

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Câmpus de Jaboticabal

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E
MOLECULAR DE *Mazama temama* (KERR, 1792):
PROPOSIÇÃO DE UM NEÓTIPO PARA A ESPÉCIE.**

Eluzai Dinai Pinto Sandoval

Médica Veterinária

2019

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
Câmpus de Jaboticabal

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E
MOLECULAR DE *Mazama temama* (KERR, 1792):
PROPOSIÇÃO DE UM NEÓTIPO PARA A ESPÉCIE.**

Eluzai Dinai Pinto Sandoval

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Dissertação de mestrado apresentada á Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - UNESP, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento Animal.

2019

S218c Sandoval, Eluzai Dinai Pinto
Caracterização morfológica, citogenética e molecular de Mazama temama
(KERR, 1792): Proposição de um neótipo para a espécie / Eluzai Dinai Pinto
Sandoval. -- Jaboticabal, 2019
86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade
de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal

Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte

1. Cariótipo. 2. Bandejamento cromossômico. 3. Filogenia. I. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama temama* (KERR, 1792): PROPOSIÇÃO DE UM NEÓTIPO PARA A ESPÉCIE


AUTORA: ELUZAI DINAI PINTO SANDOVAL

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

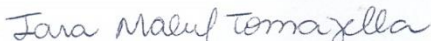
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. ROGÉRIO VIEIRA ROSSI
Universidade Federal de Mato Grosso - Cuiabá/MT



Profa. Dra. IARA MALUF TOMAZELLA
Departamento de Zootecnia / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 22 de março de 2019

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

ELUZAI DINAI PINTO SANDOVAL - Nascida em 21 de novembro de 1988, natural de Caracas, Venezuela, Médica Veterinária formada em 2012 pela Universidade Central da Venezuela. Durante o curso foi bolsista da Fundação Gran Mariscal de Ayacucho (FUNDAYACUCHO). Trabalhou como veterinária da Unidade de Saúde e Bem-estar Animal do Parque Zoológico El Pinar da Cooperativa de Serviços do Governo do Distrito Capital, Venezuela, durante o período fevereiro 2014-dezembro 2015. Bolsa de Apoio técnico pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante o período de Novembro 2016-fevereiro 2017 pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE). Em março 2017 ingressou no mestrado no Programa de Genética e Melhoramento Animal da Unesp (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias - Câmpus Jaboticabal) sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte. A aluna recebeu financiamento para o mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

O alvo verdadeiro é se conhecer a si mesmo,
saber que somos capazes de fazer,
reconhecer nossas limitações
e entender aonde devemos chegar.
Conhecer de que somos feitos, quem nós fez e o para que.
Como podemos influenciar ao outro
e como o outro pode nós influenciar.
A ciência não foge da realidade humana,
porque no fim das contas,
tudo faz parte de um conjunto de relações.

Eluzai Dinai Pinto Sandoval

Ao meu “**abuelo Pinto**” (in memoriam),
homem de Deus, exemplo de alegria e força.
Quem com cada história e piada me ensinou a
afrentar os desafios da vida elevando os olhos
para os montes de onde vem o meu socorro, o
Senhor que fez o céu e a terra.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

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

A Deus, pela vida, missão, amor e cuidado em cada etapa da minha vida.

A Unesp, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao departamento de Zootecnia, ao setor de Animais Silvestres, e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal.

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela oportunidade de ser parte da equipe NUPECCE, o ensino, a orientação e o impulso para fazer conservação na América Latina.

Ao técnico do laboratório João Airton Boer, pelo ensino e companhia em cada desafio durante este tempo.

A Rafael Reyna-Hurtado, Sonia Gallina, Guillermo Castillo, e demais parceiros do Instituto de Ecologia (INECOL) do México que foram essenciais para a realização deste trabalho.

A equipe de coleta e processamento de campo dos exemplares, Jorge Morales, Alejandro e Prof. Mauricio. Obrigada pelo tempo e esforço dedicado para fazer este estudo possível.

A Luciana Diniz, quem sequenciou a maioria dos exemplares do estudo, a sua prontidão, inteligência e alegria são admiráveis.

A minha mãe Mirtha Sandoval, exemplo de luta e coragem. Quem com muita criatividade me ensinou a sonhar, a não ter medo, a vencer as barreiras e a ser voz pela vida.

Ao meu pai Edgar Pinto, por me ensinar a cuidar da natureza e me incentivar para a ciência e sabedoria.

Aos meus irmãos, Eliel pela paciência e ajuda a resolver cada projeto em tempos de crise. Gherardo Andrés, pela amizade e parceria em todos os lugares e momentos da minha vida. Nimrod, pelos momentos de alegria, risadas, e o presente junto com a Eliana de ter a minha sobrinha Annie. Paola e Michelle, pelas loucuras, amizade e o apoio incondicional.

A Família Pinto e Sandoval. Cada pessoa tem semeado um pouco de amor e loucura no meu coração.

A Família Pérez Díaz e Diaz Pérez. Especificamente a Nice, Gherardo, Vivian e Franklin, por cada conselho e cuidado ao longo da minha profissão.

A Raquel González, que de joelhos me ajudou a voar.

A Jefferson Duque, pelo apoio profissional e pessoal.

A Mar, pela amizade e irmandade quem com tanta energia e alegria tem me ajudado nos momentos mais difíceis.

Aos amigos e colegas do NUPECCE, pelos cafés da tarde, as histórias, o ensino da cultura brasileira e o apoio sempre.

Aos amigos Lex, Valeria, Jefferson, Alessandra, Carol, Tamara, Rozana, Constanza, Ale Bertassoni, Pedro, Yuli, Carmen, Diego, Rullián, Amanda (Dou) e Ariel. Vocês fizeram de Jaboticabal um lugar incrível e cheio de muita alegria.

Aos amigos da vida, Karim, Joshua, July, Georgina, Romelys e Nathaly, que mais do que colegas são irmãos que me ajudam a seguir na frente.

A Unati-Fcav, por me permitir ensinar a arte do Teatro e a beleza de conhecer tantas pessoas e famílias. Especialmente a Dona Dina, o senhor Paulo e cada um dos meus alunos.

A Jocum Brasil por me ajudar a conhecer a Deus, a servir a sociedade e abrir as portas para me preparar para este mestrado.

Ao meu país Venezuela, que mesmo em tempos de crise tem servido de estímulo para a realização de cada projeto. Sonho com te ver livre e linda de novo, e assim passar todo o conhecimento obtido para conservar tua natureza e cultura.

A todos os que aqui não citei, mas de alguma forma contribuíram com essa conquista.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
RESUMO -----	iii
ABSTRACT -----	iv
LISTA DE ABREVIACÕES -----	v
LISTA DE FIGURAS -----	vii
LISTA DE TABELAS -----	ix
I.INTRODUÇÃO -----	1
II. REVISO DA LITERATURA -----	3
2.1 Gênero Mazama -----	3
2.2 <i>Mazama temama</i> -----	4
2.3 Morfologia de <i>Mazama temama</i> -----	8
2.4 Citogenética de <i>Mazama temama</i> -----	10
2.5 Estudos do DNA de <i>Mazama temama</i> -----	12
III.OBJETIVOS -----	14
IV. MATERIAL E MÉTODOS -----	14
4.1 Permissão de coleta -----	14
4.2 Pesquisa da localizao do holótipo -----	14
4.4 Obteno dos animais e amostras -----	15
4.4 Procedimento após a coleta do exemplar -----	16
4.4.1 Biometria -----	16
4.4.2 Documentao fotográfica -----	17
4.4.3 Biopsia de pele -----	17
4.4.4 Retirada e processamento da pele completa -----	17
4.4.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo -----	18
4.4.6 Preparao do crânio e ps-crânio -----	18
4.4.7 Relao de espécies utilizadas -----	18
4.5 Caracterizao morfológica -----	22
4.6 Análise citogenética -----	23
4.6.1 Cultivo celular -----	23
4.6.2 Colorao Convencional -----	24
4.6.3 Biometria cromossômica -----	24
4.6.4 Bandamento G -----	25
4.6.5 Bandamento C -----	25

4.6.6 Coloração Ag NOR -----	25
4.6.7 Análise das preparações cromossômicas-----	26
4.7 Genética Molecular -----	26
4.7.1 Extração de DNA -----	26
4.7.2 Amplificação e sequenciamento de genes -----	27
4.7.3 Análise filogenética -----	28
V. RESULTADOS -----	29
5.1 Descrição emendada de Mazama temama -----	29
5.2 Morfologia, biometria e craniometria -----	33
5.3 Citogenética -----	38
5.3.1 Coloração convencional-----	38
5.3.2 Bandamento C -----	39
5.3.3 Coloração de Ag-NOR -----	41
5.3.4 Bandamento G-----	42
VI. DISCUSSÃO -----	48
6.1 Análise morfológica -----	48
6.2 Análise citogenética -----	49
6.3 Análise filogenética -----	50
6.4 Validade do neótipo -----	51
VII. CONCLUSÕES -----	54
VIII.REFERÊNCIAS -----	55
APÊNDICES -----	65

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama temama* (Kerr, 1792): PROPOSIÇÃO DE UM NEÓTIPO PARA A ESPÉCIE.

RESUMO- *Mazama temama* (Temamaçame) é o veado vermelho de menor tamanho da América central. Foi uma das primeiras espécies descritas para o gênero que devido à grande similaridade morfológica com *Mazama americana* foi considerada como sinônimo por muitos autores até final do século passado. Os estudos citogenéticos de animais em cativeiro mostraram cariótipos diferenciados que levaram ao reconhecimento como espécie única. Os estudos filogenéticos têm sustentado a monofilia da espécie, embora existam algumas incongruências devido à sua grande distribuição geográfica. Assim, o objetivo do trabalho foi propor um neótipo para *M. temama* a partir da caracterização de um topótipo de Veracruz e da mesma forma, caracterizar três parátipos da localidade de Campeche. Com isso, foi possível descrevê-los morfológicamente (medidas cranianas, coloração da pele e biometria corporal), obter cariótipos de animais de vida livre com origem conhecida para análises citogenéticas (banda C, banda G, coloração Ag-NOR e coloração convencional Giemsa) e realizar análises filogenéticas de genes mitocondriais. Os resultados morfológicos separaram a espécie de *Mazama americana* mas não conseguiram diferenciar *M. temama* dos outros pequenos Mazama. As árvores filogenéticas comprovaram a monofilia do grupo mostrando um resultado similar a outros autores. O cariótipo do neótipo é significativamente diferenciado do anteriormente descrito para a espécie, sendo que os parátipos de Campeche apresentam variantes cariotípicas evidenciando um processo recente de especiação e sugerindo a presença de mais de uma espécie de Mazama vermelho no México.

Palavras-Chave: bandamento cromossômico, cariótipo, DNA mitocondrial, filogenia, taxonomia

**MORPHOLOGIC, CITOGENETICS AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF *Mazama temama* (Kerr, 1792): PROPOSAL OF A
NEOTYPE FOR THE SPECIES**

ABSTRACT- *Mazama temama* (Temamaçame) is the smallest red deer in Central America. It was one of the first species described for the genus, previously considered by many authors as synonymous of *Mazama americana* because of all the morphological similarity among these species. Cytogenetic studies of captive animals showed differentiated karyotypes that led to recognition as a single species. Phylogenetic studies have supported the monophyly of the species, although there are some incongruities related with the geographic distribution. Therefore, the objective of the study was to propose a neotype for *M. temama* through the characterization of a topotype from Veracruz and, in the same way, to characterize three paratypes of the locality of Campeche. It was possible to describe them morphologically (cranial measurements, skin coloration and body biometry), to obtain karyotypes of free-living animals for cytogenetic analyzes (C-band, G-band, Ag-NOR staining and conventional Giemsa staining) and study the phylogenetic relationship of the group using mitochondrial genes. The morphological results separated the species from *Mazama americana* species but couldn't differentiate *M. temama* from the other small *Mazama*. The phylogenetic trees proved the monophyly of the group showing a similar result to other authors. The karyotype of the neotype is significantly different from the one previously described for the species, and the Campeche paratypes present karyotypic variants evidencing a recent process of speciation and suggesting the presence of more than one red *Mazama* species in Mexico.

Key-words: chromosome banding, karyotype, mitochondrial DNA, phylogeny, taxonomy

LISTA DE ABREVIATÖES

2n – Número diploide

A – Altura

Ba – Bário

C – Canino

cm – Centímetro

CT – Comprimento total

Citb – Citocromo-b

COI – Citocromo Oxidase 1

CR – Comprimento relativo de braços cromossômicos

DMEM – Meio essencial mínimo modificado de Dulbecco

DNA – Ácido Desoxirribonucléico

g – grama

HCL – Ácido clorídrico

I – Incisivo

IB – Inferência Bayesiana

ICNZ – Código Internacional de Nomenclatura Zoológica

IUCN – International Union for Conservation of Nature

IL16 – Interleucina 16

Kg – Quilograma

LT – Largura total

mg – Miligrama

MgCl₂ – Cloreto de Magnésio

mL – Mililitro

ML – Máxima verossimilhança

M – Molar

MP – Máxima Parcimônia

mtDNA – DNA Mitocondrial

Na₂HPO₄ – Fosfato dissódico

NaCl – Cloreto de sódio

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NADH₅ – Desidrogenase subunidade 5

NF – Número fundamental de braços cromossômicos

Ng– nanograma

NUPECCE– Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos

NCBI – National Center for Biotechnology Information

O – Orelha

P– premolar

pb – Pares de bases

PCA – Análise de componentes principais

PC – Componente principal

PCR– Reação em cadeia de polimerase

RB – Razão de braços cromossômicos

rcf – Relative centrifugal force ou força G

SSC – solução salina de citrato de sódio

Sp – espécie

tRNA- ácido ribonucleico de transferência.

μl – Microlitro

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Exemplar macho de <i>Mazama temama</i> em cativeiro. Foto: Elias Sandalla.-----	1
Figura 2.	Distribuição de <i>Mazama temama</i> . Fonte: IUCN (2018) -----	1
Figura 3.	Descrição do Temamaçame. Fonte: Hernández (1651) -----	5
Figura 4.	Primeira referência de <i>Mazama temama</i> . Fonte: Kerr, (1792)- -----	6
Figura 5.	Trecho em que é alocado <i>M. temama</i> como subespécie de <i>M. americana</i> . Fonte: Hershkovitz (1951). -----	10
Figura 6.	Cariótipo de um macho <i>M. temama</i> . Fonte: Bello-Gutiérrez et al.(2010), adaptado de Jorge e Benirschke (1977). -----	11
Figura 7.	Árvore filogenética de sequências de Citocromo b da tribo Odocoileini, resultado de inferência bayesiana. Fonte: Gutiérrez et al. (2017). -----	13
Figura 8.	Mapa do México com os pontos de coleta do topótipo de <i>Mazama temama</i> e dos demais animais amostrados. -----	16
Figura 9	Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vista dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). -----	22
Figura 10.	Vista lateral do topótipo de <i>Mazama temama</i> (A) Vista lateral da cabeça (B) -----	30
Figura 11.	Vista dorsal do topótipo de <i>Mazama temama</i> (A). Coloração da cabeça (B) Ancas e dorso da cauda (C) -----	31
Figura 12.	Vista ventral do topótipo de <i>Mazama temama</i> -----	31
Figura 13.	Pele aberta taxidermizada do topótipo de <i>M. temama</i> -----	32
Figura 14.	Árvore de distância feita com as medidas biométricas de <i>M. temama</i> em comparação com outras espécies do gênero <i>Mazama</i> -----	33
Figura 15.	Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D) do crânio do topótipo de <i>M.temama</i> . -----	34
Figura 16.	Escatograma dos dois primeiros componentes da PCA para 16 medidas craneanas. Bootstrap 1000. -----	36

Figura 17.	Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 16 medidas craneanas de espécimes de <i>M. temama</i> , seu topótipo e de outras espécies do gênero. -----	37
Figura 18.	Cariótipo do topótipo de <i>M. temama</i> -----	38
Figura 19.	Cariótipo do topótipo de <i>M. temama</i> T366 sob bandamento C -----	39
Figura 20.	Metáfases sob bandamento C, evidenciando discreta marcação heterocromática intersticial nos pares 1 e 2 (setas). (A) e (B) Exemplos de <i>M. temama</i> . (C) Topótipo de <i>M. temama</i> . -----	40
Figura 21.	Cariótipo do topótipo de <i>M. temama</i> T366 sob coloração Ag-RON com cinco regiões organizadoras de nucléolo. -----	41
Figura 22.	Cariótipo sob coloração Ag-Ron. (A e B) Exemplos T363 e T364, respectivamente, com regiões organizadoras de nucléolo. -----	42
Figura 23.	Cariótipo do topótipo de <i>M. temama</i> T366 sob bandamento G. -----	42
Figura 24.	Representação gráfica do padrão de bandas do topótipo de <i>Mazama temama</i> -----	43
Figura 25.	Comparação dos cariótipos de <i>M.temama</i> sob bandamento G.-----	44
Figura 26.	Árvore filogenética do gene D-loop. Análise de Inferência Bayesiana -----	46
Figura 27.	Árvore filogenética do gene COI. Análise de Inferência Bayesiana-----	46
Figura 28	Árvore filogenética do gene ND5.Análise de Inferência Bayesiana-----	47
Figura 29.	Árvore filogenética do gene CIT-B. Análise de Inferência Bayesiana-----	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Listado de sinônimos utilizados para <i>Mazama temama</i> (Kerr, 1792)-----	7
Tabela 2.	Relação de espécies utilizadas para comparação nas análises craniométricas, com seu número de identificação do NUPECCE, número de identificação do museu, sexo e origem -----	19
Tabela 3.	Relação de animais utilizados para as análises filogenéticas -----	19
Tabela 4.	Genes mitocondriais amplificados e os iniciadores (primers) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento. -----	27
Tabela 5.	Medidas biométricas do neótipo de <i>Mazama temama</i> (em mm, massa em kg) -----	32
Tabela 6.	Medidas cranianas do neótipo de <i>Mazama temama</i> representadas em milímetros (mm) de acordo com DRIESCH (1976). -----	35
Tabela 7.	Componentes principais de 16 medidas craneanas para 18 indivíduos do gênero <i>Mazama</i> . -----	36

I. INTRODUÇÃO

A espécie *Mazama temama* representa o *Mazama* vermelho da América Central (Figura 1), ocorrendo no México, Costa Rica, Nicaragu, Belize, Guatemala, El Salvador, Honduras, Panamá e oeste da Colômbia (Figura 2).



Figura 1. Exemplar macho de *Mazama temama* em cativeiro. (Foto Elías Sandalla).



Figura 2. Distribuição de *Mazama temama* (IUCN, 2018).

A espécie recebeu diferentes nomes e status taxonômicos, sendo descrita inicialmente por Kerr (1792) no México, com posteriores descrições no Panamá (Goldman, 1913) e Costa Rica (Hollister, 1914). Todas as descrições tiveram base nas características morfológicas dos indivíduos coletados, com isso, muitas confusões taxonômicas têm sido geradas, principalmente por ter sido considerado sinônimo de *Mazama americana* (Herskovitz, 1951).

O único cariótipo conhecido da espécie foi publicado por Jorge e Bernishke (1977), provenientes de animais que se encontravam em cativeiro nos Estados Unidos com procedência de Tamaulipas no México. Embora tenha esclarecido a definição de *M. temama* como espécie única, as dúvidas sobre a origem dos exemplares gera a necessidade de conhecer o cariótipo de animais de vida livre coletados nas localidades tipo. As hipóteses filogenéticas têm sido controversas, com autores que definem os *Mazama* vermelhos da América central como um grupo monofilético (Escobedo- Morales, et al., 2016) e autores que descrevem grupos polifiléticos formados por amostras de indivíduos de *M. temama* coletados do México até Colômbia (Gutiérrez et al., 2016).

Com isso, as dúvidas sobre a espécie, sua abrangência e características taxonômicas ainda estão presentes, sendo que já foi sugerida uma revisão aprofundada dos indivíduos identificados como *M. temama* em toda sua distribuição (Gutiérrez et al., 2017), e assim obter informações específicas sobre estes táxons não descritos na América Central, Colômbia e Venezuela.

O presente estudo buscou agrupar tanto dados morfológicos quanto genéticos a partir de um topótipo da espécie *M. temama*, no sentido de redescrever a espécie desde uma visão que integre e compare os diversos padrões já descritos na literatura. Dessa forma, contribuir com a resolução taxonômica do gênero *Mazama* na América latina.

I. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Gênero *Mazama*

O gênero *Mazama* (Rafinesque, 1817) agrupa cervídeos de pequeno a médio porte, com chifres simples e não ramificados. Com uma ampla distribuição geográfica, os representantes deste grupo ocorrem desde o nordeste mexicano até a região central da Argentina, ocupando uma variedade de habitats entre florestas montanhosas, florestas tropicais chuvosas, florestas tropicais secas e savanas arbóreas e se adaptando a diferentes condições, desde o nível do mar até 4000m de altitude (Eisenberg, 1987; Allen, 1915).

A descrição das espécies de *Mazama* foi baseada em detalhes da morfologia externa (Allen, 1915; Miranda-Ribeiro, 1919), gerando 42 táxons nominais em toda sua distribuição, dos quais somente 10 são reconhecidas atualmente como espécies: *M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. bororo*, *M. temama*, *M. pandora*, *M. briceni*, *M. rufina* e *M. chunyi* (Duarte e González, 2010).

A complexidade do gênero é devido a uma grande similaridade morfológica entre as espécies, com uma ampla variação individual de caracteres, tornando mais difícil a sua definição. Já foi sugerido o agrupamento de espécies de *Mazama* baseado em alguns caracteres cranianos juntamente com alguns caracteres de pelagem e coloração (Allen, 1915), separando-os em dois clados: dos *Mazama* vermelhos (*M. nana*, *M. bororo*, *M. americana*, *M. temama*, *M. bricenii* e *M. rufina*), e dos cinzas (*M. pandora*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira* e *M. chunyi*).

As características morfológicas deste grupo não são caracteres conservados, e sim produto da adaptação ao habitat, em um processo evolutivo que levou à seleção de corpos de menor tamanho e com menor desenvolvimento da galhada (Eisenberg, 1987). Porém, em abordagens moleculares e citogenéticas, o gênero mostra muitas mudanças em sua atual classificação devido as controversas taxonômicas (Merino e Rossi, 2010) em relação à alta convergência adaptativa (Duarte, González e Maldonado, 2008).

A alta variação cariotípica inter e intra-específica, gerada pela grande fragilidade cromossômica, indica que os cromossomos do gênero *Mazama* apresentam muita instabilidade (Duarte e Jorge, 1996; Vargas-Munar, 2010,

Tomazzella et al. 2017; Valeri et al. 2018). Exemplo disso é *M. americana* (Erxleben, 1777), a espécie tipo do gênero, quem têm sido considerada como um complexo de espécies crípticas, no qual existe alta similaridade morfológica para uma grande variabilidade de cariótipos de acordo a sua região de origem geográfica (Duarte, 1998; Abril et al. 2010; Rincón, 2016).

Outros casos de mudanças taxonômicas no gênero, são as evidências citogenéticas e filogenéticas que reconhecem *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira* como gêneros distintos de *Mazama* (Duarte, González, Maldonado, 2008; Gutiérrez, 2017), bem como a sugestão de autores em revalidar *M. jucunda*, reclassificando *M. bororo* como sinonímia-junior desta (Mantellato, 2016) e ainda a nomeação de *M. bricenii* em sinonímia com *M. rufina* (Gutierrez et al. 2015). Também, Escobedo-Morales et al. (2016) defendem que *M. pandora*, considerado dentro do grupo dos *Mazama* cinza, é mais próximo das formas vermelhas de *Mazama*, sustentados por análises moleculares. Outro achado impactante, por meio da análise do neótipo de *M. americana*, foi que as formas brasileiras de *M. americana* analisadas até o presente não pertencem a este táxon (Rincón, 2016).

2.2. *Mazama temama* (Kerr, 1792)

O temamaçame, temazate ou cabrito, são os nomes usados localmente para identificar a espécie *M. temama* que representa o *Mazama* vermelho da América central. Considera-se o menor cervídeo com ocorrência no México, de coloração marrom-avermelhada nas costas do corpo e bege ou branco na região ventral (Gallardo e Sanchez-Cordero, 1997).

A primeira referência na literatura foi de Hernández (1651), um médico naturalista designado pelo Rei da Espanha Felipe II para dirigir uma expedição científica na América. Em companhia do seu filho, geógrafos e indígenas, ele descreveu muitas espécies de plantas e animais no que se conhecia como território da “Nova Espanha”. Entre as observações, ele apresentou um animal parecido com um cervo pequeno a quem chamou de Temamaçame (Figura 3).

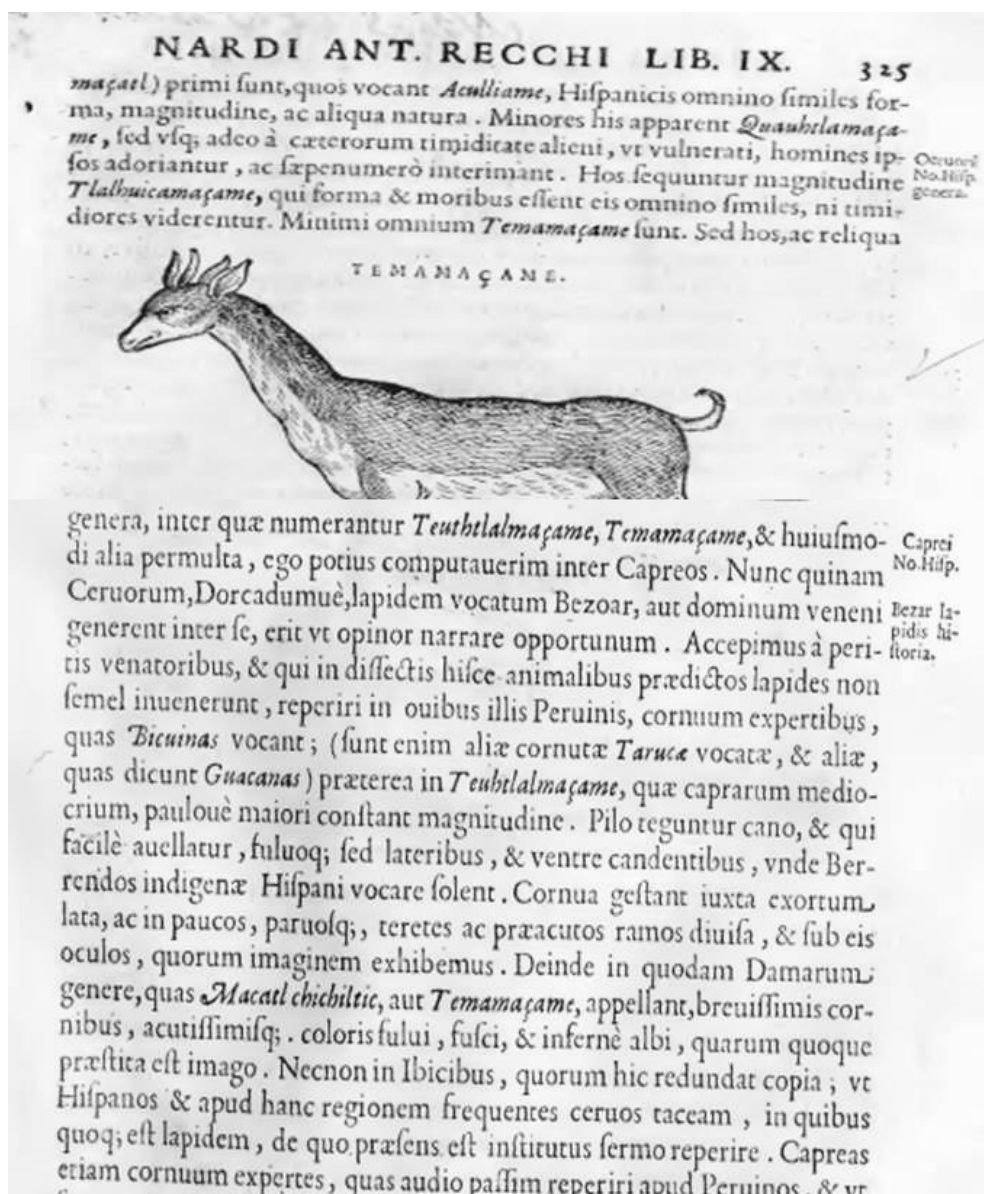


Figura 3. Primeira descrição do Temamaçame, trecho de “*Nova plantarum, animalium et mineralium Mexicanorum*” (Hernández, 1651).

A seguir a tradução da descrição original feita por Hernández: “Temamaçame, chifres muito curtos e pontudos, uma camada malva esbranquiçada abaixo; a posição é melhor entre os cervos, sendo marrom avermelhado acima, esbranquiçado por baixo, chifres cilíndricos, retos e lisos”. Entretanto, Hernández não é reconhecido como autor da espécie por não ter utilizado a nomenclatura binomial na sua descrição, que é considerado o ponto de partida da nomenclatura zoológica proposta na décima edição do *Systema Naturae* de Linnaeus (1758).

Em 1792 um cientista escocês traduziu a informação de muitas espécies descritas e adequou os nomes para a nomenclatura binomial, considerando o exemplar de Hernández dentro do grupo dos cervídeos mexicanos, sendo renomeado como *Cervus temama* (Figura 4).

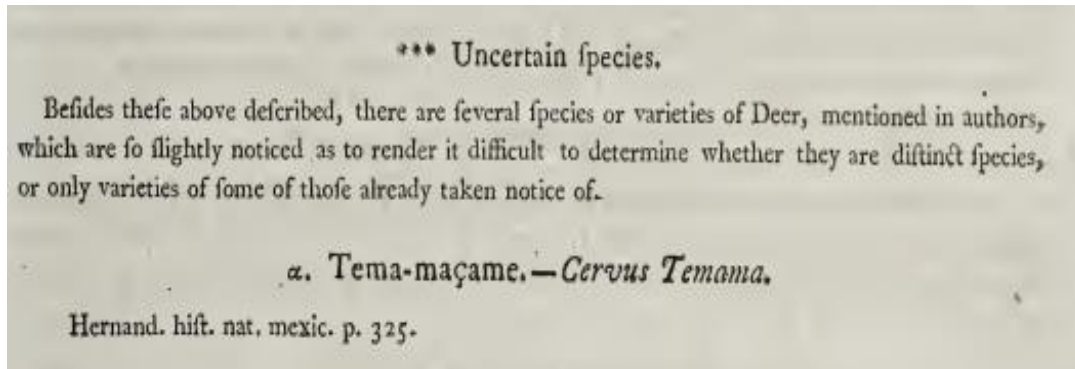


Figura 4. Primeira referência de *Mazama temama* em nomenclatura binomial (Kerr, 1792).

A seguir a tradução original de Kerr: “Espécies incertas: de acordo com a descrição acima, existem muitas espécies ou variedades de cervos, mencionadas por autores, que são levemente notáveis sendo difícil determinar se eles são diferentes, ou apenas variedades de alguns já conhecidos”. -a. *Cervus temama* Hernández, Hist. Nat. Mex. p. 325.

Embora não tenha sido feita uma descrição detalhada da espécie, a mesma foi reconhecida dentro do gênero *Mazama* por Rafinesque (1817), que o classificou como *Mazama tema*. A partir disso, os diferentes autores utilizaram vários nomes para se referir ao Mazama vermelho mexicano (Tabela 1). Saussure (1860) explica que a tradução do nome refere ao *Mazama* das estepes, um dos ruminantes de chifre oco que povoa as pastagens do norte do México, nomeando-o *Cervus sartori*, por se tratar de um veado ou cervo, diferente dos pequenos antílopes descritos por Rafinesque.

Allen (1895) revisou todos os sinônimos da espécie e o renomeu como *Mazama temama*. Lydekker (1898) considerou que o *Mazama tema* fosse a espécie andina da América do Sul e que *Mazama sartorii* correspondia a descrição da espécie centroamericana, especificamente da Guatemala. O mesmo autor, em 1901 detalhou características morfológicas da espécie como são a garganta, pescoço e torác amarelado, abdômem branco e pelos superiores sombreados.

Em 1908, o Allen coletou vários indivíduos de Nicaragua e considerou a orientação de Rafinesque com o nome de *Mazama tema* para a espécie mexicana. Em 1912, foi coletado em Gatún, no Panamá por Goldman um macho adulto, um pouco maior que *Mazama tema* mexicano, sendo considerado muito similar a este, nomeando-o de *Mazama tema reperticia* (Goldman, 1913). Hollister (1914) descreveu o crânio e pele de um macho jovem coletado em Palamanca, Costa Rica, como uma espécie de coloração mais escura e avermelhada em comparação com os *Mazama tema* do México e Panamá, nomeando-o como *Mazama tema cerasina*.

Posteriormente, na caracterização do gênero *Mazama* feita por Allen (1915), estas diferentes formas foram consideradas como pertencentes à mesma espécie, com três subespécies, *Mazama sartorii sartorii* (Kerr, 1792), *Mazama sartorii reperticia* (Goldman, 1913) e *Mazama sartorii cerasina* (Hollister, 1914). Entretanto, outro trabalho publicado no mesmo ano, considerou todos esses como *Mazama tema*, considerando o nome *Mazama sartorii* como sinônimo do anterior (Lydekker, 1915).

A mediados do século XX os autores associaram a forma de veado vermelho da América Central como subespécie de *Mazama americana*, devido as características morfológicas em comum com essa espécie (Herskhovitz, 1951; Kellog e Miller, 1955), nomeando-o *Mazama americana temama*. O reconhecimento de *Mazama temama* como espécie única foi possível após o trabalho de caracterização cariotípica de exemplares em cativeiro (Jorge e Bernishke, 1977), cujas diferenças com o cariótipo descrito para *Mazama americana*, permitiu que vários autores as distinguíssem como espécies separadas (Groves e Grubb, 1987; Geist, 1998)

Tabela 1. Listado de sinônimos utilizados para *Mazama temama* (Kerr, 1792), com o nome, autor, data e informação da publicação.

Nome	Autor	Data	Publicado em
<i>Cervus temama</i>	Kerr	1792	The Animal Kingd. 303
<i>Cervus temama</i>	Fischer	1814	Zoognosia 3, p.465
<i>Mazama tema</i>	Rafinesque	1817	American Monthly Magazine
<i>Mazama temama</i>	Allen	1895	Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. Vol. VII: 191
<i>Mazama sartorii</i>	Lydekker	1898	Deer of all Lands, 303
<i>Mazama sartorii</i>	Lydekker	1901	The great and small game of Europe: 372
<i>Mazama tema</i>	Miller	1912	Bull. U.S. Nat. Mus. N. 79: 390

<i>Mazama tema reperticia</i>	Goldman	1913	Misc. Collect. 60: No. 22, 2
<i>Mazama tema cerasina</i>	Hollister	1914	Proc. Zool. Soc., Washington, 27: 209
<i>Mazama sartorii sartorii</i>	Allen	1915	Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 34: p.541
<i>Mazama sartorii reperticia</i>	Allen	1915	Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 34: p.542
<i>Mazama sartorii cerasina</i>	Allen	1915	Bull. Amer. Mus. Nat. Hist. 34: p.542
<i>Mazama tema</i>	Lydekker	1915	Cat. Ungul. Brit. Mus. 4: 205
<i>Mazama tema tema</i>	Lydekker	1915	Cat. Ungul. Brit. Mus. 4: 206
<i>Mazama tema reperticia</i>	Lydekker	1915	Cat. Ungul. Brit. Mus. 4: 207
<i>Mazama tema cerasina</i>	Lydekker	1915	Cat. Ungul. Brit. Mus. 4: 207
<i>Mazama americana temama</i>	Miller & Kellogg	1955	U.S Nat. Mus. Bull. 205: 808
<i>Mazama americana cerasina</i>	Miller & Kellogg	1955	U.S Nat. Mus. Bull. 205: 809
<i>Mazama americana reperticia</i>	Miller & Kellogg	1955	U.S Nat. Mus. Bull. 205: 809
<i>Mazama americana temama</i>	Grub	1990	Journ. British Deer Society, 8(3): 153
<i>Mazama americana temama</i>	Whitehead	1994	The whitehead encyclopedia of deer: 492
<i>Mazama americana temama</i>	Ramirez-Pulido	2000	Bibli. Reciente de los mamif. De Mexico: 233
<i>Mazama temama</i>	Duarte & Gonzalez	2010	Neotropical Cervidology: Biol. Med. Latin Amer. Deer: 166

Os primeiros exemplares de veado vermelho mexicano foram estudados por Saussure (1860), quem analisou crânios coletados pelo senhor Sartorius de El Mirador no estado de Veracruz. Com isso, a localidade foi considerada como tipo da espécie por vários autores (Allen, 1915; Hershkovitz, 1951, Miller e Kellogg, 1955), embora que outros trabalhos citem somente ao estado de Veracruz sem detalhar localização mais específica (Lydikker, 1915).

2.3 Morfologia tradicional de *Mazama temama*

A primeira caracterização morfológica foi feita por Saussure (1860), comparando dois espécimes de *Mazama temama* com outras espécies de cervídeos. Na descrição, ele considerou os crânios mais curtos, largos e convexos em seus dois terços posteriores e os sulcos laterais do occipital menos marcados. Entre outros caracteres, também descreveu a ausência do traço do grande osso Vômer, a abertura lacrimal como mais larga na forma de um trapézio ou de um quadrado arredondado, e o ângulo anterior menos prolongado em comparação com *Cervus rufus* e *Cervus toltecus*.

Os crânios que serviram como base na descrição foram provenientes de Veracruz, um deles coletado por caçadores locais e o outro presenteado pelo Sr.

Sartorius, que foi homenageado com o nome dos exemplares (*Cervus sartorii*) hoje reconhecido como sinônimo de *M. temama* (Duarte et al., 2010).

Tate (1939) analisou crânios e dentes de diferentes espécies de *Mazama* e propôs dois grupos por tamanho, considerando *M. temama* dentro do grupo dos pequenos veados americanos. Hershkovitz (1951), baseado na cor da pele, considerou a existência de unicamente dois tipos de *Mazama*, os cinzas e os vermelhos (Figura 5). Com isso, caracterizou todos os *Mazama* vermelhos como *M. americana* de Erxleben (1777) com diversas subespécies, dentre elas *M. americana temama* (Kerr, 1792) do México, *M. americana reperticia* (Goldman, 1913) do Panamá e *M. americana cerasina* (Hollister 1914) da Costa Rica.

Depois de um longo período de ausência de revisões, foram publicados alguns trabalhos de descrição dos principais caracteres morfológicos da espécie, entre os quais destaca a forma alongada da cabeça, achatada dorsoventralmente com um pequeno focinho, pescoço pequeno, grosso e robusto, acinzentado, orelhas grandes e eretas, extremidades longas, finas e muito fortes, sendo as anteriores mais curtas que as posteriores. A cauda é curta, coberta por abundantes pelos de cor marrom-avermelhada (Aranda, 1987; Eisenberg 1989; Emmons e Feer 1990). As medidas do corpo são: CT = 620-1200 mm, A= 50-126, LT= 674, O= 99, e o peso do corpo varia entre 12 e 20 kg e tem 32 dentes com uma fórmula dentária de I = 0/3, C = 0/1, P = 3/3 e M = 3/3. (Martínez-Gallardo e Sánchez-Cordero, 1997).

Mazama americana temama Kerr

Cervus temama Kerr, 1792, Anim. Kingd., p. 303—based on the *tema-macame* of Hernandez, 1651, Hist. Nat. Mexico, p. 325.

Mazama tema Rafinesque, 1817, Amer. Monthly Mag., 2: 44—new name for *temama* Kerr.

Mazama sartorii Saussure, 1860, Rev. Mag. Zool., (2), 12: 252—type locality, Mirador, Vera Cruz, Mexico.

Mazama sartorii sartorii Allen, 1915, Bull. Amer. Mus. Nat. Hist., 34: 523–524 (*temama* Kerr, *tema* Rafinesque), 530 (name), 541–542 (synonymy, characters, distribution).

Type locality.—Mexico. Here restricted to Mirador, Vera Cruz.
Specimens collected.—1 (skin and skull).

BRITISH HONDURAS: Bokowina (B.M., No. 931).

Remarks.—Only two species of brockets can be distinguished. These are the red, *M. americana* Erxleben, and the brown, *M. gouazoubira* Fischer (1814, Zoognosia, 3: 465, originally misprinted “gouazoupira”; antedates *simplicicornis* Illiger, 1815, also based on Azara's *gouazoubira*). Middle American brockets stand as follows (type localities appended):

Mazama americana temama Kerr—Mirador, Vera Cruz, Mexico.

Mazama americana cerasina Hollister—Talamanca, Costa Rica.

Mazama americana reperticia Goldman—Gatun, Canal Zone, Panama.

Mazama gouazoubira pandora Merriam—Tunkas, Yucatan, Mexico.

Mazama gouazoubira permira Kellogg—Pearl Island, Gulf of Panama, Panama.

Figura 5. Trecho em que Hershkovitz (1951) aloca *M. temama* como subespécie de *M. americana*.

2.4 Citogenética de *Mazama temama*

As informações citogenéticas têm sido úteis na resolução dos problemas taxonômicos do gênero *Mazama*, permitindo entender os mecanismos de especiação que envolvem os rearranjos cromossômicos e a alta instabilidade cromossômica (Duarte e Jorge 2003; Duarte et al. 2008, Abril et al. 2010). Diferentes estudos indicam a citogenética como uma ferramenta importante na taxonomia da família Cervidae, desde que os primeiros trabalhos publicados já mostravam uma grande variação do número diplóide entre as espécies e consideravam as fusões cromossômicas como um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica e especiação (Chandra et al. 1967; Gustavsson e Sundt 1969; Taylor et al. 1969; Jorge e Benirschke, 1977; Neitzel, 1987).

O cariótipo da espécie *Mazama temama* foi descrito por Jorge e Benirschke (1977), partindo do cultivo de fibroblastos de um casal de *M. americana temama* e seu filhote, encontrados em cativeiro no zoológico de San

Diego, provenientes de Tamaulipas, México. O resultado apresentou $2n=49/50$ e $NF=72$, com 20 cromossomos autossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 28 cromossomos acrocêntricos, quatro deles muito pequenos, o cromossomo X um submetacêntrico semelhante em tamanho ao par 6, e o cromossomo Y metacêntrico e o menor do lote. Também, foi mencionada uma possível fusão em tandem 4/24 presente na fêmea. Posteriormente, o cariótipo foi adaptado por Bello-Gutiérrez et al.(2010), seguindo a classificação dos cromossomos por grupo de acordo com a biometria (Abril e Duarte, 2008) e considerando os cromossomos muito pequenos do Jorge e Bernishcke (1977) como cromossomos Bs (Figura 6).

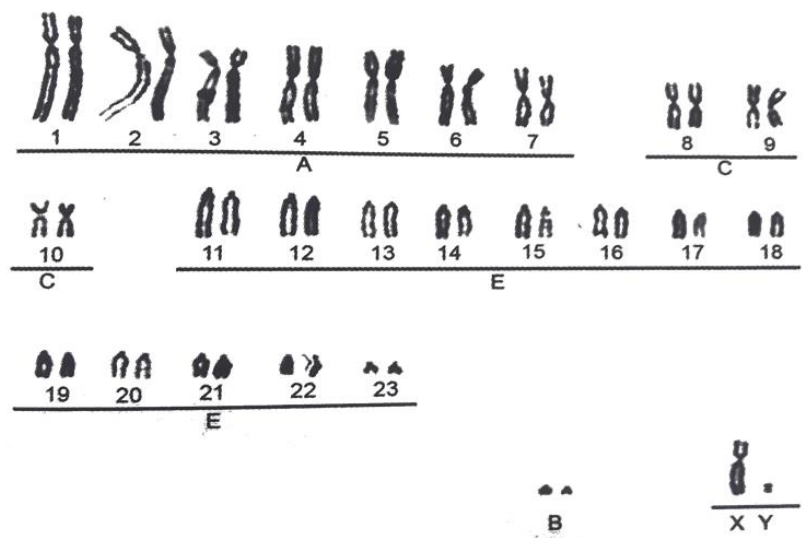


Figura 6. Cariótipo de um macho *M. temama* (Bello-Gutiérrez et al. 2010), baseado em Jorge e Benirschke, 1977.

Os autores comparam o cariótipo de *M. americana temama* do Jorge e Bernishke (1977) com o de *M. americana* descrito por Taylor et al. (1969), que descreveram uma fêmea com $2n=68$ e $NF=74$, com 6 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 62 acrocêntricos, com quatro deles muito pequenos. Da mesma forma, consideram que os rearranjos de fusão em tandem, translocação robertosiana e inversão pericêntrica estão relacionados com a redução de NF de 74 para 72 nos exemplares de *M. a. temama* e discutem a descoberta de uma possível fusão em tandem em heterozigose na fêmea, que foi compatível com a fertilidade (Jorge e Bernishcke, 1977).

Posteriormente, foi feito um estudo sobre a citogenética de várias espécies de cervídeos neotropicais, usando as medições dos cromossomos dos

cariótipos de *M. a. temama* obtidos por Jorge e Bernishke (1977), inferindo a presença de grandes cromossomos metacêntricos como exclusivos nesses exemplares e sugerindo as ocorrências de fusões alinhadas em tandem e cêntricas (Spotorno, 1987). Com isso, o cariótipo de *M. americana temama* divergente dos demais *M. americana* descritos (Taylor et al. 1969, Neitzel 1987) permitiu que outros autores (Groves e Grubb, 1987; Geist, 1998) elevassem *M. temama* ao nível de espécie.

2.5 Estudos de sequências do mtDNA de *Mazama temama*

Estudos moleculares têm sido feitos para esclarecer a identidade de *M. temama* e as suas relações filogenéticas com as outras espécies do gênero. As espécies de *Mazama* formam um grupo polifilético, evidenciado nas reconstruções filogenéticas do genoma mtDNA feitas por Hassanin et al., (2012). As análises do gene citocromo b têm gerado árvores consenso de inferência bayesiana nas quais se forma um grupo parafilético representando os *Mazama* vermelhos como um grupo formado por *M. americana*, *M. nana*, *M. bororo*, *Odocoileus sp.*, e *M. temama* (Gilbert et al, 2006; Duarte et al., 2008, Heckeberg, 2016).

Na história evolutiva, autores consideram que *M. temama* divergiu de outros veados vermelhos há dois milhões de anos e que se distribuiu nos ambientes florestais da América Central, até que se completou a formação do istmo do Panamá, permitindo que ancestrais da espécie se dispersassem pela América do Sul (Escobedo-Morales et al., 2016).

Escobedo-Morales et al. (2016) analisaram 21 sequências de *M. temama* de diferentes localidades do México. Por meio de inferência bayesiana e máxima verossimilhança dos genes ND2, Citocromo b e região tRNA-procontrol, exemplares de *M. temama* formaram um clado monofilético suportado por 99% de probabilidade posterior, separado de *M. americana* e outras espécies de veado vermelho como *M. nana*, *M. bororo*, *M. americana* e *Odocoileus sp.*, formando um grupo parafilético.

O estudo das relações filogenéticas dos cervídeos neotropicais, por meio de análises filogenéticas do CITB, tem demonstrado que as características morfológicas do gênero *Mazama* não são elementos diagnósticos do grupo e sim o resultado da convergência evolutiva, ou as plesiomorfias representadas

inerentes ao ancestral comum de muitos dos cervídeos, como considerado por outros autores (Duarte et. al, 2008; Hassanin et al, 2012; Heckeberg et al, 2016; Escobedo-Morales et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017).

Recentemente, Gutiérrez et al., (2017) analisaram 11 sequências de *M. temama*, 9 provenientes de diferentes localidades no México, uma da Guatemala e uma da Colômbia, encontrando a formação de um grupo polifilético no qual os indivíduos do México e Guatemala se agruparam separadamente do indivíduo da Colômbia. Os resultados dos trabalhos de Escobedo-Morales et al. (2016) sobre a monofilia de *M. temama* e as referências antigas de distribuição da espécie (Allen, 1915) foram questionadas por Gutiérrez et al., (2017), que consideraram que a espécie ocorre somente do México até o Panamá. As referências da ocorrência na Colômbia não foram confirmadas, já que foram baseadas em entrevistas com as comunidades (Bello e Gutiérrez, 2010). Por isso, o indivíduo colombiano analisado pode se referir a uma espécie não descrita (Gutiérrez et al., 2017) previamente confundido com *Odocoileus* sp., mas que atualmente foi reconhecida como sequência de *M. temama* (Hassanin et al., 2012; Heckeberg et al., 2016, Figura 7).



Figura 7. Árvore filogenética de sequências de Citocromo b da tribo Odocoileini, resultado de inferência bayesiana (Gutiérrez et al., 2017).

Contudo, é necessário conhecer a verdadeira identidade taxonômica de *M. temama* (Kerr, 1792), descrita em Veracruz no México, utilizando para isso tanto características morfológicas como citogenéticas e moleculares, além de comparar com indivíduos de diferentes localidades.

III. OBJETIVOS

- Caracterizar um topótipo e três exemplares de outra localidade do México da espécie *Mazama temama*, por meio de análises morfológicas (biometria corporal, padrões de coloração, craniometria, caracterização de pós-crânio), citogenéticas (cariótipo convencional, biometria cromossômica, bandamento C, bandamento G, coloração Ag-NOR) e moleculares (três regiões de DNA mitocondrial).
- Comparar os padrões obtidos com os já descritos na literatura para outros espécimes da mesma espécie, a fim de esclarecer o nível de diferença entre indivíduos já estudados, possibilitando revisar a taxonomia da espécie, incluindo suas sinonímias e subespécies.

IV. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Permissão de coleta

Todos os exemplares utilizados no estudo foram coletados em parceria com o Instituto de Ecologia A.C. do México, cuja permissão de coleta dos pesquisadores a cargo encontra-se na íntegra no Apêndice A. Todo o material foi devidamente autorizado como doação para o seu estudo no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) como exposto no Apêndice B.

4.2. Pesquisa sobre a existência do holótipo

Para poder confirmar a existência do holótipo, foi realizada uma pesquisa em museus regionais do México e em instituições reconhecidas mundialmente onde possivelmente pudesse ter sido depositado o exemplar que serviu para a

descrição do Hernández em 1651, e utilizado na referência de Kerr (1792) sobre o *Cervus temama*.

As buscas foram feitas em instituições reconhecidas mundialmente, e que disponibilizam a base de dados de suas coleções *on-line*: Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris), Natural History Museum (Londres), National Museum of Natural History¹ (Smithsonian, Nova Iorque), American Museum of Natural History² (AMNH, Nova Iorque). Da mesma forma, foi estabelecido o contato com o Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid, Espanha e revisados os museus Mexicanos para descartar a possibilidade de depósito de algum exemplar de Hernández, como são Museo de Zoología "Alfonso L. Herrera" (MZFC), Universidad Nacional Autónoma de México, Colección Nacional de Mamíferos (CNMA) e Universidad Veracruzana, Instituto de Investigaciones Biológicas IIB-UV. Não foi encontrado nenhum registro do holótipo de Hernández ou Kerr, e nem de neótipos, permitindo assim, a designação de um neótipo para esta espécie

4.3 Obtenção dos animais e amostras

A partir da realização de levantamento bibliográfico foi definida a localidade tipo para coleta de um macho de *M. temama* (Kerr, 1792), sendo a cidade Mirador no estado de Veracruz, México. A coleta foi realizada por caçadores locais, auxiliados por cães de caça no município de Zongolica em Veracruz, em uma localidade denominada San José Aqualco, coordenadas 18°38'53"N e 96°56'57"W a 45.7 kms de distância da localidade tipo. Foi coletado um macho jovem no dia 13/12/2015.

Além deste animal coletado o mais próximo da localidade tipo, houve oportunidade de coleta de dois exemplares em ZohLaguna, Campeche, próximo à Reserva de Calakmul (Figura 8). Nesta localidade, foi coletado um casal adulto, também por caçadores locais. O ponto aproximado de coleta dos exemplares foi 18°35'30"N e 89°24'55"W. Além destes, para os quais foi obtido todo material necessário para as análises citogenéticas, morfológicas e moleculares, foram ainda obtidos mais dois exemplares, um feto que estava na fêmea coletada em Zoh-Laguna (foi utilizado somente para citogenética) e uma fêmea adulta, que estava congelada no INECOL, originária de Xalapa. Para este exemplar foram realizadas as análises morfológicas e moleculares.



Figura 8. Mapa do México com os pontos de coleta do topótipo de *Mazama temama* e dos demais exemplares utilizados no estudo.

4.4 Procedimentos após a coleta do exemplar

Assim que os animais abatidos chegaram às mãos da equipe de campo, foi realizada uma sequência de procedimentos para o aproveitamento completo dos animais:

4.4.1. Biometria

Os animais inteiros foram avaliados morfologicamente através das seguintes medidas corporais: peso, comprimento do chifre esquerdo e direito, diâmetro à base dos chifres direito e esquerdo, comprimento de cabeça, largura de cabeça, comprimento da orelha, distância entre olhos, distância entre chifres, largura da mandíbula à base, comprimento do metacarpo, comprimento do metatarso, altura do corpo, comprimento do corpo, comprimento da cauda, perímetro de pescoço e perímetro torácico. Estas medidas foram tomadas por balança pendular, fita métrica e paquímetro.

Foi realizada uma análise de clusters com o programa “Paleontological Statistics” PAST (Hammer et al.2001) a partir dos dados quantitativos das medidas corporais do topótipo junto com as dos outros exemplares analisados no estudo e comparadas com indivíduos do banco de dados do NUPECCE

pertencentes as espécies *M. americana*, *M. bororo*, *M. rufa*, *M. nana* e *M. gouazoubira*. Para a seleção dos indivíduos foram considerados somente animais adultos e preferencialmente provenientes de vida livre.

4.4.2. Documentação fotográfica

Os animais foram posicionados em decúbito lateral, em cima de um pano azul com o número da coleta. Foram tomadas fotos nas seguintes posições: a) Lateral, b) Ventral, c) Dorsal e d) Detalhe da lateral da cabeça. Para a documentação foi utilizada uma identidade para cada animal coletado, sendo T366 para o topótipo e T362, T363 e T364 para os exemplares fêmea, macho e feto respectivamente.

4.4.3 Biopsia de pele

Após tricotomia e antissepsia da região interna da coxa esquerda, foi excisado um fragmento de 5 cm x 2 cm de pele que foi depositado em um tubo contendo meio de transporte (Meio McCoy's + 500 mg/L gentamicina + 200 mg/L anfotericina B) (Duarte *et al.*, 1999), permanecendo sob refrigeração até a chegada ao laboratório de campo. Ali o fragmento de pele foi dividido em 10 fragmentos, que foram depositados em tubos criogênicos contendo meio de congelamento de peles (200 mL meio McCoy's (Vitrocell®) + 40 mL soro equino 16 inativado + 2 mL dimetilsulfóxido (DMSO) + 24gr de polivinil pirrolidona + 100 mg/L sulfato de gentamicina + 4 mg/L anfotericina) (Duarte *et al.* 1999).

Esse material permaneceu por 4 horas sob refrigeração e por 30 minutos no vapor do Nitrogênio Líquido, sendo após estocado em imersão no Nitrogênio Líquido (-196 °C). Estas células, que permanecem vivas nessa condição, foram utilizadas para cultivos de fibroblastos para estudos citogenéticos.

4.4.4 Retirada e processamento da pele completa

A pele, na sua íntegra, foi retirada e limpa de restos musculares, gordura e fâscias, sendo então mergulhada em solução curtume para dessecação do material. Após secagem por 3 dias, a mesma foi acondicionada aberta para estudos morfológicos. As peles foram depositadas no Museu Cervidológico do NUPECCE que mantém a mais importante coleção de cervídeos do gênero *Mazama* do mundo, com peles, crânios e pós-crânios de mais de 100 espécimes.

Os números de catálogo foram NPC94 para o topótipo, NPC 91 e NPC 92 para macho e fêmea de Calakmul respectivamente, e NPC 95 para a fêmea de Xalapa.

4.4.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo

Durante o processamento da carcaça foram coletadas amostras de tecido (músculo, fígado, rim, baço) para estudos moleculares. Fragmentos de 1 cm³ destes tecidos foram mergulhados em tubos com etanol absoluto, permanecendo à temperatura ambiente.

4.4.6 Preparação do crânio e pós-crânio

O esqueleto completo (crânio e pós-crânio) foi limpo no local de abate dos animais após cozimento. O material seco foi acondicionado em caixas plásticas e catalogado junto com as peles no mesmo Museu.

4.4.7 Relação de espécies utilizadas

O topótipo e os exemplares coletados em Campeche foram utilizados em todas as análises morfológicas, citogenéticas e moleculares, sendo que a fêmea congelada de Xalapa, identificada como Mx08, foi utilizada para análise craniométrica e construção de árvores filogenéticas. Para as análises craniométricas foram utilizados exemplares do gênero *Mazama* depositados no Museu Cervidológico do NUPECCE (Tabela 2). Para as análises moleculares, foram utilizadas sequências disponíveis no Genbank cujo código de acesso e dados da origem encontram-se disponíveis na Tabela 3.

Tabela 2. Relação de espécies utilizadas para comparação nas análises craniométricas, com seu número de identificação do museu, sexo e origem.

Espécie	N° NPC	Origem	Sexo
<i>Mazama bororo</i>	NPC01	Campina Grande do Sul-PR	M
	NPC02	-	F
	NPC 24	Pq. Estadual Intervales, SP, Brasil. Vida livre	M
<i>Mazama nana</i>	NPC 20	-	F
	NPC 114	-	M
<i>Mazama americana</i>	NPC 22	Comunidade Cipoal-Jarí	M
	NPC 29	-	F
	NPC 34	-	M
	NPC 79	Regina, Guiana Francesa. Neótipo	M
	NPC 118	Foz do Iguaçu, PR	F
<i>Mazama gouazoubira</i>	NPC 61	Guariba, SP.	M
	NPC 113	Próximo a Assunção, Paraguai.	M
<i>Mazama nemorivaga</i>	NPC 80	Guiana Francesa	M
	NPC 62	-	M

Tabela 3. Relação de animais utilizados para as análises filogenéticas.

Espécie	ID	N° de acesso	Origem	Fonte	GENE			
					dloop	citb	coi	nd5
<i>M.temama</i>	Mt3	KC146964.1	México, Oaxaca	Escobedo et al.2012	X			
<i>M.temama</i>	Mt2	KC146963.1	México, Hidalgo	Escobedo et al.2012	X			
<i>M.temama</i>	Mt1	KC146962.1	México, Chiapas.	Escobedo et al.2012	X			
<i>M.temama</i>	Mt4	KC146965.1	México, veracruz	Escobedo et al.2012	X			
<i>M.americana</i>	MA5	GU305925	Brasil, Paraná	Abril et al., 2009	X			
<i>M.americana</i>	MA6	GU305928	Brasil, Maranhão	Abril et al., 2009	X			
<i>M.americana</i>	MA7	GU305935	Brasi, Matogrosso	Abril et al., 2009	X			
<i>M.americana</i>	MA8	GU305939	Brasil, Paraná	Abril et al., 2009	X			
<i>M.americana</i>	MAP1	NUPECCE T104	Brasil, Paraná	-	X	X	X	
<i>M.americana</i>	MAP2	NUPECCE T110	Brasil, Paraná	-	X		X	
<i>M.americana</i>	MAP3	NUPECCE T205	Brasil, Paraná	-	X		X	
<i>M.americana</i>	MAP4	NUPECCE T257	Brasil, Paraná	-	X			
<i>M.americana</i>	MAP5	NUPECCE T268	Brasil, Paraná	-	X			
<i>M.americana</i>	MAP6	NUPECCE T270	Brasil, Paraná	-	X			
<i>M.rufa</i>	MR N	NUPECCE	Brasil, Paraná	-	X	X	X	X

<i>M.americana</i>	MA T	NUPECCE	Guiana	-	X	X	X	X
<i>M.gouazoubira</i>	MG1	AF012556	-	González et al.1998	X			
<i>M.gouazoubira</i>	MG2	JF459199	Guiana	Hassanin et al.2012	X			
<i>O.virginianus</i>	OV1	KM233584	Estados Unidos	Sumners, et al, 2014	X			
<i>O.virginianus</i>	OV2	KM233521	Estados Unidos	Sumners, et al, 2014	X			
<i>B.dichotomus</i>	BD1	AY326251	Basina Río de plata	Márquez, et al. 2003	X			
<i>B.dichotomus</i>	BD2	AY326250	Basina Río de plata	Márquez, et al. 2003	X			
<i>A.alces</i>	ALCES	U12863	Alaska	Feng et al.1992	X			
<i>C.capreolus</i>	CAPREOLUS	AM279273	-	Fajardo et al.2007	X			
<i>M.temama</i>	Mt8	KP954718	México, Hidalgo	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt7	KP954717	México, Hidalgo	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt6	KP954716	México, Chiapas	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt12	KP954720	México, Veracruz	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt15	KP954719	México, Puebla	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt4	KP954721	México, Hidalgo	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt17	KC146959	México, Veracruz	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt9	KC146957	México, Hidalgo	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt3	KC146956	México, Chiapas	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	Mt11	KC146958	México, Oaxaca	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.temama</i>	EEG57MT GU	KC928661	Guatemala	Gutiérrez et al 2017		X		
<i>M.americana</i>	MAP7	NUPECCE T220	Brasil, Paraná	-		X		
<i>M.americana</i>	MAP9	DQ789225	Brasil, Pará	Duarte et al.2008		X		
<i>M.americana</i>	MA9	NC0207191	-	Hassanin et.2012		X		
<i>M.rufina</i>	RUFINA	KR107039	Equador, Pichincha	Gutiérrez et al.2015		X		
<i>M.bororo</i>	MB1	DQ789231	São Paulo, Barra turvo	Duarte et al.2008		X		
<i>M.bororo</i>	MB2	DQ789228	-	Duarte et al.2008		X		
<i>M.nana</i>	Mn1	DQ789227	Brasil, Paraná	Duarte et al.2008		X		
<i>M.nana</i>	Mn2	DQ789210	Brasil, Paraná	Duarte et al.2008		X		
<i>M.nana</i>	Mn3	DQ789214	Paraguay	Duarte et al.2008		X		

<i>M.pandora</i>	MP1	KC146954	México	Escobedo et al.2016		X		
<i>M.gouazoubira</i>	MG1	DQ789202	Brasil, SP	Duarte et al.2008		X		
<i>M.gouazoubira</i>	MG2	DQ789200	-	Duarte et al.2008		X		
<i>O.virginianus</i>	OVI	DQ379370.1	Mnnh	Duarte et al.2008		X		
<i>R.tarandus</i>	RT1	DQ673135	Russia, Evensk	Cronin et al, 2006		X		
<i>R.tarandus</i>	RT2	DQ673134	Alaska	Cronin, et al, 2006		X		
<i>M.americana</i>	MA10	JN632656	Guiana Francesa	Hassanin et al2012				X
<i>M.americana</i>	MA11	JN632657	-	Hassasnin et.2012				X
<i>M.rufina</i>	RUFINA1	JN632661	Colombia	Hassasnin et.2012				X
<i>M.rufina</i>	RUFINA2	NC_020721	-	Hassasnin et.2012				X
<i>M.gouazoubira</i>	MG5	JN632658	-	Hassanin et al2012				X
<i>M.gouazoubira</i>	MG6	KJ772514	-	Caparroz et al2014				X
<i>M.nana</i>	MN1	JN632660	Guiana	Hassasnin et.2012				X
<i>M.nana</i>	MN2	JN632659	Perú	Hassasnin et.2012				X
<i>R.tarandus</i>	RT4	KM506758	China	Ju et al 2014				X
<i>R.tarandus</i>	RT5	NC_00703	Japão	Wada, K. 2006				X
<i>M.americana</i>	MA1	JF459197	Guiana, Potaro	Lim et al.,2011			X	
<i>M.americana</i>	MA2	JF459196	Guiana, Takutu	Lim et al.,2011			X	
<i>M.americana</i>	MA3	JF459195	Guiana, Potaro	Lim et al.,2011			X	
<i>M.americana</i>	MA4	JF459194	Guiana, Potaro	Lim et al.,2011			X	
<i>M.gouazoubira</i>	MG4	JF459200	Guiana	Lim e al 2011			X	
<i>M.gouazoubira</i>	MG5	JF459199	Guiana	Lim e al 2011			X	
<i>R.tarandus</i>	RT3	JF443512	Canadá	Eger et al 2011			X	

4.5 Caracterização morfológica

Os crânios foram fotografados em todos os ângulos, com o uso de uma câmera digital para complementar a documentação e descrição do espécime.

Medidas foram tomadas do crânio, de acordo com o padrão de medições cranianas de cervídeos propostas por Rees (1969) e Driesch (1976) (Figura 9).

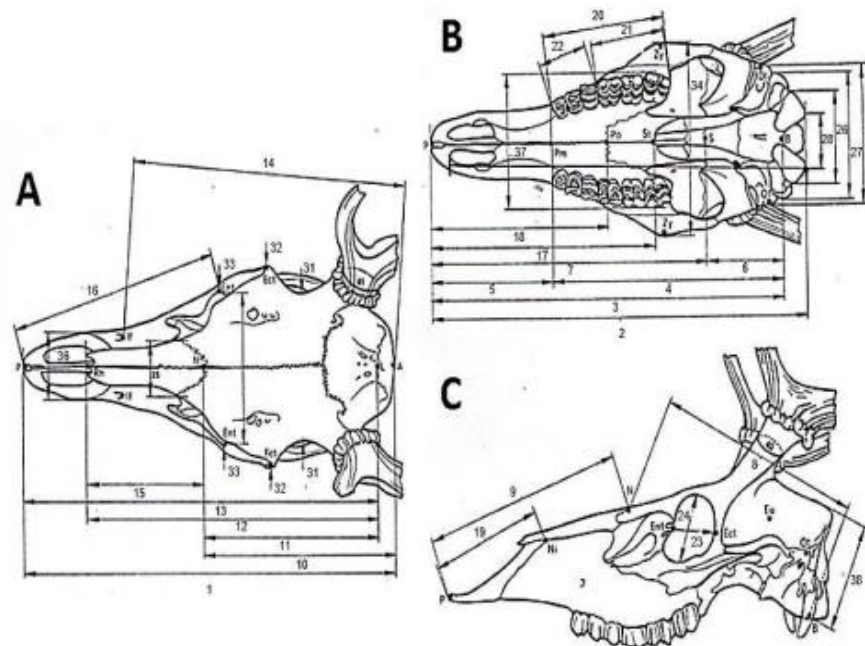


Figura 9. Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vistas dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). A medida 1 representa o comprimento total, 2 comprimento côndilo-basal, 3 comprimento basal, 4 comprimento curto do 29 crânio, 5 pré-molar – prosthion, 6 eixo base-cranial, 7 eixo base-facial, 9 comprimento vicero-craniano, 10 comprimento frontal mediano, 11 lambda – nasal, 12 lambda – região mais distal do osso nasal, 13 lambda – prosthion, 14 acrocânio, 15 maior comprimento dos nasais, 16 comprimento curto facial – lateral, 18 comprimento palatal-oral, 19 comprimento lateral do pré-maxilar, 20 distância corrida de dentes, 21 comprimento da linha do molar, 22 comprimento da linha pré-molar, 23 maior comprimento interno da órbita, 24 maior altura interna da órbita, 25 maior largura do mastóide, 26 maior largura dos côndilos occipitais, 27 maior largura das bases do processo para-occipital, 28 maior largura do forâmen magno, 29 altura do forâmen magno, 30 maior largura neurocraniana, 31 menor largura frontal, 32 maior largura entre as órbitas, 33 menor largura entre as órbitas, 34 largura do zigomático, 35 maior largura entre os nasais, 36 maior largura entre o pré-maxilar, 37 maior largura do palatal, 38 basion – ponto mais alto da crista nugal superior (REES, 1969; DRIESCH, 1976).

Foram comparadas as medidas crânio-mandibulares do exemplar coletado junto com as dos outros exemplares de *Campeche* e outras espécies do gênero *Mazama* disponíveis no Museu Cervidológico do Nupecce.

Foi realizada uma análise de componentes principais e de cluster no programa PAST 3.08 (Hammer *et al.*, 2001), para medir a similaridade entre

indivíduos, bem como para discriminar espécies e populações (Sneath e Sokal, 1973). Para isto, foram consideradas 16 medidas cranianas que se encontram na maioria dos indivíduos analisados: Comprimento total (CT), Pré-molar – prosthion (PP), comprimento frontal mediano (CFM), Lambda-nasal (LN), Lambda-rhinion (LR), Acrocânio (ACR), largura do zigomático (LZ), comprimento maior do nariz (CMN), comprimento da linha molar (CLM), distância corrida de dentes (DCD), comprimento da linha pré-molar (CLP), maior comprimento interno da órbita (MCIO), maior altura interna da órbita (MAIO), menor largura entre as órbitas (MLEO), maior largura entre os nasais (MLEN) e maior largura entre o pré-maxilar (MLEP).

Foram examinados, na pele taxidermizada e nas fotos, aspectos de coloração geral da pelagem, campos cromogénéticos da cabeça (faixas orbitais superiores e inferiores, mancha superciliar anterior, regiões auriculares anterobasal e posterobasal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular), campos cromogénéticos do corpo (região da cabeça e pescoço, linha mediana dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal posterior 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, ocorrência de faixas de pelos antevertidos e de tufo arredondado de pelos na região tarsal.

4.6 Análises Citogenéticas

4.6.1 Cultivo celular

As amostras de peles foram importadas e encontram-se no banco criogênico do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) FCAV, UNESP, Jaboticabal SP.

Estas amostras de pele foram descongeladas em banho-maria a 37°C e colocadas em placas de Petri, contendo tampão fosfato (PBS), sendo então divulsionadas mecanicamente e divididas em fragmentos finos. Estes foram transferidos para os frascos de cultivo T25 com 1ml de meio de cultura DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco), enriquecido com 50% de soro fetal bovino, suplementado com 5µL de amicacina para cada 1ml de meio, e

levados a estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a aderência das células no frasco, o meio foi trocado por 5ml de meio com 15% de soro fetal bovino (Verma; Babu, 1995).

Os cultivos foram supervisionados a intervalos de 24 horas, e o meio foi trocado a cada dois dias. Quando as células alcançaram o ponto de confluência, o meio foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS, tratadas com 2 ml de solução de tripsina ATV durante um minuto, sob monitoramento em microscópio invertido.

Posteriormente, as células foram colocadas em tubo de fundo cônico e alimentadas com 10 ml de meio enriquecido, e passado para outro frasco de cultivo onde estiveram "realimentados" da mesma maneira, até obter um número suficiente de cultivos secundários. Os cultivos secundários com ótimo crescimento celular, após 24 horas de cultivo, foram tratados com 60µL de Colchicina 0,016% durante 30 a 60 minutos antes da colheita e uma solução de tripsina no momento da colheita.

Em seguida, as células foram ressuspensas em 8mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubadas numa temperatura de 37,5°C por 20 minutos. Depois o material passou por centrifugação, o sobrenadante foi descartado novamente e o sedimento foi restituído a 6ml com solução fixadora de metanol e ácido acético 3:1. O processo se repetiu com sucessivas centrifugações após a restituição do volume a 4:3:2 com solução fixadora até obter 1 ml.

4.6.2 Coloração convencional

As lâminas foram coradas com 3,0 mL de tampão fosfato 0,01M (1,36 g KH₂PO₄/L + 1,42 g Na₂HPO₄/L) e 0,1 mL de corante Giemsa (2,0 g de Giemsa + 108,0 mL de glicerina + 168,0 mL de metanol)/lâmina por 5 minutos. Cinquenta metáfases foram analisadas para se verificar o número diplóide de cromossomos (2n) exato do espécime.

4.6.3 Biometria Cromossômica

Para a classificação cromossômica, foram utilizadas 10 metáfases do topótipo coletado e 3 metáfases dos outros exemplares do estudo. Os

cromossomos foram medidos a partir do centrômero até o telômero utilizando o programa computacional “AxioVision”, e com base nesses dados, foi estimada a razão entre braços ($r = \text{braço longo} / \text{braço curto}$). De acordo com o valor de r os mesmos foram classificados como metacêntricos ($1 \leq r < 1,7$), submetacêntricos ($1,7 \leq r \leq 3$) ou acrocêntricos ($r > 3$) (Levan; Fredga; Sandberg, 1964). De acordo com o comprimento relativo (CR), os cromossomos autossomos foram classificados como sendo do grupo A (grandes cromossomos de dois braços, com $CR > 6\%$), C (pequenos cromossomos de dois braços, com $CR < 6\%$), D (grandes cromossomos acrocêntricos, com $CR > 5\%$), E (pequenos cromossomos acrocêntricos, com $CR < 5\%$) e B (micro-cromossomos ou cromossomos B = $CR < 1,5\%$) (Tomazella, 2017).

4.6.4 Bandeamento G (Seabright, 1971, modificada)

Foram empregadas lâminas com dez dias de preparação, as quais foram mergulhadas numa solução de tripsina 0,0025% em tampão fosfato e a 38°C por 2 a 5 segundos. A coloração foi feita com solução Giemsa 1:2 em tampão fosfato pH 6,8 por 9 minutos. Após a obtenção dos padrões de bandamento G, foi elaborado um idiograma com este padrão utilizando como base 3 metáfases do topótipo. Este idiograma será adotado como referência para os demais trabalhos que venham a ser realizados com o táxon.

4.6.5 Bandeamento C (Sumner, 1972)

As lâminas foram mergulhadas em solução de HCl (0,02N) por 20 minutos, sendo em seguida lavadas com água corrente, mergulhando-se em solução de Ba(OH)₂ (0,07N) a 40°C por 20 a 25 minutos. As lâminas foram lavadas de novo com água corrente e depois mergulhadas em solução 2 x SSC por 1,5 a 2 horas. Após isso, as lâminas foram coradas com Giemsa a 2% em tampão fosfato, por 25 minutos.

4.6.6 Coloração AgRON (Howell; Black, 1980)

Em uma lâmina com aproximadamente 7 dias, foram pingadas duas gotas de nitrato de prata a 50% e uma gota de solução coloidal (1 g de gelatina P.A. em 50 mL de água deionizada mais 0,5 mL de ácido fórmico), colocando-se uma lamínula sobre a preparação. A lâmina foi colocada em placa de Petri

com papel molhado, sendo aquecida a 56°C em estufa, por 4 a 5 minutos até obter uma cor dourada. Após isso, a lâmina foi mergulhada em água deionizada para retirada da lamínula, sendo depois lavada com água corrente e analisada ao microscópio.

4.6.7. Análise das preparações cromossômicas

As lâminas submetidas às técnicas de bandamento cromossômico foram analisadas e fotografadas em um microscópio Olympus CX31 em objetiva de 100x com uma câmera digital Olympus Camedia C5060 equipado com uma câmara Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision Release.

Todas as imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2.

Foram comparadas as metáfases sob cada bandamento dos exemplares de Campeche em relação aos bandamentos do topótipo, utilizando o idiograma construído e demais colorações realizadas. Com isso, estudar o nível de diferença entre os exemplares e ao mesmo tempo, comparar com o cariótipo descrito para a espécie pelo Jorge e Bernishke (1977).

4.7. Genética molecular

Os fragmentos de fígado ou músculo foram utilizados para a extração do DNA dos animais amostrados.

4.7.1. Extração de DNA

A extração de DNA genômico a partir das amostras de tecido foi realizada utilizando-se a digestão com proteinase K e extração com fenol/clorofórmio, utilizando-se um protocolo modificado a partir da metodologia descrita por Sambrook et al. (1989). As amostras foram quantificadas por espectrofotometria e por análise em gel de agarose, sendo em seguida diluídas em uma solução de uso.

4.7.2. Amplificação e sequenciamento de genes mitocondriais e nucleares

Para realizar a caracterização molecular da espécie foram utilizados marcadores de DNA mitocondrial. No genoma mitocondrial se realizou amplificação do gene do citocromo b (cit B) (Hassanin et al., 1998, Duarte et al., 2008), a subunidade I da citocromo oxidase (COI) (Folmer et al., 1994; Hassanin & Ropiquet, 2004), NADH5 Desidrogenase subunidade 5 (Caparroz et al., 2015) e região controladora mitocondrial (D-loop) (Vilà et al., 1999) como é apresentado na Tabela 4.

Tabela 4. Genes mitocondriais amplificados e os iniciadores (primers) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento.

GENE	INICIADORES (Primers)	SEQUÊNCIAS (forward Reverse)	Tamanho fragmto (pb)	T° pareamto	Fonte
CIT-B	L14724 H15149	5'CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTGE3' 5'AAACTGCAGCCCTCAGAATGATATTTGCTCA3'	480 pb	55°C	Kocher et al., 1989
CIT-B	FARH FARL	5'TCCAATAGTAATAAGGGGTGTTCA3' 5'CCATGAGGACAAAATATCATCTGAT3'	660pb	55°C	Duarte et al., 2008
COI	LCO1490 HCO2198	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3' 5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAATCA3'	658 pb	59°C	Folmer et al., 1994
D-LOOP	ThrL15926 DLH16340	5'GGTTCGCCGGTCTTGTAACC3' 5'CCTGAAGTAGGAACCAGATG3'	660pb	55°C	Vilà et al., 1999
ND5	Leu11775 ND512427	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3' 5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'	691pb	53°C	Caparroz et al., 2015
ND5	ND512326 ND512988	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3' 5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'	688pb	53°C	Caparroz et al., 2015
ND5	ND513167 ND513709	5'AATARTTGGGAAGCCTTTTCG3' 5'TATGATACAGGRGATTCTGG3'	581pb	53°C	Caparroz et al., 2015

Os fragmentos de DNA foram amplificados em termociclador BioradTM usando uma reação de PCR padrão, conforme segue: 300µM de d NTPs, 1,5mM de MgCl, tampão 1x (200 mM Tris-HCL pH 8,4; 500 mM KCL), 1U de taq DNA polimerase, 20 pmol do iniciador forward, 20 pmol do iniciador reverse, 6-10 ng de DNA, em um volume final de 30 µL. O programa de temperaturas da reação foi; ciclo inicial de 5 min a 94°C para a desnaturação do DNA; 30 ciclos de: 94°C por 1 min, temperatura de hibridização específica de cada para de iniciadores (tabela 4), 45-75 seg, 72°C por 1 min, com uma extensão final de 72°C por 7 min.

Em todas as reações foram incluídos controles negativos para verificar a possibilidade de contaminação.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram corados com Gel RedTM (Biotium), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e, sob transiluminador de luz ultravioleta 302 nm (BioAgency), fotodocumentados e analisados. A purificação dos produtos da PCR foi feita com o kit Wizard SV gel

and PCR Clean-Up System (Promega TM) e em seguida foi feito o sequenciamento utilizando-se o kit ABI BigDye Terminator (Applied Biosystems) em sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems).

4.7.3. Análise filogenética

As sequências de nucleotídeos foram alinhadas com Clustal X (Thompson et al., 1997), e manejadas manualmente substituindo com “N” as extremidades com BioEdit (Hall, 1999). Obtidas as matrizes de cada gene, estas foram carregadas no programa Paup para aferição das árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (Swofford, 1999), usando o modelo evolutivo gerado através do Modeltest 3.7 (Posada e Crandall, 1998).

As análises de inferência bayesiana (IB) foram realizadas no programa MR. BAYES 3 (Huelsenbeck; Ronquist; 2001), com 10.000.000 de gerações até obter uma variância de <0.01 , adotando um descarte por “burn-in” de 25%. Para estimar a probabilidade posterior foi utilizado o método “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) com nchains=4, nrns=2 e burnfrac=0,25 para todos os genes. As árvores obtidas de todas as análises foram editadas com auxílio do programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

O suporte dos agrupamentos filogenéticos foi estimado pelas probabilidades posteriores. Tudo isso para conseguir uma comparação das sequências obtidas com as sequências já existentes no Genbank e assim obter uma avaliação preliminar da posição dos exemplares coletados neste estudo em relação aos demais já avaliados filogeneticamente.

Os dados obtidos foram finalmente analisados dentro dos conceitos de espécie filogenética (Cracraft, 1983) que consiste no menor conjunto de organismos que compartilham um ancestral e podem ser distinguidos de outros grupos de organismos, ou seja, grupo monofilético. Também, foi discutido o conceito de coesão das espécies (Templeton, 1989; 2001) definido como “a mais inclusiva população de indivíduos que têm o potencial para a coesão através de intercâmbios genéticos e intercâmbios demográficos” (Templeton, 1989). Foi também considerado o princípio da concordância genealógica (Avice; Ball, 1990), que seria uma variante do conceito filogenético de espécie baseado no consenso de muitas genealogias (filogenias de gene único), estimadas de diferentes genes.

V. RESULTADOS

5.1 Descrição emendada de *Mazama temama* (Kerr, 1792) (MAMMALIA, CERVIDAE): Cor geral da pelagem vermelha, assemelhando-se a cor de tijolo. Membros posteriores vermelhos na parte traseira, a região proximal externa da mesma coloração que a região lateral do corpo e a região proximal interna levemente amarelada (Figuras 10A, 11A e 12); Região distal externa de cor castanha avermelhada na porção mais distal e a região distal interna avermelhada. Faixas orbitais inferior e superior da mesma tonalidade do corpo, esbranquiçada na região mais cranial. Fossa lacrimal relativamente profunda. Face interna da orelha branca pura com abundantes pelos, além de muito longos. Borda da face interna da orelha castanha escura (Figura 10B). Pelos lisos, com uma variação no seu comprimento segundo a região do corpo, os mais curtos e finos na região que recobre o focinho, o queixo e a região distal dos membros anterior e posterior. Pelos um pouco mais longos na superfície interna da orelha, ancas e a cauda (Figura 10B). Presença de um tufo de pelos no dorso da cabeça imediatamente anterior aos chifres (topete). Chifres relativamente pequenos e grossos, inclinados póstero-dorsalmente, levemente curvados e paralelos entre si (Figura 11B). A região dorsal é a parte do corpo que apresenta a tonalidade da cor mais escura (Figura 11). Na região lateral do corpo, a mesma tonalidade do dorso, levemente mais fraca, e a região abdominal da mesma coloração que os flancos, tornando-se levemente amarelada (Figura 12 e 13). Cauda na região dorsal avermelhada, da mesma coloração do corpo e a região ventral branca. Região inguinal esbranquiçada, assim como a região bucal e o interior das orelhas (Figura 12B).

Localização do registro: Songolica-Veracruz, San José Aqualco. Bosque mesófilo de montanha, 497m de altitude.

Coordenadas geográficas do ponto de coleta: 18° 38' 53" N, 96° 56' 57"W.

Depositado em: Museu Cervidológico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Universidade Estadual Paulista "Júlio Mesquita Filho" - Campus de Jaboticabal/SP

N. de tombo: NPC94

N. de tesis: T366

Cariótipo: 2n=44 NF=70 + 4-5Bs



Figura 10. (A) Vista lateral do topótipo de *Mazama temama* (B) Vista lateral da cabeça



Figura 11. (A) Vista dorsal do topótipo de *Mazama temama*. (B) Coloração da cabeça (C) Ancas e dorso da cauda.



Figura 12. Vista ventral do topótipo de *Mazama temama*.

Na figura 13 é apresentada a pele taxidermizada do topótipo estudado. Os dados da biometria corporal são apresentados na tabela 5.



Figura 13. Pele aberta taxidermizada do topótipo de *M. temama*

Tabela 5. Medidas biométricas do topótipo de *Mazama temama* (em mm, massa em kg).

Comprimento da cabeça:	200	Comprimento do corpo:	640
Largura da cabeça:	75	Abdômen:	535
Comprimento da orelha:	82	Comprimento do testículo direito:	52,5
Distância entre olhos:	49	Comprimento do testículo esquerdo:	49,5
Mandíbula:	61	Diâmetro do testículo direito:	24
Perímetro do pescoço:	230	Diâmetro do testículo esquerdo:	21,5
Tórax:	490	Metatarso:	185
Altura:	480	Comprimento da cauda:	105
Metacarpo:	117	Massa:	11.6

5.2 Análises morfológicas de biometria e craniometria

A árvore de distância morfológica feita a partir das medidas biométricas dos indivíduos (Figura 14) mostrou a formação de dois clados principais. Um grupo é formado por indivíduos das espécies de médio porte como são *M. americana*, *M. rufa* e dois indivíduos de *M. bororo* sendo que no outro grupo também são agrupados dois *M. bororo* junto com *M. nana*, *M. goazoubira* e *M. temama*, não sendo possível a distinção entre as espécie dentro dos grupos.

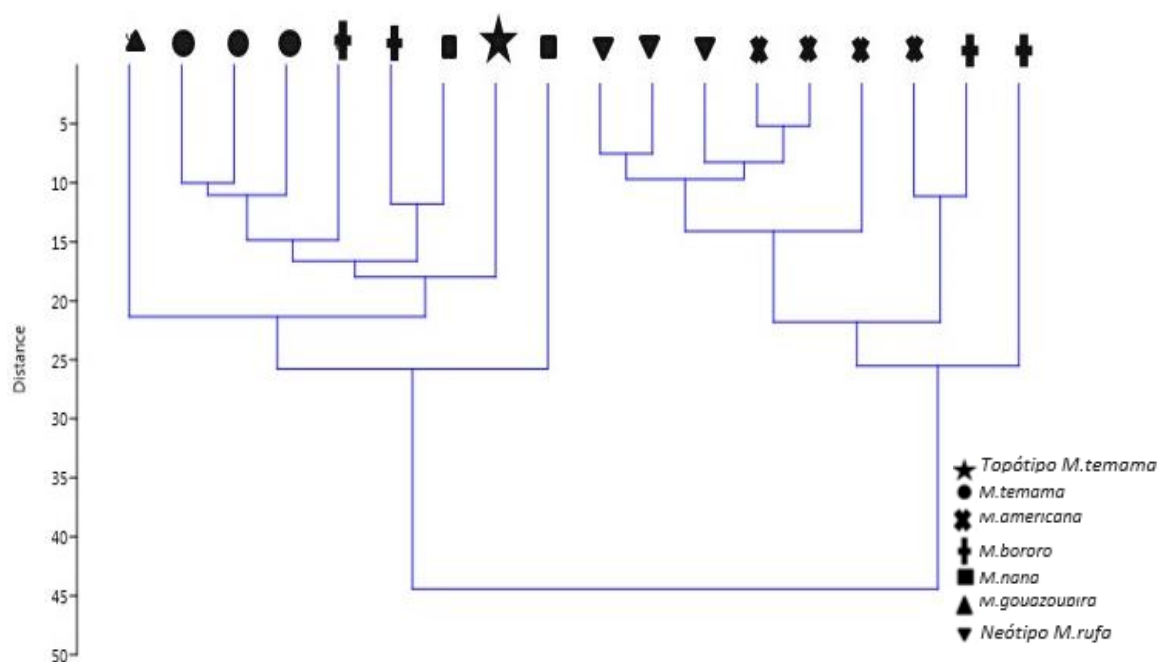


Figura 14. Árvore de distância feita com as medidas biométricas de *M. temama* em comparação com outras espécies do gênero *Mazama*.

O crânio macerado do topótipo de *M. temama* é apresentado na figura 15 enquanto suas medidas cranianas são apresentadas na tabela 6.



Figura 15. Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D) do crânio do topótipo de *M.temama*. A régua ilustra medida em centímetros.

Tabela 6. Medidas cranianas do topótipo de *Mazama temama* representadas em milímetros (mm) de acordo com DRIESCH (1976).

Caráter	mm	Caráter	mm	Caráter	mm	Caráter	mm
CT	162.81	LN	88.02	CLM	31.15	MLNC	53.01
CCB	152.82	LR	133.7	CLP	26.61	LFM	57.61
CB	141.2	LP	160.3	MCIO	29.71	MLEO	68.5
CCC	87.02	ACR	117.2	MAIO	28.46	LMEO	47.11
PP	45.52	MCN	48.9	MLM	45.1	LZ	73.25
EBC	31.1	CCFL	78.8	MLCO	34.82	MLEN	21.48
EBF	112.54	CPO	64.92	MLPP	45.2	MLPM	17.3
CVC	72.22	CLP	40.1	MLFM	17.5	MLP	51.5
CFM	102.82	DCD	55.3	AFM	16.4	BCNS	37.7

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

Nas análises de componentes principais das medidas biométricas e cranianas, machos e fêmeas foram colocados na mesma matriz seguindo as considerações de Rossi (2000) sobre ausência de dimorfismo sexual para o gênero *Mazama*.

O escatograma dos dois primeiros componentes da PCA de 16 medidas cranianas (Figura 16) mostrou um padrão de aglomeração de pontos para espécies de pequeno porte como *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. temama* e outra aglomeração de pontos para as espécies de porte médio como *M. bororo*, *M. americana*.

Os dois primeiros componentes principais acumularam 84.32% da variância da matriz de dados (tabela 7). As medidas comprimento total (CT) e Lambda-rhinion (LR) tiveram as maiores cargas no primeiro componente (PC1), sendo que a maior parte da variação entre os indivíduos é devida ao tamanho. A medição com maior carga no segundo componente (PC2) foi a Maior largura entre o pré-maxilar (MLEP), e como as variáveis dentro desse componente

possuíram escores com sinais opostos, o alto contraste está relacionado com a forma.

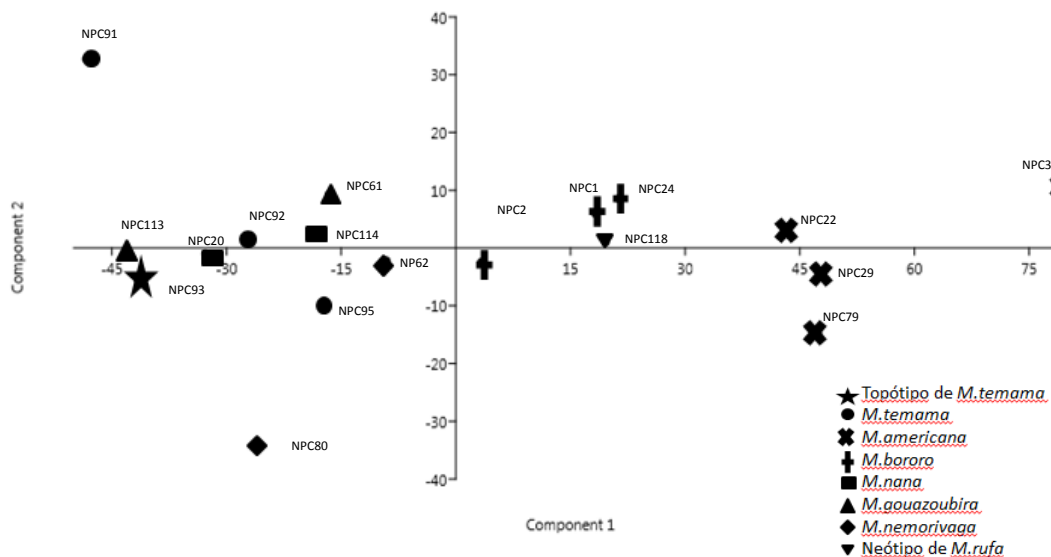


Figura 16. Escatograma dos dois primeiros componentes da PCA para 16 medidas craneanas. Bootstrap 1000.

Tabela 7. Componentes principais de 16 medidas craneanas para 18 indivíduos do gênero *Mazama*.

Medidas	PC1	PC2
Comprimento total	0,50613	-0,026532
Pré-molar - prosthion:	0,23376	0,024982
Comprimento frontal mediano	0,15669	0,044801
Lambda-nasal	0,19273	0,20325
Lambda-rhinion	0,60074	0,25651
Acrocrânio	0,32432	-0,02033
Maior comprimento dos nasais	0,30534	-0,8022
Distância corrida de dentes	0,05848	-0,0097583
Comprimento da linha molar	0,036329	0,13295
Comprimento da linha pré-molar	0,0334	0,010936
Maior comprimento interno da órbita	0,052324	-0,034294
Maior altura interna da órbita	0,044227	0,01561
Menor largura entre as órbitas	0,087881	0,091843

Largura do zigomático	0,1932	0,0054825
Maior largura entre os nasais	0,052226	-0,0029206
Maior largura entre o pré-maxilar	0,099283	0,46672
%Variância	74,868	9,4682

A árvore de distância (Figura 17), construída pelo método UPGMA utilizando os caracteres cranianos, assim como na PCA, mostrou dois grupos separados, um grupo representando as espécies de médio porte como *M. americana*, *M. bororo* e outro grupo, com as espécies de pequeno porte, mostrando sobreposição de amostras de *M. temama* com *M. nemorivaga*, *M. nana* e *M. gouazoubira*, não sendo capaz de diferenciá-las.

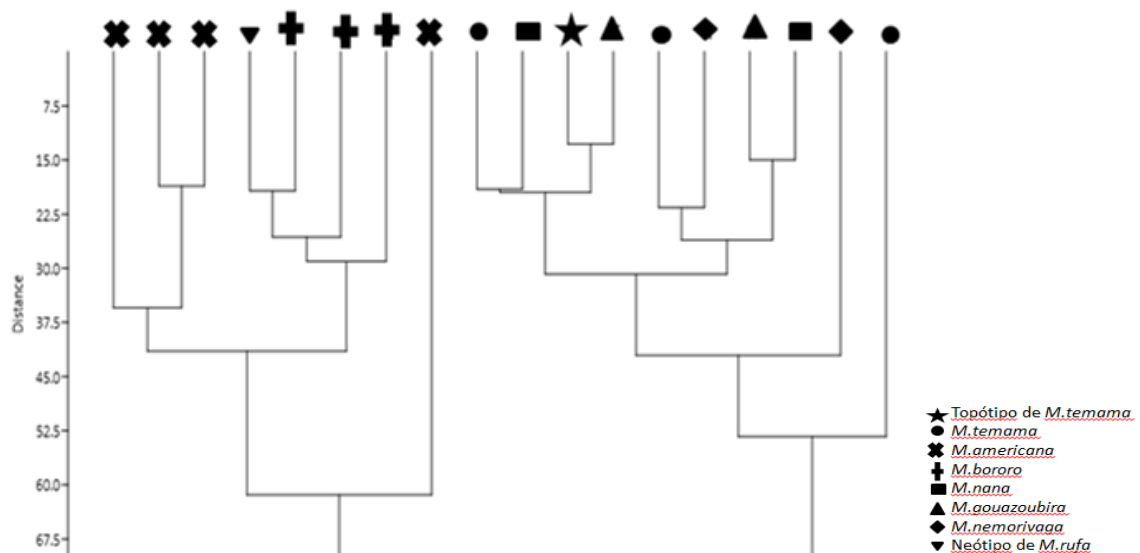


Figura 17. Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 16 medidas craneanas tomadas de espécimes de *M. temama*, incluindo seu topótipo e de outras espécies do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. bororo*, *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*).

5.3 CITOGENÉTICA

5.3.1 Coloração convencional

O topótipo coletado apresentou um cariótipo com $2n=44 + 4-5Bs$, com $NF=70$, com 21 pares de cromossomos autossômicos. A biometria feita sob coloração convencional permitiu classificar os cromossomos de acordo com o seu comprimento relativo de braços (CR), sendo que o grupo A (grandes autossômicos de dois braços) é composto pelos pares 1 a 4, o grupo C (pequenos autossômicos de dois braços) pelos pares 5 a 12, e todos os acrocêntricos pertencentes ao grupo E (pequenos cromossomos de um braço). O cromossomo X se apresentou como um cromossomo submetacêntrico e o Y como um pequeno metacêntrico (Figura 18).

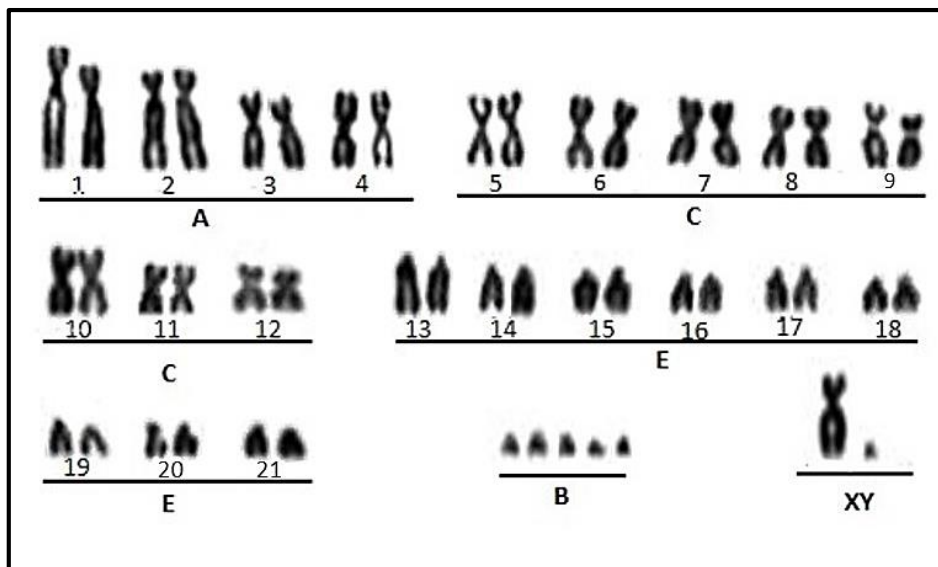


Figura 18. Cariótipo de um topótipo macho de *M. temama* ($2n=44 + 5Bs$, $NF= 70$) sob coloração convencional de Giemsa.

Os exemplares de Campeche apresentaram um cariótipo com $2n= 46/47 +1-4b$, $NF=70$ com 22 pares de cromossomos autossômicos. Foram encontrados polimorfismos cromossômicos no grupo C e D destes exemplares em relação com o cariótipo do topótipo, apresentando 11 pares de cromossomos no grupo C e 11 pares de cromossomos no grupo D.

5.3.2 Bandamento C

Foi possível visualizar blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica dos cromossomos autossômicos de todos os exemplares do estudo (Figuras 19, 20). Os pares 1 e 2 apresentaram este padrão e uma discreta marcação de heterocromatina intersticial na região terminal dos braços longos de cada par (Figura 20). Tal característica é, possivelmente, o vestígio de um rearranjo tipo fusão em tandem. Em relação aos cromossomos sexuais, o cromossomo X apresentou uma marcação heterocromática na região centromérica sendo que o cromossomo Y mostrou-se eucromático. Os cromossomos Bs apresentaram-se heterocromáticos.

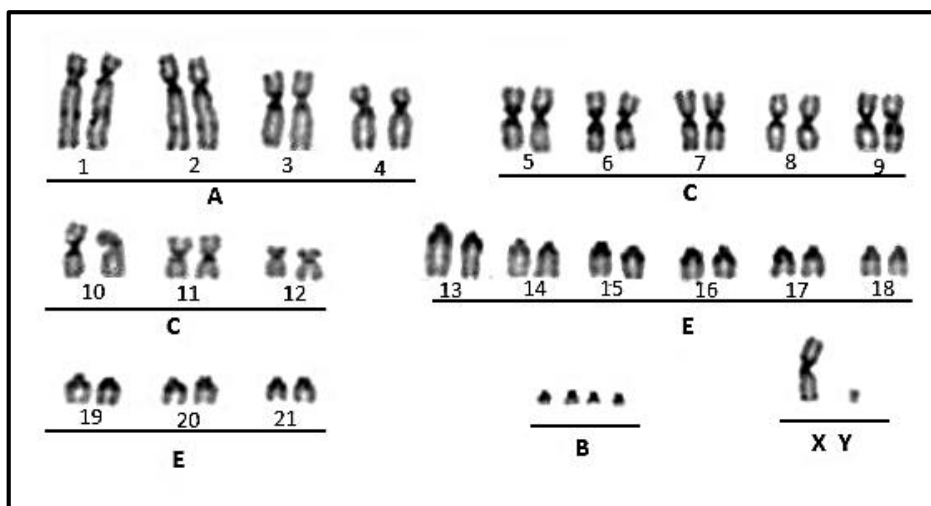


Figura 19. Cariótipo de um topótipo macho de *M. temama* T366 ($2n=44 +4Bs$, $NF= 70$) sob bandamento C.

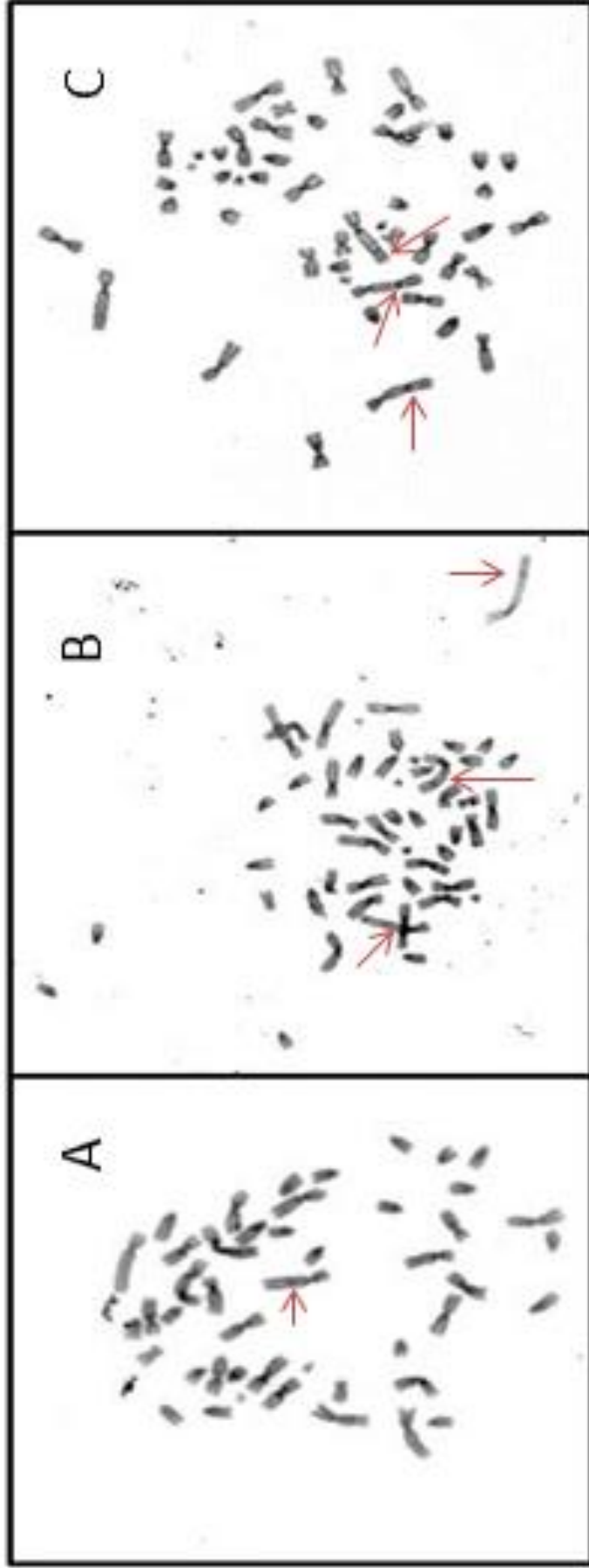


Figura 20. Metáfases sob bandamento C, evidenciando discreta marcação de heterocromática intersticial nos pares 1 e 2 (setas). (A) e (B) Exemplos de *M. femama* de Campeche (T363 e T364, ambos machos, $2n=46$, $NF=70$) (C) Topótipo de *M. femama* ($2n=44$, $NF=70$)

5.3.3 Coloração de Ag-NOR

Com a coloração Ag-NOR foi observado que no topótipo a região organizadora do nucléolo está localizada na região telomérica dos braços longos dos 2 cromossomos do par 8, na região telomérica do braço curto de um cromossomo do par 1 e na região telomérica dos braços longos dos cromossomos do par 3 (Figura 21). Com menor frequência, também foram encontradas metáfases com marcação na região telomérica do braço longo de um cromossomo do par 13 (Figura 21). A diferença com os outros exemplares do estudo, é que estes somente apresentaram marcações na região telomérica dos braços longos do par 3 e 7 (Figura 22).

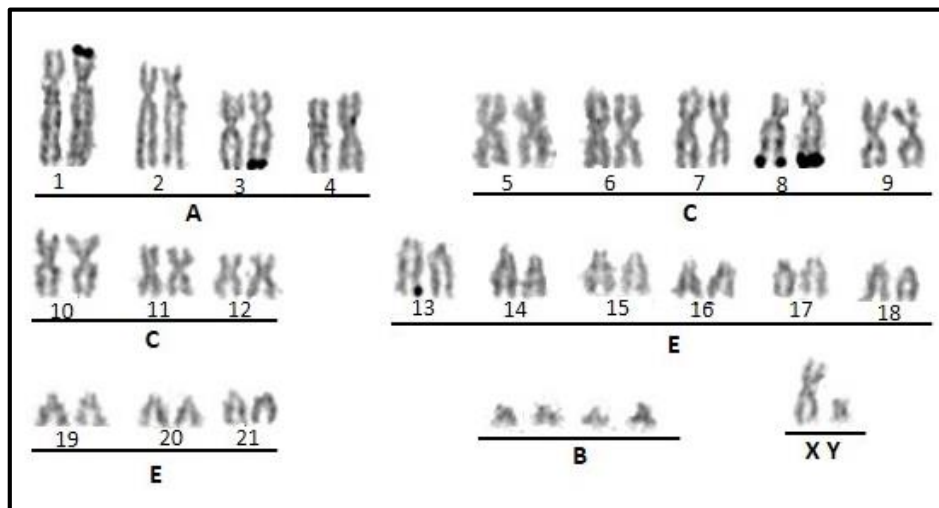


Figura 21. Cariótipo de um topótipo macho de *M. temama* T366 ($2n=44 + 4bs$, $NF=70$) sob coloração Ag-RON com cinco regiões organizadoras de nucléolo.

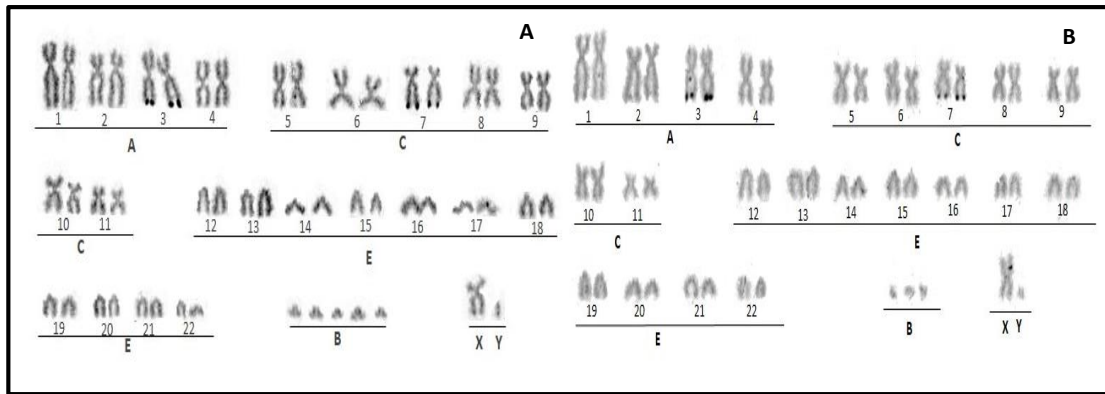


Figura 22. Cariótipo sob coloração Ag-Ron. (A e B) Exemplos de Campeche T363 e T364, respectivamente, ambos machos, $2n= 46 +1-4b$, $NF=70$, com regiões organizadoras de nucléolo.

5.3.4 Bandamento G

A técnica de bandamento G permitiu o pareamento correto dos cromossomos homólogos (Figura 23), a elaboração do ideograma baseado em três metáfases do topótipo (Figura 24) e a comparação do padrão de bandas G do topótipo com o bandamento G descrito para a espécie (Jorge e Bernishke, 1977) e com outros exemplares (T362, T363 e T364).

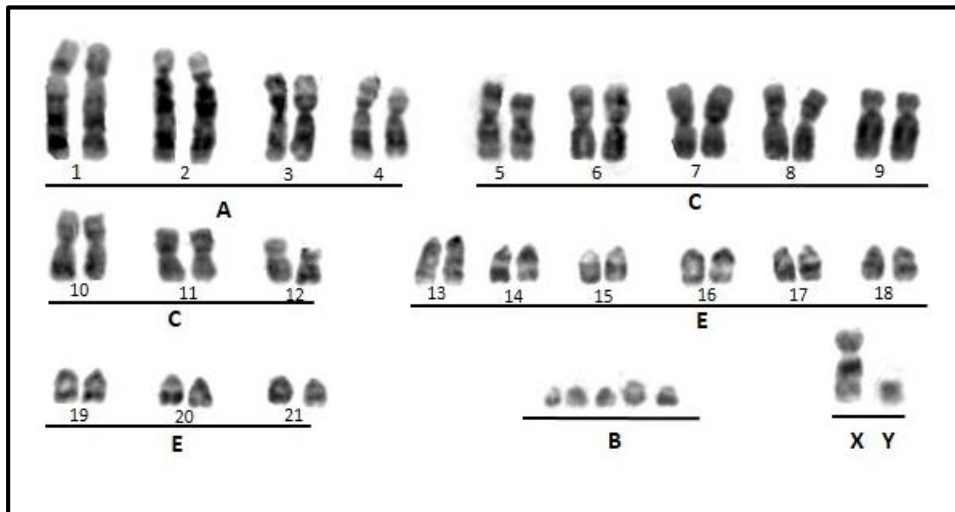


Figura 23. Cariótipo de um topótipo macho de *M. temama* T366 ($2n=44 + 5Bs$, $NF=70$) sob bandamento G.

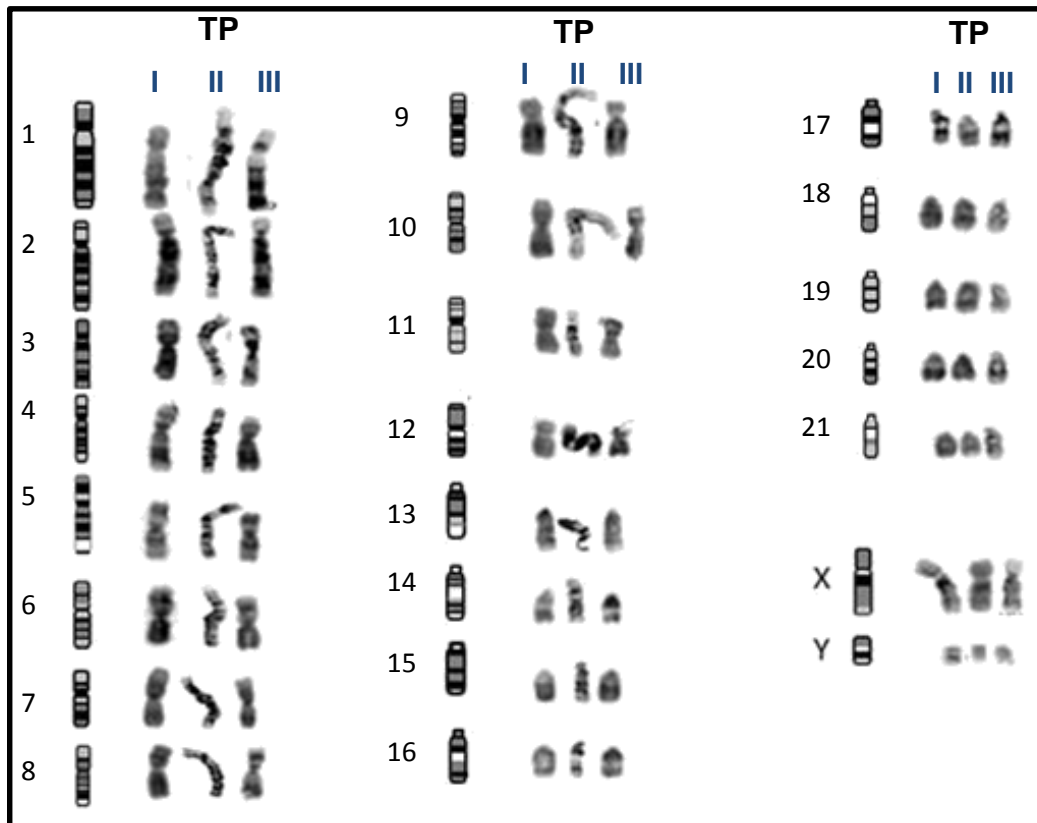


Figura 24. Representação gráfica do padrão de bandas de três metáfases (I, II e III) de um topótipo (TP) macho de *Mazama temama*.

Por meio da comparação com os outros animais analisados (Figura 25), também foi possível confirmar que o topótipo diferencia-se deles por possuir duas fusões em homozigose em relação ao animal T362, que é uma forma ancestral cromossomicamente ao topótipo e por uma fusão em relação aos animais T363 e T364.

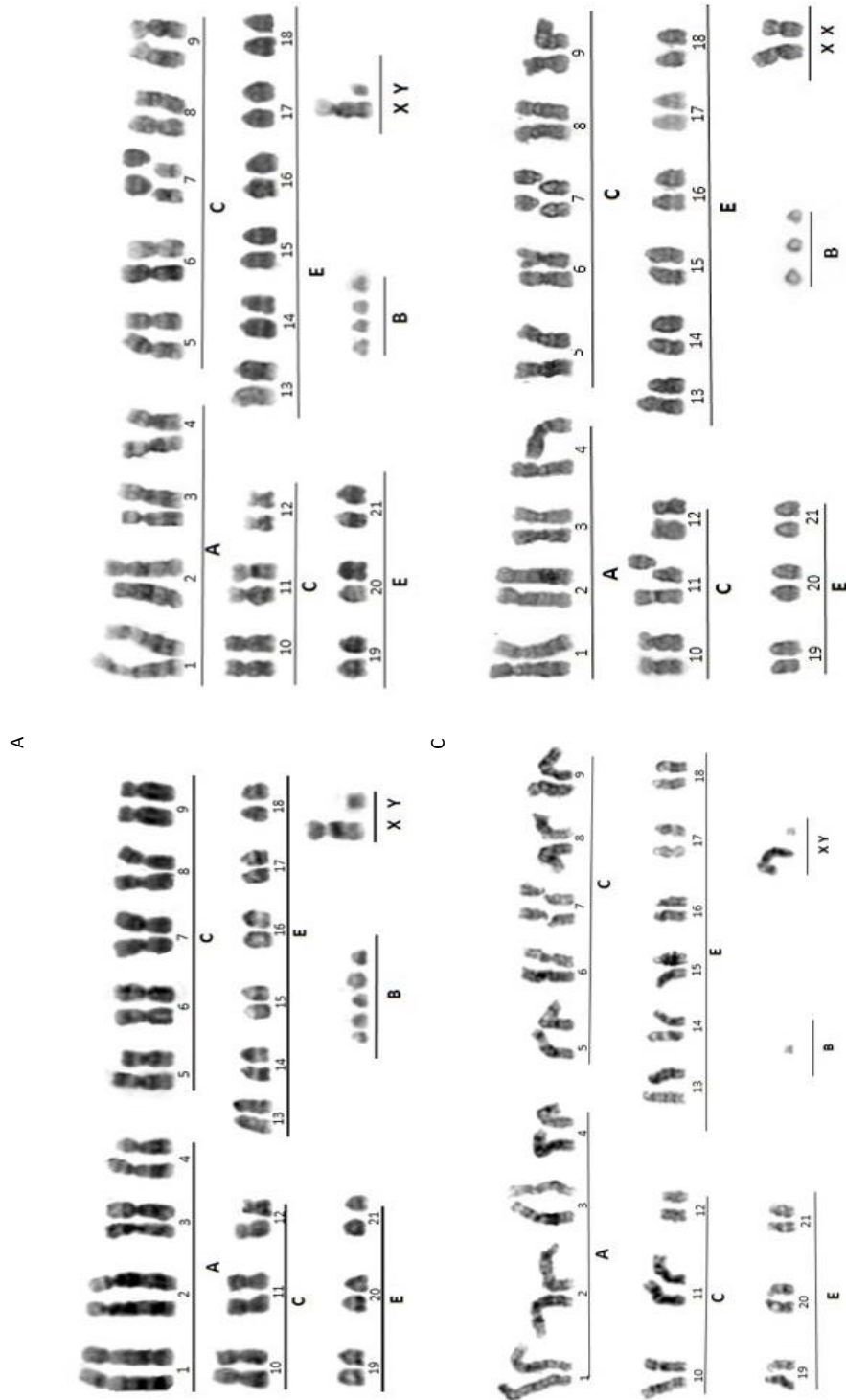


Figura 25. Comparação dos cariótipos de *M. temama* sob bandamento G. (A) TOPÓTIPO (T366, $2n=44 +5b$, $NF=70$). (B) T364, $2n=46 +4b$, $NF=70$, par 7 acrocêntricos. (C) T363, $2n=4 +1b$, $NF=70$, par 7 acrocêntricos. (D) T362, $2n=47 + 3b$, $NF=70$, heterozigoto para fusão cêntrica do par 11, par 7 acrocêntricos.

5.4 ANÁLISE DO DNA MITOCONDRIAL

Para o gene Dloop o melhor modelo evolutivo foi HYK+I+G, para Cit-b o TIM+G, para COI o HKY+G e para Nd5 o TrN+G, com parâmetros definidos de $\text{nst}=6$ para todos os genes. A topologia obtida nas análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana de todos os alinhamentos foi similar.

A árvore gerada pela análise do gene mitocondrial D-loop (Figura 26) evidencia o agrupamento de *M. temama* em um grupo monofilético separado do clado de *M. americana* com alta probabilidade posterior.

A árvore gerada pela análise do gene mitocondrial COI (Figura 27) apresenta uma topologia similar à árvore de ND5 (Figura 28) na qual os espécimes analisados de *M. temama* se agruparam em um grupo monofilético, sendo que os exemplares T363 e T362 se situaram mais próximos entre si em relação ao topótipo com uma probabilidade de 100%.

A árvore obtida com o gene CIT-B (Figura 29) apresenta o grupo de *M. temama* em um grupo monofilético em comparação com as outras espécies do gênero *Mazama*, *O. virginianus* e *R. tarandus* e desta forma acompanha os resultados obtidos com as análises dos genes Dloop, COI e ND5. Dentro do clado temama se evidencia os indivíduos provenientes da localidade tipo da espécie (Veracruz) formando um grupo polifilético, não havendo estruturação geográfica devido à presença de amostras da mesma localidade em clados diferentes. Também, formou-se uma politomia com quatro indivíduos de diferentes localidades.

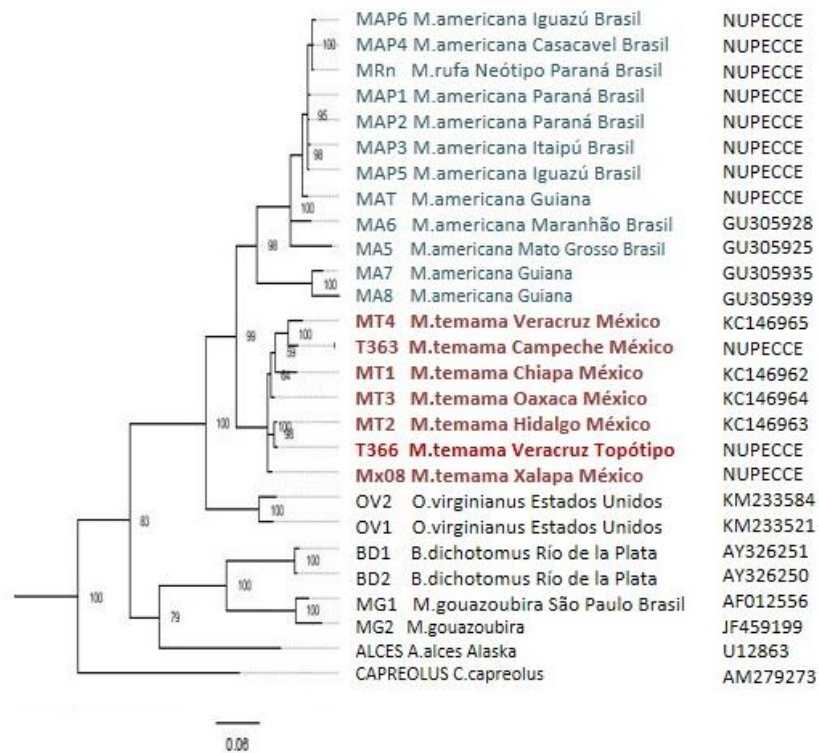


Figura 26. Árvore filogenética do gene D-loop. Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *A. alces* e *C. capreolus*

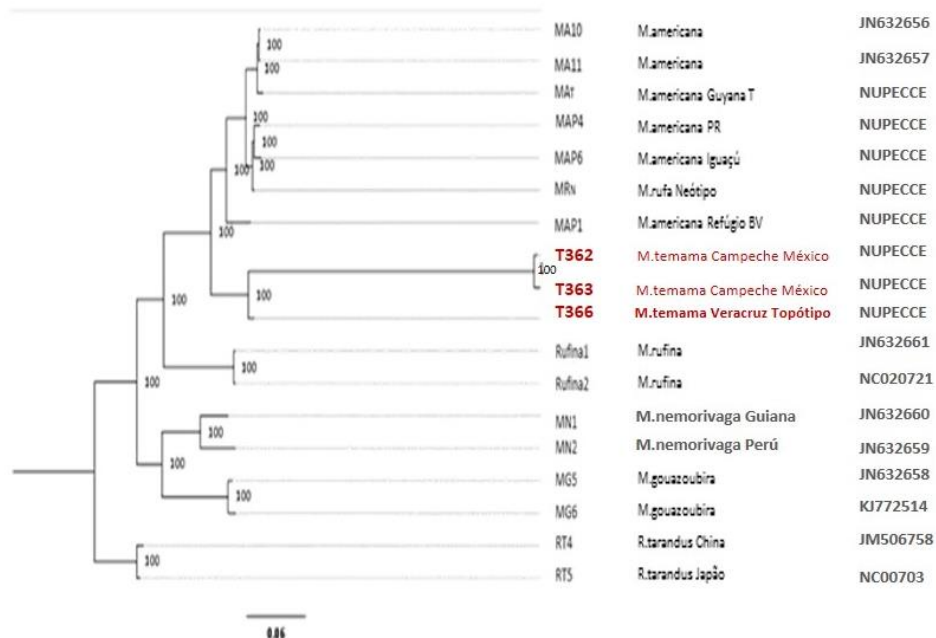


Figura 27. Árvore filogenética do gene COI. Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

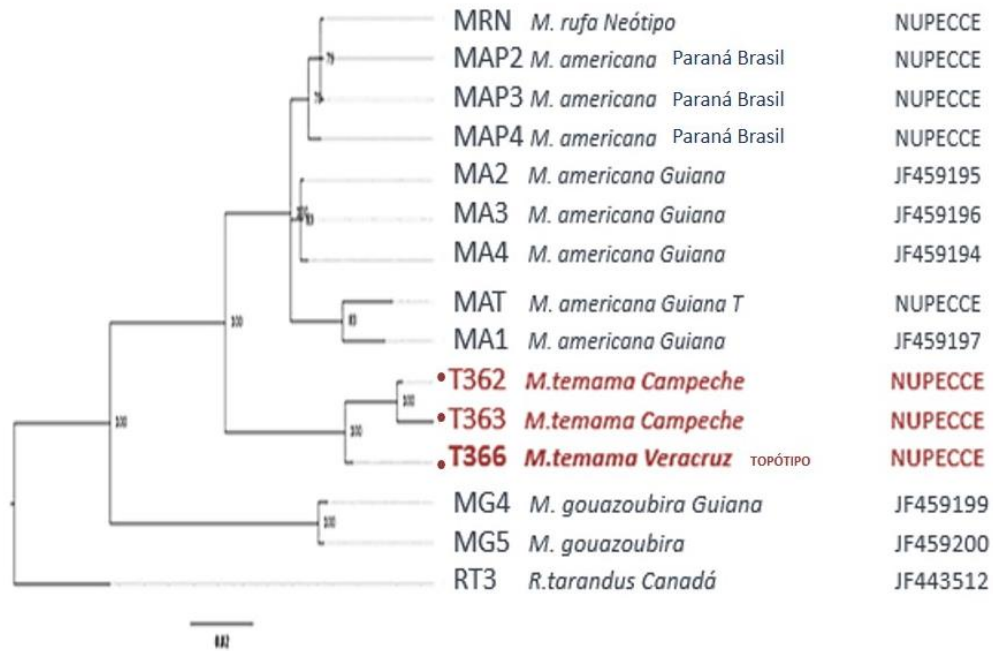


Figura 28. Árvore filogenética do gene ND5. Análise de Inferencia Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

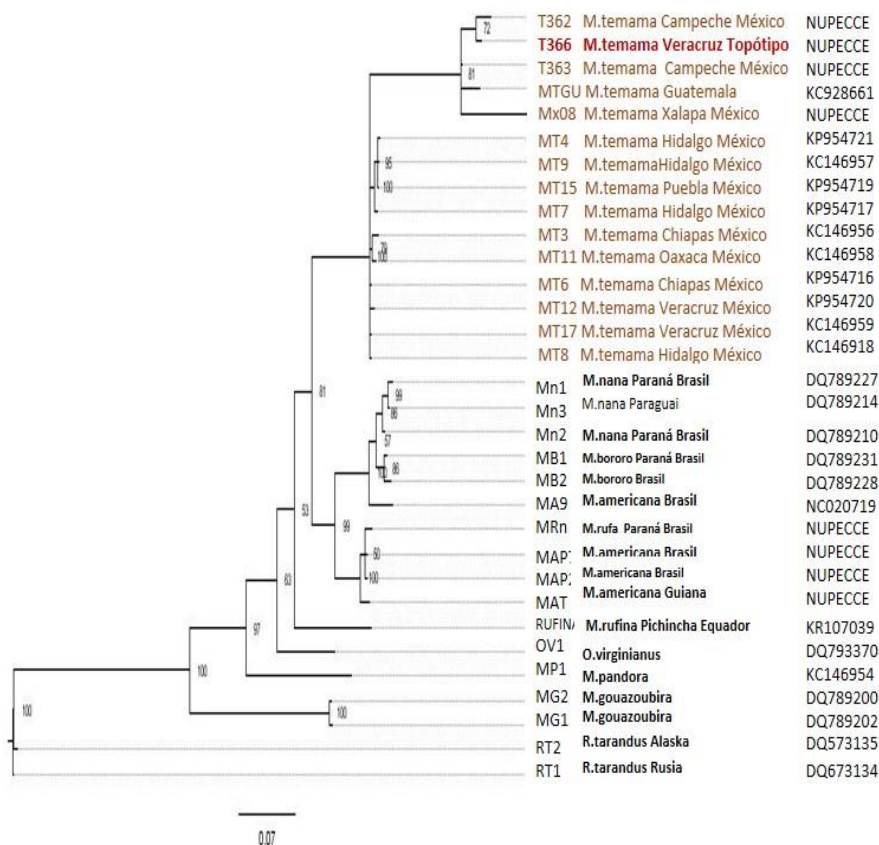


Figura 29 Árvore filogenética do gene CIT-B. Análise de Inferencia Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

VI. DISCUSSÃO

6.1 Análise morfológica

O Temazate vermelho se caracteriza por ser uma espécie do gênero *Mazama* pertencente ao grupo vermelho e de menor porte, que devido a sua morfologia foi considerado previamente como *M. americana* (Hershkovitz, 1951) e relacionado como espécie próxima da espécie andina *M. bricenii* (Thomas, 1908).

Com base no padrão de cores e morfologia externa foi possível comparar características detalhadas dos exemplares coletados no estudo. Estes se apresentaram como pequenos *Mazama* de coloração avermelhada com a parte dorsal do corpo mais escura em relação com a parte ventral, e regiões mais castanhas na parte dorsal do pescoço e cabeça, coincidindo com as descrições para a espécie de *M. temama* dada pelos diferentes autores (Hernández, 1651; Saussure, 1860, Lydkker, 1901). Uma característica comum para todos, foi a presença de uma mancha branquecina na parte mais cranial das órbitas. Da mesma forma, os exemplares apresentaram pêlos na face interna da orelha, que no caso do topótipo de Veracruz, foram abundantes, brancos e compridos, sendo que para os indivíduos de Campeche os mesmos foram amarelados e curtos, e para a fêmea de Xalapa se apresentaram de coloração acastanhada.

As medidas biométricas estão de acordo com os padrões descritos na literatura para *M. temama* (Martínez-Gallardo e Sánchez-Cordero, 1997), possuindo um comprimento total entre 640 mm \pm 100, massa de 11,56 kgs \pm 4,97 e comprimento da orelha de 82 mm \pm 0,33 com base nos 4 exemplares analisados no estudo. É importante considerar que a análise de cluster das medidas biométricas não conseguiu separar e classificar as espécies do gênero *Mazama*, corroborando os trabalhos de outros autores (Rossi, 2000; Duarte et al. 2008).

Um resultado similar foi obtido com a árvore de distância gerada com as medidas cranianas dos diferentes citótipos de *M. americana*, na qual evidenciam-se dois grupos separados, o primeiro formado por indivíduos pertencentes às espécies *M. americana* e *M. bororo* e outro por indivíduos das

espécies *M. temama*, *M. gouazoubira*, *M. nana* e *M. nemorivaga*. Os indivíduos analisados neste estudo se agruparam no grupo dos *Mazama* de menor tamanho (Tate, 1939) distribuídos em sub grupos diferentes e não havendo distinção entre espécies dentro do grupo.

6.2 Análise citogenética

A alta fragilidade cromossômica tem gerado uma grande diversificação cariotípica entre os *Mazama* que não está correlacionada com os baixos níveis de diversificação morfológica encontrados nestas mesmas espécies (Groves; Grubb; 1987; Duarte; Merino, 1997). Da mesma forma, essa fragilidade é causante da variabilidade cariotípica intraespecífica encontrada no gênero (Abril e Duarte 2008; Abril et al. 2010).

Os exemplares analisados neste estudo, mesmo sendo morfológicamente similares, apresentaram variações cariotípicas entre si. O topótipo apresentou um cariótipo de $2n=44$, $NF=70$ com presença de 4 a 5 cromossomos B nas diferentes metáfases. Por se tratar de um exemplar próximo à localidade tipo e que a evolução cromossômica dos cervídeos se deu principalmente por fusões cêntricas e em tandem (Neitzel, 1987), este cariótipo é considerado ótimo para a espécie.

Em comparação com o topótipo, os exemplares T363 e T364 apresentaram um $2n=46$ com dois pares de acrocêntricos não fusionados. O indivíduo T362 apresentou um cariótipo mais ancestral, se diferenciando do topótipo por três pares de acrocêntricos não fusionados, sendo que o mesmo foi heterozigoto para uma fusão cêntrica no par 11. Em relação ao cariótipo dos exemplares de Jorge e Bernishke (1977), a diferença radica em 4 pares de cromossomos acrocêntricos que se encontram fusionados em homozigose no topótipo.

A variação cromossômica encontrada em *M. temama* pode ser explicada pela teoria da fragilidade cromossômica proposta por Duarte e Jorge (1998) na qual os cromossomos são susceptíveis a quebras e trocas, gerando rearranjos que levam a formação de novas espécies em um tempo curto após isolamento geográfico. Outros estudos também consideram que a espécie *M. temama* evoluiu a partir de sucessivas fusões em tandem e cêntricas, em complexos rearranjos cromossômicos que envolveram, em alguns casos, mais de um

cromossomo (Jorge e Bernishke, 1977; Neitzel, 1987; Sarria-Perea, 2004; Abril et al. 2010).

Em outras espécies do gênero *Mazama* ocorre o mesmo que em *M. temama*. As variantes cariotípicas de *M. americana* com diferentes números diploides de 42 a 53 indicaram a existência de várias espécies dentro dos veados-mateiros, caracterizados como citótipos dentro de uma coerência geográfica (Duarte, 1997; Duarte, 1998, Abril et al, 2010). É fato de que os distintos citótipos encontrados possam se tratar de espécies distintas, uma vez que estas diferenças cromossômicas levam à formação de uma eficiente barreira reprodutiva (Duarte, 1998; Abril et al, 2010; Cursino et al. 2014; Salviano et al. 2017).

A recente descrição de um neótipo para a espécie *M. americana* (Erleben, 1777), permitiu o conhecimento de seu cariótipo sendo o $2n=45$ e $NF=50$ com 3Bs (Rincón, 2016) e apresentando grande diferença cromossômica para com os distintos citótipos já conhecidos para a espécie (Abril, 2010). Outro estudo feito recentemente com indivíduos de *M. americana* da bacia do Rio Paraná encontrou um cariótipo diferente da espécie tipo, levando à sugestão de da revalidação de uma espécie para o gênero, *Mazama rufa* (Luduvério, 2018).

Apesar de *M. temama* ter sido separado de *M. americana* pelas diferenças cariotípicas (Geist, 1998) e que as análises feitas foram de animais em cativeiro, no presente estudo a caracterização citogenética do topótipo analisado além de confirmar a separação de *M.temama* de *M.americana*, também propõe um novo cariótipo para a espécie. Como dito anteriormente, o topótipo aqui estudado, apresenta duas fusões cêntricas em relação ao cariótipo de *M. temama* descrito por Jorge e Bernishke (1977). Essas diferenças cariotípicas, podem levar a uma maior probabilidade dos descendentes de portadores de rearranjos diferentes produzirem maior número de gametas desbalanceados e, com isso, terem uma queda na capacidade reprodutiva, o que pode indicar o início de um mecanismo de isolamento reprodutivo, como encontrado por Abril e Duarte (2008) com a espécie *Mazama nana*.

6.3 Análise Filogenética

O grupo dos *Mazama* vermelhos formou um grupo monofilético, corroborando os resultados de Duarte et al. (2008) e dentro deste clado, *Mazama*

temama encontra-se intimamente relacionado com as espécies da América do sul *M. americana*, *M. bororo* e *M. nana* (Escobedo-Morales et al., 2016).

A topologia da árvore mostra uma monofilia para *M. temama* com uma proximidade maior com todas as espécies da subtribo Odocoileina do que com outras espécies do gênero, como *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira* (Heckeberg, 2016; Gutiérrez, 2017)

Na análise dos genes ND5 e COI, os dois exemplares de Campeche se posicionaram em um subclado separado do topótipo, mas é possível que esse fenômeno seja devido a que as amostras pertençam a uma mesma localidade. Para o gene DLOOP e CITB foi possível obter uma maior quantidade de sequências de *M. temama* cuja distribuição abrange diferentes estados do México. As topologias das árvores resultantes evidenciaram que não existe uma relação entre a proximidade filogenética com a localidade de origem.

Já foi mencionada a possibilidade de ocorrência de duas espécies com o nome de *M. temama*, sendo uma atribuída para o veado vermelho do México e América Central, e outra para o veado do leste do Panamá e Colômbia (Gutiérrez et al., 2017). Outro trabalho com animais de cativeiro relaciona um morfotipo de um veado vermelho descrito inicialmente como *M. zetta* (Thomas, 1913) tendo uma proximidade filogenética maior com *M. temama* do que com outros *Mazama* vermelhos sul-americanos (Perea, 2012). Devido a isso, outros estudos devem ser feitos abrangendo uma análise de exemplares dos países ao sul da América Central.

No presente estudo, os resultados evidenciam um grupo monofilético para *M. temama* com alta probabilidade posterior, confirmando a independência da espécie do grupo *M. americana*, como encontrado por outros autores por meio de inúmeras técnicas de análise (Jorge e Benirschke, 1977; Geist, 1998; Escobedo-Morales et al., 2016).

6.4. Validade do neótipo

A espécie *M. temama* foi descrita por Kerr (1792) a partir das observações de Hernández (1651) em Veracruz no México. Pouco se sabe sobre a coleta e preservação do material, porém alguns autores tem apresentado a contribuição histórica das obras de Hernández e o processo de publicação do “Nova

plantarum, animalium et mineralium Mexicanorum” de 1651 na qual está exposta a descrição do temamaçame junto com inúmeros táxons de animais, plantas e minerais mexicanos (Peláez, 1995). É conhecido que Hernández foi o primeiro a realizar uma expedição científica à América do Sul, criando uma coleção de todas as espécies de plantas descritas nos três anos de missão (1574-1577) na Nova Espanha após a colonização do México, sendo que ele acompanhava a descrição das aves e mamíferos com figuras e notas que somente foram publicadas depois da morte do autor.

A descrição válida da espécie, de Kerr (1792), foi baseada no relato de Hernández sobre o Temamaçame e não estabeleceu um tipo, a descrição detalhada de um topótipo atual propõe um neótipo da espécie devido a confirmação da inexistência de holótipo ou neótipo de *Mazama temama*.

Quando não existe o exemplar tipo portador do nome (holótipo, lectótipo, sintipo ou neótipo), é possível a designação de um neótipo se algum autor considera necessário estabelecê-lo e sempre seguindo as condições exigidas pelo ICZN (1999), as quais são:

“*Declaração de que se designa com o propósito expresso de esclarecer a posição taxonômica*”. Neste caso a designação do neótipo é necessária para realizar comparações com as outras espécies do gênero *Mazama*, especificamente com *M. americana* de quem foi considerado subespécie por muitos autores, até sua validação como espécie independente a final do século passado.

“*Declaração dos caracteres que o autor considere distintivos ou uma referência bibliográfica a essa declaração*”. Esses caracteres são definidos nos resultados (5.1) e na discussão (6.1).

“*Dados e descrição para assegurar o reconhecimento do exemplar designado*”. As informações e a descrição detalhada são definidas nos resultados (5.1, 5.2 e 5.3).

“*Razões do autor para considerar o material tipo perdido o destruído*”. São mencionados na metodologia (4.2) e discussão (6.4).

“*Evidência de que o neótipo concorda com o que se sabe do material tipo original*”. Neste caso o exemplar coletado se ajusta a descrição original de Kerr (1792) baseado nas observações de Hernández (1651).

“Evidencia de que o neótipo tenha procedência tão perto quanto possível da localidade tipo original (Art. 76.1) e do mesmo horizonte geológico (ver Art 76.3 e recomendação 76.01). O exemplar foi coletado no município de Songólica no estado de Veracruz, México (a 45 kms da localidade tipo registrada na descrição original da espécie).

“Declaração de que o neótipo é propriedade de uma instituição científica reconhecida e que tenha uma coleção com a infraestrutura adequada para conservar ao neótipo”. O neótipo encontra-se depositado no museu do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, NUPECCE, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista —Júlio de Mesquita Filho, câmpus de Jaboticabal. Atualmente o NUPECCE possui uma das maiores coleções de cervídeos neotropicais do mundo, especialmente do gênero *Mazama*, com um acervo de aproximadamente 130 exemplares, incluindo neótipos e parátipos de espécies da América Latina.

O espécime analisado será considerado como topótipo e não neótipo, até que seja aceito pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, após a publicação do artigo. Com isso, este estudo seria a primeira referência disponível na literatura sobre o estabelecimento de um neótipo para *M.temama*, sendo o ponto de partida para a descrição de novas espécies do gênero *Mazama*.

VII. CONCLUSÕES

Mazama temama é uma espécie do grupo vermelho do gênero *Mazama* cujas características morfológicas são similares a outros *Mazama* de menor porte, sendo que as análises craniométricas e biométricas foram incapazes de separar essas espécies entre si.

A espécie forma um grupo monofilético comprovado em todas as árvores filogenéticas realizadas com exemplares coletados do México.

A caracterização citogenética de um exemplar de vida livre coletado em Veracruz, México, mostra a existência de um novo cariótipo para a espécie *M.temama*, diferenciado do cariótipo antes descrito para a espécie a partir de exemplares em cativeiro.

É proposto um neótipo para a espécie *M.temama*.

Todas as análises morfológicas, citogenéticas e filogenéticas separaram a espécie *M. temama* de *M. americana*, previamente considerada como subespécie da mesma e confirmando que trata-se de espécies independentes.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abril, V.V., Duarte, J.M.B. 2008. Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf red brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, v.31. p.53-57, 2008.
- Abril, V.V., Carnellosi, E.A.G., González, S., Duarte, J.M.B. 2010. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). *Cytogenetic Genome Research*. v. 128 (1-3). p. 177-187.
- Allen, J. A: 1895. *Bulletin American Museum of Natural History*. V.7.p.191.
- Allen, J.A. 1895. On the names of mammals given by Kerr in his 'animal kingdom,' published in 1792. *Bull. Amer. Mus. Nat. Hist.* Vol. V.2. p: 191
- Allen, J. A. 1908. *Bulletin of the American Museum of Natural History*. v 24. p 649.
- Allen, J. A: 1915. Notes on American deer of the genus *Mazama*. *Bulletin of the American Museum of Natural History* .v.34.p.521–553
- Aranda, M. y March I. 1987. *Guía de los mamíferos silvestres de Chiapas*. Instituto Nacional de Investigaciones sobre recursos bióticos. Veracruz. México. p.149.
- Avila-Pires, F. D. 1959. As formas sul-americanas do “veado virá”. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* v. 31. p.547-556.
- Avise, J. C. & Ball, R. M. 1990. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surv. Evol. Biol.* v 7. p. 45-67.
- Bello-Gutiérrez, J., Reyna-Hurtado, H. Jorge. 2010. Central american red brocket deer: *Mazama temama* (Kerr 1782). *Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American Deer* (Barbanti, M., y S. González, eds.). Funep/IUCN. Jaboticabal, Brasil. Pp. 166-170
- Brook, V. F.Z.S. 1878. One the classification of Cervidae, with a synopsis of the existing species. *Proceeding of the Zoological Society of London*. V.46 (1). p. 883-928.
- Cabrera, A. 1960. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. *Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia*. Argentina. v. 4. p. 309-732.
- Caparroz, R.; Mantellato, A. M.B.; Bertioli, D.; Figueiredo. M.; Duarte, J. M.B. 2015 Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of

- polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. *Genetics and Molecular Biology*, Ribeirão Preto, SP v.38, n.3, p.338-345.
- Carnelossi, E.A.G. 2008. Diferenças moleculares entre citótipos de *Mazama americana* (Mammalia: Cervidae). Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias
- Chandra, H.S.; Hugenford, D.A.; Wagner, J. 1967. Chromosomes of five artiodactyls mammals. *Chromosoma*, Berlin, v.2, p.211-220.
- Cracraft, J. 1983. Species concepts and speciation analysis. In: Johnston, R. F. (ed) *Current Ornithology*. Plenum Press, New York.
- Cursino, M.S.; Salviano, M.B.; Abril, V. V.; Zanetti, E.D; Duarte, J. M. B. 2014. The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. *BMC Evolutionary Biology*, v.14, p. 40.
- Cuvier GF, 1817. *Dictionnaire des Sciences Naturelles Zoologie. Mammifères*. FG Levrant, Paris. v.7. p. 1–534
- Czernay, S. 1987. Die Spiesshirsche und Pudus: die Gattungen *Mazama* und *Pudu*. A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt. *Die Neue Brehm-Bucherei Heft*. v. 581. p.84.
- Driesch, A. 1976. A guide to the measurement of animal bones from archaeological sites. Harvard University, Peabody Museum of Archaeology and Ethnology, Peabody Museum Bulletin 1
- Duarte, J.M.B. 1992. Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros. Dissertação (Mestrado Melhoramento Genético Animal) Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias. Jaboticabal. p.153
- Duarte, J.M.B., Merino, M.L. 1997. Taxonomia e Evolução. In: Duarte, J.M.B (Ed.), *Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. FUNEP, Jaboticabal. p. 1-21.
- Duarte, J.M.B., Jorge, W. 1998. Análise citotaxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*). Dissertação, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu.

- Duarte, J.M.B & Jorge, W. 2003. Morphologic and Cytogenetic Description of the Small Red Brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. *Mammalia*. v.67(3). p.403-410
- Duarte, J.M.B., Gonzalés, S., Maldonado, J.E. 2008. The surprising evolutionary history of South American Deer. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol. 49. p. 17-22.
- Duarte, J.M.B & González, S. 2010. *Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer*, Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland, IUCN. p.393.
- Eisenberg, J. F: 1989. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation, in *Biology and management of the Cervidae*, p.60-64.
- Emmons, I.h., Feer. 1990. *Mamíferos de los bosques húmedos de América tropical. Una guía de campo*. Editorial f.a.n. Santa Cruz de la Sierra.
- Ennis, S. & Gallagher, T.F. 1994. A PCR-based sex-determination assay in cattle based on the bovine amelogenin locus. *Animal Genetics*. v.25. p. 425-427.
- Escobedo-Morales, L. A; Mandujano, S; Eguiarte, L. E.; Rodríguez-Rodríguez, M. A; Maldonado, J. E. 2016. First phylogenetic analysis of Mesoamerican brocket deer *Mazama pandora* and *Mazama temama* (Cetartiodactyla:Cervidae) based on mitochondrial sequences: Implications on Neotropical deer evolution. *Mammalian Biology*, v.81. p. 303- 313.
- Erxleben J.C.P. 1777. *Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates cum synonymia et history animalium*, Classis 1. *Mammalia*. Impensis Weygandianis, Lipsiae. p. 1-636.
- Farris, S. 1970. Methods for computing Wagner trees. *Syst. Zool.* Washington. v.19. p.83-92.
- Felsenstein, J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. v.39. p.783-791.
- Felsenstein, J. 1993. PHYLIP 3.5 Distribuido eletronicamente por J. Felsenstein, Washington University, Seattle, Washington, EUA.
- Ferguson-Smith, M.A.; Yang, F.; O'Brien, P.C. 1998. Comparative mapping using chromosome sorting and painting. *Ilar J.* v.39. p. 68-76.
- Fisher, G. 1814. *Zoognosia Tabulis Synopticis Illustrata*. Typis Nicolai Sergeidis Vsevolozky, Mosquae v.3.p.1-732.

- Folmer, O.; Black, M.; Hoeh, W.; Lutz, R.; Vrijenhoek, R. 1998. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*. v. 3. p. 294–299.
- González, S., Duarte, J.M.B., Maldonado, J.E. 2010. Molecular, Phylogenetics and Evolution. In: Duarte, J.M.B., González, S. (eds): *Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer*, Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland, IUCN. v. 393
- Gilbert, C., Ropiquet, A., Hassanin, A. 2006. Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia; Ruminantia): Systematics, morphology, and biogeography. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. vol.40. p. 101-117.
- Goldman, 1913. Descriptions of new mammals from Panama and Mexico. Washington :Smithsonian Institution. Vol 60. p 2-11.
- Grooves, C.P. & Grubb, P. 1987. Relationships of living deer. In: Wemmer, C.M. *Biology and Management of the Cervidae*. Washington: Smithsonian Institution Press. p.21-59.
- Grubb P, 2005. Order Artiodactyla. In: Wilson DE, Reeder DM, editors. *Mammal species of the world*. 3rd ed. Baltimore: Johns Hopkins University Press. p. 629–722.
- Gualberto, A.F. 2008. Variantes moleculares de *Mazama americana* (Mammalia: Cervidae) no estado de Rondônia. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Gustavsson, I.; Sundt, C.O. 1969. Three polymorphic chromosome systems of centric fusion type in a population of Manchurian Sika Deer (*Cervus Nippon hotulorum*). *Chromosoma*, Berlin. v.28, p. 245 -254.
- Gutiérrez E.E., Maldonado J.E., Radosavljevic A., Molinari J., Patterson B.D., Martínez C. J.M., et al. 2015. The Taxonomic Status of *Mazama bricenii* and the Significance of the Táchira Depression for Mammalian Endemism in the Cordillera de Mérida, Venezuela. *PLoS ONE* 10(6): e0129113.
- Gutiérrez, E.E, Helgen K.M, McDonough, M.M, Bauer, F., Hawkins M.T.R, Escobedo Morales L.A, Patterson B.D. , Maldonado J.E. 2017. A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher

- specimens, geographic data, and dense sampling. *ZooKeys* v.697. p. 87–131
- Hall, T.A. 1999. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Version 6.0.7. Hassanin, A. & Douzery, E.J.P. 2003. Molecular phylogeny of Ruminantia and the alternative position of the Moschidae. *Syst. Biol.* v.52. p.206–228.
- Hammer. Harper, D. A. T., Ryan, P. D. 2001. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. *Paleontologia Electronica*. Disponível em: <http://palaeo-eletronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>.
- Hassanin, A.; Pasquet, E.; Vignes, J.-D. 1998. Systematic relationships within the subfamily Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as determined from cytochrome b sequences. *J. Mammal. Evol.*, v.5. p.217–236.
- Hassanin, A; Delsuc, F; Ropiquet, A.; Hammer, C.; Van Vuuren, B.J; Matthee, C.; RuizGarcia, M; Catzeflis, F; Areskoug, V Howell, W.W. & Black, D.A. 1980. Controlled silver staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. *Experientia*, v.36. p. 1014-1015.
- Hassanin, A.; 2012 Matthee, C.; Ruiz-Garcia, M.; Catzefliz, F.; Areskoug, V.; Nguyen, T.T.; Couloux, A. 2012. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. *Comptes Rendus Biologies*, v. 335, p. 32-50.
- Heckeberg, N. S.; Erpenbeck, D.; Worheide, G.; Rossner, G. E. 2016. Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. *PeerJ*, 4.
- Howell, W., Black, D.A. 1980. Controlled silver-staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer. *Experientia*. V.36. p. 1014-1015.
- Hollister, 1914. New mammals for Puerto Rico and Mexico. Smithsonian institution. Vol 27 p.209-210.
- Huelsenbeck, J.; Ronquist, F. 2001. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics*, v. 17, p. 754-755.
- Johnson, C.; Johnson, J.; Vanderloo, J.P.; Keane, D.; Aiken, J.M.; McKenzie, D. 2006. Prion protein polymorphisms in white-tailed deer influence susceptibility to chronic wasting disease. *J Gen Virol.*, v.87. p.2109-2114.

- Jorge, W., Benirschke K. 1977. Centromericheterochromatine and G-banding of the red brocket deer, *Mazama americana* temama (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable nonrobertsonian translocation. *Cytologia (Tokio)*. v. 42(3- 4). p.711- 21.
- Kerr, 1792. *The Animal Kingdom*. *Cervus* temama. p.303
- Klingenberg, C.2008. MorphoJ. Faculty of Life Sciences, University of Manchester UK .
- Kumar, S.; Tamura, K.; Nei, M. 2004. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analisys and sequence alignment. Brief Bioinformat, Oxford University Press.
- Levan, A., Fredga, K., Sandberg, A. A. 1964 Nomenclature for centromeric position of chromosome. *Hereditas*, v.52, p. 201-219.
- Luduvério, D. J. 2017. O status taxonômico de *Cervus rufus* Illiger, 1811 e sua caracterização genética e morfológica. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.
- Lydekker, R. 1898. *The deer of all lands: a history of a family Cervidae living and extinct*. Rowland Ward.
- Lydekker, R. 1901. *The great and small game of Europe*. p.372
- Lydekker, R. 1915. *Cat. Ungul. Brit. Mus.* v.4, p. 205-207
- Medellin, R., Gardner, A., Aranda, M. 1998. The taxonomic status of the Yucatán brown brocket, *Mazama pandora* (Mammalia: Cervidae). *Proceedings of the Biological Society of Washington*. v.111 (11). p.1-14.
- Miranda-Ribeiro, A. 1919. Os veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. *Revista do Museu Paulista*, v. 11, p. 209-308.
- Merino, M.L., Rossi, R.V. 2010. Origin, Systematics, and Morfological Radiation. In: Duarte, J.M.B., González, S. (eds): *Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer*, Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland, IUCN. p. 393.
- Miller, G. S., Jr., & R. Kellogg. 1955. List of North American Recent mammals. *Bulletin United States National Museum* 205:xii + 1-954
- Naveda A., Yerena O. 2008. *Sistemas de Parques Nacionales de Venezuela: Una Evaluación Aproximada de su situación actual*. Simpósio en

- Investigación y Manejo de Fauna Silvestre en Venezuela en homenaje al Dr. Juhani Ojasti. p.225 – 246.
- Neitzel, H. 1987. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: Obe, G., Basler, A. (Ed.). Cytogenetics, Basic and Applied aspects, Berlin: Springer Verlag. p. 90-112.
- Perea, J.A.S. 2012. Taxonomia e filogenia de algumas espécies de *Mazama* (mammalia; cervidae) da Colômbia. Tese apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal.
- Pinder, L. & Leeuwenberg, F. 1997. Veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*, Fischer 1814). In: Duarte, J.M.B. (Ed). Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama*. FUNEP, Jaboticabal, p.60-68.
- Posada, D.; Crandall, K. A. 1998. Modeltest: testing the modelo f DNA substitution. *Bioinformatics*, v. 14, p. 817 -818.
- Pucheran J. 1851. Note sur une espèce nouvelle de Cerf (*Cervus rufinus* Bourc. et Puch). *Rev et Mag Zool*. V. 2(3). p. 561–565.
- Rambault, A. 2012. Figtree v1.3.1. Computer program and documentation. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>
- Rafinesque, C.S. 1817. *American Monthly Magazine*.v. 1(5). p. 363.
- Ramírez-Pulido, J. Castro-Campillo, A. 1990. Regiones y Provincias Mastrogeográficas. Catálogo de metadatos geográficos. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad.
- Rees, J. W. 1969. Morphologic variation in the cranium and mandible of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a comparative study of geographical and four biological distances. *Journal of Morphology*. v. 128. p. 95-112.
- Ribeiro, A.M. 1919. Os veados do Brasil segundo as colecções Rondon e de varios museus nacionaes e estrangeiros. *Rev. Museu Paulista*. V. 11. p. 209-308.
- Rincón, A. C. 2016. Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama americana* (artiodactyla: cervidae) a partir de um topótipo atual..Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal.

- Rohlf, F.J. 2005. tpsDig, digitize landmarks and outlines, version 2.04. Department of Ecology and Evolution, State University of New York at Stony Brook.
- Ropiquet, A. & Hassanin, A. 2005. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). *Mol. Phylogenet. Evol.* v.36. p.154–168.
- Ropiquet, A. & Hassanin, A. 2005. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 36:154–168.
- Rossi, R. V. 2000. Taxonomia de *Mazama Rafinesque, 1817* do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. p.147.
- Rossi, R.V., Bodmer, R., Duarte, J.M.B., Trovati, G. 2010. Amazonian brown brocket deer. In: Duarte, J.M.B., González, S. (eds): *Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer*. Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland, IUCN. p. 393.
- Rossi, R.V., Duarte, J.M.B. 2008. *Mazama nemorivaga*. IUCN Red List of threatened Species. Version 2011.1 Saiki, R.K.; Scharf, S.; Faloona, F.; Mullis, K.B.; Horn, G.T.; Erlich, H.A.; Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. v.230. p.1350-1354.
- Saitou, N. & Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruct in phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution*. v. 4. p.406-425.
- Sánchez-Cordero, V., Martínez-Gallardo, R., 1998. Postdispersal fruit and seed removal by forest-dwelling rodents in a lowland rainforest in Mexico. *Journal of Tropical Ecology*, vol. 14, no. 2, p. 139-151.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sarria-Perea, J.A. 2004. Comparação entre alguns citótipos de *Mazama americana* (Artiodactyla; Cervidae): Quão grande é a diferença entre eles? Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.
- Saussure, 1860. *Revue et Mag. Zool.*, Paris, ser. v. 2. p. 12:252.

- Seabright M. 1971. A rapid banding technique for human chromosomes. v.11.p. 971-972.
- Small, C.G. 1996. *The Statistical Theory of Shape*. Springer-Verlag, Berlin.
- Sneath, P.H.R.A. & Sokal, R.R. 1973. *Numerical taxonomy: the principles and practice of numerical classification*. 2nd edn, W. H. Freeman and Co.
- Sumner, A.T. 1972. A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. *Exp. Cell Res.* V.75. p. 304-306.
- Sumner, A.T. 1972 A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. *Experimental Cell Research*, New York, v. 75, p. 304-306.
- Swofford, D.L. 1999. PAUP*. *Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods)*. Version 4.0b10. Sinauer Associates, Sunderland, MA.
- Tamura, K.; Dudley, J.; Nei, M.; Kumar, S. 2007. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software versión 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. v.24. p.1596-1599.
- Tate, G. ,H.H. 1939. The mammals of the Guiana region. *Bulletin Americano Museum Natural History*, LXXVI, p. 151-229.
- Taylor, K.M., Hungerford, D.A.; Snyder, R.L. 1969. Artiodactyl mammals: their chromosome cytology in relation to patterns of evolution. In: Benirschke,K. *Comparative mammalian cytogenetics*. Springer Verlag, Berlin, p.346-356.
- Telenius, H.; Pelmeur, A.H.; Tunnacliffe, A.; Carter, N.P.; Behmel, A.; Ferguson-Smith, M.A.; Nordenskjold, M.; Pfragner, R.; Ponder, B.A.J. 1992. Cytogenetic analysis by chromosome painting using DOOP-PCR amplified flow-sorted chromosomes. *Genes, Chromosomes & Cancer*. v. 4. p.257-263.
- Templeton, A. R. 1989. The meaning of species and speciation: a genetic perspective. In: Otte, D., Endler, J. (eds.) *Speciation and its consequences*. Sinauer, Sunderland, MA, p. 3-27.
- Templeton, A. R. 2001. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. *Mol. Ecol.* V. 10. p. 779-791
- Thomas, O. 1908. A new deer of the brocket group from Venezuela. *Ann. Mag. Nat. Hist.* 1 v.8. p. 349-350.
- Thomas O. 1913. The smaller south American cervidae. *Ann Mag Nat Hist.* v.8 11.p. 587.
- Thompson JD, et al. 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific

- gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* vol. 22. p 4673-4680.
- Tomazella, I.M.; Abril, V.V.; Duarte, J.M.B. 2017 Identifying *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae) chromosomes involved in rearrangements induced by doxorubicin. *Genet Mol Biol*, 40:460- 467.
- Vargas-Munar, D. S. F.; Sarria-Perea, J. A.; Duarte, J. M. B. 2010. Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. *Genetics and Molecular Research*, v. 9, p. 1545-1549.
- Valeri, M.; Tomazella, I. M.; Duarte, J. M.B. 2018. Intrapopulation Chromosomal Polymorphism in *Mazama gouazoubira* (Cetartiodactyla; Cervidae): The Emergence of a New Species? *Cytogenetic and Genome Research*. P. 154(3)
- Verma, R. S. Babu, A. 1995. *Human chromosomes: principles and techniques*. McGraw Hill, New York, 2. ed., p. 419.
- Vilà, C.; Amorim I. R.; Leonard, J. A.; Posada, D.; Castroviejo, J.; Petrucci-Fonseca, F.; Crandall, K. A.; Ellegren, H.; Wayne, R. K. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. *Molecular Ecology*, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2089-2103.
- Vogliotti, A., Duarte, J.M.B. 2009. Discovery of the fifth wild population of the small red brocket deer *Mazama bororo* (Artiodactyla- Cervidae). *Mastozoologia Neotropical*. v.16. p. 499- 503.
- Whitehead, G. 1972. *Deer of the World*. London: Constable.
- Wise, D.; & Nail, B. 1987. A technique for analysing fish meiotic chromosomes with light and electron microscopies. *Copeia*. p.499-503.
- Worton, B.J. 1987. A review of models of home range for animal movement. *Ecological Modelling*, v.38 p.277-298

APÊNDICE A

Permissão de coleta



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES



SAFETY

SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 06821 /14

MÉXICO, D. F., A 25 JUL 2014

"2014, Año de Octavio Paz".

DRA. GRISELDA ESCALONA SEGURA
DIVISIÓN DE BIOLOGÍA DE LA CONSERVACIÓN
EL COLEGIO DE LA FRONTERA SUR - UNIDAD CAMPECHE
AV. RANCHO POLÍGONO No. 2 - A
CIUDAD INDUSTRIAL, C.P. 24500
CAMPECHE, CAMPECHE
TEL. (981)127 3720, gescalon@ecosur.mx

Considerando que ha dado cumplimiento a los requisitos establecidos para efectuar investigación y colecta científica de flora y fauna silvestres en territorio mexicano y con fundamento en el Artículo 32 Bis fracciones I, III, XX, XXXIX de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; Artículos 19 fracción XXV y 32 fracciones VI, XVIII, XXI, XXIV del Reglamento Interior de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales, publicado en el Diario Oficial de la Federación el 26 de noviembre de 2012; 79, 80 fracción I, 82, 83 y 87 párrafo cuarto de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente; Artículos 9º. Fracción XII, 97 y 98 de la Ley General de Vida Silvestre; 12, 123 Fracción III y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre; Artículo 85, Artículo 88, fracciones I y II, Artículo 105, fracciones II y III del Reglamento de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente en Materia de Áreas Naturales Protegidas (ANP's); las disposiciones relativas de la Norma Oficial Mexicana NOM-126-SEMARNAT-2000, por la que se establecen las especificaciones para la realización de actividades de colecta científica de material biológico de especies de flora y fauna silvestres y otros recursos biológicos en el territorio nacional; la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, protección ambiental-especies nativas de México de flora y fauna silvestres-categorías de riesgo y especificaciones para su inclusión, exclusión o cambio-lista de especies en riesgo, la Dirección General de Vida Silvestre **autoriza** la Colecta Científica por proyecto sobre especies o poblaciones en riesgo o sobre hábitat crítico, para realizar las siguientes actividades inherente al Proyecto denominado **"Monitoreo de especies prioritarias (aves y mamíferos) en la Reserva de la Biosfera de Calakmul/Estado de conservación de las aves y mamíferos en la Península de Yucatán"**:

- Colecta, recolecta y liberación de ejemplares de las especies pertenecientes a las Clases: **Aves y Mammalia (mamíferos pequeños)** para toma de medidas morfométricas, obtención de muestras de sangre, colecta de ecto y endoparásitos y su liberación inmediata.
- Colecta definitiva de hasta tres (03) ejemplares por especie de las Clases: **Aves y Mammalia (mamíferos pequeños)** de las especies que no hayan sido colectadas anteriormente y que no se encuentren listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010.
- Observación directa y grabación de cantos de aves y registro de huellas de mamíferos medianos y grandes.
- Colecta definitiva de hasta cinco (05) muestras para herbario por especie de flora silvestre que se encuentre listada en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010 y que no haya sido colectada anteriormente.
- De ejemplares de "pavo ocelado" *Meleagris ocellata* aprovechados legalmente en UMA se obtendrán muestras de contenido estomacal y muestras de tejidos.

La autorización de colecta de Plantas vasculares que no se encuentren listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, de conformidad con el artículo 1° de la Ley General de Vida Silvestre, queda fuera del ámbito de competencia de esta Dirección General de Vida Silvestre, motivo por el cual, deberá dirigirse a la Dirección General de Gestión Forestal y Suelos, ubicada en Av. Progreso No. 3, Edificio 3, Planta Alta, Colonia del Carmen Coyoacán, Delegación Coyoacán, C.P. 04100, México, D.F., Tels. 5484 35 68 y 5484 35 69, (dgforestal@semarnat.gob.mx), para que le informen el trámite que deberá realizar.

Las actividades de colecta se llevarán a cabo en la Reserva de la Biosfera Calakmul, Reserva de la Biosfera Los Petenes y Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos, Estado de Campeche; Reserva de la Biosfera Ría Lagartos, Reserva de la Biosfera Ría Celestún y Parque Nacional Arrecife Alacranes, Estado de Yucatán; Reserva de la Biosfera Sian Ka'an, Área de Protección de Flora y Fauna Bala 'an K' aax, Área de Protección de Flora y Fauna Uaymil y Área de Protección de Flora y Fauna Yum Balam, Estado de Quintana Roo; Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla, Estado de Tabasco. Esta autorización tendrá una vigencia de un (01) año a partir de la expedición de la presente.

Las actividades se realizarán con el Aval del El Colegio de la Frontera Sur-Unidad Campeche, con la colaboración de la Dra. Sophie Calmè Delande, Dr. Manuel Weber, Biol. Enrique Escobedo y C. Guillermo E. Castillo Vela, todos de la Institución antes mencionada; M. en C. Sergio Padilla, Biol. Rodolfo Noriega, Biol. Jesús Vargas Soriano y Biol. David Enrique Simá Pante de la Universidad Autónoma de Campeche; Dr. Hugo Ruiz Piña, Dr. Jorge Eduardo Zavala Castro, Dr. José Arturo Farfán Alé, Dr. Ignacio Vado Solís, Dr. Carlos R. Ávila Buenfil y Dra. Rosani Flores Canul del Laboratorio de Parasitología del Centro de Investigaciones Regionales "Dr. Hideyo Noguchi" de la Universidad de Yucatán; Jorge A. Vargas Contreras de la Universidad Nacional Autónoma de México y los estudiantes José del C. Puc Cabrera, José D. Cú Vizcarra, Alma de La Gala Quijano, Rosalía Puch Chávez, Tammy Esperanza Chi Coyoc; Dr. Armando Alayón Gamboa; MVZ. Ana Romero Calderón, MVZ. Adriana Vallarino Moncada, C. Alexis Plasencia del Colegio de la Frontera Sur; Jon T. McRoberts de Texas Tech Univ y Pas. de Biol. Ana Catzim Uc; MsC. Anay Serrano Rodríguez; M. en B. Moisés Andrade Herrera, Biol. Rodríguez Macedo de El Colegio de la Frontera Sur y el titular y colaboradores quedan sujetos a las siguientes condicionantes:

1.- Deberá cumplir con las disposiciones Administrativa, Fiscales y de Sanidad exigibles por las autoridades competentes en la Materia, sean Federales, Estatales ó Municipales, así como con las disposiciones establecidas en la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y su Reglamento en Materia de Áreas Naturales Protegidas y demás disposiciones legales aplicables.

2. - Obligatoriamente y previo al inicio de las actividades de campo en el Área Natural Protegida, deberá contactar a su Director correspondiente: C. José Adalberto Zúñiga Morales, Director de la Reserva de la Biosfera de Calakmul (Xpugil, Calakmul, Campeche (Av. Insurgentes No. 445 entre Tecnológico de Chetumal y Tecnológico de Mérida, C.P. 77039, Chetumal Q. Roo. Tel(s). 01 (983) 285 4623 e-mail: calakmul@conanp.gob.mx); C. César Uriel Romero Herrera, Subdirector de la Reserva de la Biosfera Los Petenes (Calle 10 No. 329, entre calles 59 y 61 Edificio San Ignacio, 1er Nivel, L 4 y L 7, Col. Centro, C. P. 24000, San Francisco de Campeche, Campeche). Tel. 01 (981) 811 7156, e-mail: petenes@campeche.semarnat.gob.mx); C. José Hernández Nava, Director del Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos (Av. Adolfo López Mateos s/n esq. Héroes del 21 de Abril, Prolongación Playa Norte, C.P. 24140, Ciudad del Carmen, Campeche, Tel. 01 (938) 382 6270, e-mail: jhernandez@conanp.gob.mx); C. Rafael Robles de Benito, Director de la Reserva de la Biosfera Ría Lagartos (Estación de Campo Ría Lagartos: Crucero Ría Lagartos-Tizimin, Ría Lagartos, Yuc. y Calle 18, No 120 por Av. Pérez Ponce, Col. Itziminá, C.P. 97100, Mérida, Yuc., Tel. 01 (986) 861 14 30, e-mail: rafael.robles@conanp.gob.mx, lagartos@conanp.gob.mx y rbrialagartos@prodigy.net.mx); C. René Humberto Kantu Palma, Director de la Reserva de la Biosfera Ría Celestún y del Parque Nacional Arrecife Alacranes (Calle 18, No. 120 por Av. Pérez Ponce, Col. Itziminá, C.P. 97100, Mérida, Yuc., Tel. 01 (999) 926 42 18 y 938 07 08, e-mail: celestun@conanp.gob.mx y rkantu@conanp.gob.mx); C. Ángel Omar Ortiz Moreno, Director de la RB Sian Ka'an y el APFF Uaymil (Calle Venado No. 71, Segundo Piso, Supermanzana 20, Manzana 18, C. P. 77500, Cancún, Benito Juárez, Quintana Roo., Tel. 01 (998) 892 15 67, e-mail: siankaan@conanp.gob.mx y omortiz@conanp.gob.mx); C. José Juan Pérez Ramírez, Director del Área de Protección de Flora y Fauna Bala 'an Ka' ax (Venado No. 71, 2do Nivel, Sm 20 Mz. 18, C.P. 77500, Cancún, Q. Roo., Tel. 01 (998) 887 1997, e-mail: jperrez@conanp.gob.mx); y al C. José Bernardo Rodríguez de la Gala Méndez, Director del Área de Protección de Flora y Fauna Yum Balam (Calle Venado # 71 y 73, Supermanzana 20, Manzana 18, Retorno 8, Lotes 2 y 4



SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES



SUBSECRETARÍA DE GESTIÓN
PARA LA PROTECCIÓN AMBIENTAL
DIRECCIÓN GENERAL DE VIDA SILVESTRE

OFICIO NÚM. SGPA/DGVS/ 06821 /14

MÉXICO, D. F., A

25 JUL 2014

"2014, Año de Octavio Paz".

C.P. 77500, Cancún, Benito Juárez, Q. Roo y Avenida Palominos s/n, Edificio SEMARNAT, C.P. 37580, Holbox, Municipio de Lázaro Cárdenas, Q. Roo., Tel. 01 (999) 938 07 08, e-mail: yumbalam@conanp.gob.mx), C. Carlos Agustín Bautista Jiménez, Director de la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla (Av. Paseo de la Sierra 613, 2ª. Planta, Col. Reforma, C.P. 86080, Villahermosa, Tabasco, Tel. (993)313 9362, e-mail: pcentla@conanp.gob.mx; cbautista@conanp.gob.mx), lo anterior para coordinar las actividades de campo con el ANP, presentar su programa de actividades, lista de participantes y fechas en que pretende ingresar al ANP; así mismo se le asignará el personal del ANP que lo acompañará durante los trabajos de campo y deberá acatar las indicaciones, acceso y recomendaciones que le haga dicho personal.

3. - Obligatoriamente y previo al inicio de actividades en la UMA, deberá contactar al Director ó Propietario de las mismas, para que le permita el acceso, para lo cual deberá indicar del Proyecto que realiza las actividades que realizará y los beneficios que obtendrá al participar el proyecto.

4. - En la realización del proyecto propuesto, se responsabilizará al titular de la investigación de cualquier impacto significativo que resulte sobre las poblaciones de la flora o fauna silvestres y sus hábitats, por lo que deberá considerar el riesgo de perturbación del ecosistema, antes de su ejecución y no llevarlo a cabo si existe algún riesgo.

5. - Previo al inicio de las actividades de campo, deberá enviar obligatoriamente por escrito y utilizando cualquier medio su programa de trabajo a las Delegaciones Federales de la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales en los Estados de **Campeche** (Tel. 01 (981) 811 23 31), **Quintana Roo** (Tel. 01 (983) 835 0222, 835 0226), **Tabasco** (Tel. 01 (993) 910 14 07, 910 1408), **Yucatán** (Tel. 01 (999) 942 13 07), enviando copia del mismo a la Dirección General de Vida Silvestre. De igual manera, al término de dichas actividades lo notificará a esas Delegaciones Federales, enviándole un reporte detallado por escrito.

6. - La totalidad del material colectado deberá destinarse exclusivamente a los fines específicos del proyecto, objeto de la presente autorización. Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre, el material biológico colectado será depositado en las instalaciones del Herbario del CEDESU y el Museo de la Biodiversidad Maya, ambos de la Universidad Autónoma de Campeche y en el Museo de Zoología de El Colegio de la Frontera Sur y el titular de la autorización, asume la responsabilidad de remitir a esta Dirección General, copia de la(s) constancia(s) del(os) depósito(s) debidamente firmado(s), especificando la cantidad del material depositado.

7. - Con base al Capítulo IV, Artículo 98 de la Ley General de Vida Silvestre y 126 del Reglamento de la Ley General de Vida Silvestre, el responsable del proyecto deberá someter a la consideración de la Dirección General de Vida Silvestre, en un plazo no mayor de 30 (TREINTA) días de concluida la vigencia de la presente, un informe que describa **detalladamente** las actividades realizadas, los resultados obtenidos, la problemática del área trabajada, las potenciales alternativas de solución y -en su oportunidad-, la(s) publicación(es) y sobre tiros producto de la investigación.

8. - Queda estrictamente **prohibido** efectuar cualquier aprovechamiento de las especies de flora y fauna silvestres, cualesquiera que sea su estatus, excepto lo aquí autorizado, así como realizar actividades en áreas naturales protegidas de México, sean Estatales o Federales, sin previa autorización.

continúa al reverso.../ Hoja 2 de 2

Av. Revolución 1425, Nivel 1, Col. Tlacotepec San Ángel,
Delegación Álvaro Obregón, C. P. 21040, México, D. F.
Teléfono 01(55) 56-24-33-05, Fax 01(55)56-24-38-42

SAFETY

OAK-TREE

SAFETY

9. - De acuerdo al Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y al Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, esta autorización no ampara el aprovechamiento del material biológico colectado para fines comerciales, ni de utilización en biotecnología.

Se recomienda que durante sus actividades de campo, en el caso de observar ejemplares de especies listadas en la Norma Oficial Mexicana NOM-059-SEMARNAT-2010, se notifique de ello (la especie, ubicación geográfica y la fecha) a esta Dirección General, en el informe de actividades antes mencionado.

La presente autorización es personal e intransferible y habrá de mostrarse a las Autoridades Federales, Estatales y Municipales cuantas veces lo soliciten. Así mismo y tomando en consideración lo establecido por el Artículo 87 de la Ley General del Equilibrio Ecológico y la Protección al Ambiente y por el Capítulo IV, Artículo 97 de la Ley General de Vida Silvestre, el titular de la presente deberá contar con el consentimiento previo, expreso e informado de los legítimos propietarios de la(s) tierra(s) donde pretende desarrollar el proyecto.

El incumplimiento de las condiciones aquí establecidas, dará origen a la instauración de un procedimiento administrativo ante la autoridad competente, para proceder a la cancelación de la autorización y a la aplicación de la legislación correspondiente, según sea el caso.

EL DIRECTOR GENERAL

JORGE MAKSABEDIAN DE LA ROQUETTE

SECRETARÍA DE MEDIO AMBIENTE
Y RECURSOS NATURALES



- C.c.p. C. Joel González Moreno.- Director General de Inspección y Vigilancia de Vida Silvestre, Recursos Marinos y Ecosistemas Costeros, PROFEPA.- Carr. Picacho Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C.P. 14210, México D.F. vida_silvestre@profepa.gob.mx; mejilla@profepa.gob.mx
- C. Cesar Murillo Juárez.- Coordinador de Asesores de la Subsecretaría.- coordinacion.gpps@semarnat.gob.mx
- C. Enrique Pérez Gómez.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Campeche.- delegado@campeche.semarnat.gob.mx
- C. Raúl Omar González Castilla.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Quintana Roo.- delegado@qr.semarnat.gob.mx; raulogonzalez@qr.semarnat.gob.mx
- C. Luis Alberto López Carbajal.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Tabasco.- delegado@tabasco.semarnat.gob.mx
- C. Jorge Carlos Berlin Montero.- Delegado Federal de la SEMARNAT en el Estado de Yucatán.- delegado@yucatan.semarnat.gob.mx
- C. José Adalberto Zúñiga Morales.- Director de la Reserva de la Biosfera de Calakmul.- calakmul@conanp.gob.mx; jzuniga@conanp.gob.mx
- C. César Uriel Romero Herrera.- Director de la Reserva de la Biosfera Los Petenes.- petenes@campeche.semarnat.gob.mx
- C. José Hernández Nava.- Director del Área de Protección de Flora y Fauna Laguna de Términos.- jhernandez@conanp.gob.mx
- C. Rafael Robles de Benito.- Director de la Reserva de la Biosfera Ria Lagartos.- rafael.robles@conanp.gob.mx; lagartos@conanp.gob.mx; rbrialaqartos@prodigy.net.mx
- C. René Humberto Kantu Palma.- Director de la Reserva de la Biosfera Ria Celestún y del Parque Nacional Arrecife Alacranes.- celestun@conanp.gob.mx; rkantu@conanp.gob.mx
- C. Ángel Omar Ortiz Moreno.- Director de la Reserva de la Biosfera Sian Ka'an y Área de Protección de Flora y Fauna Uaymil.- siankaan@conanp.gob.mx; omortiz@conanp.gob.mx
- C. José Juan Pérez Ramírez.- Director del Área de Protección de Flora y Fauna Bala'an Ka'ax.- jperez@conanp.gob.mx
- C. José Bernardo Rodríguez de la Gala Méndez, Director del Área de Protección de Flora y Fauna Yum Balam.- yumbalam@conanp.gob.mx
- C. Carlos Agustín Bautista Jiménez.- Director de la Reserva de la Biosfera Pantanos de Centla.- pcentla@conanp.gob.mx; cbautista@conanp.gob.mx
- C. David Gutiérrez Carbonell.- Director General de Manejo para la Conservación de Áreas Naturales Protegidas, Comisión Nacional de Áreas Naturales Protegidas.- Carretera Picacho Ajusco No. 200, 6º. Piso, Col. Jardines de la Montaña, Delegación Tlalpan, C. P. 14210, México, D. F.- daguati@conanp.gob.mx
- C. Fernando Sánchez Camacho.- Jefe del Departamento de Análisis para el Aprovechamiento de Otras Especies.- Edificio Sánchez@semarnat.gob.mx

LEGIMACGIFSCICRA

ColectClient- GriseldaEscalonaSeg-AVE_MAMIFER(18-7-14)

"Por una cultura ecológica y el uso eficiente del papel, las copias de conocimiento de este oficio de remiten vía electrónica"

APENDICE B

Doação inecol



INSTITUTO DE ECOLOGÍA A.C

Carretera Antigua a Coatepec #351
Las Hayas, Xalapa, Veracruz, México.

Enero, 27 2016

A: Autoridades de la Aduana Brasileira.

Asunto: Donación de Material Biológico.

A quien pueda interesar,

Por medio del siguiente documento doy constancia de la donación de material biológico que se encuentra actualmente bajo la responsabilidad de la Profa. Dr. Sonia Gallina Tessaro, Investigador titular del Instituto de Ecología A.C. La presente donación va dirigida al Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) perteneciente a la Universidad Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" UNESP. Este material forma parte de la colaboración científica entre el investigador brasileiro José Mauricio Barbanti Duarte y los investigadores mexicanos Sonia Gallina Tessaro y Rafael Reyna-Hurtado, que servirá para la realización del proyecto de investigación titulado: "La búsqueda de Topótipos y producción de citótipos y genotipos como la mejor forma para la resolución de la compleja taxonomía del género *Mazama* (Mammalia; Cervidae)", financiado por el Consejo Nacional de Desarrollo Tecnológico (CNPq) Brasil.

Están siendo donados al Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE): Cráneos, post-cráneos, Pieles abiertas y muestras de tejido conservados en formol y etanol, así como también tejidos conservados en nitrógeno líquido, correspondientes a los siguientes animales:

Un macho de la especie *Mazama pandora*, originario de la Península de Yucatán, colectado bajo el permiso SGPA/DGVS/04214/2015.

Un macho y un hembra de la especie *Mazama temama*, originarios de la Península de Yucatán, colectados bajo el permiso SGPA/DGVS/06821/2014 Y donados al Instituto de Ecología A.C. (INECOL) según consta en el oficio anexo.

Una hembra de *Mazama temama*, originaria del estado de Veracruz, donada al INECOL según consta en el oficio redactado por el señor Carlos Ros.

Todos los documentos se encuentran anexados a esta declaración como parte de la justificativa del origen legal de los especímenes.

Sin más que decir, por favor no deje de contactarme para cualquier otra información que pueda ser necesaria.

Dr. Martín Ramón Aluja Schuneman Hofer
Director General
Instituto de Ecología A.C

Prof. Sonia Gallina Tessaro
Investigador titular
Red de Biología y Conservación de Vertebrados
Instituto de Ecología A.C