

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

**TAXONOMIA E FILOGENIA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE
MAZAMA (MAMMALIA; CERVIDAE) DA COLÔMBIA**

Javier Adolfo Sarria Perea

Médico Veterinário

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

2012

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

TAXONOMIA E FILOGENIA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE
***MAZAMA* (MAMMALIA; CERVIDAE) DA COLÔMBIA**

Javier Adolfo Sarria Perea

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutor em Zootecnia (programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal).

JABOTICABAL – SÃO PAULO – BRASIL

Julho de 2012

S247t Sarría-Perea, Javier Adolfo
Taxonomia e filogenia de algumas espécies de *Mazama*
(Mammalia; Cervidae) da Colômbia. / Javier Adolfo Sarría-Perea. --
Jaboticabal, 2012
viii, 67 f.; 28 cm

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de
Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte
Banca examinadora: Pedro Manoel Galetti Júnior, Maurício Bacci
Júnior, Vera Cristina Silva, Jeffrey Frederico Lui

Bibliografia

1. Taxonomia. 2. Filogenética. 3. Mazama-Colômbia. I. Título. II.
Jaboticabal – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 581.961:575.86:599.735.34(862)

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Javier Adolfo Sarria Perea – nascido em Monterrey, México em oito de novembro de 1972, é graduado em Medicina Veterinária pela Universidade Nacional da Colômbia em 1999 e obteve seu título de Mestre em Zootecnia pela Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" em 2004. Atualmente exerce o cargo de tecnologista em saúde pública na Fundação Instituto Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Maria Japzy Perea e Mario Irne Sarria, pelos seus ensinamentos, pelos seus conselhos, pelos valores, pela confiança, pelo apoio, por acreditar em mim e nas minhas capacidades e me incentivar em ir atrás dos meus objetivos sem jamais desistir.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, e em particular à Profa. Dra. Lúcia Galvão de Albuquerque, por todo o seu apoio e confiança.

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela oportunidade de desenvolver mais uma pesquisa sob sua orientação e pela sua colaboração na coleta do material biológico nos zoológicos da Colômbia.

Ao Ministério do Ambiente, Vivenda e Desenvolvimento Territorial da Colômbia MAVDT, por me autorizar o acesso ao material genético utilizado nesta pesquisa.

À Associação Colombiana de Parques Zoológicos, Aquários e Afins ACOPAZOA e aos Zoológicos Jaime Duque, Barranquilla, Santa Fe e Cali, pela autorização da amostragem dos animais das suas coleções e pela atenção brindada durante a nossa visita.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo FAPESP, pela bolsa concedida, inicialmente de 36 meses e prorrogada por mais seis meses, pela reserva técnica que fez possível a coleta do material biológico na Colômbia o trabalho no laboratório e a participação em vários eventos científicos nacionais e internacionais, e pela infinita paciência para comigo, mesmo tendo estourado todos os prazos estabelecidos. Muito obrigado por acreditar em mim e no meu projeto.

Aos médicos veterinários Leonardo Arias do Zoológico Jaime Duque, Dave Wehdeking do Zoológico de Barranquilla, Marta Camacho do Zoológico Santa Fe, Juliana Peña do Zoológico de Cali e Santiago Lozada da Fundação “El Refugio”, pela sua hospitalidade e assistência veterinária durante as amostragens.

Ao Dr. André Dayan da Tecniviro S.A.U. (Vitrogen – Colômbia) e a Dra. Yeda Watanabe da Vitrogen, pelo apoio logístico e institucional durante as amostragens na Colômbia e à Diana Vargas e Mario Enrique Sarria, pelo apoio logístico no processo de exportação e importação das amostras.

Ao pessoal do Setor de Perdimento da Infraero no Aeroporto Internacional Cumbica (Guarulhos, SP), pela colaboração na conservação do material durante os 16 meses que esteve retido na alfândega, e ao pessoal do setor de transportes da FCAV/UNESP, pela imensa ajuda logística nas viagens a São Paulo, para as reposições mensais de nitrogênio líquido do botijão.

Aos companheiros e amigos do NUPECCE, e em particular ao João Airton Bôer, a Juliana Pinho, a Iara Tomazella, o Bruno Fiorillo, a Aline Mantellatto, a Paula Ribas Soares, o Márcio Oliveira e a Marina Figueiredo pela sua valiosa colaboração durante as fases laboratoriais.

Ao Prof. Dr. Antônio Sérgio Ferraud, pelas orientações na técnica de análise de componentes principais, ao Prof. Dr. Maurício Bacci Jr e o Prof. Dr. Vitor Miranda pelos ensinamentos na área da análise filogenética animal e a Profa. Dra. Vera Cristina Silva pelas orientações na área da taxonomia animal.

Aos amigos e parceiros de república Elias Carnelossi, Leonardo Seno, Hermógenes Torres, Vinicius Antunes e Roberto Gomes, pela amizade, camaradagem e colaboração durante o tempo que dividimos o espaço.

Aos demais colegas e amigos do NUPECCE: Eveline Zanetti, Ana Maria Nievas, Christina Capalbo, Maurício Cristofolletti (Janota), Luciana Diniz, Ellen

Peroni, Marina Suzuki Cursino, Vanessa Abril, André Gualberto, Mauricio Salviano (Piauí), Francisco Grotta, Josi Cerveira, Natália Versiani, Pedro Peres e Raoni Toratti, pelos convívio e bons momentos compartilhados ao longo destes 42 meses.

A todas as pessoas que de uma ou outra forma me ajudaram e torceram para que este trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

I. INTRODUÇÃO	9
II. REVISÃO DE LITERATURA	11
III. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Material experimental	18
3.2. Coleta do material biológico.....	23
3.3. Processamento para estocagem do material biológico.	24
3.4. Análises de morfologia externa.....	25
3.5. Análises citogenéticas	26
3.6. Análises moleculares.....	29
IV. RESULTADOS	33
4.1. Morfologia externa:	33
4.1.1. Morfotipo 1	33
4.1.2. Morfotipo 2	34
4.1.3. Morfotipo 3	35
4.1.4. Morfotipo 4	36
4.1.5. Morfotipo híbrido	38
4.2. Análise de componentes principais das medidas morfométricas	39
4.3. Análises citogenéticas: descrição de cariótipos	41
4.3.1. Morfotipo 1	41
4.3.2. Morfotipo 2	42
4.3.3. Morfotipo 3	43
4.3.4. Morfotipo 4	44
4.3.5. Cariótipo híbrido:	46
4.5. Análise de filogenia molecular	46
V. DISCUSSÃO	50
VI. CONCLUSÕES	59
VIII. REFERÊNCIAS	60
Apêndice A. Matriz de divergência entre sequências.	67

TAXONOMIA E FILOGENIA DE ALGUMAS ESPÉCIES DE MAZAMA (MAMMALIA; CERVIDAE) DA COLÔMBIA.

RESUMO – Foi feita uma revisão da taxonomia e filogenia de algumas espécies de Mazama da Colômbia. 15 animais provenientes da região caribe e da região andina colombiana foram analisados por técnicas morfométricas, citogenéticas e moleculares. Para definir morfotipos foram feitas a descrição detalhada dos padrões cromatogênicos do rosto e corpo e análises de componentes principais das medidas morfométricas. Para as análises cromossômicas, foi feita biometria cromossômica e cariotipagem de metáfases obtidas a partir de cultivos de fibroblastos. Para as análises moleculares foram construídas árvores filogenéticas pelos métodos de máxima verossimilhança e inferência bayesiana, a partir de um fragmento de 979 nucleotídeos do marcador mitocondrial citocromo b (Cytb). Os resultados mostraram que *Mazama bricenii* pertence a uma linhagem que divergiu precoce na evolução do grupo, confirmaram a validade taxonômica da subespécie *M. cita sanctaemartae* na região Caribe e de *M. zetta* na região entre as cordilheiras Central e Oriental, e revelaram a existência de duas espécies de *Mazama* novas para ciência, uma filogeneticamente relacionada a *M. gouazoubira*, ao norte da região andina central e outra filogeneticamente próxima de *M. zetta*, no maciço colombiano. Os resultados confirmam a enorme diversidade da fauna colombiana, e a necessidade de estudos visando à conservação destas espécies.

PALAVRAS-CHAVE: Citogenética, Colômbia, filogenética, *Mazama*, morfometria, taxonomia.

TAXONOMY AND PHYLOGENY OF SOME SPECIES OF MAZAMA (MAMMALIA; CERVIDAE) FROM COLOMBIA

SUMMARY – A review of the taxonomy and phylogeny of some species of *Mazama* from Colombia was made. 15 animals from the Caribbean region and the Colombian Andean region were analyzed by morphometric, cytogenetic and molecular techniques. Morphotypes were defined by the detailed description of facial and body chromatogenic patterns and by principal components analysis of morphometric measurements. Chromosome analyses were made by biometrics and karyotyping of metaphases from cultures of fibroblasts. For molecular analyzes, phylogenetic trees were constructed by maximum likelihood methods and Bayesian inference, from a fragment of 979 nucleotides of the mitochondrial marker cytochrome b (Cytb). The results revealed that *Mazama bricenii* belongs to a lineage that early diverged in evolution of the group, confirmed the taxonomic validity of *M. cita sanctaemartae* in the Caribbean region and *M. zetta* the region between the Central and Eastern cordilleras, and revealed the presence of two *Mazama* species new to science, the first one from the north of the central Andean region phylogenetically related to *M. gouazoubira*, and second from the Colombian Massif phylogenetically close to *M. zetta*. The results confirm the enormous diversity of the Colombian fauna and the need of studies focusing the conservation of the aforementioned species.

KEYWORDS: Colombia, cytogenetics, *Mazama*, morphometrics, phylogenetics, taxonomy.

I. INTRODUÇÃO

O gênero *Mazama* (RAFINESQUE, 1817) é o grupo taxonômico que reúne uma variedade de cervídeos de pequeno a médio porte e chifres simples, que se distribuem ao longo da América tropical e subtropical desde o nordeste mexicano até a região central da Argentina, ocupando uma ampla variedade de habitats entre florestas montanhosas, florestas tropicais chuvosas, florestas tropicais secas e savanas arbóreas, em margens altitudinais entre o nível do mar até acima dos 4.000 m. (EISEMBERG, 1989; ALLEN, 1915).

EISEMBERG (1987) propõe que as características morfológicas deste grupo não sejam caracteres conservados, e sim produto da adaptação ao habitat, em um processo evolutivo que levou a seleção de corpos de menor tamanho e com menor desenvolvimento da galhada. O mesmo autor especula que tal processo ocorreu durante os ciclos de glaciação do Pleistoceno, ao se formarem os habitats isolados chamados de refúgios.

A complexidade deste grupo está na ampla diversidade morfológica tanto entre como dentro das distintas espécies, as quais são classificadas primariamente como veados vermelhos e cinzas ou marrons (THOMAS, 1913; ALLEN, 1915). Esta diversidade se estende em nível cromossômico, tendo sido identificados cariótipos muito diferentes entre as espécies estudadas, que vão desde $2n=32$ até $2n=70$, muitos deles com diversas variantes e sendo frequentes os polimorfismos cromossômicos (NEITZEL, 1987; FONTANA e RUBINI, 1990; DUARTE e JORGE, 2003; ABRIL e DUARTE 2008; ABRIL et al., 2010).

Apesar da sua ampla diversidade morfológica e citogenética, a monofilia deste grupo não foi discutida até que GILBERT et al. (2006) e mais tarde DUARTE et al. (2008) descobriram que os dois grupos principais de veados *Mazama*, conhecidos como veados vermelhos e marrons, pertenciam a duas linhagens filogenéticas distintas.

De forma ainda mais intrigante, DUARTE et al. (2008) e posteriormente HASSANIN et al. (2012) encontraram que esta polifilia existia também tanto dentro do grupo dos veados marrons quanto dos vermelhos. Estes achados evidenciam não só a necessidade de uma revisão criteriosa da taxonomia e filogenia do grupo, mas também a possível necessidade de definir novos gêneros.

Nesse contexto, deve-se ressaltar a importância do território colombiano como cenário fundamental no processo evolutivo dos cervídeos neotropicais. A sua posição geográfica como porta de entrada para a América do Sul serviu de ponte para que as espécies de cervídeos vindas da América Central e do Norte pudessem migrar para este continente, durante o processo conhecido como a “Terceira Grande Migração” durante o Plioceno tardio, há cerca de 2,5 milhões de anos (EISENBERG, 1987). Da mesma forma, os diversos ecossistemas da Colômbia, que variam entre os bosques secos da região do Caribe ao nível do mar, as florestas úmidas tropicais da Amazônia e o Chocó, até os biomas das altas montanhas acima de 3.000 metros chamados de “páramos”, provavelmente foram alguns dos cenários que influenciaram os processos de seleção e adaptação dos modernos cervídeos classificados hoje dentro do gênero *Mazama*.

Embora na Colômbia já tenham sido descritas detalhadamente seis espécies de veados do gênero *Mazama*, quatro delas aparentemente endêmicas, na atualidade, só se reconhecem quatro, sendo duas delas consideradas subespécies de espécies de ampla distribuição (LAWRENCE, 1993; EISENBERG, 1989; LIZCANO et al., 2010a, b). O trabalho recente de HASSANIN et al. (2012) sobre filogenética dos Cetartiodactyla incluiu sequências de algumas espécies de *Mazama* da Colômbia, porém com fortes dúvidas sobre o seu status taxonômico real. De igual forma, não se conhece o cariótipo de nenhuma espécie de *Mazama* deste país.

O presente estudo buscou revisar a taxonomia do gênero *Mazama* e reconstruir a filogenia de algumas das espécies atualmente classificadas dentro

deste gênero na Colômbia, usando técnicas de análises morfológicas, citogenéticas e moleculares, visando contribuir com o conhecimento do processo evolutivo dos cervídeos na América do Sul.

II. REVISÃO DE LITERATURA

A família Cervidae é a segunda mais extensa dentro da ordem Cetartiodactyla, depois da família Bovidae, abrangendo 54 espécies, que variam amplamente em forma e tamanho, desde o gênero *Pudu*, de até 40 cm de alçada e aproximadamente 5 kg de peso até o gênero *Alces* de quase dois metros de alçada e mais de 600 kg de peso. Esta família é atualmente dividida em duas subfamílias: Cervinae e Capreolinae que ocorrem naturalmente na Europa, na Ásia, nas Américas e norte da África; algumas espécies foram introduzidas pelo homem na Austrália e Nova Zelândia (GROVES e GRUBB, 1987; GILBERT et al., 2006; LOYOLA et al., 2010; HASSANIN et al., 2012).

O primeiro ancestral conhecido dos Cervidae é o *Eumeryx*, uma espécie morfológicamente semelhante ao moderno veado-de-cheiro (em inglês “musk deer”, gênero *Moschus*; família Moschidae) que habitou a Ásia durante o Oligoceno. Porém, os primeiros ruminantes com apêndices frontais decíduais e que atualmente são reconhecidas como sendo cervídeos verdadeiros (*Dicrocerus* e *Procervulus*) apareceram somente até o Mioceno na Eurásia (EISENBERG, 1987). Os primeiros cervídeos verdadeiros identificados na América do Norte datam de começos do Plioceno e se acredita que chegaram à América do Sul até finais do Plioceno quando o estreito do Panamá emergiu permanentemente (EISENBERG, 1987; EISENBERG, 1989). A seguinte é uma chave taxonômica para a família Cervidae, baseada em SCOTT e JANIS (1987), GILBERT et al. (2006) e HASSANIN et al. (2012):

- Ordem Cetartiodactyla: Ordem recentemente definida por filogenia molecular que abrange as espécies antigamente agrupadas na ordem Artiodactyla e na ordem Cetacea (golfinhos e baleias). A característica

comum a este grupo é a polia dupla no astrágalo e os membros podais paraxônicos (eixo de simetria entre o terceiro e quarto dígitos), presentes também nas baleias do Eoceno.

- Subordem Ruminantia: Estômago dividido em quatro compartimentos, adaptado para permitir a fermentação da celulose por micro-organismos simbiontes. Presença da conduta de rinação. Presença de um canino inferior incisiforme e ausência total dos incisivos superiores, os quais foram substituídos por uma almofada córnea.
- Infra-ordem Pecora: Presença de apêndices craniais de origem óssea e dérmica, os quais podem ser permanentes ou decíduos.
- Família Cervidae: Apêndices craniais decíduos nos machos, presença de dois orifícios no ducto lacrimal, situados dentro da órbita, ou na fossa lacrimal ou no orifício anterorbital, molares braquiodontos, sutura parietal-escamosa mais próxima da borda superior da fossa temporal, placenta com alguns cotilédones., ausência de vesícula biliar, presença do osso canônico, produto da fusão extensa, porém parcial, dos ossos metatarsianos. Esta família está atualmente subdividida nas subfamílias Cervinae e Capreolinae.

A sub-família Capreolinae (sinonímia: Odocoileinae) se distingue pela presença de vestígios distais do segundo e quinto ossos metacarpianos (telemetacarpalia). Inclui as tribos Capreolini, Alcelinii e Odocoileinii (GILBERT et al., 2006).

A tribo Odocoileini Inclui todos os gêneros de cervídeos presentes nas Américas excetuando *Cervus*, sendo todos eles endêmicos desta região excetuando *Rangifer*. Inclui os gêneros *Rangifer*, *Odocoileus*, *Blastocerus*, *Ozotoceros*, *Hippocamelus*, *Pudu* e *Mazama*. A tribo se caracteriza pela sua rápida radiação e ampla plasticidade adaptativa a diversos ecossistemas (EISENBERG, 1987).

O gênero *Mazama* é o grupo taxonômico que reúne os cervídeos de pequeno a médio porte e de chifres simples que são endêmicos das Américas Central e do Sul. A complexidade taxonômica deste grupo foi claramente reconhecida desde os primeiros estudos realizados neste gênero, devido à ampla variabilidade morfológica encontrada nos diversos espécimes analisados, tanto em nível interespecífico como intra-específico (THOMAS, 1913; ALLEN, 1915).

Em termos gerais, o grupo é dividido em dois grandes subgrupos: os veados vermelhos e os veados cinza ou marrons. O nome mais antigo conhecido é *Moschus americanus*, dado por ERXLEBEN em 1777 a um espécime originário da Guiana. Em 1792, KERR dá o nome de *Cervus temama* à espécie de veado vermelho do México. Em 1801, AZARA publica a primeira descrição detalhada dos cervídeos de chifres simples do Paraguai, e dá o nome de “Gouazoupita” ao veado vermelho e “Gouazoubira” ao veado marrom. Em 1815, ILLIGER faz uma nova revisão das mesmas espécies e muda o nome do veado vermelho para *Cervus rufus* e do veado marrom para *Cervus simplicicornis*. Em 1817, CUVIER descreve as espécies de Cayenne (Guiana Francesa) e dá o mesmo nome à espécie de veado vermelho (*C. rufus*) e propõe o nome *C. nemorivagus* para a espécie marrom. Nesse mesmo ano, RAFINESQUE descreve a espécie *Mazama tema* a partir de um espécime originário do México; esta espécie seria sinônima de *Cervus temama*, anteriormente descrito por KERR (ALLEN, 1915).

ALLEN (1915) faz a primeira grande revisão do gênero e reconhece 16 formas de veados vermelhos e oito formas de veados marrons entre espécies e subespécies. As formas de veado vermelho que ele reconheceu foram *Mazama trinitatis*, *M. americana americana*, *M. americana tumatumari*, *M. americana juruana*, *M. rufa rufa*, *M. rufa jucunda*, *M. sheila*, *M. zetta*, *M. sartorii sartorii*, *M. sartorii cerasina*, *M. sartorii reperticia*, *M. gualea*, *M. fuscata*, *M. zamora*, *M. rufina* e *M. briceni*. As formas de veado marrom reconhecidas por ele foram *M. simplicicornis*, *M. murelia*, *M. tschudi*, *M. nemorivaga* (*M. nemorivagus*), *M. superciliaris*, *M. cita cita*, *M. cita sanctaemartae* e *M. pandora*. Na mais recente

revisão taxonômica do gênero são reconhecidas 10 espécies e nenhuma subespécie: *M. americana*, *M. nana*, *M. temama*, *M. bororo*, *M. rufina*, *M. bricenii*, *M. chunyi*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, e *M. pandora* (DUARTE e GONZALEZ, 2010).

Na Colômbia, foram descritas até hoje quatro formas do gênero *Mazama*, entre espécies e subespécies. A primeira delas é *Mazama zetta*, uma forma de veado vermelho descrita por THOMAS, (1913) como sendo menor e algo mais compacta que *M. americana* e de cor castanha amarronzada ao longo do corpo e pelos antevértidos no pescoço, originária da região do norte da Cordilheira Central próximo da cidade de Medellín. A segunda é *Mazama cita sanctaemartae*, descrita por ALLEN, (1915), uma forma de veado marrom de tamanho médio, pelagem curta e fina de cor ocre (amarelo queimado) pálida no dorso e partes inferiores brancas, que habita as regiões semi-áridas do litoral do Caribe colombiano. A terceira é *Mazama murelia*, outra forma de veado marrom descrita também por ALLEN, (1915), de tamanho médio, cor cinza amarronzada no dorso e branco na parte inferior, e com faixa periorbitaria laranja amarelada, que habita a região limítrofe entre a Amazônia colombiana e a Cordilheira Oriental. A quarta forma é *M. americana carrickerii*, descrita por HERSHKOVITZ (1959) como sendo uma forma de veado vermelho do grupo de *M. americana*, de tamanho médio a pequeno, cor ocre e membros curtos, que habita a “Serra Nevada de Santa Marta” na região Caribe.

Em 1963, HALTENORTH (caput LAWRENCE, 1993) propõe uma reclassificação das espécies do gênero *Mazama*, na qual considera as espécies descritas na Colômbia como sendo as subespécies, a saber: *M. americana zetta*, *M. gouazoubira sanctamarctae*, *M. gouazoubira murelia* e *M. americana carrickerii*. Esta classificação parece ter sido amplamente aceita e é adotada até hoje por vários pesquisadores. No seu livro sobre mamíferos do Neotrópico, EISENBERG (1989) menciona três espécies de *Mazama* para Colômbia: *M.*

americana, *M. gouazoubira* e inclui *M. bricenii*, e diz que as duas primeiras têm uma ampla distribuição.

Só até 2010 é admitida oficialmente a presença das espécies *M. bricenii* e *M. rufina* na Colômbia. *M. bricenii*, descrita por THOMAS (1908), é um cervídeo pequeno de cor castanha intensa, cabeça, pescoço, orelhas e membros marrom escuro, parte inferior do corpo mais clara e base da cauda branca. Tem como característica principal uma fossa infra-orbitária profunda. Esta espécie habita os bosques alto-andinos e páramos ao oeste da Venezuela e o nordeste da Colômbia (LIZCANO et al., 2010b). Morfologicamente é semelhante a *M. rufina* PURCHERAN, 1951 e difere principalmente na sua distribuição geográfica, que nesta última é ao longo da região andina do Equador, desde o norte do Peru e passando pelo maciço Colombiano até a Cordilheira Central (LIZCANO et al., 2010a).

Já do ponto de vista filogenético, a origem monofilética do grupo não tinha sido questionada, dado as similaridades morfológicas como o tamanho e formato do corpo e chifres. Este conceito foi rebatido por GILBERT et al. (2006), ao fazerem uma análise filogenética da Família Cervidae, incluindo a tribo Odocoileini, a qual pertence o gênero em questão. A partir da análise de quatro os marcadores moleculares, dois nucleares e dois mitocondriais, os pesquisadores demonstraram que os veados vermelhos descendiam de um clado diferente ao dos veados cinza. Os resultados mostraram duas linhagens biogeográficas, a primeira agrupando os veados vermelhos junto ao gênero *Odocoileus*, e a segunda agrupando *M. gouazoubira* junto aos outros gêneros exclusivamente Sul-americanos *Blastocerus*, *Hippocamelus* e *Pudu*. Estas evidências demonstraram a origem polifilética do gênero *Mazama* e por esse motivo os autores propuseram desconsiderar a sua validade como gênero e fazer uma nova re-classificação do grupo.

Em uma análise filogenética mais recente do *Cytb* (934 nucleotídeos), que incluiu as espécies *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. americana*, *M. bororo*, *M.*

nana e *M. temama*, DUARTE et al. (2008) confirmaram o caráter polifilético do gênero e confirmaram que os cervídeos Sul-americanos da tribo Odocoileini descendem de duas linhagens ancestrais que divergiram há cinco milhões de anos, uma delas agrupando em clados diferentes *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* junto com os gêneros exclusivamente Sul-americanos, e a outra agrupando no mesmo clado *M. americana*, *M. bororo*, *M. nana* e *M. temama*, junto como o gênero *Odocoileus*. Essa mesma análise mostrou que *M. gouazoubira* surgiu de maneira independente de *M. nemorivaga*, que duas linhagens de *M. americana* divergiram precocemente há dois milhões de anos atrás e que *M. bororo* e *M. nana* surgiram a partir de uma delas há somente um milhão de anos atrás.

Recentemente, HASSANIN et al. (2012) fizeram um extenso estudo filogenético da ordem Cetartiodactyla, buscando determinar os tempos de diversificação das espécies que o compõem. O estudo, que incluiu amostras de 183 espécies representando todas as famílias do grupo, analisou um total de 14.902 nucleotídeos representando a sequência inteira de DNA mitocondrial. Este estudo incluiu espécimes de *M. americana*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira* e *M. rufina* do Peru e da Colômbia. Os autores confirmaram os achados de DUARTE et al. (2008), e encontraram que *M. rufina* seria uma espécie irmã de *Pudu mephistophiles* e que este clado aparentemente forma parte do clado maior que agrupa *Odocoileus* sp/*M. americana*. Mais ainda, encontraram que *O. virginianus* seria uma espécie parafilética, ao observar um espécime da Colômbia agrupando junto com *M. americana* como espécie irmã. Contudo, as relações filogenéticas dentro deste grupo de cervídeos ainda não ficam bem esclarecidas.

No que se refere à citogenética, a grande variabilidade cariotípica entre as espécies do gênero *Mazama* tem gerado muita confusão no seu estudo. A tribo Odocoileini se caracteriza pela ampla diversidade cariotípica, que varia de $2n=32$ e $NF=46$ em *M. bororo* até $2n=70$ e $NF=74$ em *Odocoileus virginianus*, *O. hemionus*, *Pudu puda* e *Hippocamelus bisulcus* (NEITZEL, 1987; FONTANA e

RUBINI, 1990; DUARTE e JORGE, 2003; ABRIL e DUARTE, 2008; ABRIL et al., 2010).

Ao analisar a citogenética do grupo, os pesquisadores consideram que o cariótipo ancestral da tribo *Odocoileini* manteve a conformação cariotípica original da família *Cervidae* $2n=70$ e $NF=70$, ao estar conservado na espécie *Mazama gouazoubira* (NEITZEL, 1987; FONTANA e RUBINI, 1990). As outras espécies do grupo (inclusive as demais espécies do gênero *Mazama*) apresentam um cromossomo X submetacêntrico, similar ao das espécies das tribos irmãs *Capreolini* e *Alcelini* (FONTANA e RUBINI, 1990). Os pesquisadores especulam que este cromossomo surgiu após fixação de uma inversão pericêntrica no ancestral comum a estas espécies (FONTANA e RUBINI, 1990). Uma posterior inversão pericêntrica em um autossomo foi fixada nos cariótipos dos gêneros *Odocoileus*, *Pudu* e *Hippocamelus*, levando ao cariótipo $2n=70$ e $NF=74$, presente nestes gêneros. Este rearranjo está também presente em *Blastocerus* e *Ozotoceros*, porém estes dois gêneros fixaram posteriormente algumas fusões cêntricas, levando ao $2n=66$ e $NF=74$ em *B. dichotomus* e $2n=68$ e $NF=74$ em *O. bezoarticus* (FONTANA e RUBINI, 1990; DUARTE e GIANNONI, 1995a, b).

Já as espécies do gênero *Mazama* apresentam um padrão de evolução mais complexo. Têm-se evidências de que os cariótipos de *M. americana* ($2n=42-53+3-5B$ e $NF=48-57$), *M. nana* ($2n=36-40+1-7B$ e $NF=56$), *M. bororo* ($2n=32-34+3-6B$ e $NF=46$) e *M. temama* ($2n=50$ e $NF=70$) evoluíram a partir de sucessivas fusões em tandem e cêntricas, em complexos rearranjos cromossômicos que envolveram em alguns casos mais de um cromossomo (JORGE e BENIRSHKE, 1977; NEITZEL, 1987; DUARTE e JORGE, 2003; SARRIA-PEREA, 2004; ABRIL e DUARTE, 2008; ABRIL et al. 2010). Contudo, ainda surgem muitas perguntas acerca das diferenças nas taxas de evolução cromossômica entre os distintos gêneros e espécies e do verdadeiro cariótipo ancestral do grupo. Para esclarecer estas questões é preciso fazer, além das

análises morfológicas, filogenias moleculares e estudos cromossômicos, incluindo novos táxons e a sua distribuição geográfica.

III. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material experimental

Entre julho e outubro de 2007 foi feita uma triagem para averiguar o número de espécimes vivos de cervídeo do gênero *Mazama* em cativeiro na Colômbia, que pudessem ser potencialmente usados na pesquisa. O levantamento incluiu 28 Corporações Autônomas Regionais CAR (Tabela 1) e os oito zoológicos membros da Associação Colombiana de Parques Zoológicos, Aquários e Afins, ACOPAZOA (Tabela 2). A consulta incluiu a visita a alguns dos locais onde os animais eram mantidos, para confirmação visual do morfotipo dos animais, e avaliar assim a sua relevância no estudo.

Tabela 1. – Lista de Corporações Autônomas Regionais consultadas no levantamento de cervídeos do gênero *Mazama* em cativeiro, nos seus respectivos centros de triagem e áreas de jurisdição, de uso potencial para a pesquisa. A área total coberta pelas Corporações consultadas equivale a mais de 80% do território colombiano, e abrange todas as áreas nas quais as espécies do gênero *Mazama* têm sido registradas.

Corporação Autônoma Regional (CAR)	Jurisdição
CAR do Alto Magdalena (CAM)	Departamento do Huila
CAR de Cundinamarca (CAR)	Bogotá e parte do departamento de Cundinamarca
CAR de Risaralda (CARDER)	Departamento de Risaralda
CAR do Dique (CARDIQUE)	Cartagena e parte do departamento de Bolívar.
CAR de Sucre (CARSUCRE)	Parte do departamento de Sucre
CAR de Santander (CAS)	Parte do departamento de Santander
CAR de Nariño (CORPONARIÑO)	Departamento de Nariño
CAR da Fronteira Nororiental (CORPONOR)	Departamento de Norte de Santander
CAR do Tolima (CORTOLIMA)	Departamento do Tolima
CAR do Quindío (CRQ)	Departamento do Quindío
CAR das bacias dos rios Negro e Nare (CORNARE)	Parte do departamento de Antioquia
CAR dos vales do Sinú e San Jorge (CVS)	Departamento de Córdoba

CAR da Orinoquia (CORPORINOQUIA)	Departamentos de Arauca, Vichada, Casanare, Meta e parte de Cundinamarca e Boyacá
CAR do Centro de Antioquia (CORANTIOQUIA)	Parte do departamento de Antioquia
CAR do Atlântico (CRA)	Departamento del Atlántico
CAR de Boyacá (CORPOBOYACA)	Parte do departamento de Boyacá
CAR de Chivor (CORPOCHIVOR)	Parte do departamento de Cundinamarca
CAR do Guavio (CORPOGUAVIO)	Parte do departamento de Cundinamarca.
CAR do Sul de Bolívar (CSB)	Parte do departamento de Bolívar
CAR do Magdalena (CORPAMAG)	Departamento do Magdalena
CAR do Cesar (CORPOCESAR)	Departamento do Cesar
CAR da Guajira (CORPOGUAJIRA)	Departamento da Guajira
CAR de Caldas (CORPOCALDAS)	Departamento de Caldas
CAR do Cauca (CRC)	Departamento do Cauca
CAR do Valle del Cauca (CVC)	Departamento do Valle del Cauca
CAR da Amazonía (CORPOAMAZONÍA)	Departamentos do Amazonas, Putumayo e Caquetá.
CAR de La Macarena (CORMACARENA)	Parte da área de Manejo Especial La Macarena
CAR do Chocó (CODECHOCO)	Departamento de Chocó

Departamento: unidade territorial equivalente a estado no Brasil.

Tabela 2. – Lista dos Zoológicos consultados no levantamento de cervídeos do gênero *Mazama* em cativeiro, de uso potencial para a pesquisa. Todos os zoológicos consultados são membros da ACOPAZOA.

Zoológico	Localização	Número de animais
Jaime Duque	Briceño, Cundinamarca	0 fêmeas 2 machos
Santa Fe	Medellín, Antioquia	6 fêmeas 3 machos
Cali	Cali, Valle del Cauca	3 fêmeas 2 machos
Barranquilla	Barranquilla, Atlántico	0 fêmeas 2 machos
Ocarros	Villavicencia, Meta	2 fêmeas 1 macho
Piscilago	Girardot, Cundinamarca	0 fêmeas 1 macho
Matecaña	Pereira, Risaralda	1 fêmea 1 macho
Santacruz	Mesitas del Colegio, Cundinamarca	0 fêmeas 0 machos

Das 28 CARs consultadas, só duas delas, CORPORINOQUIA e CORMACARENA tinham espécimes sob sua jurisdição, porém nenhum destes

animais pôde ser incluído no estudo por estarem ilegalmente mantidos em cativeiro.

Dos oito zoológicos consultados, sete tinham cervídeos do gênero *Mazama* nas suas coleções. Os zoológicos Jaime Duque, Piscilago, Santa Fe, Cali, “Los Ocarros” e Barranquilla informaram que os animais das suas coleções provinham de vida livre, na maioria dos casos de locais conhecidos. Porém, o único espécime no zoológico Piscilago veio a óbito antes da amostragem e os espécimes do Bioparque “Los Ocarros” não puderam ser usados por estarem ilegalmente mantidos em cativeiro. No momento que foi efetuada a triagem, o veterinário do zoológico Matecaña informou que os dois animais na sua coleção tinham nascido em cativeiro no zoológico Santa Fe, por este motivo considerou-se que a sua contribuição ao estudo seria pouco relevante do ponto de vista genético e foram descartados da amostragem.

A amostragem dos espécimes do presente estudo foi autorizada pelo Ministério de Ambiente, Vivenda e Desenvolvimento Territorial da Colômbia MAVDT através do contrato de acesso a recursos genéticos para pesquisa científica sem interesse comercial n° 19 de 06/2008. O processo de coleta das amostras se levou a cabo entre os dias três e 16 de fevereiro de 2009. Foram percorridos 2.456 quilômetros ao longo do território colombiano, visitando-se cinco cidades, quatro zoológicos e um centro de triagem. As instituições visitadas foram o Zoológico Jaime Duque, o Zoológico de Baranquilla, o Zoológico Santa Fe, o Zoológico de Cali e o centro de triagem da Fundação “El Refugio”. A última instituição mencionada serviu como guarda (na modalidade de sequestre depositário) de um exemplar que estava originalmente no Zoológico de Cali.

Foram amostrados no total 15 animais do gênero *Mazama*, sete do grupo dos veados vermelhos e oito do grupo dos veados marrons, onze deles com origem geográfica conhecida: dois do departamento de Atlântico na região do Caribe (T281 e T282); seis do departamento de Antioquia (T283, T284, T285, T287, T288 e T289) e um do departamento de Tolima (T290), os dois

departamentos localizados na região centro–norte da Cordilheira Central; e dois do departamento de Cauca, ao sul da Cordilheira Andina colombiana no Maciço Colombiano (T292 e T293) (Tabela 3, Figura 1). Não houve certeza da origem geográfica exata dos espécimes T279 e T280, porém se sabia que o T280 provinha de uma das reservas de bosque altoandino e páramo próximas de Bogotá D.C., no centro da Cordilheira Oriental; estas são a saber o Parque Nacional Natural Chingaza ou o páramo de Sumapaz. O espécime T291 não tinha origem conhecida.

Tabela 3. – Espécimes do gênero *Mazama* estudados no presente estudo. Id= número de identificação, *= indivíduo confiscado no município de Tabio – Cundinamarca, mas de origem incerta, ** indivíduo confiscado no município de Sopó – Cundinamarca, porém de origem incerta.

Id.	Sexo	Tipo	Origem geográfica	Local de coleta
T279	M	cinza	Incerta*	Zoo Jaime Duque
T280	M	vermelho	Incerta**	
T281	M	cinza	Sabanilla, Atlântico	Zoo Barranquilla
T282	M	cinza	Sabanilla, Atlântico	
T283	F	cinza	San Jerónimo, Antioquia	
T284	F	vermelho	Antioquia	
T285	F	vermelho	San Jerónimo, Antioquia	
T286	F	cinza*	Nascida em cativeiro	Zoo Santafe
T287	M	cinza	San Jerónimo, Antioquia	
T288	F	vermelho	Antioquia	
T289	M	cinza	San Jerónimo, Antioquia	
T290	F	vermelho	Tolima	
T291	F	cinza	Desconhecida	Zoo Cali
T292	F	vermelho	Bolívar, Cauca	
T293	M	vermelho	Mercaderes, Cauca	Fund. El Refugio

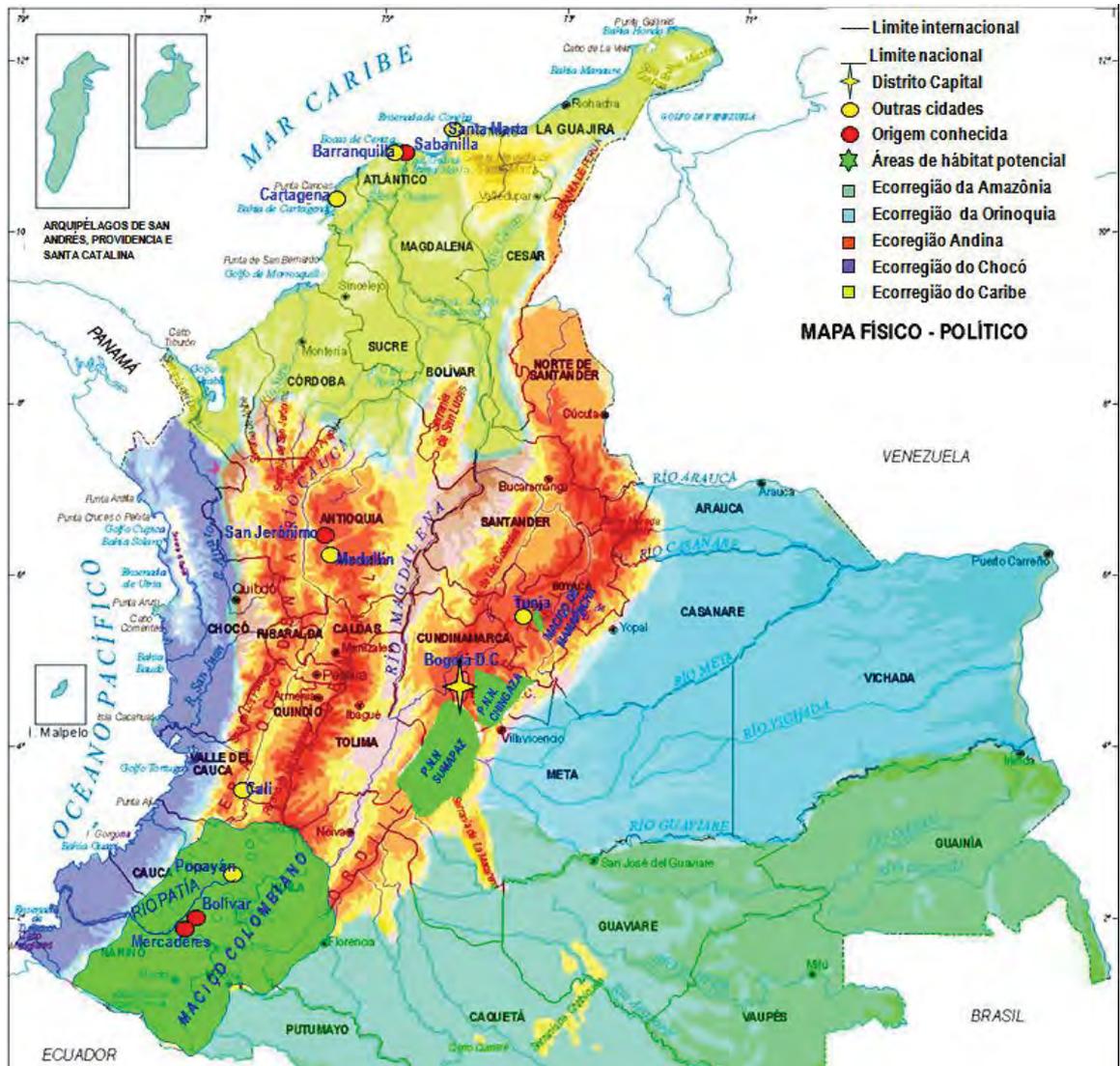


Figura 1. – Mapa da origem geográfica por ecorregiões. I. Ecorregião Andina: a) *Mazama bricenii* (T280): centro-norte da Cordilheira Oriental (origem suspeita no P.N.N. Sumapaz, o P.N.N. Chingaza ou o Maciço de Mamapacha); b) *M. zetta*: San Jerónimo - Antioquia (T284, T285, T288) e Tolima (T290); c) *Mazama* sp.1.(veado vermelho): Bolívar – Cauca (T292), Mercaderes – Cauca (T293) no Maciço Colombiano; d) *Mazama* sp.2 (veado marrom): San Jerónimo – Antioquia (T283, T287, T289); II. Ecorregião do Caribe: e) *Mazama cita sanctamartae*: Sabanilla - Atlântico (T281 e T282). Espécimes T279 e T291 com origens desconhecidas; espécime T286 era um híbrido nascido em cativeiro.

Todos os procedimentos utilizados para a contenção física e química assim como de coleta de material biológico foram aprovados pela Comissão de Ética e Bem Estar Animal da UNESP- Jaboticabal CEBEA (protocolo nº0015140-

08). Foram usados os métodos de contenção química com dardo, usando zarabatana ou pistola pneumática nos espécimes do zoológico Jaime Duque, Barranquilla, Cali e “El Refugio”, e o método de contenção física com rede, seguido de injeção endovenosa de anestésico nos espécimes do zoológico Santa Fe. O procedimento foi executado pelo Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte nos Zoológicos Jaime Duque e Santa Fe e no centro de triagem “El Refugio”, e pelos veterinários responsáveis nos zoológicos de Barranquilla e Cali. Os protocolos de anestesia variaram de acordo com a experiência do veterinário de cada instituição e foram devidamente monitorados pelos profissionais qualificados de cada instituição (Tabela 4).

Tabela 4. – Protocolos anestésicos usados nos procedimentos de coleta de material biológico para o presente estudo. Protocolos 1 e 2 usados no Zoológico Jaime Duque e no centro de triagem “El Refugio” (protocolo 1), protocolo 3 usado no zoológico de Barranquilla, protocolos 4 e 5 usados no zoológico Santa Fe, protocolo 6 usado no zoológico de Cali.

Protocolo	Via de aplicação	Modo de aplicação
1. Cetamina: 7 mg/kg + Xilazina: 1 mg/kg	Intramuscular	Dardo propulsionado por zarabatana
2. Cetamina: 10 mg/kg + Xilazina: 0,5 mg/kg	Endovenosa	Seringa
3. Cetamina: 10 mg/kg + Xilazina: 0,5 mg/kg + Midazolam 0,25 mg/kg	Intramuscular	Dardo propulsionado por pistola de gás pneumático
4. Cetamina: 7 mg/kg + Xilazina: 1,1 mg/kg + Midazolam: 0,125 mg/kg, reversão com loimbina: 0,25 mg/kg	Endovenosa	Seringa
5. Cetamina: 7 mg/kg + Xilazina: 1,1 mg/kg + Atropina: 0,05 - 0,1 mg/kg, reversão com loimbina: 0,25 mg/kg	Endovenosa	Seringa
6. Tiletamina/Zolazepam: 5 mg/kg + Xilazina: 1,25 mg/kg(indução)	Intramuscular	Dardo propulsionado por pistola de gás pneumático

3.2. Coleta do material biológico

Foi coletado sangue periférico por punção venosa da veia jugular, em tubos de 5 cc com heparina (dois tubos) e EDTA (dois tubos), usando agulhas para coleta múltipla de 25x8mm. O sangue foi mantido a 4-6°C em isopor ou garrafa térmica com gelo gel durante no máximo 8 horas até o seu processamento.

De cada animal coletou-se por biópsia, um fragmento de pele da face interna da coxa de aproximadamente 1 cm², usando pinça e tesouras finas estéreis e com desinfecção previa da área com sabão bactericida e álcool 70%. A amostra foi conservada em meio de transporte (meio McCoy com 20% de solução de antibióticos) e armazenada a 4 – 6°C em gelo gel durante no máximo 8 horas até o seu processamento. A pele foi suturada com pontos em “U”, utilizando fio de nylon e tratada com povidina iodada e pomada cicatrizante.

Coletou-se também uma amostra de pelo com bulbo, do rosto de cada animal. Cada amostra foi armazenada em um criotubo de 2 mL à temperatura ambiente.

3.3. Processamento para estocagem do material biológico.

As amostras de sangue foram centrifugadas para separar o anel leucocitário (1.000 r.p.m. nas amostras com heparina e 1.500 r.p.m. nas amostras com EDTA). O anel das amostras com heparina foi restituído em 1 mL de plasma e dissolvido em 4 mL de meio de congelamento de células (Meio McCoy com 20% de glicerol e 20% de solução de antibiótico), e posteriormente dividido em 10 alíquotas de 0,5 mL cada. O anel das amostras com EDTA foi restituído em 1 mL de plasma e dividido em duas alíquotas de 0,5 mL cada (DUARTE et al. 1999).

As amostras de pele foram divididas em sete fragmentos e cada um deles foi colocado em criotubo de 2 mL com 1 mL de meio de congelamento de pele (Meio Iscove com 20% de Glicerol e/ou DMSO e 20% de solução de antibiótico).

As palhetas com as alíquotas de sangue, junto com os fragmentos de pele, foram levados a refrigeração (4 – 6°C) por espaço de quatro horas, posteriormente levadas ao vapor de nitrogênio líquido por 30 minutos e finalmente congelados em nitrogênio líquido. Todas as amostras, inclusive as de pelo, foram devidamente etiquetadas incluindo o número de identificação, o tipo de amostra e a data da coleta.

3.4. Análises de morfologia externa

Os morfotipos foram identificados pelo padrão de pelagem e morfologia externa, por serem parâmetros comparáveis com a literatura. Para estabelecer os padrões de pelagem, foram analisados caracteres qualitativos do padrão de coloração da pelagem, chamados de campos cromatogênicos, os quais foram observados em fotografias dos animais, tiradas em decúbito lateral, decúbito ventral, detalhes da vista dorsal e lateral da cabeça e da região torácica e do períneo. Foram registrados os seguintes campos:

- Rosto: faixa periorbitária, mancha superciliar anterior, regiões auriculares anterobasal e posterobasal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular.
- Corpo: região da cabeça e pescoço, linha mediana dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal do corpo, região ventral do corpo, ventre da cauda e região distal dos membros; padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo; comprimento dos pelos nas diferentes regiões do corpo; e ocorrência de faixas de pelos antevertidos.

As medidas morfométricas foram tomadas usando fita métrica e paquímetro. Estas foram classificadas de acordo com a sua estrutura em medidas ósseas, que medem uma parte do corpo predominantemente de tecido ósseo e medidas moles, que medem estruturas predominantemente de tecido muscular, dérmico ou de órgãos internos. Para avaliar seu potencial informativo nas análises de componentes principais, buscou-se um método para selecionar aquelas medidas com tendência a serem constantes, e para tal fim foram analisados os desvios-padrão em geral e por morfotipo. Foram calculadas a média e o desvio padrão em geral (M e DP respectivamente) e por morfotipo (m_i e dp_i respectivamente, onde i corresponde ao morfotipo). Para determinar o seu grau de variabilidade, foi calculada uma porcentagem de variação de cada medida, pela fórmula DP/M , e se considerou como ponto de corte o valor de 10%. As variáveis com valores acima deste ponto foram consideradas como altamente variáveis e

aquelas com valores abaixo foram consideradas como de variabilidade baixa e portanto com tendência a serem constantes.

As variáveis foram padronizadas pela seguinte equação: $X = (x_{ij} - M_i)/D_{pi}$, onde x é o valor da "i"ésima medida do "j"ésimo indivíduo, M_i é a média da "i"ésima medida e DP é o desvio padrão da "i"ésima medida. A análise de componentes principais foi feita com base nas correlações entre as variáveis e as variâncias foram computadas como sendo amostrais ($SQ/[N-1]$).

Para construir os gráficos bidimensionais, seguiu-se o critério de KAISER (1958): foram selecionados aqueles componentes principais (fatores) com autovalores acima de 1, por conterem maior informação das variáveis originais. Os objetos foram então plotados no gráfico bidimensional com o componente principal 1 no eixo x e o componente principal 2 no eixo y.

3.5. Análises citogenéticas

Para as análises citogenéticas foram feitos cultivos de fibroblastos de pele. As amostras de pele foram descongeladas em banho Maria a 37°C, e lavadas uma vez em etanol 70% e duas consecutivas em solução tampão de PBS. Cada amostra foi subdividida em dez fragmentos menores que foram depositados em garrafa T25 e deixados de cinco a dez minutos em seco para favorecer a sua aderência ao substrato. Após esse tempo, os fragmentos foram hidratados lentamente com 1 mL de soro fetal bovino (SFB) e 1 mL de meio de Earle Modificado de Dulbecco (DMEM) e levados a incubação a 37° C em estufa com 5% de CO₂ durante 48 a 72 horas. O meio foi trocado a cada três dias, trocando-o por 5 mL de DMEM enriquecido com 10% de SFB até se formar uma monocamada, geralmente de 11 a 15 dias após o início da cultura.

De cada garrafa com monocamada fechada foram feitos três repiques, 12 horas após a última troca de meio. Para o repique, as monocamadas foram lavadas duas vezes com 2 mL de solução de PBS e seguidamente tratadas com 2

mL de solução de tripsina 0,5% por até dois minutos para lograr o descolamento das células. Logo após esse tempo, a tripsina foi neutralizada com quantidade igual de SFB e as células foram transferidas a tubo de fundo cônico de 15 mL estéril e centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos. O sobrenadante foi retirado e as células re-suspendidas em meio DMEM enriquecido com 10% de SFB e distribuídas nas três garrafas. As culturas foram acompanhadas até o momento da colheita, ou congeladas em nitrogênio líquido.

Para a colheita, as culturas foram monitoradas durante as primeiras duas horas após o último repique, para determinar o grau de sobrevivência celular após a “tripsinização” (o que foi determinado pela proporção de células que aderiram ao substrato) e oito a dez horas após o repique, para conferir o número de células entrando em divisão celular (células de formato arredondado e citoplasma refringente). Quando o número destas células na cultura foi significativo, foram adicionados 10 µL de solução de colchicina por cada mL de meio na cultura e continuou-se a incubação por um período entre 20 minutos até no máximo seis horas, observando-se aumento destas células ao longo do tempo em algumas culturas.

No final do tratamento com colchicina, as culturas foram tratadas com solução de tripsina segundo descrito no procedimento de repique. As células foram depois transferidas a tubo de fundo cônico de 15 mL e centrifugadas a 1000 r.p.m. durante 5 minutos, o sobrenadante foi removido e as células foram re-suspendidas lentamente em 6 a 8 mL de solução hipotônica de KCl 0,067M a 37°C, e incubadas por 20 a 30 minutos. As células foram pré-fixadas com 8 a 10 gotas de solução de Carnoy 3:1, centrifugadas a 1000 r.p.m. por 5 minutos e fixadas três vezes com 5 mL de solução de Carnoy 3:1.

Para preparar as metáfases para as análises ao microscópio, as lâminas foram previamente desengorduradas em solução de detergente neutro a 10%, enxaguadas e secadas, passadas em metanol absoluto, passadas em água gelada, escurridas e imediatamente pingadas com o material fixado e secadas ao

ar. As lâminas pingadas foram coradas com solução de Giemsa (1,5 mL de Giemsa, 3 mL de tampão fosfato e 25,5 mL de água destilada) durante sete minutos e analisadas ao microscópio em aumento de 1000X.

Na análise ao microscópio das metáfases, foi feita contagem cromossômica, detalhando-se a morfologia e tamanho de cada cromossomo e posteriormente elas foram desenhadas a lápis. Fez-se de novo a contagem no desenho, para confirmar o número e morfologia vistos ao microscópio. Foram analisadas de 12 a 50 metáfases por animal, e as que mostraram melhor morfologia foram fotografadas em câmera digital AxioCam MRc (Carl Zeiss). As imagens foram capturadas no programa Axiovision e os cariótipos foram montados usando o programa Adobe PhotoShop CS4®.

Os braços dos cromossomos foram medidos para fazer a biometria cromossômica, calculando o comprimento relativo (CR) e a relação de braços ($RB = \text{braço longo } q / \text{braço curto } p$). De acordo com estes parâmetros, os cromossomos foram classificados por forma em metacêntricos (M, $RB = 1,0 - 1,7$), submetacêntricos (sm, $RB = 1,7-3,0$), subtelocêntricos (st, $RB = 3,0-7,0$) e acrocêntricos (7,0-infinito) (GUERRA, 1986) e tamanho, como sendo do grupo A: grandes cromossomos de dois braços, C: pequenos cromossomos de dois braços, D: grandes cromossomos de um braço, E: pequenos cromossomos de um braço e B: cromossomos supranumerários, de número variável e de tamanho igual ou inferior ao cromossomo Y (DUARTE e MERINO, 1997).

Para calibrar a classificação cromossômica, foram medidos os cromossomos do cariótipo de *Mazama gouazoubira*, espécie que se considera que conserva o cariótipo ancestral dos Cervidae (NEITZEL, 1987), e foi definido como ponto de corte entre os cromossomos grandes (A e D) e pequenos (C e E), o valor de 5% do comprimento relativo, por ser o tamanho encontrado no cromossomo 1; de igual forma foram classificados como cromossomos B os que apresentaram comprimento relativo inferior a 0,7%, que corresponde à medida do cromossomo Y. Os cromossomos de tamanho grande (grupos A e D) são geralmente produto

de fusões entre dois ou mais cromossomos, os cromossomos do grupo C são produto de inversões pericêntricas ou de fusões entre cromossomos pequenos, e os cromossomos do grupo E são geralmente cromossomos conservados a partir do cariótipo ancestral (SARRIA-PEREA, 2004; ABRIL et al, 2010).

3.6. Análises moleculares

As amostras de pelo inteiro foram colocadas em tubos de 1,5 cc, centrifugadas a 10.000 r.p.m. por cinco minutos e tratadas com 500 µL de TE-tween a 65°C em banho maria e com agitação periódica por duas horas. Seguidamente foram tratadas com 5 µL de proteinase k a uma concentração final de 3,6 µg/µL a 55°C por seis horas. A proteinase k foi retirada e as amostras foram incubadas a 37°C por uma noite.

No dia seguinte, a extração foi feita com fenol – clorofórmio – álcool isoamílico (PCL) em proporções de volume 1:1. As amostras foram então agitadas em vórtex por 10 segundos e seguidamente centrifugadas a 15.000 r.p.m. por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e transferido a novos tubos.

O DNA nas amostras foi precipitado com acetato de sódio 0,3M em proporção 1:10 de volume de amostra, incrementando o volume 2,5 vezes com etanol absoluto gelado. A mistura foi centrifugada a 14000 r.p.m. a 4°C por 15 minutos e o pellet foi secado ao ar, invertendo o tubo.

As amostras foram re-suspendidas em 100 µL de tampão TE em proporção 1:10 e agitadas por no mínimo 12 horas a temperatura ambiente. O DNA foi medido em espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific Inc). As amostras foram armazenadas em geladeira a 4°C até o seu uso.

Foram testados cinco marcadores moleculares para as análises filogenéticas, sendo quatro deles mitocondriais: citocromo b (Cytb, iniciadores H15149 e L14724 para a sequência de 480 nucleotídeos anelada a 56°C por um minuto, e MH104 e ML103 para a sequência de 1140 nucleotídeos anelada a 54°C por 1 minuto), citocromo oxidase 1 (COI, iniciadores FAR-H, FAR-L, VERTCOIR1

e VERTCOIF1 para anelar a 55 – 56°C por um minuto), citocromo oxidase 2 (CO2, iniciadores U1 e L374 para anelar a 53 °C e U291 e L582 a 57°C por um minuto) e o fragmento hipervariável (D-loop, iniciadores Thr-15910 e DL-H16498 para anelar a 55–65°C por um minuto). O fragmento nuclear testado foi o intron 2 da alfa lactalbumina (α LAlb, iniciadores H+ e L+, para anelar a 60°C por 30 segundos).

Para as reações de amplificação por PCR (reação em cadeia da polimerase, segundo sigla em inglês), foram preparados volumes de reação de 30 μ L, contendo aproximadamente 75 ng de DNA (1,5 μ L de DNA extraído, a uma concentração aproximada de 50 ng/ μ L), 100 pMol de cada iniciador (1,0 μ L de iniciadores diluídos a 100 pMol/ μ L), 5 nMol de mistura de dNTPs (1,0 μ L de mistura de dNTPs diluídos a 5 nMol/ μ L), uma unidade de enzima Taq polimerase Taq Platinum (Life Technologies cat. nº 10966030: 0,2 μ L de enzima diluída a 5 unidades/ μ L), 0,9 mMol de cloreto de magnésio (0,9 μ L de cloreto de magnésio diluído a 1,0 mMol/ μ L), e 0,3X de tampão Platynum (Life Technologies, cat. nº 10966030: 3,0 μ L de tampão, a 0,1x). Os volumes foram completados com água de MilliQ esterilizada.

O protocolo padrão usado para amplificação das sequências pela reação em cadeia da polimerase (PCR) foi o seguinte: desnaturação inicial a 94°C por 5 minutos, seguido de 35 a 40 ciclos, cada um composto de uma fase de desnaturação a 94°C por um minuto, uma fase de anelamento a temperatura variando de 52 a 60°C por um minuto (de acordo com os iniciadores utilizados) e uma fase de extensão a 72°C por um minuto, e finalizando com uma extensão final a 72°C por dez minutos. Os produtos de PCR foram marcados com uma mistura de Gel Red® em azul de metileno, corridos em gel de agarose ao 2% a 100 volts por um período de 30 minutos a uma hora e lidos sob luz ultravioleta no sistema de imagem Gel Doc®.

Os produtos de PCR foram purificados pelo método de digestão enzimática usando uma mistura de 0,5 μ L de diluição de Exonuclease 1, 0,5 μ L de SAP (fosfatase alcalina de camarão), 1 μ L de tampão SAP e 1 μ L de água estéril

deionizada para 7 μL de produto de PCR. A digestão é feita no termociclador, utilizando o seguinte protocolo: 37°C por uma hora, 80°C por 10 minutos.

Para o sequenciamento se usaram 50 μL de produto de PCR (purificado) por reação, a uma concentração mínima de 10 ng/ μL . Esse produto foi amplificado usando os mesmos iniciadores da reação original a uma concentração de 10 pmol/ μL . A mistura para esta reação consta de 1 μL de Big Dye, 2 μL de tampão "Save Money" 5X ((200 mM Tris pH 9,0; 5 mM MgCl₂)), 1 μL de iniciador, 5 μL de água e 1 μL de produto de PCR. O protocolo da amplificação foi feito em 36 ciclos do seguinte protocolo: três minutos a 95°C, 30 segundos a 95°C, 20 segundos à temperatura de anelamento do iniciador e quatro minutos a 60°C (Figura 2).

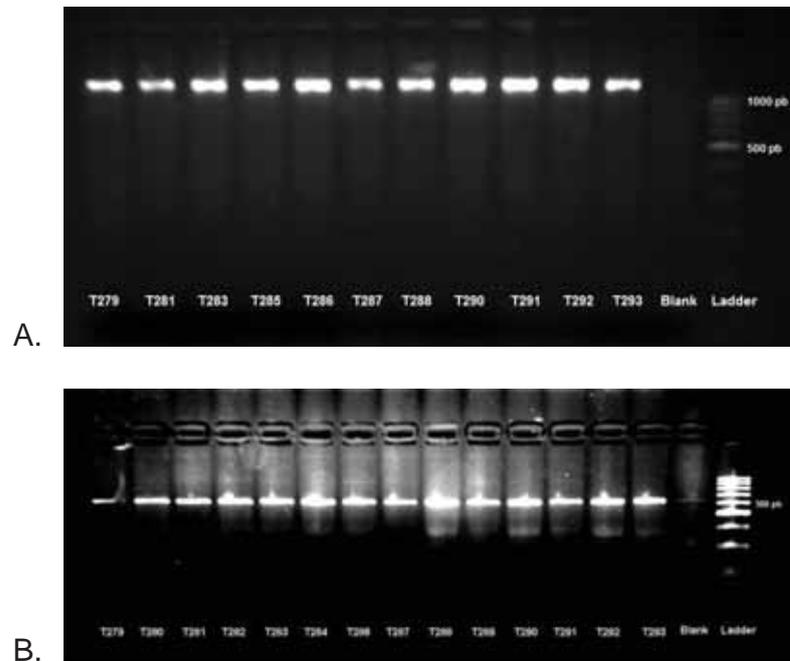


Figura 2.– Bandas em gel de agarose 2% da (A) Cytb de mais de 1000 nucleotídeos usando os iniciadores ML103 e MH104 e da (B) CO2 entre 500 e 600 nucleotídeos usando os iniciadores L582 e U1 (B).

Para a leitura no sequenciador, foi acrescentado ao produto 80 μL de isopropanol 75%, se levou ao vórtex, se deixou à temperatura ambiente e protegido da luz durante 15 minutos, se centrifugou a 3200 r.p.m. durante 45 minutos, se descartou o sobrenadante, se acrescentou 150 mL de etanol 70%, se

centrifugou a 3200 r.p.m. durante 15 minutos, se deu um breve spin com a placa invertida sobre papel e se secou em estufa 37°C durante 10 minutos.

As seqüências foram analisadas e alinhadas no programa MEGA5 (TAMURA et. al, 2011), conjuntamente com as obtidas do GenBank. Foram amplificados fragmentos da Cytb de até 1.160 nucleotídeos nos 15 animais analisados. Calculou-se a matriz de distâncias pelo método de bootstrap com 1.000 replicações usando o modelo de substituição de nucleotídeos de TAMURA e NEI (1993) e seguindo a distribuição Gamma com cinco parâmetros A matriz de seqüências foi completada adicionando outras 17 seqüências extraídas do GenBank, sendo oito provenientes do trabalho de DUARTE et al. (2008): *Mazama americana* (Para) DQ789221.2, *Mazama americana* (Rondonia) DQ789217.2, *Mazama bororo* DQ789231.2, *Mazama nana* DQ789210.2, *Mazama nemorivaga* DQ789226.2, *Mazama gouazoubira* DQ789184.2, *Mazama gouazoubira* DQ789186.2, *Mazama gouazoubira* DQ789185.2, duas provenientes do trabalho de GILBERT et al. (2006): *Mazama gouazoubira* DQ379308.1, *Mazama* sp AJ00027.1; duas do trabalho de HASSANIN et al. (2012): *Pudu mephistophiles* JN632691.1, *Mazama rufina* JN632661.1; e outras cinco seqüências extraídas aleatoriamente do GenBank: *Odocoileus hemionus* HM222707.1, *Odocoileus virginianus* AY607035.1, *Pudu puda* AY607039.1, *Blastoceros dichotomus* AY607038.1, e *Rangifer tarandus* AB245426.1, como grupo externo.

A reconstrução filogenética foi feita pelos métodos de máxima verossimilhança e por inferência Bayesiana. O modelo de substituição para a análise de máxima verossimilhança, selecionado pelo método hierárquico no programa Mega 5 (TAMURA et al. 2011), foi o de TAMURA e NEI (1993), o qual assume taxas de substituição diferentes entre transições e transversões e diferenças entre os tipos de transição. Para a inferência Bayesiana escolheu-se um modelo equivalente, de HASEGAWA et al. (1985), o qual usa o parâmetro k (razão transição / transversão) e assume diferenças nas taxas de substituição das quatro bases. Para modelar as diferenças nas taxas evolutivas entre sítios

assumiu-se nos dois métodos uma distribuição discreta *Gamma* com cinco categorias e um parâmetro *G* calculado em 3,11 e 59,7% dos sítios evolucionariamente invariáveis. Na análise de máxima verossimilhança foram efetuadas 1000 réplicas e a árvore consenso foi calculada com bootstraps (bst) acima de 70%. Na inferência Bayesiana, foram calculadas as taxas de substituição em 1'000.000 de gerações e a frequência de amostragem para construção das árvores foi a cada 10 gerações. A árvore consenso foi calculada após descartar 25% das amostras. O método de máxima verossimilhança foi corrido no programa MEGA5 (TAMURA et al., 2011) e o de inferência Bayesiana foi efetuado no programa MrBayes 3.1 (RONQUIST et al., 2005).

Os tempos de divergência foram calculados no programa MEGA5, calibrando o relógio molecular em 5 milhões de anos no nó de separação entre os clados (*B. dichotomus* + *P. puda*) e (*M. americana* + *Odocoileus* sp.), segundo DUARTE et al. (2008).

IV. RESULTADOS

4.1. Morfologia externa:

De acordo com os padrões cromatogênicos e de morfologia externa, foram identificados quatro morfotipos, dois de veados vermelhos e dois de veados cinza, os quais coincidiram na sua descrição e distribuição geográfica com os previamente publicados na literatura. Os morfotipos são descritos a continuação:

4.1.1. Morfotipo 1 – Encontrado no espécime T280. Corpo pequeno e robusto, 47 cm de alçada e 12 kg de peso, pelagem comprida e densa no corpo inteiro, cor castanha escura no dorso que vai clareando até ficar amarelo queimado no ventre, garganta, queixo e face interna dos braços e pernas; cor marrom escura quase preta no pescoço, cabeça, calcanhares e extremo superior da cauda; face de cor preta; pequenas manchas brancas no maxilar superior e na região ventral da cauda; chifres curtos, finos e levemente inclinados para trás da linha do rosto (Figura 3).



Figura 3. – Morfotipo 1. Veado vermelho das florestas altoandinas e paramos próximos de Bogotá, na Cordilheira Oriental colombiana. A) Detalhe do rosto; B) vista ventral do corpo; C) vista lateral do corpo. Fotos: José Maurício Barbanti Duarte.

4.1.2. *Morfotipo 2* – Encontrado nos espécimes T283, T287, T289 e T291. Corpo médio membros compridos, alçada entre 55,7 a 58,8 centímetros e peso entre 20,77 e 26,33 quilogramas, pelagem densa, longa principalmente na região posterior do corpo e pernas e na frente; cor marrom escura misturada com pelos alaranjados que se concentram principalmente na borda posterior das pernas e braços; cor amarelada ao longo de toda a região ventral do corpo desde o pescoço até a virilha, períneo, face interna das pernas, braços e calcanhares; faixa

periorbitaria ampla e de cor amarelo intenso; uma pequena mancha esbranquiçada no lábio superior e uma mancha branca na face interna da cauda. Chifres relativamente finos nos machos, aparentemente retos com respeito à linha lateral do rosto. (Figura 4).



Figura 4. – Morfofoto 2: Veado marrom da Cordilheira Oriental. A) Detalhe do rosto; B) vista ventral do corpo; C) vista lateral do corpo. Fotos: José Maurício Barbanti Duarte.

4.1.3. *Morfofoto 3* – Encontrado nos espécimes T279, T281 e T282. Corpo médio e esbelto, algo mais leve que no morfofoto 2, alçada entre 53,46 a 55,54 centímetros e peso entre 14,84 e 23,16 quilogramas, pelagem curta e densa; tufo marrom na frente; cor ocre a marrom clara no dorso do corpo e de creme pálido a

branco ao longo da região ventral desde a parte ventral do queixo e garganta, passando pela face interna dos braços até chegar na virilha e se estende pela face interna das pernas, períneo e face ventral da cauda; cor cinzenta clara no pescoço, rosto e calcanhares; manchas brancas nos lábios superior e inferior; chifres longos e robustos, levemente inclinados para frente da linha lateral do rosto. (Figura 5).



Figura 5. – Morfofoto 3: Veado marrom da região Caribe colombiana. A) detalhe do rosto; B) vista ventral do corpo; C) vista lateral do corpo. Fotos: José Maurício Barbanti Duarte.

4.1.4. *Morfotipo 4* – Encontrado nos espécimes T284, T285, T288, T290, T292 e T293. Corpo médio e um pouco mais robusto que no morfotipo 2, alçada entre

49,89 e 56,11 centímetros, peso entre 19,96 e 22, 24 quilogramas, pelagem densa e curta; cor castanha amarronzada a castanho queimada de forma uniforme ao longo do corpo, exceto na região da virilha, onde tem uma cor branca que se estende ao longo da face interna das pernas, períneo e cauda. Esta pelagem se apresenta misturada com pelos cinzentos no peito, pescoço, frente e face e é cinzenta esbranquiçada nas bochechas e garganta. Manchas brancas no lábio superior e inferior, na face inferior da mandíbula e na garganta. Alguns animais apresentam pequenas áreas brancas na região axilar (Figura 6).

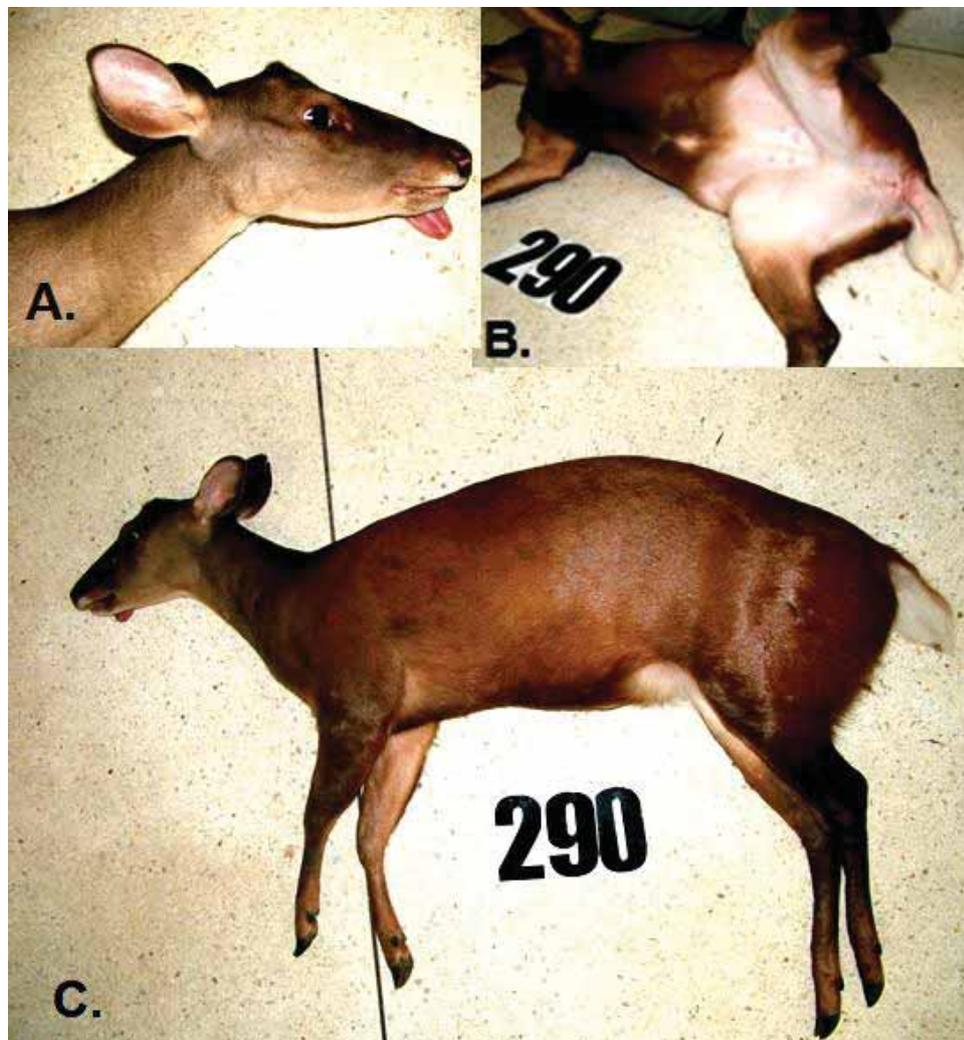


Figura 6. – Morfotipo 4: Veado vermelho da região da Cordilheira Central e o Maciço Colombiano.. A) detalhe do rosto; B) vista ventral do corpo; C. vista lateral do corpo. Fotos: José Maurício Barbanti Duarte.

4.1.5. *Morfotipo híbrido* – Encontrado no espécime T286, nascido em cativeiro no zoológico Santa Fe, apresentou características intermediárias entre os morfotipos 2 e 3, sendo a cor do dorso e os campos cromatogênicos do rosto similares aos do morfotipo 2, porém com a pelagem ventral branca, como no morfotipo 3 (Figura 7).

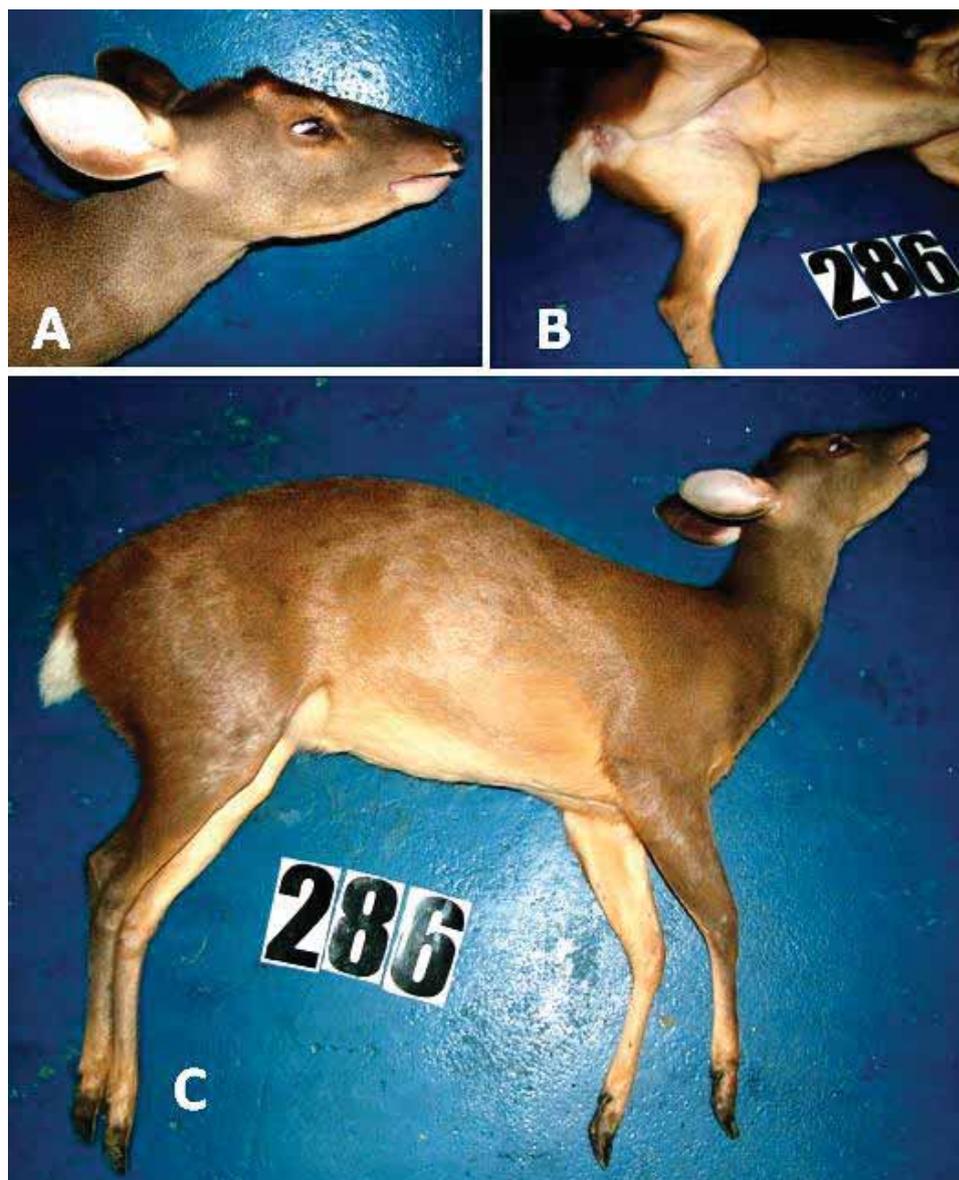


Figura 7. – Morfotipo híbrido. Espécime T286, nascido no zoológico Santa Fe. A) detalhe do rosto; B) vista ventral do corpo; C. vista lateral do corpo. Fotos: José Maurício Barbanti Duarte.

4.2. Análise de componentes principais das medidas morfométricas

Determinaram-se sete medidas ósseas e quatro medidas não ósseas. As medidas ósseas mostraram em geral baixas porcentagens de variação em todos os citótipos, menos a medida largura da mandíbula, que foi do 15% no morfotipo 2. As porcentagens de variação foram igualmente baixas nas medidas não ósseas, menos no morfotipo 3 onde todas, menos o comprimento da orelha, apresentaram valores altos (tabela 5)

Tabela 5. – Medidas morfométricas por morfotipo. Media geral (M) desvio padrão geral (DP) e porcentagem de variação (%). Para cada morfotipo (Ni) foi calculad também a média (m) e o desvio padrão (dp). Entre parênteses aparece o número de indivíduos por morfotipo (n). O morfotipo 1 tem só um indivíduo na amostra.

Medida	Geral			N1(n=1)			N2 (n=4)			N3 (n=3)			N4 (n=6)		
	<i>M</i>	<i>DP</i>	%	<i>m</i>	<i>dp</i>	%	<i>m</i>	<i>dp</i>	%	<i>m</i>	<i>dp</i>	%	<i>m</i>	<i>dp</i>	%
ósseas	Comprimento de cabeça	22,0	1,5	7%	19,0	23,5	0,8	3%	22,0	0,3	1%	21,0	1,1	5%	
	Largura de cabeça	8,4	0,5	6%	7,5	8,2	0,5	6%	8,5	0,3	3%	8,5	0,4	5%	
	Distância entre olhos	5,0	0,4	8%	4,1	4,9	0,3	5%	5,3	0,3	5%	4,9	0,3	5%	
	Largura da mandíbula	7,0	0,7	10%	6,5	7,4	1,1	15%	6,6	0,9	13%	7,0	0,3	4%	
	Comprimento do metacarpo	12,5	1,1	9%	10,0	13,8	0,5	3%	12,5	0,5	4%	12,5	0,9	7%	
	Comprimento do metatarso	20,8	1,6	8%	17,0	22,3	0,7	3%	20,5	0,5	2%	20,0	1,3	6%	
	Altura	54,3	3,6	7%	47,0	57,3	1,6	3%	54,5	1,0	2%	53,0	3,1	6%	
Comprimento do corpo	78,3	6,3	8%	62,0	82,5	1,7	2%	73,0	5,8	8%	75,0	4,0	5%		
Não ósseas	Comprimento da Orelha	9,3	0,8	9%	7,5	10,5	0,4	4%	9,2	0,2	2%	9,2	0,6	6%	
	Perímetro do pescoço	27,0	1,9	7%	26,5	26,5	2,2	8%	24,5	4,0	16%	27,0	0,8	3%	
	Perímetro do tórax	61,0	8,6	14%	52,0	62,0	2,5	4%	56,0	19,4	35%	61,0	1,4	2%	
	Perímetro do abdômen	67,3	7,7	11%	52,5	67,3	1,6	2%	63,0	15,0	24%	67,5	3,1	5%	

A análise das variáveis morfométricas gerou sete componentes principais, só os dois primeiros tiveram valores acima de um e representaram cerca de 80% da informação original, portanto foram selecionados (Tabela 6).

Tabela 6. – Autovalores da matriz de correlações das variáveis originais e estatísticas relacionadas. Os dois primeiros autovalores estão acima de 1 (critério de Kaiser) e representam quase 80% da variação dos dados, portanto podem ser utilizados na análise de componentes principais.

Valor	Autovalor	% Total variância	Autovalor acumulado	Acumulado %
1	3,968615	56,69450	3,968615	56,6945
2	1,616349	23,09071	5,584965	79,7852
3	0,731192	10,44560	6,316157	90,2308
4	0,350802	5,01146	6,666959	95,2423
5	0,159289	2,27556	6,826248	97,5178
6	0,124799	1,78285	6,951048	99,3007
7	0,048952	0,69932	7,000000	100,0000

As variáveis de maior contribuição no primeiro fator foram comprimento de metacarpo e comprimento de metatarso, seguidas do comprimento da cabeça; no segundo fator, a variável de maior contribuição foi largura da cabeça, seguida da distância entre olhos (Tabela 7).

Tabela 7. – Contribuições das variáveis originais, em cada fator.

Variável	Fator 1	Fator 2	Fator 3	Fator 4	Fator 5	Fator 6	Fator 7
Comp. da cabeça	0,20	0,07	0,02	0,00	0,08	0,29	0,33
Largura da cabeça	0,03	0,44	0,07	0,20	0,15	0,10	0,00
Comp. da orelha	0,17	0,09	0,12	0,08	0,46	0,05	0,04
Distância entre olhos	0,09	0,24	0,05	0,58	0,01	0,02	0,00
Largura da mandíbula	0,07	0,13	0,66	0,03	0,11	0,00	0,00
Comp. do metacarpo	0,22	0,03	0,05	0,03	0,15	0,00	0,52
Comp. do metatarso	0,22	0,01	0,02	0,08	0,04	0,53	0,10

Ao projetar as coordenadas dos espécimes no plano de autovetores, houve superposição entre os grupos formados pelo morfotipo 3 e o morfotipo 4 (figura 7).

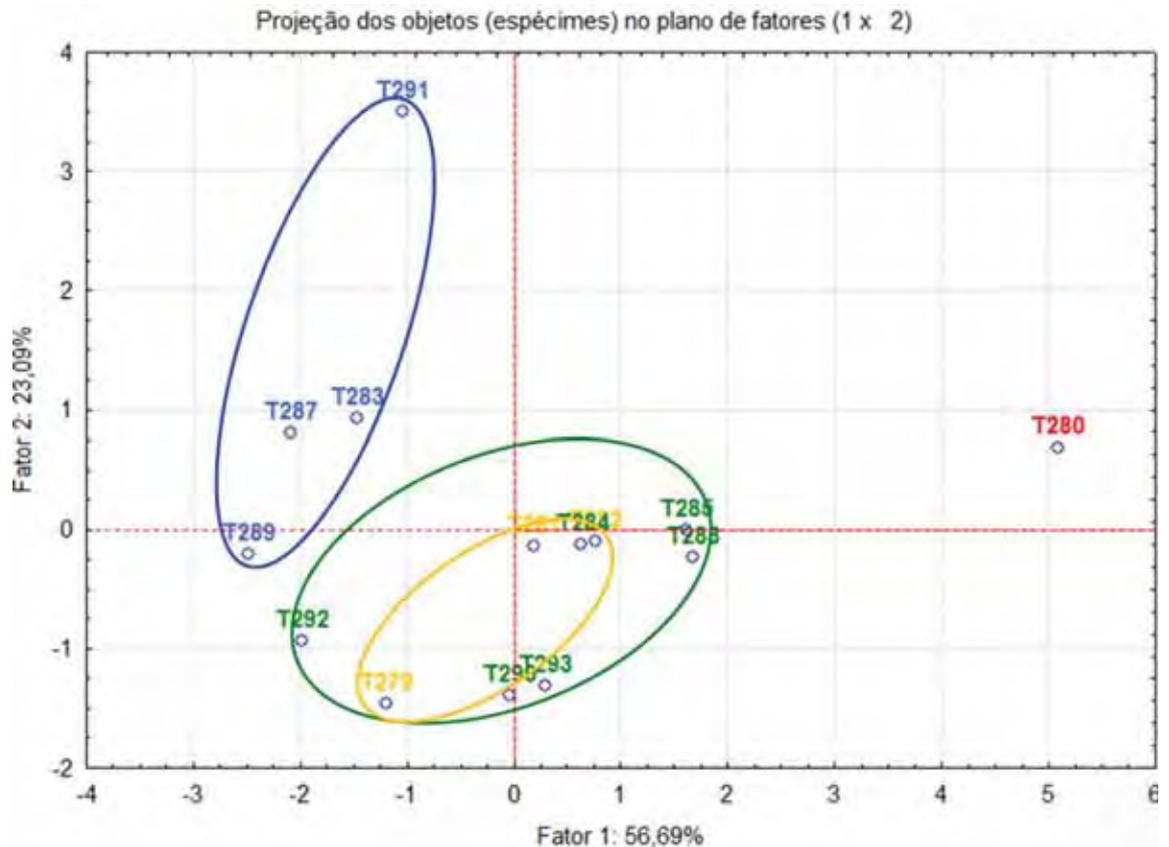


Figura 7. – Projeção dos objetos (espécimes) no plano de autovetores (fatores) 1 x 2, utilizando os valores originais: morfo tipo 1=vermelho, morfo tipo 2=azul, morfo tipo 3=amarelo; morfo tipo 4=verde.

4.3. Análises citogenéticas: descrição de cariótipos

Foram analisados os cariótipos dos 15 animais amostrados, obtendo-se um total de seis cariótipos diferentes, todos eles novos para ciência

4.3.1. Morfo tipo 1

O cariótipo deste morfo tipo é $2n=60$ XY, NF=62, D=5, E=24, X=m, Y=M. Todos os autossomos são acrocêntricos, e o cromossomo X é submetacêntrico e com um comprimento relativo de aproximadamente 5% (Figura 10).

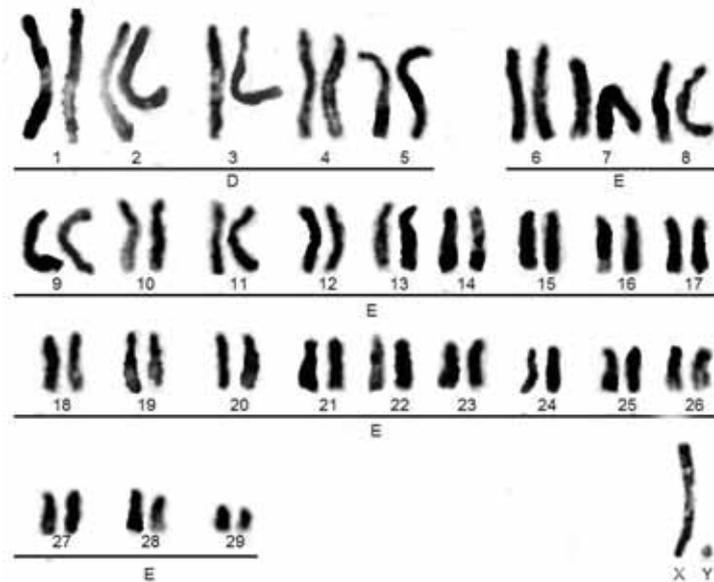


Figura 10. – Cariótipo do morfotipo 1 sob coloração de Giemsa:

4.3.2. Morfotipo 2

Foram encontradas duas variantes cariotípicas, a primeira no espécime T290, com $2n=66XY+3-4B$, $NF=68$, $D=4$, $E=60$, $X=m$, $Y=M$, sendo todos os autossomos acrocêntricos e o cromossomo X submetacêntrico e com um comprimento relativo de aproximadamente 5% (Figura 11A). A segunda variante foi encontrada nos espécimes T283, T287 e T289 e apresentou heteromorfismo para uma fusão Robertsoniana entre dois autossomos do grupo E (Figura 11B)

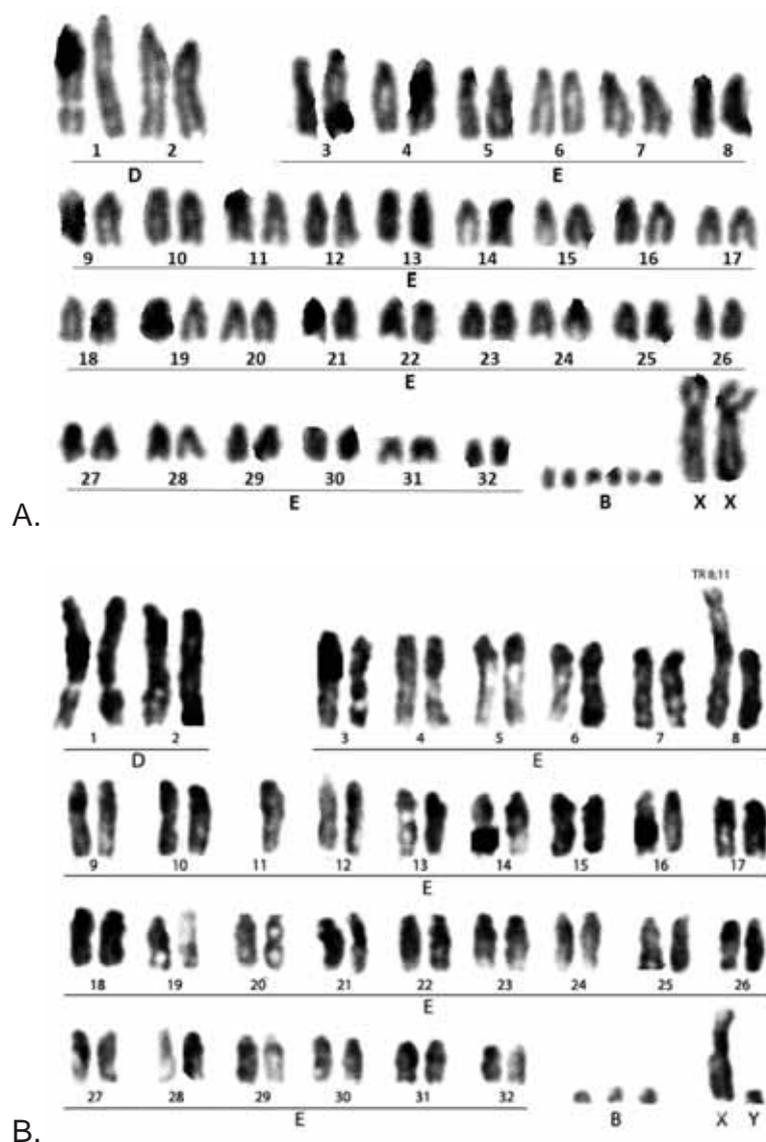


Figura 11. – Cariótipo do morfotipo 2, sob coloração de Giemsa. A) cariótipo padrão, B) variante heteromórfica para uma fusão cêntrica entre dois cromossomos do grupo D.

4.3.3. Morfotipo 3

Foram encontradas igualmente duas variantes cariotípicas, a primeira esteve presente no indivíduo T281 e teve $2n=64XY+3-4B$, $NF=70$, $A=4$, $D=2$, $E=56$, o cromossomo X é metacêntrico e tem comprimento relativo de cerca do 5% e o Y é metacêntrico (Figura 12A). A outra variante cariotípica esteve presente no espécimes T279 e T282 e teve $2n=63+3-4B$, $NF=70$, apresentando

heteromorfismo para uma fusão Robertsoniana entre dois autossomos (Figura 12B)

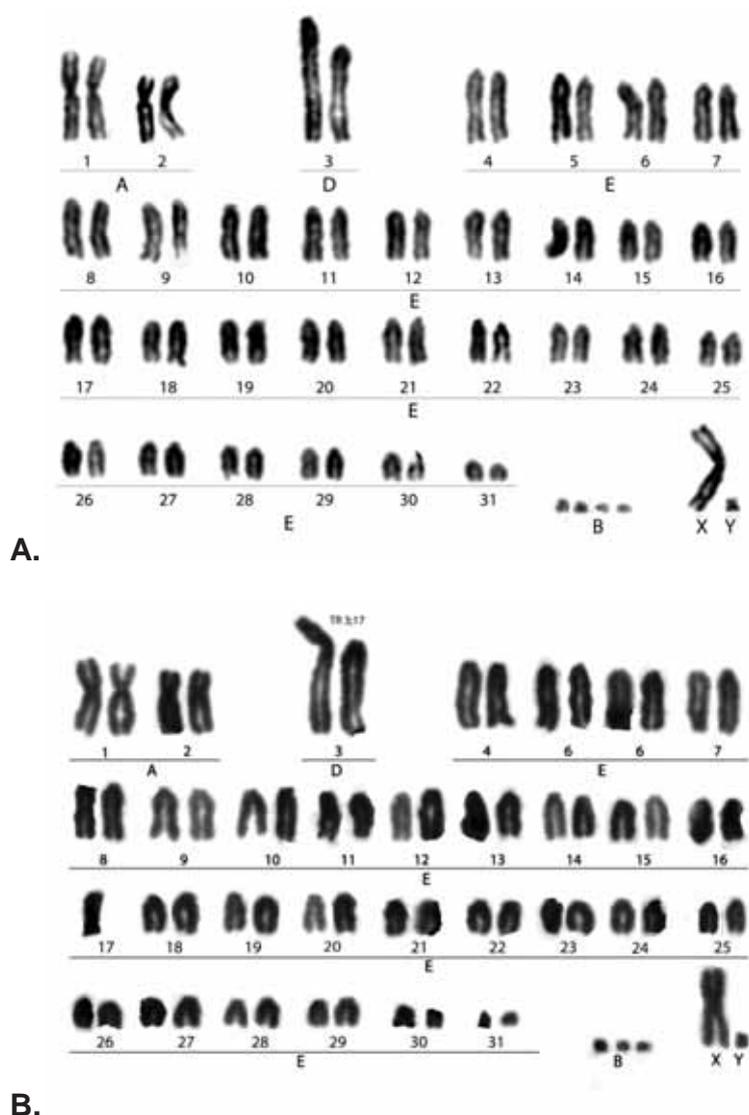


Figura 12. – Cariótipos não bandeados do morfotipo 3 *Mazama* sp.:Caribe colombiano, sob coloração de Giemsa. A) Cariótipo padrão; B) variante cariotípica apresentando uma fusão cêntrica em estado heteromórfico.

4.3.4. Morfotipo 4

Este morfotipo apresentou duas variantes cromossômicas com 18 cromossomos de diferença. A primeira variante, $2n=44XX$, $NF=62$, $A=10$, $C=6$, $E=26$, $X=M$ correspondeu aos indivíduos de São Jerónimo – Antioquia e Tolima,

na região centro-norte da Cordilheira Central (Figura 13A). A segunda variante, $2n=62XY$, $NF=78$, $A=2$, $C=12$, $E=46$, $X=M$, $Y=M$, foi encontrada nos dois indivíduos do Cauca, no Maciço Colombiano, (Figura 13B). Nas duas variantes, o cromossomo X apresentou-se metacêntrico e com um comprimento relativo do 5%.

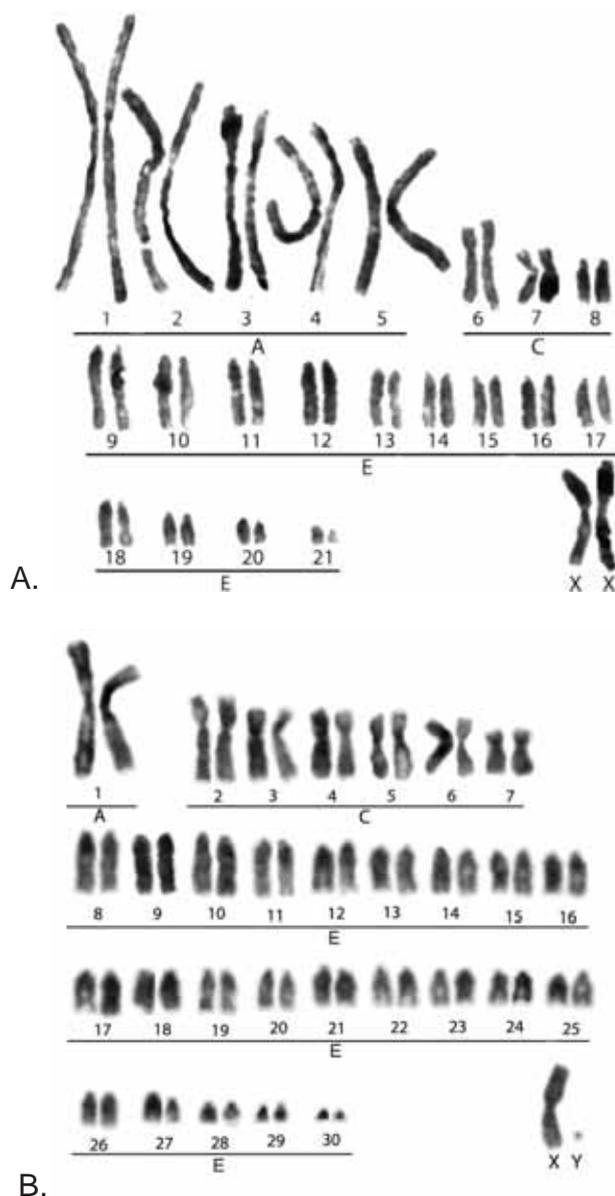


Figura 13. – Variantes cariotípicas encontradas no Morfotipo 4: *Mazama* sp. (Centro-norte da Cordilheira Central e Maciço Colombiano). A) população do Centro-norte da Cordilheira Central: $2n=44$ e $NF=62$; B) população do Maciço Colombiano: $2n=62$ e $NF=78$.

4.3.5. Cariótipo híbrido:

O espécime T286 apresentou um cariótipo híbrido entre os morfotipos 2 e 3. Foi possível diferenciar as unidades cromossômicas características dos dois cariótipos, e desta forma recompor os cariótipos haplóides de cada um por separado. Porém houve uma grande homologia entre os cromossomos do grupo E dos dois cariótipos. O complemento haplóide correspondente ao morfotipo 2 apresentou $n=32$ X, D=2, E=29, X=SM; o complemento haplóide correspondente ao morfotipo 3: apresentou $n=31$ X, A=3, E=27, X=M (Figura 14).

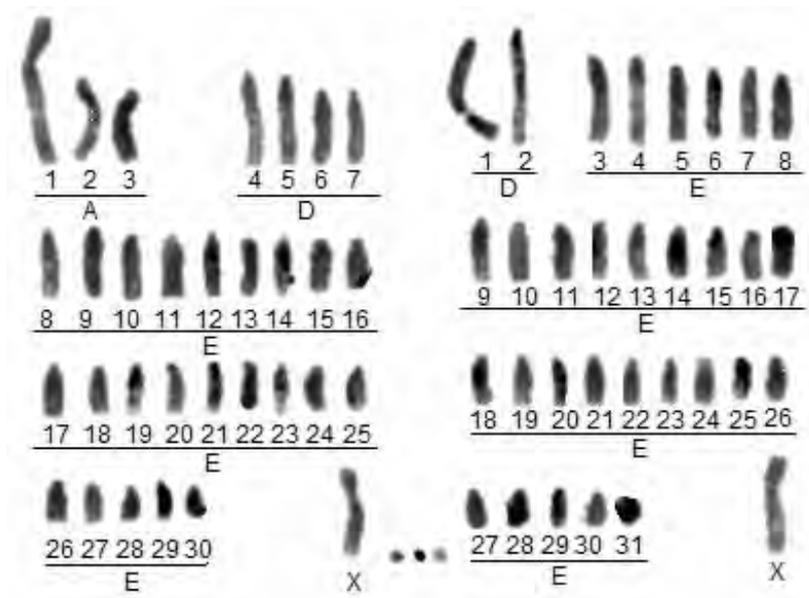


Figura 14. – Cariótipo não bandeado do indivíduo híbrido T286. Direita: cariótipo haploide $n=32$, X correspondente ao morfotipo 2; esquerda, cariótipo haplóide $n=31$, X correspondente ao morfotipo 3.

4.5. Análise de filogenia molecular

Dos cinco marcadores testados só foram obtidas sequências adequadas da Cytb e da COII. Da primeira foi possível obter nove sequências de até 1160 nucleotídeos nos 15 espécimes analisados, porém só foi possível alinhar um total de 979 nucleotídeos para correr as análises. Da COII obtiveram-se sequências de aproximadamente 520 nucleotídeos só nos espécimes do morfotipo 4.

Devido a disponibilidade de seqüências da *Cytb* no GenBank das espécies de interesse, optou-se por fazer as duas análises usando só este marcador. Não foram encontradas sequências disponíveis da COII das espécies *M. nana*, *M. bororo*, *M. nemorivaga* nem *H. bisulcus*. Foi possível observar que os resultados foram semelhantes usando os dois métodos testados, obtendo-se bootstraps e probabilidades posteriores acima do 80% nos nós mais relevantes (Figuras 15 e 16 respectivamente).

Nas análises feitas no presente estudo, formaram-se dois cladogramas maiores, o primeiro agrupando o morfotipo 1 junto a *Mazama rufina* e *Pudu mephistophiles*, e um segundo agrupando o resto das espécies da família Odocoileini. O nó deste grupo teve um suporte baixo na análise de máxima verossimilhança (bst=50). Já os dois cladogramas surgidos a partir deste nó têm suportes bem mais sólidos. O primeiro, o que agrupa as espécies de *Mazama* vermelhos junto ao gênero *Odocoileus*, teve bst=99 e pp (probabilidade posterior)=100; como estas espécies podem ocorrer tanto na América do Norte como na América Central e do Sul, este clado maior será chamado de clado Pan-americano. O segundo clado, que reúne as espécies de *Mazama* marrons junto a *P. puda* e *B. dichotomus*, teve bst=81 e pp=96; devido a que as espécies neste clado maior só ocorrem na América do Sul, ele será chamado de clado Sul-americano.

O morfotipo 4 dividiu-se em dois subclados, o primeiro reunindo os espécimes de San Jerónimo e o espécime de Tolima (bst=95, pp=94) e o segundo reunindo os espécimes de Bolívar e Mercaderes no Cauca (bst=64, pp=72). O nó que reuniu estes dois grupos foi solidamente suportado com bst=99 e pp=100. Assim mesmo, o morfotipo 4 se agrupou ao lado de *M. temama* (*Mazama* sp AJ0027.1), formando um clado cujo nó foi também solidamente suportado com bst=98 e pp=100. Na inferência bayesiana, este clado agrupou ao lado do clado conformado pelas espécies de *Mazama* vermelho que ocorrem abaixo da Cordilheira dos Andes (ou complexo *M. americana*/*M. bororo*/*M. nana* – ABRIL et al., 2010) com um nó consistente, de pp=97. Este nó não foi evidenciado na

análise de verossimilhança, onde estes dois clados acima mencionados formaram uma tricotomia junto ao clado que reúne as duas espécies de *Odocoileus* (bst=99).

Embora o clado Sul-americano seja robusto, as relações filogenéticas entre os táxons que o compõem não ficam muito claras. A sequência de *M. gouazoubira* DQ379308.1, do trabalho de GUILBERT et al. 2006, agrupou junto à sequência de *M. nemorivaga* DQ789226.2 de DUARTE et al. (2008) de forma robusta (bst=99, pp=100). Uma vez que o status taxonômico por análises morfológicas e citogenéticas foi plenamente estabelecido só no segundo espécime, deduz-se que houve erro na identificação taxonômica do primeiro e que se trata na verdade de duas sequências de *M. nemorivaga*.

As sequências do morfotipo 2 formaram um clado único fortemente suportado (bst=100, pp=100) e ao mesmo tempo, este grupo esteve inserido de forma consistente dentro do das outras três seqüências de *M. gouazoubira*, todas do trabalho de DUARTE et al. (2008) (bst=99, pp=100). Ao igual que com *M. nemorivaga*, os espécimes dos que se extraíram estas sequências foram plenamente identificados por métodos morfológicos e citogenéticos. Este clado complexo esteve suportado, em ambas as análises, por um nó de consistência alta ao lado de *B. dichotomus* (bst=82, pp=97).

As sequências do morfotipo 3 formaram um clado exclusivo e de consistência muito alta sustentado por um nó de bst=100 e pp=100. Nele esteve incluída a sequência T286, cuja identidade taxonômica não foi bem definida. Da mesma forma, este clado se agrupou ao lado do clado *B. dichotomus*/(*M. gouazoubira*/morfotipo 2), formando um nó pouco consistente (bst=45, pp=60).

Finalmente, a posição da espécie *P. puda* não fica bem resolvida, uma vez que o nó relacionando-a com as outras espécies do clado Sul-americano colapsa ao ter baixos valores (bst= 39, pp=50).

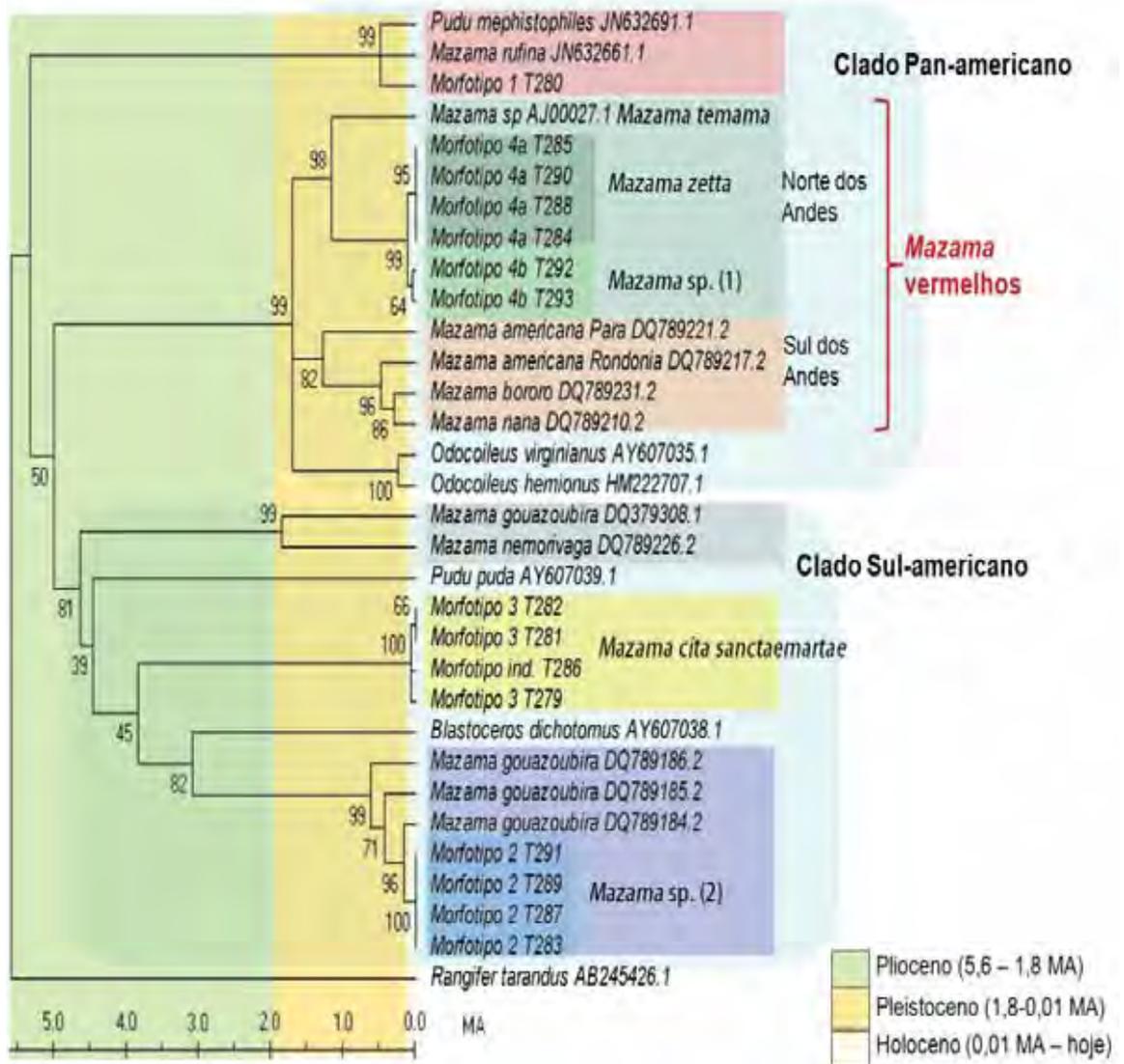


Figura 15. – Árvore filogenética dos cervídeos da tribo Odocoileini, gerada pelo método da máxima verossimilhança (ML), incluindo 15 sequências de *Mazama* da Colômbia (Morfolotipo). Baseado no modelo de Tamura-Nei (1993). A árvore de consenso foi gerada a partir de 1000 réplicas, pelo método de bootstrap (bst). Os ramos com bst < 80% estão colapsados. Estes valores são mostrados próximo aos ramos. As árvores iniciais foram calculadas automaticamente pelo método de máxima parcimônia, quando o número de sítios comuns foi menor que 100 ou foi menos que o 25% do número total sítios; no caso contrário, usou-se o método BIONJ com matrizes de distância MCL. Para modelar as diferenças nas taxas de substituição entre sítios, usou-se a distribuição Gamma (5 categorias e parâmetro +G= 3,11). A taxa de evolução do modelo permitiu que alguns sítios fossem evolutivamente invariáveis (+I= 59,73%). A árvore foi feita em escala, sendo medida a longitude dos ramos de acordo com o número de substituições por sítio. A análise incluiu 32 sequências e as posições dos códons incluíram a 1a, a 2a e a 3a posições além das não codificantes. Houve no total 979 posições na matriz final. A análise foi feita no programa MEGA5.

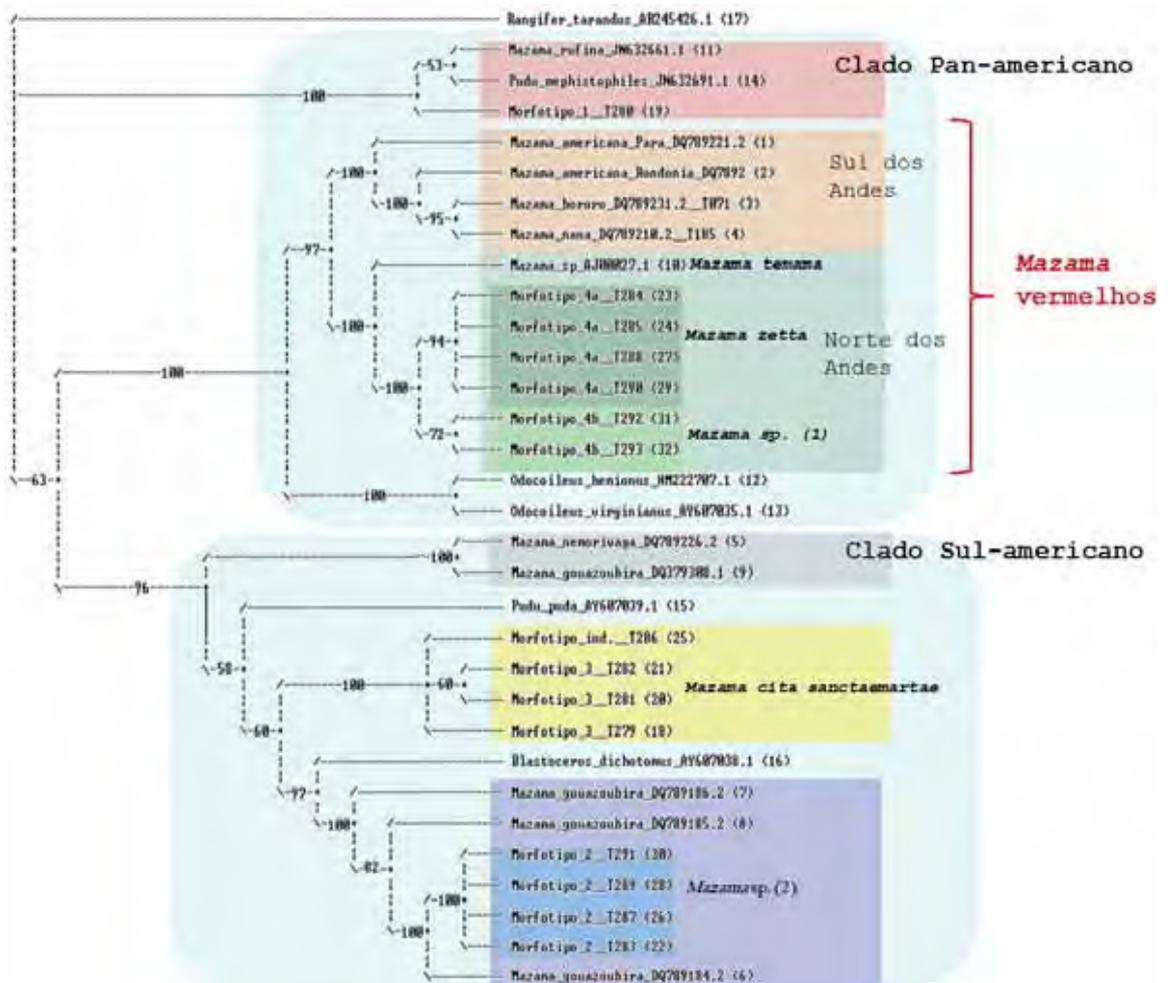


Figura 16. – Árvore filogenética de consenso pelo método de inferência Bayesiana dos cervídeos da tribo Odocoileini, incluindo 15 seqüências de *Mazama* da Colômbia (Morfolotipo), foram calculadas as taxas de substituição em 1'000.000 de gerações e a freqüência de amostragem para construção das árvores foi a cada 10 gerações. A árvore consenso foi calculada após descartar 25% das amostras. A análise incluiu 32 seqüências e as posições dos códons incluíram a 1a, a 2a e a 3a posições além das não codificantes. Houve no total 979 posições na matriz final. A análise foi feita no programa MrBayes 3.1.

V. DISCUSSÃO

Pelas características descritas no presente estudo, o morfolotipo 1 corresponde à espécie *Mazama bricenii* THOMAS (1908). Este autor destaca como características principais o tamanho reduzido e a presença de fossas lacrimais profundas; esta última característica não pôde ser confirmada devido ao

animal estar vivo. O holótipo desta espécie encontra-se depositado no Museu de História Natural em Londres (espécime NHM-5.7.5.18.). Esta espécie tem sido considerada por alguns autores como sinonímia de *M. rufina*, devido às enormes semelhanças fenotípicas, porém, a existência de descontinuidade geográfica importante entre as duas espécies, a primeira nas cordilheiras da Venezuela e norte da Colômbia e a segunda nas cordilheiras de Peru, Equador e sul da Colômbia até a cordilheira central, seria difícil considerá-las uma única espécie (ALLEN, 1915; LIZCANO et al., 2010b). Recentemente, foi proposta uma distribuição que iria desde o parque El Tamá entre os estados de Táchira e Apure na Venezuela até o Parque Nacional Natural El Cocuy entre os departamentos de Arauca, Casanare e Boyacá ao norte da Colômbia (LIZCANO et al., 2010b). Esta distribuição pode estender-se mais ao sul da Cordilheira Oriental colombiana, uma vez que se tem conhecimento de pequenas populações desta espécie no Maciço de Mamapacha no departamento de Boyacá e no Parque Nacional Natural Chingaza em Cundinamarca, a menos de 100 quilômetros de Bogotá D.C., no centro da cordilheira (com. pess. Dr. Olga Montenegro; obs. pess). Embora a origem exata do indivíduo analisado no presente estudo seja incerta, sabe-se que veio de alguma reserva de bosque alto andino ou páramo mais ao centro do país, perto de Bogotá D.C.

Na análise molecular, é interessante ver como este espécime formou um mesmo clado junto com *M. rufina*, o qual apresentou um nó de consistência forte (bst=99, pp=100). De acordo com o relógio molecular no presente estudo, este foi um terceiro grande clado basal, que divergiu precocemente há aproximadamente 5,5 milhões de anos aproximadamente, inclusive antes da divergência entre os clados Pan-americano e Sul-americano. Por um lado, estes resultados estariam confirmando a origem comum de *M. bricenii* e *M. rufina* ou inclusive indicando a possibilidade que se trate da mesma espécie. Estas afirmações podem ficar em dúvida, e tratar-se na verdade só de *M. bricenii*, dado a incerteza taxonômica dos espécimes incluídos nas análises de HASSANIN et al. (2012), o que foi admitido pelos mesmos autores ao descobrir que o espécime identificado como sendo *P.*

mephistophiles agrupou surpreendentemente junto a *M. rufina*. Por outro lado, estaria sendo comprovada a sua condição de espécie antiga, porém isto diverge grandemente do obtido por HASSANIN et al. (2012), onde o nó *M. rufina*/*P. mephistophiles* aparece como clado irmão do clado *Odocoileus* sp/*M. americana*. O resultado do presente estudo pode ser devido ao tamanho da sequência, de 979 nucleotídeos, que é consideravelmente menor comparado ao trabalho de HASSANIN et al. (2012) de 14.902 nucleotídeos. Estas hipóteses deverão ser testadas aumentando o número de espécimes a analisar, da precisão na identificação taxonômica e do tamanho das sequências a serem estudadas.

No que se refere ao cariótipo deste morfotipo, apresentou-se como evoluindo aparentemente só a partir de fusões em tandem. Este tipo de rearranjo tem sido visto em outras espécies da tribo Odocoileini, como *M. americana*, *M. bororo*, *M. nana* e *M. nemorivaga* (ABRIL et al., 2010; SARRIA-PEREA, 2004) e difere do visto em outras espécies do grupo como *Ozotoceros bezoarticus* e *B. dichotomus*, que evoluíram a partir de sucessivas fusões cêntricas (JORGE e BENIRSCHKE, 1977; DUARTE e GIANNONI, 1995a, b). Porém, devido ao isolamento precoce deste táxon, é mais provável que este processo evolutivo tenha ocorrido de maneira independente.

De maneira interessante, o morfotipo 2 foi morfologicamente semelhante a *Mazama gouazoubira* (AZARA, 1801). Isto coincidiu com os resultados das duas análises filogenéticas, nas quais os quatro haplótipos deste morfotipo formaram um nó altamente consistente junto com *M. gouazoubira*, com bst=99 e pp=100. Até agora se acreditava que a distribuição desta espécie ia desde a Argentina ao sul do continente até a Bolívia e Brasil, tendo a floresta amazônica como limite superior é ao norte do continente, onde supostamente é substituída por *M. nemorivaga* (BLACK-DÉCIMA et al., 2010). Só se tem notícia de um espécime semelhante a esta espécie no Museu de História Natural de Londres cujo número de espécime é o NHM- 97.1.5.20, o qual foi identificado com o nome de *M. simplicicornis simplicicornis*, e que foi coletado em Medellín por H.

CARRACCILO no ano de 1892 (Em LIDEKKER, 1915). Como a descrição morfológica desta espécie é equivalente à de *M. gouazoubira* (ALLEN 1915), esta forma pode ser considerada como sinonímia de *M. gouazoubira* (BLACK DÉCIMA et al., 2010). Três dos quatro animais analisados eram provenientes do município de São Jerónimo, perto de Medellín. Este município está localizado na região do canhão do Rio Cauca, caracterizada por ter áreas semidesérticas na parte baixa e de bosque seco na região do pé da montanha. A vegetação é característica de bosque seco e deserto, e sofre forte pressão antrópica pela transformação das pradarias naturais em pastagens para gado (CORANTIOQUIA, 2007). Os dados da origem geográfica destes animais sugerem que corresponda a mesma espécie coletada por CARRACCILO,

Contudo, embora as análises filogenéticas mostrassem uma forte relação entre o morfotipo 2 e a espécie *M. gouazoubira*, os cariótipos revelaram profundas diferenças entre os dois táxons. A primeira grande diferença está presente no cromossomo X, o qual é de formato submetacêntrico no morfotipo 2 e acrocêntrico em *M. gouazoubira*. Devido a que não foi possível obter os bandamentos cromossômicos dos cariótipos neste estudo, não foi possível confirmar a identidade do cromossomo X, portanto a identidade deste cromossomo foi baseada em dois critérios, o primeiro pela sua presença em estado homomórfico (duas cópias) no cariótipo das fêmeas e heteromórfico (uma cópia) nos machos, e segundo pelo tamanho relativo do cromossomo X, que em todos os cariótipos foi do 5%, ao igual que no cariótipo padrão de *M. gouazoubira*. No caso de confirmar a morfologia deste cromossomo, a morfologia acrocêntrica do cromossomo X de *M. gouazoubira* poderia ser explicada, pelo princípio da máxima parcimônia, como sendo o produto de uma inversão pericêntrica *de novo*, a partir de um cromossomo X ancestral de dois braços, uma vez que as demais espécies da tribo Odocoileini possuem um cromossomo X com este formato. A explicação inversa, ou seja, o cromossomo X de dois braços sendo derivado a partir de um ancestral recente acrocêntrico seria menos provável pelo mesmo princípio, porém não é descartável. A outra grande diferença entre os dois cariótipos é o acúmulo e

fixação de duas aparentes fusões em tandem no morfotipo 2, evidenciadas pela presença de dois pares de cromossomos do grupo D (o cromossomo 1 representou 6% e o cromossomo 2 representou 5,5%), os quais estão ausentes em *M. gouazoubira*, sendo no total 64 autossomos no morfotipo 1 e 68 autossomos em *M. gouazoubira*. O mais surpreendente é que, de acordo com o relógio molecular calculado na análise de máxima parcimônia, tamanhas diferenças foram acumuladas nos últimos 200.000 anos. Por outro lado, a alta frequência da fusão cêntrica em estado heteromórfico, observado somente nos indivíduos provenientes de San Jerónimo pode ser devido a um efeito de fundador, que pode estar refletindo uma diminuição no tamanho populacional na região de Antioquia. Estes resultados indicam que não só se trata apenas de duas espécies diferentes, mas também que estas duas são espécies crípticas e que *M. gouazoubira* seria mais uma espécie parafilética de cervídeo neotropical.

O morfotipo 3 correspondeu à descrição feita por ALLEN (1904, 1915) da subespécie *M. cita sanctaemartae* (sin=*M. gouazoubira sanctaemartae* HALTENORTH, 1963). O autor inicialmente mencionou a existência de uma espécie de veado cinza na região norte da Colômbia, no município de Bonda no departamento de Magdalena, e a denominou como sendo a espécie *M. nemorivaga* (in error: *M. memorivaga*) de CUVIER (1817). Posteriormente o mesmo autor revisou novamente os espécimes e propôs a subespécie mencionada. O holótipo desta forma está depositado no Museu Americano de História Natural de Nova Iorque (espécime AMNH-14640). Atualmente, o nome *M. gouazoubira sanctaemartae* dado por HALTENORTH (1963) é aceito por vários pesquisadores.

A área de distribuição desta subespécie se encontra dentro do chamado cinturão árido Peri-caribenho na região Caribe, e inclui os departamentos de Guajira, Magdalena, Atlântico, Cesar, Bolivar, Córdoba e Sucre. São, em termos gerais, planícies, algumas delas pantanosas e inundáveis durante certos períodos do ano. O clima é seco e árido e permanece sem chover durante grande parte do

ano. As árvores são baixas e decíduas. Os solos são salgados devido à proximidade com o mar e as características pantanosas da região. Esta região sofre uma forte pressão antrópica, uma vez que nela se encontram importantes assentamentos humanos, e proximidade de cidades importantes como Cartagena, Santa Marta e Barranquilla.

O cariótipo do morfotipo 3 diferiu marcadamente dos já descritos nas outras espécies do gênero *Mazama*, aparentemente a partir de sucessivas fusões cêntricas como em *B. dichotomus* com $2n=66$ e $NF=72$ e *O. bezoarticus* com $2n=68$, $NF=72$ (DUARTE e GIANNONI, 1995a e b) porém diferindo destas espécies por apresentar aparentemente uma fusão em tandem. A presença de dois indivíduos heteromórficos e um híbrido aparentemente portando este rearranjo denota que esta espécie ainda não estabilizou o seu cariótipo.

O morfotipo 4 correspondeu morfológica e geograficamente com a descrição da espécie *M. zetta*, feita por THOMAS (1913). O holótipo é procedente de Medellín e está depositado no Museu de História Natural de Londres (NHM-78.8.31.3). O autor enfatizou a proximidade desta espécie com *M. americana* e ainda especulou a possibilidade de se tratar de uma subespécie da mesma. ALLEN (1915) analisou espécimes provenientes do município de Gallera, no departamento de Cauca, ao sul da Colômbia, no Maciço Colombiano. O autor inicialmente os identifica como sendo a espécie de veado cinza *M. tschudii* (ALLEN, 1912), mas posteriormente corrige a sua identificação para *M. zetta*. Três dos seis animais analisados provinham do município de São Jerónimo, local muito próximo ao dos animais analisados por THOMAS (1913) no departamento de Antióquia ao norte da Cordilheira Central, e dois de locais próximos da origem dos animais estudados por ALLEN (1915) no vale do rio Patia no departamento de Cauca, na região conhecida como Maciço Colombiano, ao sul do país: uma fêmea do município de Bolivar e um macho de Mercaderes. Um espécime era originário do departamento do Tolima, situado no vale entre as Cordilheiras Central e

Oriental, As regiões mencionadas possuem, segundo a sua orientação, áreas de bosque pré-montano e montano úmido ou seco.

No trabalho de DUARTE ET AL. (2008), *M. temama* caiu fora do clado *M. americana/M. bororo/M. nana*. No presente trabalho, o morfotipo 4 formou um clado com um nó fortemente suportado junto a *M. temama*, e claramente separado do clado *M. americana/M. bororo/M. nana*, o que indica que este morfotipo é filogeneticamente mais próximo dos *Mazama* vermelhos centro-americanos do que dos sul-americanos. Dado que o ponto de corte entre estes dois grupos parece ser a Cordilheira dos Andes, poderia se dizer que os veados *Mazama* vermelhos (ou os *Mazama* verdadeiros) se diferenciam em dois grupos principais: os que ocorrem ao norte da região Andina e os que ocorrem ao sul desta região.

Os espécimes provenientes de San Jerónimo em Antioquia e o espécime de Tolima, ao centro – norte da região Andina, entre as Cordilheiras Central e Oriental, se agruparam de maneira consistente na análise filogenética e apresentaram o mesmo cariótipo $2n=44$ XX, NF=62, enquanto os exemplares de Mercaderes e Bolivar, em Cauca, no Maciço Colombiano ao sul da cordilheira andina, formaram outro grupo de mesmo cariótipo, que foi marcadamente diferente do anterior: $2n=62$, NF=78. Dadas as semelhanças morfológicas e moleculares, fica evidente que se trata de duas espécies irmãs, uma ocorrendo na região norte e a outra ao sul da região andina colombiana. Já que o holótipo da espécie *M. zetta* THOMAS (1913) era procedente da região de Antioquia, o nome deve ficar na espécie do norte, já a espécie do sul representa uma espécie nova que precisa ser descrita., uma vez que não se tem conhecimento de ter sido descrita alguma espécie diferente na região onde ela ocorre.

No que se refere à citogenética, as características comuns aos dois cariótipos como o sistema de cromossomos sexuais XY e o formato do cromossomo X, assim como a presença de numerosos cromossomos de dois braços em presença de NF altos, denotam que o padrão de evolução cromossômica deste grupo ocorre não só a partir de fusões cêntricas, mas

também de numerosas inversões pericêntricas, Um padrão semelhante é observado em *M. temama*, o que confirma ainda mais a proximidade destas espécies. A amostragem para este estudo foi muito pequena e não se evidenciaram polimorfismos intrapopulacionais, porém o mais intrigante nestas duas espécies irmãs é que tamanhas diferenças cromossômicas vêm ocorrendo em populações que aparentemente não enfrentam barreiras geográficas importantes há menos de 50.000 anos. Devido a isto, o processo de diferenciação não poderia ser explicado por vicariância e sim por dispersão, em presença de uma alta pressão de seleção por acasalamento (FRANKHAM et al., 2008).

Finalmente, é importante ressaltar a importância de identificar as diferentes espécies de *Mazama* em cativeiro. Os resultados deste trabalho mostraram a existência de um híbrido entre os morfotipos 2 e 3. Este indivíduo, T286, apresentou padrões cromatogênicos do rosto semelhantes aos do morfotipo 2 e o padrão de coloração do corpo semelhante ao do morfotipo 3. As medidas morfométricas deste indivíduo foram igualmente intermédias entre os morfotipos mencionados, sendo as medidas do corpo mais semelhantes às do morfotipo 3, porém as medidas da cabeça em grande parte eram mais parecidas ao morfotipo 2. O cariótipo também ajudou a confirmar este diagnóstico, ao ser observado um set haplóide similar ao do morfotipo 2 e o outro similar ao do morfotipo 3. Pela análise de filogenia molecular, pode se deduzir que a mãe desse espécime era do morfotipo 3, uma vez que o seu haplótipo do marcador *Cytb* caiu no mesmo grupo deste morfotipo.

Embora neste trabalho, após as análises morfológicas, citogenéticas e moleculares tenham sido evidenciadas as diferenças entre os diferentes morfotipos, na realidade estas diferenças podem ser muito sutis, principalmente para pessoal não treinado nestas espécies. Em um dos zoológicos, havia exemplares de três espécies diferentes, identificadas como sendo duas espécies identificadas de maneira errada. Em dois dos zoológicos, o morfotipo 3 era considerado como sendo só uma variante individual do morfotipo 2. Estes erros

são muito graves, dado que de acordo com os resultados deste estudo, elas são duas espécies claramente diferentes, pertencendo a duas linhagens com histórias evolutivas bem distintas.

Uma vez que análises genéticas nem sempre estão disponíveis para o pessoal dos zoológicos, centros de triagem e criadouros, uma técnica mais simples e ao alcance, tem que ser utilizada. Uma delas é o uso de chaves taxonômicas, as quais incluem características chave para diferenciar uma espécie da outra. Uma chave taxonômica poderia ser construída entre os veados marrons, tendo em conta características bem diferenciadas como a cor da pelagem dorsal e ventral, assim como os padrões cromatogênicos da cabeça. Outra forma pode ser pela análise de medidas morfométricas, amplamente usadas para ressaltar as diferenças entre táxons muito próximos. ALLEN (1915) criou índices a partir das medidas longitude preorbital e comprimento condilobasal, para ressaltar as diferenças entre as espécies de *Mazama* que estudou. MEIJAARD e GROOVES (2004) usaram medidas cranianas e fizeram análises multivariadas de componentes principais e junção de vizinhos para fazer uma reconstrução filogenética de algumas espécies de cervídeos asiáticos da tribo Cervini. Da mesma forma, ENDO et al. (2003) conseguiram detectar com este método, diferenças no tamanho do crânio dos esquilos de ventre cinza (*Callosciurus caniceps*) da ilha de Terutau e terra firme na Tailândia.

Os resultados obtidos, além de discriminar os espécimes nos quatro grupos morfológicos identificados, tenderam a agrupar estes elementos da mesma forma, mostrando que esta pode ser uma técnica eficiente para identificar espécies diferentes. As diferenças detectadas nesta análise são muito sutis, como por exemplo, o morfotipo 2 é o que apresenta o crânio mais estreito e alongado, enquanto que os morfotipos 3 e 4 apresentaram crânios de formato mais cúbico. Ao usar esta ferramenta, junto com a chave taxonômica, é possível detectar as diferenças entre o morfotipo 2 e o morfotipo 3, com o qual podem ser evitados futuros erros no manejo destas duas espécies,

VI. CONCLUSÕES

Mazama bricenii é uma espécie basal, que aparentemente divergiu cedo na evolução dos Odocoileini, e tem apresentado uma evolução cariotípica intensa de maneira independente. Pode estar relacionada a *M. rufina* ou inclusive ser a mesma espécie.

Mazama gouazoubira é uma espécie parafilética, uma espécie irmã divergiu recentemente há 200.000 anos, na região andina da cordilheira central colombiana e vem se diferenciando cromossomicamente. Esta última é uma espécie nova e necessita ser descrita.

Confirma-se a validade taxonômica de *Mazama cita sanctaemartae*, esta subespécie é distante de *M. gouazoubira* e de *M. nemorivaga* e divergiu das outras espécies do clado Sul-americano há pouco mais de 4,5 milhões de anos. O seu padrão de evolução cariotípica é similar ao de outras espécies do clado, como *B. dichotomus* e *O. bezoarticus*. Esta espécie precisa estar em um gênero diferente.

Existem duas espécies de veado vermelho na região Andina da Colômbia, as quais vem se diferenciando de maneira acelerada há 50.000 anos: a primeira é *Mazama zetta*, cuja validade taxonômica fica confirmada, ocorre na região andina e interandina entre as cordilheiras Oriental e Central. A segunda é uma espécie irmã desta, fenotipicamente indistinguível, mais cromossomicamente bem diferenciada, que ocorre no Maciço Colombiano, ao sul da região andina. Esta última espécie precisa ser definida.

VIII. REFERÊNCIAS

ABRIL, V.V.; CARNELOSSI E.A.G.; GONZÁLEZ,S; DUARTE,J.M.B. Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama Americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and genome research** V. 128, n. 1-3, p. 177 – 187. 2010.

ABRIL, V.V.; DUARTE, J.M.B. Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**. V. 31, p. 53 – 57. 2008.

ABRIL, V.V.; SARRIA-PEREA, J.A.; VARGAS-MUNAR D.S.F.; DUARTE J.M.B. Chapter 3: Chromosome evolution. – Em: DUARTE J.M.B., GONZALEZ S. *Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer*. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 18 – 26. 2010.

ALLEN, J. A. Mammals from Western Colombia. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, Nova lorque, v.31, p. 71-95. 1912.

ALLEN, J.A. Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. Nova lorque, v. 34, p. 521 – 553. 1915.

ALLEN, J.A. Report on mammals from the district of Santa Marta, Colombia, collected by Mr. Herbert H. Smith, with field notes by Mr. Smith. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. Nova lorque, v. 20, p. 407 – 468. 1904.

BLACK-DÉCIMA, P.; ROSSI, R.V.; VOGLIOTTI, A.; CARTES, J.L.; MAFFEL, L.; DUARTE, J.M.B.; GONZÁLEZ, S.; JULIÁ, J.P. Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814) – Em: DUARTE, J.M.B., GONZALEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 190 – 201. 2010.

CORANTIOQUIA. **Plan de Gestión Ambiental Regional 2007 - 2019**. Medellín, p. 316. 2007. Disponível em: < <http://pt.scribd.com/doc/65996445/Plan-de-Gestion-Ambiental-Regional-2007-2019>>. Acesso em 27/07/2011.

DUARTE, J.M.B.; GIANNONI, M.L. Cytogenetic analysis of the marsh deer, *Blastocerus dichotomus* (Mammalia, Cervidae), **Revista Brasileira de Genética**, v. 18, n. 2, p. 245 – 248. 1995a

DUARTE, J.M.B.; RAMALHO, M. F. P. T.; LIMA, V. F. H.; JORGE, W. A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. **Genetics and Molecular Biology**, v.22, n.3, p. 399–400. 1999. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-47571999000300019&lng=pt&nrm=iso>. Acesso em 18/06/2012.

DUARTE, J.M.B.; GIANNONI, M.L. Cytogenetic analysis of the Pampas deer *Ozotoceros bezoarticus* (Mammalia, Cervidae). **Brazilian Journal of Genetics**. V. 18 p. 485 – 488. 1995b

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

DUARTE, J.M.B.; JORGE, W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, Paris, v.67, n.3, p.403 – 410. 2003.

DUARTE, J.M.B.; MERINO, M.L. Taxonomia e Evolução. Em: DUARTE, J.M.B. **Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal, FUNEP, p. 1 – 21.1997.

EISEMBERG, J.F. **Mammals of the Neotropics Vol. I: The Northern Neotropics**. Chicago, University of Chicago Press 449 p. 1989.

EISENBERG, J.F. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. Em: WEMMER, C. **Biology and Management of the Cervidae**. Washington, Smithsonian Institution Press. p. 60 – 64. 1987.

ENDO, H.; KIMURA J.; OSHIDA T.; STAFFORD B.J.; RERKAMNUAYCHOKE, W.; NISHIDA, T.; SASAKI M.; HAYASHIDA A.; HAYASHI Y. Geographical and functional morphological variations of the skull in the Gray-Bellied Skirrel. **Journal of Veterinary Medicine Science**. V.66, n. 3, p 277 - 283. 2004.

ESCAMILO, L.L.B.; BARRIO J.; BENAVIDES, J.F.; TIRIRA, D.G. Northern pudu *Pudu mephistophiles* (De Winton 1896). – Em: DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 181 – 184. 2010..

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **Biosystems**. V 24, p. 157 – 174. 1990.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J.D.; BRISCOE, D.A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto, Sociedade Brasileira de Genética, 259 p.. 2008.

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

GUERRA, M.S. Reviewing the chromosome nomenclature of Levan et al. **Revista Brasileira de Genética**. V. 9, n. 4, p 741-743. 1986.

HASSANIN, A.; DELSUC. F.; ROPIQUET, A.; HAMMER, C.; JANSEN VAN VUUREN, B.; MATTHEE, C.; RUIZ-GARCIA, M.; CATZEFLIS, F.; ARESKOU, V.; NGUYEN, TT.; COULOUX, A. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus Biologies**. V. 335, n. 1, p. 32 – 50. 2012.

HERSHKOVITZ, P. A new race of red brocket deer (*Mazama americana*) from Colombia. **Proceedings of the Biological Society of Washington**. V. 72, p. 93-96. 1959.

JORGE, W.; BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the Red Brocket Deer *Mazama americana temama* (Cervoidea, Artiodactyla) with probable non-Robertsonian translocation. **Cytology**. V. 42, p. 711 – 721. 1977.

LAWRENCE, M.A. Catalog of recent mammal types in the American Museum of Natural History. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. Nova Iorque, v.217, 200 p. 1993.

LIDDEKER F.R.S. **Catalogue of the ungulate mammals in the British Museum of Natural History. Volume IV; Artiodactyla**. Londres. British Museum of Natural History, 470 p. 1915.

LIZCANO, D.J.; ÁLVAREZ, S.J.; DELGADO-V, C.A. Dwarf red brocket *Mazama rufina* (PURCHERAN 1951) – Em: DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 177 – 180. 2010a.

LIZCANO, D.J.; YERENA, E.; ALVAREZ, S.J.; DIETRICH, J.R. Merida Brocket Deer *Mazama bricenii* (THOMAS 1908) – Em: DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 181 – 184. 2010b.

MEIJNAARD, E.; GROOVES, P. Morphometrical relationships between South-east Asian deer (Cervidae, tribe Cervini): evolutionary and biogeographic implications. **Journal of Zoology, London**. Londres, v. 263, p. 179 - 196. 2004.

NEI M.; KUMAR S. **Molecular Evolution and Phylogenetics**. Nova Iorque, Oxford University Press, 340 p. 2000.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. Em: OBE G, BASLER A. **Cytogenetics: Basic and applied aspects**. Berlin, Springer Verlag, p. 90 – 112. 1987.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics** v. 19, p. 1572 – 1574. 2003.

ROSSI, R.V. **Taxonomia de *Mazama* Ranfinesque, 1817 do Brasil (*Artyodactyla*, *Cervidae*)**. 174 f. 2000. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2000.

ROSSI, R.V.; BODMER, R.; DUARTE, J.M.B.; TROVATI, R.G. Amazonian brown brocket deer *Mazama nemorivaga* (CUVIER 1817) – Em: DUARTE, J.M.B., GONZALEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 202 – 210. 2010.

SARRIA-PEREA, J.A. **Comparação entre alguns citótipos da espécie *Mazama americana*: Quão grande é a diferença entre eles?** 2004, 51 p Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal. 2004.

TAMURA, K.; NEI M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. **Molecular Biology and Evolution**. V. 10, p. 512 – 526. 1993.

TAMURA, K.; PETERSON, D.; PETERSON, N.; STECHER, G.; NEI, M.; KUMAR, S. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. **Molecular Biology and Evolution** (no prelo). (2011).

THOMAS, O. A new deer of the brocket group from Venezuela. **Annals and Magazine of Natural History**. V. 1, n. 8, p 349 – 359. 1908.

THOMAS, O. On certain of the smaller South American Cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**. V. 11, n. 8, p. 585 – 589. 1913.

VERMA, R.S., BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**. 2.ed. New York: McGraw Hill. 170 p. 1995.

VOGLIOTTI A., DUARTE J.M.B. Small red brocket deer *Mazama bororo* (DUARTE 1996) – Em: DUARTE, J.M.B., GONZALEZ, S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 172 – 176. 2010.

WEBB, S. D. A new species of *Pediomeryx* from the late Miocene of Florida, with comments on Dromomerycid ruminant evolution. **Journal of Mammalogy**. V. 64, n. 2, p. 261 – 276. 1983.

LUTEYN, J. L. (1999). **Páramos: A Checklist of Plant Diversity, Geographical Distribution, and Botanical Literature**. Bronx, New York: New York Botanical Garden Press.

Instituto Agustín Codazzi. **Mapa físico-político de Colombia**. 2005. URL: <http://mapacolombia.igac.gov.co/wps/portal/mapasdecolombia/>. Acessado em 09/2008;

APÊNDICE

