CONCLUSÕES

O presente trabalho caracterizou morfológica, citogenética e molecularmente um topótipo de *Mazama gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla 1966, demonstrando sua similaridade com *M. nemorivaga* (Cuvier, 1817) e não como subespécie de *S. gouazoubira* (Fischer, 1814). O espécime apresenta um cariótipo não comum de  $2n=70$ ;  $NF=71$  dentre os indivíduos da espécie *M. nemorivaga*. Nas evidências filogenéticas o topótipo foi recuperado dentro do clado das amostras de *M. nemorivaga* pertencentes à Guiana Francesa (*loc. typ*) e ao norte da Amazônia, o que sugere o status taxonômico de *M. g. medemi* como sinônimo júnior de *M. nemorivaga*.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, V., Carnelossi, E. A. G., González, S., & Duarte, J. M. B. (2010). Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). *Cytogenetic and Genome Research*, 128(1–3), 177–187. <https://doi.org/10.1159/000298819>
- Abril, V. V., & Duarte, J. M. B. (2008). Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 53–57. <https://doi.org/10.1590/S1415-47572008000100011>
- Allen, J. A. (1915). Notes on American deer of the genus *Mazama*. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 34(18), 521–553. <https://digitallibrary.amnh.org/handle/2246/1794>
- Azevedo, N., Oliveira, M., & Duarte, J. (2021). Guia ilustrado dos cervídeos brasileiros. In *Guia ilustrado dos cervídeos brasileiros*. Sociedade Brasileira de Mastozoologia. <https://doi.org/10.32673/9788563705037>
- Bacon, C. D., Silvestro, D., Jaramillo, C., Smith, B. T., Chakrabarty, P., & Antonelli, A. (2015). Biological evidence supports an early and complex emergence of the Isthmus of Panama. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(19), 6110–6115. <https://doi.org/10.1073/pnas.1423853112>
- Barriga-Bonilla, E. (1966). Estudios mastozoológicos colombianos, II. *Caldasia*, 9(45). <https://www.jstor.org/stable/43405871>
- Bernegossi, A. M. (2021). *Caracterização de homologias entre sondas de BACs de bovino (*Bos taurus*) e cromossomos de veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*): novas perspectivas em estudos intra e interespecíficos do gênero *Mazama**. [Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal]. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/214968>
- Bernegossi, A. M., Borges, C. H. S., Sandoval, E. D. P., Cartes, J. L., Cernohorska, H., Kubickova, S., Vozdova, M., Caparroz, R., González, S., & Duarte, J. (2022). Resurrection of the genus *Subulo* Smith, 1827 for the gray brocket deer, with designation of a neotype. *Journal of Mammalogy*. <https://doi.org/10.1093/JMAMMAL/GYAC068>
- Bernegossi, A. M., Vozdova, M., Cernohorska, H., Kubickova, S., Galindo, D. J., Kadlcikova, D., Rubes, J., & Duarte, J. M. B. (2022). Cytogenetic Mapping of Cattle BAC Probes for the Hypothetical Ancestral Karyotype of the Family Cervidae. *Cytogenetic and Genome Research*, 1–8. <https://doi.org/10.1159/000525592>
- Bonnet-Garnier, A., Claro, F., Thévenon, S., Gautier, M., & Hayes, H. (2003). Identification by R-banding and FISH of chromosome arms involved in Robertsonian translocations in several deer species. *Chromosome Research*, 11(7), 649–663. <https://doi.org/10.1023/A:1025981508867>
- Borges, C. H. S. (2017). Caracterização morfológica, citogenética e molecular *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla, Cervidae) a partir de um topótipo

- actual. In *Universidade Estadual Paulista - Unesp*.  
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/151757>
- Burgin, C. J., Colella, J. P., Kahn, P. L., & Upham, N. S. (2018). How many species of mammals are there? *Journal of Mammalogy*, 99(1), 1–14.  
<https://doi.org/10.1093/jmammal/gyx147>
- Cabrera, A. (1961). *Catálogo de los mamíferos de América del Sur*. Impr. y Casa Editora “Coni.”
- Cassini, G., Muñoz, N., & Merino, M. (2016). Evolutionary history of South American Artiodactyla. *Historia Evolutiva*.
- Cifuentes-Rincón, A., Morales-Donoso, J. A., Sandoval, E. D. P., Tomazella, I. M., Mantellatto, A. M. B., de Thoisy, B., & Duarte, J. M. B. (2020). Designation of a neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla, cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. *ZooKeys*, 2020(958), 143–164. <https://doi.org/10.3897/zookeys.958.50300>
- Cursino, M. S., Salviano, M. B., Abril, V. V., Dos Santos Zanetti, E., & Duarte, J. M. B. (2014). The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: The study of reproductive isolation in females. *BMC Evolutionary Biology*, 14(1), 1–13. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-14-40>
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R., & Posada, D. (2012). JModelTest 2: More models, new heuristics and parallel computing. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 8, p. 772). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2109>
- Dobigny, G., Britton-Davidian, J., & Robinson, T. J. (2017). Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective. *Biological Reviews*, 92(1), 1–21. <https://doi.org/10.1111/brv.12213>
- Duarte, J., & González, S. (2010). *Neotropical Cervidology; Biology and Medicine Biology and Medicine of Latin American Deer*.
- Duarte, J., González, S., & Maldonado, J. E. (2008). The surprising evolutionary history of South American deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), 17–22. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2008.07.009>
- Duarte, J. M. B., & Jorge, W. (2003). Morphologic and Cytogenetic Description of the Small Red Brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. *Mammalia*, 67(3), 403–410. <https://doi.org/10.1515/mamm.2003.67.3.403>
- Duarte, J. M. D., & Jorge, W. (1998). *Análise taxonômica dos Mazama cinzas do Brasil*. Dissertação (Doutorado Em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.
- Eisenberg, J. F. (2000). The contemporary Cervidae of Central and South America. In *Antelopes, deer, and relatives: fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation* (pp. 189–202).
- Figueiredo, M. G. (2014). *Filogenia e taxonomia dos veados cinza (Mazama gouazoubira e M. nemorivaga)* [Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias].  
<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/115676>

- Fiorillo, B. F., Sarria-Perea, J. A., Abril, V. V., & Duarte, J. M. B. (2013). Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla, Cervidae). *Comparative Cytogenetics*, 7(1), 25. <https://doi.org/10.3897/COMPCYTOGEN.V7I1.4314>
- Fontana, F., & Rubini, M. (1990). Chromosomal evolution in cervidae. *Biosystems*, 24(2), 157–174. [https://doi.org/10.1016/0303-2647\(90\)90008-O](https://doi.org/10.1016/0303-2647(90)90008-O)
- Galindo, D. J., Martins, G. S., Vozdova, M., Cernohorska, H., Kubickova, S., Bernegossi, A. M., Kadlcikova, D., Rubes, J., & Duarte, J. M. B. (2021). Chromosomal polymorphism and speciation: The case of the genus *Mazama* (cetartiodactyla; cervidae). *Genes*, 12(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/genes12020165>
- García-Herrera, L. V, Ramírez-Fráncel, L. A., & Reinoso-flórez, G. (2015). Mamíferos En Relictos De Bosque Seco Tropical Del Tolima, Colombia. *Mastozoología Neotropical*, 22(1), 11–21. <http://www.scielo.org.ar/pdf/mznt/v22n1/v22n1a02.pdf>
- Gilbert, C., Ropiquet, A., & Hassanin, A. (2006). Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 40(1), 101–117. <https://doi.org/10.1016/J.YMPEV.2006.02.017>
- González, S., Bonfim Mantellatto, A. M., & Barbanti Duarte, J. M. (2018). Craniometrical differentiation of gray brocket deer species from Brazil. *Revista Del Museo Argentino de Ciencias Naturales, Nueva Serie*, 20(1), 179–193. <https://doi.org/10.22179/REVMACN.20.561>
- Gregory-Wodzicki, K. M. (2000). Uplift history of the Central and Northern Andes: A review. *Bulletin of the Geological Society of America*, 112(7), 1091–1105. [https://doi.org/10.1130/0016-7606\(2000\)112<1091:UHOTCA>2.0.CO;2](https://doi.org/10.1130/0016-7606(2000)112<1091:UHOTCA>2.0.CO;2)
- Groves, C., & Grubb, P. (2011). Ungulate Taxonomy. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 165(4), 925–926. <https://doi.org/10.1111/j.1096-3642.2012.00836.x>
- Grubb, P. (1993). *Artiodactyla: Cervidae. Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference* (Wilson DE and Reeder DM, eds.). Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Guindon, S., & Gascuel, O. (2003). A Simple, Fast, and Accurate Algorithm to Estimate Large Phylogenies by Maximum Likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), 696–704. <https://doi.org/10.1080/10635150390235520>
- Gutiérrez, E. E., Helgen, K. M., McDonough, M. M., Bauer, F., Hawkins, M. T. R., Escobedo-Morales, L. A., Patterson, B. D., & Maldonado, J. E. (2017). A gene-tree test of the traditional taxonomy of american deer: The importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. *ZooKeys*, 697, 87–131. <https://doi.org/10.3897/zookeys.697.15124>
- Hall, T. (2004). *BioEdit version 7.0. 0*. Distributed by the Author, Website: [www.Mbio.Ncsu.Edu/BioEdit/Bioedit.Html](http://www.Mbio.Ncsu.Edu/BioEdit/Bioedit.Html). <https://thalljiscience.github.io/BioDoc.pdf>

- Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Jansen Van Vuuren, B., Matthee, C., Ruiz-Garcia, M., Catzeflis, F., Areskoug, V., Nguyen, T. T., & Couloux, A. (2012). Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus - Biologies*, 335(1), 32–50. <https://doi.org/10.1016/J.CRVI.2011.11.002>
- Heckeberg, N. S. (2020). The systematics of the Cervidae: A total evidence approach. *PeerJ*, 2020(2), e8114. <https://doi.org/10.7717/PEERJ.8114/SUPP-9>
- Heckeberg, N. S., Erpenbeck, D., Wörheide, G., & Rössner, G. E. (2016). Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. *PeerJ*, 2016(4). <https://doi.org/10.7717/PEERJ.2307>
- Howell, W. M., & Black, D. A. (1980). Controlled silver-staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1-step method. *Experientia*, 36(8), 1014–1015. <https://doi.org/10.1007/BF01953855>
- Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). Package ‘factoextra’: Extract and visualize the results of multivariate data analyses. *CRAN- R Package*, 84. <https://cran.r-project.org>
- Katoh, K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2018). MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), 1160–1166. <https://doi.org/10.1093/bib/bbx108>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/MOLBEV/MSY096>
- Levan, A., Fredga, K., & Sanberg, A. A. (1964). Nomenclature for centromeric position on chromosomes. *Hereditas*, 52(2), 201–220. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5223.1964.tb01953.x>
- López-Arévalo, H. F., Montenegro, O. L., & Cárdenas-González, C. (2020). Colección de Mamíferos “Alberto Cadena García” Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia (ICN). In *Mammalogy Notes* (Vol. 6, Issue 2). Sociedad Colombiana de Mastozoología. <https://doi.org/10.47603/mano.v6n2.199>
- Mammal Diversity Database. (2022, April 1). *Mammal Diversity Database (Version 1.9)*. American Society of Mammalogist. <https://doi.org/http://doi.org/10.5281/zenodo.4139818>
- Mantellatto, A. M. B., González, S., & Duarte, J. M. B. (2022). Cytochrome b sequence of the *Mazama americana jucunda* Thomas, 1913 holotype reveals *Mazama bororo* Duarte, 1996 as its junior synonym. *Genetics and Molecular Biology*, 45(1). <https://doi.org/10.1590/1678-4685-gmb-2021-0093>
- Martinez-Aguero, M., & Ruiz-Garcia, M. (2001). Aplicacion de microsatelites disenados para el ciervo de cola blanca, renos y bovidos a ocho especies

- de cervidae neotropicales (generos *Odocoileus*, *Mazama*, *Blastoceros*, *Ozotoceros*, *Hippocamelus* y *Pudu*): Niveles de variabilidad genética, heterogeneidad y . *Acta Biologica Colombiana*, 6(2), 75. <https://revistas.unal.edu.co/index.php/actabiol/article/view/26324>
- Merino, M. L., Milne, N., & Vizcaíno, S. F. (2005). A cranial morphometric study of deer (Mammalia, Cervidae) from Argentina using three-dimensional landmarks. *Acta Theriologica*, 50(1), 91–108. <https://doi.org/10.1007/BF03192622>
- Merino, M. L., & Rossi, R. V. (2010). Origin, Systematics, and morphological radiation. In *Neotropical Cervidology: biology and medicine of Latin American deer* (pp. 2–11). <http://naturalis.fcnym.unlp.edu.ar/id/20121227011710>
- Miller, M. A., Pfeiffer, W., & Schwartz, T. (2010). Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010*. <https://doi.org/10.1109/GCE.2010.5676129>
- Mora-Fernández, C., Peñuela-Recio, L., & Castro-Lima, F. (2015). Estado del conocimiento de los ecosistemas de las sabanas inundables en la Orinoquia Colombiana. *Orinoquia*, 19(2), 253. <https://doi.org/10.22579/20112629.339>
- Morales-Donoso, J. A. (2017). Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817) a partir de um topótipo atual. In *Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) FCAV\_UNESP*. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/150756>
- Morales-Martinez, D. M. (2021). Mamíferos (Mammalia) de la Amazonia colombiana. *Revista de La Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 45(175), 474–488. <https://doi.org/10.18257/RACCEFYN.1318>
- O’Dea, A., Lessios, H. A., Coates, A. G., Eytan, R. I., Restrepo-Moreno, S. A., Cione, A. L., Collins, L. S., De Queiroz, A., Farris, D. W., Norris, R. D., Stallard, R. F., Woodburne, M. O., Aguilera, O., Aubry, M. P., Berggren, W. A., Budd, A. F., Cozzuol, M. A., Coppard, S. E., Duque-Caro, H., ... Jackson, J. B. C. (2016). Formation of the Isthmus of Panama. In *Science Advances* (Vol. 2, Issue 8). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1600883>
- Oliveira, M. L., de Faria Peres, P. H., Gatti, A., Morales-Donoso, J. A., Mangini, P. R., & Duarte, J. M. B. (2020). Faecal DNA and camera traps detect an evolutionarily significant unit of the Amazonian brocket deer in the Brazilian Atlantic Forest. *European Journal of Wildlife Research*, 66(2). <https://doi.org/10.1007/s10344-020-1367-2>
- Peres, P. H. F., Luduvério, D. J., Bernegossi, A. M., Galindo, D. J., Nascimento, G. B., Oliveira, M. L., Sandoval, E. D. P., Vozdova, M., Kubickova, S., Cernohorska, H., & Duarte, J. M. B. (2021). Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (*Artiodactyla: Cervidae*) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). *Frontiers in Genetics*, 12, 2415. <https://doi.org/10.3389/fgene.2021.742870>

- R Core Team. (2022). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing.
- Ramírez-Chaves, H. E., Suárez-Castro, A. F., & González-Maya, J. F. (2016). Cambios recientes a la lista de los mamíferos de Colombia. *Mammalogy Notes*, 3(1), 1–9. <https://doi.org/10.47603/manovol3n1.1-9>
- Rees, J. W. (1969). Morphologic variation in the cranium and mandible of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): A comparative study of geographical and four biological distances. *Journal of Morphology*, 128(1), 95–112. <https://doi.org/10.1002/jmor.1051280105>
- Resende, J. P. D. A. (2012). Comparação cariotípica entre *Mazama gouazoubira* e *Mazama nemorivaga* (ARTIODACTYLA; CERVIDAE) por meio de marcadores citogenéticos clássicos, FISH telomérica e pintura cromossômica. In *Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) FCAV\_UNESP*. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/92425>
- Richardson, J. E., Madriñán, S., Gómez-Gutiérrez, M. C., Valderrama, E., Luna, J., Banda-R., K., Serrano, J., Torres, M. F., Jara, O. A., Aldana, A. M., Cortés-B., R., Sánchez, D., & Montes, C. (2018). Using dated molecular phylogenies to help reconstruct geological, climatic, and biological history: Examples from Colombia. *Geological Journal*, 53(6), 2935–2943. <https://doi.org/10.1002/gj.3133>
- Ronquist, F., Teslenko, M., Van Der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., & Huelsenbeck, J. P. (2012). Mrbayes 3.2: Efficient bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. *Systematic Biology*, 61(3), 539–542. <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>
- Rossi, R. V. (2000). Taxonomia de *Mazama Rafinesque*, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). In *Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)*. <https://repositorio.usp.br/item/001081367>
- Rossi, R. V., Bodmer, R., Duarte, J. M. B., & Trovati, R. G. (2010). Amazonian Brown Brocket Deer *Mazama nemorivaga* (Cuvier 1817). In *Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer* (Issue Cuvier 1817, pp. 202–210).
- Ruiz-García, M., Martínez-Agüero, M., Álvarez, D., & Goodman, S. (2009). Variabilidad genética en géneros de ciervos neotropicales (Mammalia: Cervidae) según loci microsatelitales. *Revista de Biología Tropical*, 57(3), 879–904. <https://doi.org/10.15517/rbt.v57i3.5500>
- Ruiz-García, M., Randi, E., Martínez-Agüero, M., & Alvarez, D. (2006). Relaciones filogenéticas entre géneros de ciervos neotropicales (Artiodactyla: Cervidae) mediante secuenciación de ADN mitocondrial y marcadores microsatelitales. *Revista de Biología Tropical*, 55(2), 723–741. <https://doi.org/10.15517/rbt.v55i2.6049>
- Salviano, M. B., Cursino, M. S., Zanetti, E. dos S., Abril, V. V., & Duarte, J. M. B. (2017). Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: An example in red brocket deer (*Mazama*

- americana). *Biology of Reproduction*, 96(6), 1279–1287. <https://doi.org/10.1093/biolre/iox041>
- Sambrook, L. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York: Cold Spring Harbor Press, 2(18), 47. <https://ci.nii.ac.jp/naid/10010689861/>
- Sandoval, E. D. P., Rola, L. D., Morales-Donoso, J. A., Gallina, S., Reyna-Hurtado, R., & Duarte, J. M. B. (2022). Integrative analysis of *Mazama temama* (Artiodactyla: Cervidae) and designation of a neotype for the species. *Journal of Mammalogy*, 103(2), 447–458. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyab169>
- Sarria-Perea, J. A. (2012). *Taxonomia e filogenia de algumas espécies de Mazama (Mammalia; Cervidae) da Colômbia*. Dissertação (Doutorando Em Genética e Melhoramento Animal) FCAV-UNESP. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/102769>
- Seabright, M. (1971). A Rapid Banding Technique for Human Chromosomes. *The Lancet*, 298(7731), 971–972. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(71\)90287-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(71)90287-X)
- Solari, S., Muñoz-saba, Y., Rodríguez-mahecha, J. V., Defler, T. R., Ramírez-chaves, H. E., & Trujillo, F. (2013). Riqueza, Endemismo y Conservación de los Mamíferos de Colombia. *Mastozoología Neotropical*, 20(2), 301–365.
- Summer, A. (1972). A simple technique for demonstrating heterochromatin. *Experimental Cell Research*, 75(12), 304–306. <https://doi.org/10.1007/BF01919708>
- Thomas, O. (1913). LXXI.— On certain of the smaller S.-American Cervidæ. *Annals and Magazine of Natural History*, 11(66), 585–589. <https://doi.org/10.1080/00222931308693360>
- Tomazella, I. M., Abril, V. V., & Duarte, J. M. B. (2017). Identifying *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae) chromosomes involved in rearrangements induced by doxorubicin. *Genetics and Molecular Biology*, 40(2), 460–467. <https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2016-0275>
- Vacari, G. Q. (2021). *Caracterização morfológica, citogenética e molecular de Mazama rondoni (Miranda-Ribeiro, 1914)*. <https://repositorio.unesp.br/handle/11449/215120>
- Valeri, M. P., Tomazella, I. M., & Duarte, J. M. B. (2018). Intrapopulation chromosomal polymorphism in *Mazama gouazoubira* (Cetartiodactyla; Cervidae): The emergence of a new species? *Cytogenetic and Genome Research*, 154(3), 147–152. <https://doi.org/10.1159/000488377>
- Von den Driesch, A. (1978). : A Guide to the Measurement of Animal Bones from Archaeological Sites . Angela von den Driesch. In *American Anthropologist* (Vol. 80, Issue 1). <https://doi.org/10.1525/aa.1978.80.1.02a00730>
- Vozdova, M., Kubickova, S., Cernohorska, H., Fröhlich, J., Vodicka, R., & Rubes, J. (2019). Comparative Study of the Bush Dog (*Speothos venaticus*) Karyotype and Analysis of Satellite DNA Sequences and Their Chromosome Distribution in Six Species of Canidae. *Cytogenetic and Genome Research*,

159(2), 88–96. <https://doi.org/10.1159/000503082>

Wilson, D., Wilson, D., & Mittermeier, R. (2011). Handbook of the mammals of the world: v.2: Hoofed mammals. In *Lynx Edicions* (Vol. 49, Issue 07). <https://doi.org/10.5860/choice.49-3618>

Zurano, J. P., Magalhães, F. M., Asato, A. E., Silva, G., Bidau, C. J., Mesquita, D. O., & Costa, G. C. (2019). Cetartiodactyla: updating a time-calibrated molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 133, 256–262. <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2018.12.015>