

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E  
MOLECULAR DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA:  
CERVIDAE) A PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL**

**Analorena Cifuentes Rincón**  
**Médica Veterinária e Zootecnista**

**2016**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**

**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**

**Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias**

**Câmpus de Jaboticabal**

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E  
MOLECULAR DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA:  
CERVIDAE) A PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL**

**Analorena Cifuentes Rincón**

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

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

**2016**

Cifuentes Rincón, Analorena

C569c Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama americana* (Artiodactyla Cervidae) a partir de um topótipo atual / Analorena Cifuentes Rincón. – – Jaboticabal, 2016  
ix, 118 p: il.; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2016

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

Banca examinadora: Elias Alberto Gutierrez Carnelossi, Estevam Guilherme Lux Hoppe

Bibliografia

1. Neótipo. 2. Taxonomia. 3. Veado-Mateiro. 4. DNA mitocondrial. 5. DNA nuclear. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias.

CDU 639.111.1

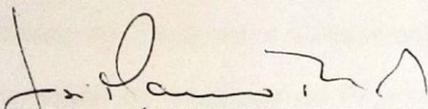
**CERTIFICADO DE APROVAÇÃO**

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGÊNÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) A PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL

**AUTORA: ANALORENA CIFUENTES RINCÓN**

**ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE**

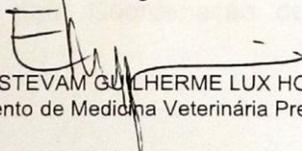
Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em GENÉTICA E MELHORAMENTO ANIMAL, pela Comissão Examinadora:



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



Prof. Dr. ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI  
Faculdade de Ciências Agrárias / Universidade Federal da Grande Dourados



Prof. Dr. ESTEVAM GUILHERME LUX HOPPE  
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Reprodução Animal / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Jaboticabal, 05 de agosto de 2016

## **DADOS CURRICULARES DA AUTORA**

**ANALORENA CIFUENTES RINCÓN** – Nascida em 10 de março de 1991, natural de Bogotá – DC, Colômbia, Médica Veterinária e Zootecnista, formada em 2014 pela Universidade Cooperativa de Colômbia – Ibagué, Tolima. Durante o curso de graduação foi bolsista do Comité Nacional para el Desarrollo de la Investigación (CONADI), – Bolsa de Apoio Técnico pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) durante o período de Março – Agosto de 2014 pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de cervídeos (NUPECCE). Em Agosto de 2014 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).

*"A emoção mais bela que podemos experimentar é o sentimento do mistério. É a emoção fundamental que está no berço de toda verdadeira arte e ciência.*

*Aquele que desconhece essa emoção, aquele que não consegue mais se maravilhar, ficar arrebatado de admiração, é como se estivesse morto; é uma vela que foi apagada. Sentir que por trás de qualquer coisa que possa ser experimentada há algo que nossa mente não consegue captar, algo cuja beleza e solenidade nos atinge apenas indiretamente: essa é a religiosidade. Nesse sentido, e apenas nesse sentido, sou devotamente religioso."*

**Albert Einstein**

Extraído do livro "Albert Einstein - Sua vida, seu universo (Walter Isaacson).

*À minha mãe **Dora Isabel**, mulher guerreira  
que me ensinou a lutar. Quem, apesar de não  
estar presente fisicamente, encontrou  
uma maneira de me orientar neste mundo  
e, mesmo não acreditando em outras vidas  
depois da morte, guardo inevitavelmente  
a esperança de um dia, poder sentir  
novamente, seu abraço quente e seu colo fofo.*

***Dedico.***

## AGRADECIMENTOS

À **Família Cifuentes**, especialmente às minhas tias **Hilda** e **Angélica** que sempre tiveram o amor suficiente para me apoiar nesta fase da minha vida. Agradeço também aos meus irmãos **Diego** e **Camilo** por torcer tanto por mim e fazer sempre tudo o possível pela minha felicidade. A gente olha para o mundo de jeitos diferentes, mas o amor sempre será o mesmo.

À minha freira favorita, **Ángela**, pela ajuda na minha formação desde criança até hoje, e quem nem imagina que lembro das suas palavras em cada um dos passos que dou.

Ao Prof. Dr. **José Maurício Barbanti Duarte**, pela confiança, orientação e por todas as suas palavras, dicas e puxões de orelha que me tornaram ainda mais apaixonada pela fauna silvestre e a conservação.

Ao **João Boer**, o técnico, quem além de facilitar minha vida no laboratório e me ajudar nas épocas de desespero, compartilhou comigo tantas boas conversas.

Ao Prof. Dr. **Vítor Miranda**, pela grande ajuda nas análises filogenéticas e pelas dicas respeito à genética molecular e evolução.

Ao **Nestor**, meu grande amigo de Jaboticabal, pelas longas conversas e cervejas compartilhadas. Assim como também pelo ensinamento e as discussões sobre genética molecular.

À **Jahir**, pela paciência e as demonstrações de amor mesmo na distância. Prometo não voar tão longe a próxima vez, e se não consigo, tentarei pelo menos te levar comigo.

Às minhas melhores amigas **Catha** e **Laura**, que mesmo de longe sempre tiveram tempo para me escutar e aconselhar com paciência e carinho.

Aos amigos e colegas do **NUPECCE** pelas tardes do café, o companheirismo e apoio sempre. Agradeço especialmente à **Mar** e ao **David** por estar sempre dispostos a me ajudar desinteressadamente. À **Lu** e à **Lincy** pelas conversas, risos e amizade sempre. À **Carol** e à **Nadime**, pelas (tantas) risadas e momentos de filosofia dentro e fora do laboratório. À **Iara**, **Aline**, **Louise** e **Jorge** por estar perto e oferecer sua colaboração constante.

À **Dasmi** e **Malu**, por escutar com paciência todas as histórias na hora de chegar em casa, pelos conselhos, a convivência e amizade.

À **Unesp** por ter sempre as portas abertas e me fazer sentir em casa. Também por oferecer tantas oportunidades para me divertir, as quais recebi com muito agrado; os torneios de futebol feminino, tardes de voleibol, as aulas de capoeira e o coral. Agradeço também à **Unati-FCAV** por me brindar a oportunidade de ensinar uma das coisas que eu mais disfruto fazer: dançar. Obrigada por fazer meus dias aqui mais felizes.

Gostaria de agradecer à todo o pessoal estrangeiro de Jaboticabal. Sem dúvida a saudade de casa se torna mais leve com a presença de vocês por perto.

**¡Muito obrigada!**

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES.....	III
LISTA DE FIGURAS.....	IV
LISTA DE TABELAS.....	VII
RESUMO.....	VIII
ABSTRACT.....	IX
I. INTRODUÇÃO.....	1
II. REVISÃO DE LITERATURA.....	4
2.1 Família Cervidae.....	4
2.2 <i>Mazama americana</i> (Erxleben, 1777).....	8
2.3 Morfologia tradicional, craniometria e morfometria geométrica.....	10
2.4 Citogenética de <i>Mazama americana</i> .....	12
2.5 Filogenia de <i>Mazama americana</i> .....	16
2.6 Especiação e isolamento reprodutivo.....	17
III. OBJETIVOS.....	18
3.1 Objetivo geral.....	18
3.2 Objetivos específicos.....	19
IV. MATERIAL E MÉTODOS.....	19
4.1 Obtenção do animal e amostras.....	19
4.2 Morfologia, biometria, craniometria e morfometria geométrica.....	20
4.2.1 Medidas corporais.....	20
4.2.2 Morfologia externa.....	21
4.2.3 Medidas cranianas.....	22
4.3 Caracterização citogenética.....	25
4.3.1 Cultivo de fibroblastos a partir de fragmentos de pele.....	25
4.3.2 Preparação das lâminas.....	27
4.3.3 Coloração convencional Giemsa.....	27
4.3.4 Biometria cromossômica.....	27
4.3.5 Bandamento G.....	28

4.3.6	Bandamento C.....	28
4.3.7	Coloração Ag-NOR.....	29
4.3.8	Construção de árvore de distância a partir de dados citogenéticos.....	29
4.4	Filogenia molecular.....	29
4.4.1	Amostras.....	29
4.4.2	Extração de DNA.....	31
4.4.3	Quantificação do DNA.....	32
4.4.4	Amplificação do DNA.....	32
4.4.5	Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento.....	34
4.4.6	Alinhamento e análises de sequências.....	34
4.4.7	Análises filogenéticas e construção das árvores.....	34
V.	RESULTADOS.....	35
5.1	Morfologia tradicional, craniometria e morfometria geométrica.....	35
5.1.1	Descrição emendada de <i>Mazama americana</i> .....	35
5.2	Citogenética.....	48
5.3	Filogenia molecular.....	58
VI.	DISCUSSÃO.....	64
6.1	Morfologia, biometria, craniometria e morfometria geométrica.....	64
6.2	Citogenética.....	65
6.3	Filogenia molecular.....	68
6.4	Validade do neótipo.....	70
VII.	CONCLUSÕES.....	72
VIII.	REFERÊNCIAS.....	73

## LISTA DE ABREVIACÕES

**2n** – Número diploide

***α-LA1b*** – Íntron 2 da lactoalbúmina

**BOLD** - Barcode of Life Data

***Citb*** - *Citocromo-b*

***COI*** – Citocromo Oxidasa 1

**DMEM** - Meio essencial mínimo modificado de Dulbecco

**DNA** - Ácido Desoxirribonucléico

**IB** – Inferência Bayesiana

**ICNZ** – Código Internacional de Nomenclatura Zoológica

**IUCN** – International Union for Conservation of Nature

***IL16*** - Interleucina 16

**Lt** – Litro

**mg** – Miligrama

**MgCl<sub>2</sub>** - Cloreto de Magnésio

***MGF*** - Fator de crescimento de mastócitos

**mL** – Mililitro

**MP** – Máxima Parcimônia

**mtDNA** – DNA Mitocondrial

**NF** - Número fundamental de braços cromossômicos

**NUPECCE** - Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos

**NCBI** - National Center for Biotechnology Information

**pb** - Pares de bases

**PCA** - Análise de componentes principais

**PC** – Componente principal

**rcf** - Relative centrifugal force ou força G

**μl** – Microlitro

**Spp** – espécie

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Macho de *Mazama americana* (veado-mateiro). Foto: DUARTE, J.M.B.....2
- Figura 2.** Distribuição geográfica do *Mazama americana* na América do Sul (Fonte: VARELA et al. 2010).....2
- Figura 3.** Espécies do gênero *Mazama* reconhecidas no Brasil. (A) *M. nemorivaga*, (B) *M. gouazoubira*, (C) *M. nana*, (D) *M. bororo*, (E) *M. americana*. Fotos: DUARTE, J.M.B.7
- Figura 4.** Descrição original do *M. americana* Fonte: ERXLEBEN (1777). Biodiversity Heritage Library.....9
- Figura 5.** Citótipos de *M. americana* com seus respectivos cariótipos.....15
- Figura 6.** Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vista dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). Fonte: VON DEN DRIESCH A (1976).....24
- Figura 7.** Ilustração do crânio em vista dorsal evidenciando os pontos de “landmarks” tomados para o topótipo.....25
- Figura 8.** Topótipo de *M. americana* em vista dorsal, corpo (A) e dorsal, cabeça (B)....37
- Figura 9.** Topótipo de *M. americana* em vista lateral esquerdo, corpo (A) e lateral esquerdo, cabeça (B).....38
- Figura 10.** Topótipo de *M. americana* em vista ventral, região anterior (A) e ventral, região posterior (B).....39
- Figura 11.** Pele aberta taxidermizada do topótipo de *M. americana*.....40

<b>Figura 12.</b> Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D) do crânio do topótipo de <i>M. americana</i> . A régua ilustra medida em centímetros.....	<b>41</b>
<b>Figura 13.</b> Diagrama dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas corporais de indivíduos de <i>M. americana</i> provenientes de diferentes localidades de Brasil com relação ao topótipo analisado neste trabalho.....	<b>45</b>
<b>Figura 14.</b> Árvore de distância feita com as medidas biométricas dos diferentes citótipos de <i>M. americana</i> encontrados no Brasil em comparação com o topótipo e um grupo externo .....	<b>46</b>
<b>Figura 15.</b> Árvore de distancia feita com as medidas cranianas de diferentes citótipo encontrados no Brasil .....	<b>47</b>
<b>Figura 16.</b> Cariótipo básico pertencente ao topótipo de <i>Mazama americana</i> sob coloração convencional Giemsa.....	<b>48</b>
<b>Figura 17.</b> Cariótipo básico pertencente ao topótipo de <i>M. americana</i> sob coloração Ag-NOR.....	<b>49</b>
<b>Figura 18.</b> Cariótipo básico pertencente ao topótipo de <i>M. americana</i> sob bandamento C.....	<b>50</b>
<b>Figura 19.</b> Representação esquemática do padrão de bandas C do topotipo de <i>M. americana</i> .....	<b>51</b>
<b>Figura 20.</b> Cariótipo básico pertencente ao topótipo de <i>M. americana</i> sob bandamento G.....	<b>52</b>

<b>Figura 21.</b> Representação esquemática do padrão de bandas G do topotipo de <i>M. americana</i> .....	<b>53</b>
<b>Figura 22.</b> Representação esquemática do padrão de bandas G do Topótipo de <i>M. americana</i> . Cromossomos de cinco metáfases diferentes.....	<b>54</b>
<b>Figura 23.</b> Cromossomos correspondentes entre o citótipo Paraná (PR) e o Topótipo (TP) sob bandamento G em (A) e bandamento C em (B).....	<b>56</b>
<b>Figura 24.</b> Evolução cromossômica mostrando as relações dos 6 citótipos em comparação com o topótipo de <i>M. americana</i> .....	<b>57</b>
<b>Figura 25.</b> Árvore de distância a partir de caracteres citogenéticos de todos os citótipos conhecidos no Brasil em comparação ao topótipo analisado neste estudo.....	<b>58</b>
<b>Figura 26.</b> Árvore filogenética do gene <i>Cit-b</i> . Análise de Inferência Bayesiana (IB).....	<b>59</b>
<b>Figura 27.</b> Árvore filogenética dos fragmentos da região controladora <i>D-loop</i> . Análise de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB).....	<b>60</b>
<b>Figura 28.</b> Árvore filogenética concatenada dos fragmentos da região controladora <i>D-loop</i> e o <i>Cit-b</i> . Análise de Inferência Bayesiana (IB).....	<b>61</b>
<b>Figura 29.</b> Árvore filogenética do gene $\alpha$ - <i>LAIb</i> . Análise de Inferência Bayesiana (IB).....	<b>62</b>
<b>Figura 30.</b> Árvore filogenética do gene <i>IL16</i> . Análise de Máxima Parcimônia (MP) e Inferência Bayesiana (IB).....	<b>63</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Amostras utilizadas para as análises filogenéticas.....	<b>30</b>
<b>Tabela 2.</b> Características gerais dos marcadores moleculares utilizados neste estudo.....	<b>33</b>
<b>Tabela 3.</b> Medidas corporais do topótipo de <i>M. americana</i> analisado neste estudo.....	<b>42</b>
<b>Tabela 4.</b> Medidas cranianas do topótipo de <i>M. americana</i> representadas em milímetros (mm).....	<b>42</b>
<b>Tabela 5.</b> Resultados da análise de componentes principais com base em medições corporais de todos os indivíduos adultos do banco de dados do NUPECCE e o topótipo analisado neste estudo.....	<b>44</b>
<b>Tabela 6.</b> Cromossomos envolvidos na diferenciação dos citótipos de <i>M. americana</i> ...	<b>66</b>

## CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) A PARTIR DE UM TOPÓTIPO ATUAL

**RESUMO-** A espécie *Mazama americana* (veado-mateiro) é conhecida como a maior espécie pertencente ao gênero *Mazama*, e também um dos cervídeos mais abundantes e amplamente distribuídos na floresta Neotropical. A espécie já passou por diferentes classificações taxonômicas ao longo do tempo devido a potencial existência de diversas espécies dentro do que hoje é conhecido como *M. americana*. É considerada um complexo de espécies crípticas, pois apresenta alta taxa de paralelismo morfológico entre indivíduos com uma variação cromossômica coerente em termos geográficos, sugerindo a existência de unidades evolutivamente distintas. Assim, o objetivo do trabalho foi propor um neótipo para *M. americana* a partir da caracterização morfológica, citogenética e molecular de um topótipo, no sentido de fazer uma descrição emendada da espécie a partir de uma visão integrativa, permitindo assim a comparação com outros padrões já descritos na literatura considerados *M. americana*. Para tanto, um indivíduo foi coletado na localidade tipo da espécie (Guiana Francesa), e caracterizado por técnicas de morfologia tradicional (medidas cranianas, coloração da pele, biometria corporal) e morfometria geométrica, assim como por análises citogenéticas (banda C, banda G, coloração Ag-NOR, coloração convencional de Giemsa) e moleculares (análises filogenéticas de genes mitocondriais e nucleares). Os resultados corroboram evidências da existência de um complexo de espécies dentro do que hoje se considera *M. americana*, já que, segundo os seus padrões citogenéticos, o topótipo não se enquadra em nenhuma variante da espécie até agora conhecida. Molecularmente, as análises indicam a existência de pelo menos duas espécies diferentes dentro deste táxon. A similaridade morfológica é clara dentro de todas as variantes, comprovando mais uma vez que as unidades taxonômicas do veado-mateiro são muito difíceis de se diferenciar só pelos caracteres morfológicos. Deste modo, no presente trabalho, é proposto um neótipo o qual é o ponto de partida para a descrição de novas espécies e possível mudança completa na nomenclatura do gênero *Mazama*.

Palavras-Chave: Neótipo, taxonomia, veado-mateiro, DNA mitocondrial, DNA Nuclear.

**MORPHOLOGICAL, CYTOGENETICS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION  
OF *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) FROM A CURRENT  
TOPOTYPE**

**ABSTRACT-** The red brocket deer species, *Mazama americana*, is known as the largest species of the genus *Mazama*, and also one of the most abundant deer and widely distributed in Neotropical forests. This species has undergone different taxonomic classifications over time due to the potential existence of several species within what is currently known as *M. americana*, which is considered as a complex of cryptic species. Individuals included in this species show a high morphological convergence between them with a consistent chromosomal variation in geographical terms, suggesting the existence of different evolutionary units. The objective of this study, therefore, was to obtain the morphological, cytogenetic and molecular profile of a *M. americana* toptype to gain an exact description of the species and be able to compare them with other standards already described in the literature for *M. americana*. For this purpose, an individual was collected at the type locality of this species (French Guiana) and characterized by traditional morphological techniques (cranial measurements, skin color, body biometrics), geometric morphometry, cytogenetic analysis (Band C, Band G Ag-NOR staining, conventional Giemsa staining) as well as molecular analysis (phylogenetic analyzes of mitochondrial and nuclear genes). Among highlights of the results, cytogenetic analysis showed a pattern that does not fit into any of the *Mazama americana* variants until now known. Similarly, the molecular analysis revealed the existence of, at least, two different species within this taxon, being clear the morphological similarity in all variants, proving once again that the red brocket variants are impossible to differentiate only by morphological characters. All these results, therefore, corroborate the existence of several species within *M. americana* species, contributing largely to the taxonomy of this species, as well as to the description of new species within the genus *Mazama* and the generation of a new holotype.

Keywords: Neotype, taxonomy, red brocket deer, mitochondrial DNA. nuclear DNA.

## I. INTRODUÇÃO

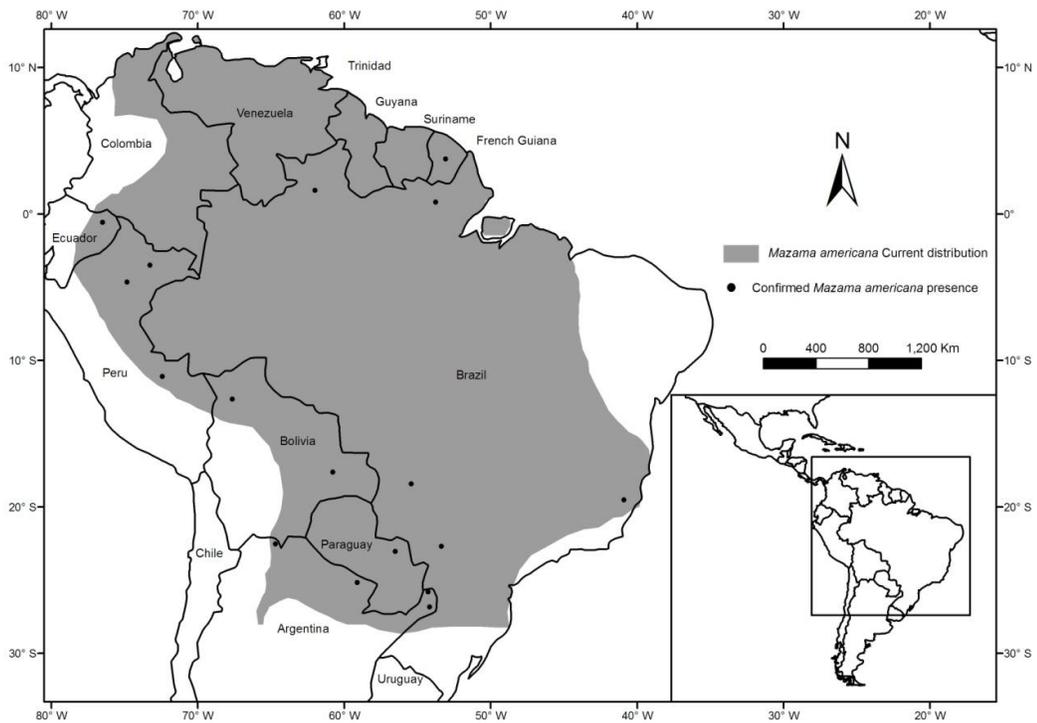
A família Cervidae é uma das famílias mais extensas dentro da ordem Artiodactyla, albergando aproximadamente 55 espécies no mundo, das quais 17 delas habitam o Neotrópico, podendo ser ainda mais. As espécies que habitam no Neotrópico dividem-se em duas formas morfológicas, as espécies pequenas constituídas pelas espécies presentes nos gêneros *Mazama* e *Pudu*, as quais apresentam adaptações morfológicas para se desenvolver na floresta fechada, e as espécies de médio a grande porte representadas pelos gêneros *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Odocoileus* e *Ozotoceros*, que são espécies de corpo maior, chifres ramificados e geralmente habitam áreas abertas (DUARTE et al. 2008)

Entre os cervídeos neotropicais, o gênero *Mazama* é o que apresenta maior distribuição, sendo *Mazama americana*, veado-mateiro, (Figura 1) um dos cervídeos mais abundantes na floresta Neotropical, distribuindo-se ao longo da América tropical e subtropical, entre Colômbia e Venezuela, incluindo Trinidad e Tobago, até o norte da Argentina (Misiones, Salta, Jujuy, Tucumán, Formosa, Chaco e Corrientes) e sul do Brasil (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina) (EMMONS e FEER, 1997; JULIÁ e RICHARD, 2001) (Figura 2).

O veado-mateiro é um táxon cercado de grandes dúvidas quanto à sua validade como espécie única, uma vez que exhibe extensa variação cariotípica de acordo com a sua procedência geográfica, apesar da pequena variação morfológica (ROSSI 2000; DUARTE, et al. 2008; ABRIL et al. 2010; CURSINO et al. 2014).



**Figura 1.** Macho de *Mazama americana* (veado-mateiro). Foto: DUARTE, J.M.B.



**Figura 2.** Distribuição geográfica do *M. americana* na América do Sul (Fonte: VARELA et al. 2010).

Dentro de *Mazama americana* é sugerida a existência de novas espécies, já que além das diferenças moleculares (DUARTE, et al. 2008; CARNELOSSI, 2008) e citogenéticas (DUARTE, 1998; ABRIL et al. 2010), existem evidências de isolamento reprodutivo entre populações de veado-mateiro (SALVIANO, 2011; CURSINO et al. 2014), gerando assim controvérsias quanto ao número de espécies dentro de *M. americana* e a correta definição taxonômica do gênero *Mazama*, que apresenta a maior diversidade dentro dos gêneros da família Cervidae no Neotrópico (DUARTE e MERINO, 1997) que tem como espécie tipo *M. americana*.

A variação cariotípica de *M. americana* e do gênero *Mazama* em geral, pode ser explicada, segundo Duarte e Jorge (1996) e Vargas-Munar (2010), pela teoria da fragilidade cromossômica, a qual indica que os cromossomos do gênero *Mazama* apresentam mais instabilidade do que outras espécies da família Cervidae.

Devido à grande variabilidade de cariótipos de acordo a sua região geográfica (DUARTE, 1998 e ABRIL et al. 2010) somados aos caracteres moleculares nas sequências de DNA de genes mitocondriais como *citocromo b* (KOCHER et al. 1989 e DUARTE et al. 2008) e *região controladora D-loop* (VILÀ et al. 1999), bem como de nucleares como *beta e kapa caseínas* (OTAVIANO, 2006), *IRBP* (“Interphotoreceptor Retinoid Binding Protein”) (WEKSLER et al. 2003) e *SRY* (GRIFFITHS, 1993 e KIKKAWA et al. 2003), a espécie deve ser considerada como um complexo de espécies (complexo *M. americana*). Sendo assim, estudos futuros podem separá-lo em várias espécies, modificando sua área de distribuição atual (DUARTE, 1996; DUARTE e MERINO, 1997).

Além dos problemas taxonômicos de *M. americana*, a descrição original da espécie (ERXLEBEN, 1777) é problemática, uma vez que o holótipo hoje é considerado inexistente. Com a intenção de aumentar as provas da inexistência do holótipo ou de qualquer espécime portador do nome, durante a elaboração deste trabalho, este foi procurado nas grandes coleções de mamíferos mundiais como o Museu Nacional de História Natural da França (MNHN), e o Museu Americano de História Natural de Nova York (MAHN) (Anexo 3). Também foi realizada consulta a outros pesquisadores da área sobre o possível paradeiro do holótipo ou de qualquer

espécime da série tipo, sem sucesso, corroborando a sua inexistência, impedindo portanto qualquer comparação atual. Deste modo, no presente trabalho, é proposto um neótipo para a espécie, trazendo uma descrição emendada de *M. americana* a partir de um topótipo atual, seguindo uma detalhada caracterização morfológica e citogenética, assim como de fragmentos de DNA mitocondrial e nuclear, obtendo todos os padrões da espécie, permitindo compará-los com tudo o que até hoje é considerado *M. americana*. A refinada caracterização deste topótipo, o qual será chamado de neótipo uma vez aceito pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, após publicação do artigo, permitirá a descoberta de novas espécies dentro do gênero *Mazama* e sua categorização do ponto de vista do grau de ameaça atual.

## II. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Família Cervidae

A família Cervidae compreende animais da ordem Artiodactyla, cuja característica mais comum são os chifres decíduos presentes nos machos. É constituída por 17 gêneros distribuídos no mundo, com exceção dos extremos polares (EISENBERG e REDFORD, 1999), sendo também a segunda família mais extensa dentro desta ordem, depois da família Bovidae, albergando aproximadamente 55 espécies (IUCN, 2016).

Estima-se que os cervídeos tiveram radiação adaptativa na América do Sul durante o Pleistoceno (2,5 milhões de anos atrás aproximadamente), ocupando assim nichos ecológicos diversos (DUARTE e MERINO, 1997) que em outros continentes como a África, são ocupados por bóvidos (REDFORD e EISENBERG, 1984). Alguns autores como Eisenberg (1987) e Vislobokova (1990) indicam que os cervídeos evoluíram de animais onívoros de pequeno porte e sem chifres, até animais herbívoros de grande porte com chifres ramificados.

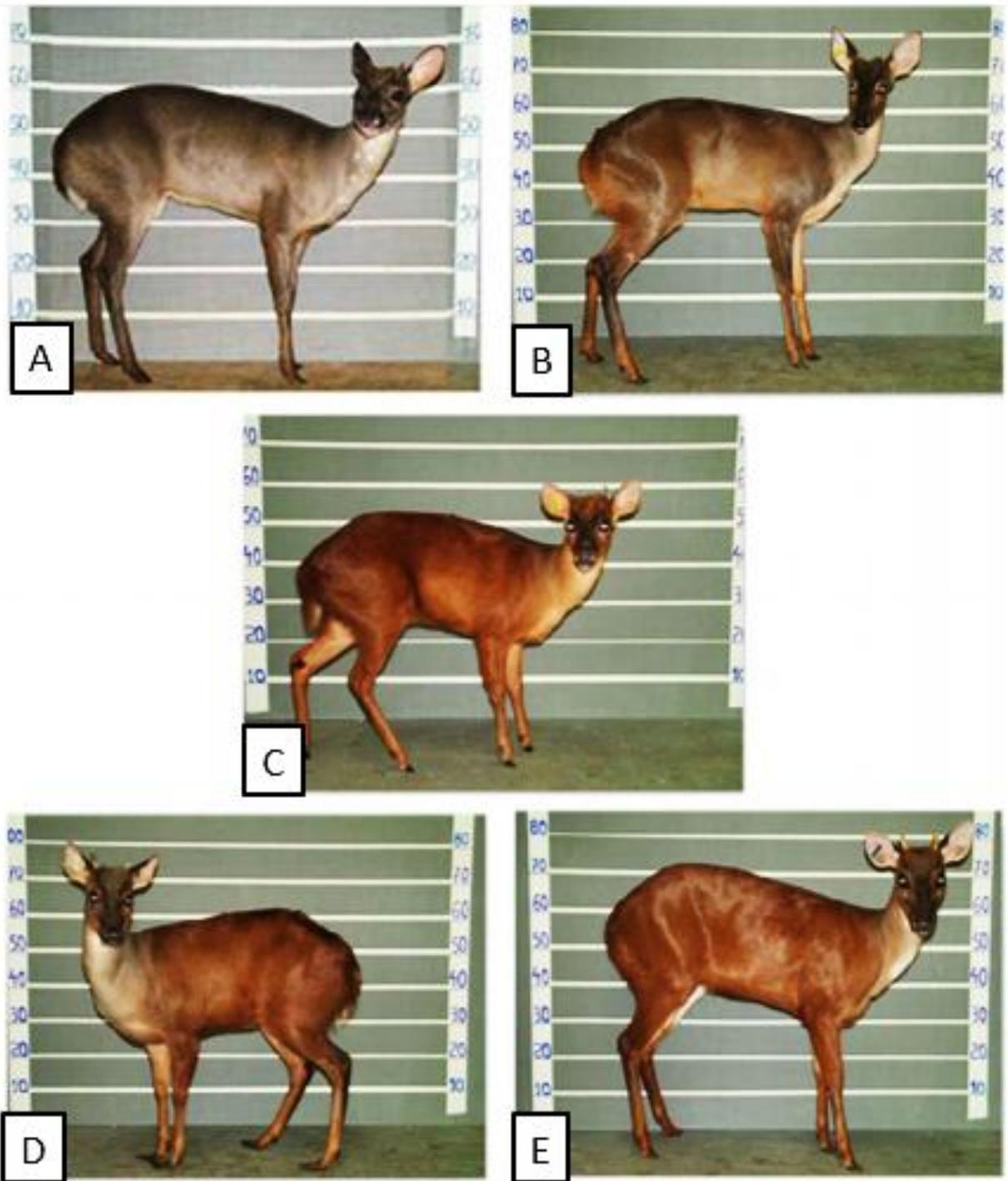
Os Artiodactyla se caracterizam por terem cascos que recobrem os dedos, cada membro possui quatro dedos, dos quais apenas dois deles são apoiados no solo

(DUARTE e MERINO, 1997). Na maioria das espécies da família, os machos apresentam chifres, estruturas ósseas maciças desenvolvidas por processos no osso frontal, com exceção das espécies do gênero *Moschus* e a espécie *Hydropotes inermis*, que não apresentam chifres, e sim um desenvolvimento marcado dos caninos superiores nos machos. Em algumas espécies, os chifres se ramificam, como é o caso do cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus*), veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) e veado-cariacu (*Odocoileus virginianus*), enquanto em outras não se ramificam, como no caso das espécies do gênero *Mazama* e *Pudu* (DUARTE e MERINO, 1997).

Entre os cervídeos neotropicais, o gênero *Mazama* é o que apresenta maior distribuição, ocupando quase todas as regiões tropicais e subtropicais (CZERNAY, 1987), com grande diversidade de espécies. É cercado de muita controvérsia quanto à sua nomenclatura e composição específica. Allen (1915) separa as espécies do gênero *Mazama* por meio de alguns aspectos morfológicos em dois grupos, os veados cinzas e os veados vermelhos. Os cinzas são representados pelas espécies *M. simplicicornis*, *M. murelia*, *M. tschudii*, *M. nemorivaga*, *M. superciliaris*, *M. cita* e *M. pandora*. Os vermelhos por sua vez, são representados pelas espécies *M. trinitatis*, *M. rufa*, *M. sheila*, *M. rufina*, *M. bricenii*, *M. sartorii*, *M. zetta*, *M. gualea*, *M. fuscata*, *M. zamora* e *M. americana*. No entanto, essa hipótese proposta por Allen foi depois desconsiderada por Miranda-Ribeiro, em 1919, na sua revisão taxonômica de cervídeos, na qual ele limita para o Brasil somente quatro espécies: *M. simplicicornis*, *M. rondoni*, *M. rufina* e *M. americana*. Da mesma maneira, Miller (1930) encontrou *M. rufa* no Mato Grosso. Cabrera (1960) considerou como subespécies a maioria das espécies descritas por Allen (1915) e só cita como espécies *M. americana*, *M. chunyi*, *M. gouazoubira* e *M. rufina* para a América do Sul. Já em 1987, em uma revisão do gênero, Czernay citou seis espécies do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. rufina*, *M. bricenii* e *M. chunyi*) e 29 subespécies entre a América Central e a América do Sul.

Atualmente, são aceitas dez espécies dentro deste gênero: *M. rufina* Pucheran, 1851. *M. pandora* Merriam, 1901. *M. chunyi* Hershkovitz, 1959. *M. temama* Kerr, 1792.

*M. bricenii* Thomas, 1908. *M. gouazoubira* Fisher, 1814. *M. nana* Hensel, 1872. *M. nemorivaga* Cuvier, 1817. *M. americana* Erxleben, 1777 e *M. bororo* Duarte, 1996. Cinco destas são reconhecidas no Brasil: *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. bororo* e *M. americana* (Figura 3) (FONTANA e RUBINI, 1990; DUARTE e MERINO, 1997; WEMMER, 1998; DUARTE e JORGE, 2003; DUARTE, 2007; ABRIL et al. 2010).



**Figura 3.** Espécies do gênero *Mazama* reconhecidas no Brasil. (A) *M. nemorivaga*, (B) *M. gouazoubira*, (C) *M. nana*, (D) *M. bororo*, (E) *M. americana*. Fotos: DUARTE, J.M.B.

## 2.2. *Mazama americana* (Erxleben, 1777)

O veado-mateiro (*Mazama americana*) também conhecido como “corzuela colorada” em Espanhol, “red brocket deer” em Inglês e “guazú-pitá” em Guaraní, é a maior espécie pertencente ao gênero *Mazama*, com uma altura entre 58 a 80 cm e comprimento de 90 a 145 cm (DUARTE, 1996). O peso varia dependendo da sua área de distribuição, entre 12 e 65 Kg com um peso médio de 30 Kg (DUARTE, 1996). A cor dominante na maioria das regiões do corpo é vermelho escuro, enquanto o pescoço e o rosto são geralmente cinzas, a parte interna dos membros traseiros e cauda, região submandibular, ponta do maxilar superior e a borda interior das orelhas são brancas. Os membros posteriores são pretos na região caudal, tornando-se marrom escuro na região cranial, seus chifres são pequenos e não ramificados e apresenta pintas brancas no corpo durante os primeiros meses de vida (DUARTE, 1996).

A espécie foi descrita pela primeira vez no ano 1777 por um médico naturalista Alemão chamado Jonann Christian Polycarp Erxleben, filho de Dorothea Erxleben, e quem hoje é considerado um dos fundadores da Medicina Veterinária moderna. Erxleben (1777), não coletou nenhum espécime, no entanto ele utiliza uma série de relatos de outros autores como base para a sua descrição, mencionando as seguintes características: “*corpo vermelho, boca preta, garganta branca, comprimento da orelha de quatro polegadas, olhos grandes e pretos, nariz grande, região da boca preta, pernas posteriores mais longas que as anteriores, cauda curta, cabelo curto e macio, cabeça fundida no escuro, parte interior do pescoço branca, corpo e pernas castanho avermelhado, cascos pretos, corpo vermelho, pintas brancas no corpo. Tímido, rápido e ágil. Nada através dos rios. Bom nadador*” (Figura 4).

Ao longo do tempo, a espécie passou por diferentes classificações taxonômicas, entretanto essa classificação ainda é incerta em relação ao número de subespécies até quanto ao desdobramento destas subespécies em espécies. Em 1913, Thomas elevou ao nível de espécie duas subespécies: *M. zetta* e *M. sheila*, reconhecidas posteriormente por Allen (1915). Em 1960, Cabrera citou 9 subespécies de *M.*

*americana* (*M. a. gualea*, *M. a. jacunda*, *M. a. rosii*, *M. a. rufa*, *M. a. sarae*, *M. a. Sheila*, *M. a. whitelyi*, *M. a. zamora* e *M. a. zetta*).

4. *M. rufo-fuscus*, ore nigro, gula alba.  
nus. Biche de Guiane *Des March. voy. III p. 281*.  
*Ceruula surinamensis* subrubra, albis maculis notata  
*Seb. thes. I p. 71 tab. 44 fig. 2*.  
*Tragulus Surinamensis* *Klein. quadrup. p. 22*.  
Le Chrevrotain de Surinam: *Tragulus* (*surinamen-*  
*fis*) ex rufo luteus, maculis albis variegatis *Briff.*  
*regn. an. p. 96 n. 3*.  
Das Surinamische röthliche Hirschgen mit weissen  
Flecken und langen Ohren *Hall. vierf. p. 321*.  
Chevrotain de Surinam *Dictionn. anim. I p. 602*.  
The Wirrebocerra *Bancr. Guian. p. 123*.  
Die zwote Art von Hirschchen *Fermin. Surin. II p. 89*.  
The Brasilian Musk *Penn. syn. quadr. p. 58 n. 47*.

Magnitudo Capreoli (Bancroftio tertia parte minor).  
Auriculae longitudine quatuor pollicum. Oculi  
magni, nigri. Nares magnae. Oris regio ni-  
gra. Crura postica longiora anticis. Cauda bre-  
vis. Pili breues mollesque, capitis collique supra  
fusci, colli subtus albi, corporis crurumque rufo-  
fusci. Ungulae nigrae.

*Habitat* in Guiania et Brasilia. Timidissimus, celer-  
rimus, agilis. Natat per fluuios. Caro bona.

*Species*

**Figura 4.** Descrição original do *Mazama americana* Fonte: ERXLEBEN (1777). Biodiversity Heritage Library.

Posteriormente, Rossi (2000) fez um estudo taxonômico do gênero *Mazama* no Brasil, encontrando que o veado-mateiro apresenta grande variabilidade intra e interpopulacional com respeito a seus caracteres morfológicos, concluindo que existe só uma espécie, descartando a existência das subespécies. No entanto, esse autor comenta que a população litorânea (desde Santa Catarina até o sul de São Paulo) apresentou-se parcialmente diferenciada da população do interior, podendo esta constituir outra espécie, a qual seria incapaz de ser diferenciada apenas pelos caracteres morfológicos que ele analisou. Posteriormente, Duarte e Jorge (2003) descreveram, mediante estudos citogenéticos, que a população citada por Rossi era realmente diferenciada, e foi considerada uma nova espécie, *Mazama bororo*.

Referente ao estado de conservação, *M. americana* foi avaliado de acordo com os critérios da IUCN (2000) como dados deficientes (DD), esta categoria foi proposta justamente pelos grandes problemas taxonômicos e a potencial existência de diversas espécies dentro do que é reconhecido como *M. americana*.

Recentes informações citogenéticas da espécie indicam uma variação cromossômica coerente em termos geográficos, sugerindo a existência de unidades evolutivamente distintas com implicações taxonômicas desconhecidas aos níveis subespecífico e específico (DUARTE, et al. 2008; ABRIL, et al. 2010). A espécie não se encontra incluída na lista brasileira de fauna ameaçada (MMA, 2003).

### **2.3 Morfologia tradicional, craniometria e morfometria geométrica**

As contribuições mais recentes de morfometria em cervídeos foram com *Ozotoceros bezoarticus* do Uruguai (GONZALEZ et al. 2002) e Argentina (BEADE et al. 2000), assim como do gênero *Mazama* no Brasil (ROSSI, 2000).

Gonzalez et al. (2002) fizeram uma análise de craniometria comparativa para determinar se as populações de veado-campeiro mostravam padrões de dimorfismo sexual e variação geográfica. Os autores reconhecem duas subespécies distintas do veado-campeiro, uma no noroeste (Departamento de Salto) e outra ao leste (Departamento de Rocha) da pradaria do Uruguai. Os resultados obtidos exibem forte

dimorfismo sexual entre indivíduos desta espécie, além de apresentar altos níveis de variabilidade morfológica intrapopulacional, mostrando assim concordância com os níveis genéticos de diferenciação encontrado anteriormente entre as populações.

Rossi (2000) examinou peles abertas e crânios pertencentes a 431 exemplares do gênero *Mazama* depositados em coleções brasileiras, concluindo que as espécies de *Mazama* do Brasil são distinguidas por caracteres da pelagem e coloração, como presença de pelos antevertidos na nuca, coloração geral, coloração das ancas, coloração do dorso da cauda, coloração da região abdominal, proporção das faixas de pigmentos nos pelos do corpo e presença da mancha superciliar anterior, assim como por dimensões cranianas como largura da bula timpânica, diâmetro vertical da órbita e largura do arco zigomático. O autor reconheceu quatro espécies de *Mazama* no Brasil: *M. nana*, Hensel. *M. gouazoubira*, Fischer. *M. nemorivaga*, Cuvier. e *M. americana*, Erxleben.

Já Merino et al. (2005), utilizando uma abordagem de morfometria geométrica, examinaram as diferenças de tamanho e a variação da forma de setenta crânios de cervídeos adultos em oito espécies diferentes depositados em coleções de mamíferos da Argentina. Foi demonstrado, pela análise de componentes principais, que as espécies são claramente distinguidas com base na flexão craniana e a orientação da região occipital.

Análises de forma desempenham um papel importante em muitos tipos de estudos biológicos. Diferenças na forma entre indivíduos ou suas peças, podem ser muito úteis na hora de estudar a adaptação a fatores geográficos locais ou mesmo a diversificação evolutiva das espécies (ZELDITH, 2004). Tais diferenças podem indicar o desempenho funcional como respostas às mesmas pressões seletivas, bem como as diferenças nos processos de crescimento e morfogênese.

A análise das formas é uma abordagem para a compreensão das diversas causas de variação e transformação morfológica. “*Morfometria geométrica nos permite visualizar diferenças entre as formas complexas com quase a mesma facilidade como podemos visualizar diferenças entre os círculos ou letras do alfabeto*” (ZELDITH, 2004). Portanto, a morfometria geométrica é uma técnica muito

interessante, mas que requer um grande número amostral, que atualmente é difícil pelo pequeno número de crânios de *Mazama* existentes nos museus do mundo.

## 2.4 Citogenética de *Mazama americana*

A citogenética ao longo do tempo tem sido considerada uma ferramenta muito importante no estudo taxonômico e evolutivo da família Cervidae, já que dentre os mamíferos, esta família é marcada por uma grande diversificação cromossômica e, a diferenciação cariotípica entre as linhagens envolve tipos específicos de rearranjos cromossômicos.

A família Cervidae ocupa uma posição especial em relação à variação cariotípica dentro dos mamíferos, pois apresenta uma extensa diversificação cromossômica, com números diplóides que variam de  $2n=6/7$  em *Muntiacus muntjac*, até  $2n=80$  em *Capreolus pygargus* (NEITZEL, 1987). No entanto, o padrão de evolução cromossômica das espécies da família ainda foi pouco estudado, havendo, assim, pouca compreensão dos processos que geraram sua enorme variabilidade cariotípica, encontrada principalmente nas espécies neotropicais do gênero *Mazama* (SARRIA-PEREA, 2004; ABRIL et al. 2010).

O padrão cariotípico das espécies do gênero *Mazama* é considerado o mais complexo dentro da família Cervidae (FONTANA e RUBINI, 1990). Os primeiros estudos publicados já mostraram uma enorme variação do número diplóide e as fusões cromossômicas foram consideradas como um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica (CHANDRA et al. 1967; GUSTAVSSON e SUNDT, 1969; TAYLOR et al. 1969; JORGE e BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987). Dentro das espécies do gênero *Mazama* também são observados altos níveis de diferenciação cariotípica, com número diplóide que varia de 32 em *M. bororo* até 70 em *M. gouazoubira*.

O grupo dos veados cinzas apresenta baixo polimorfismo intraespecífico, do ponto de vista citogenético, o que o diferencia do grupo dos veados vermelhos, os quais possuem alta variação cariotípica inter e intraespecífica (DUARTE et al. 2008).

Análises citogenéticas já mostram claramente que existem conflitos em relação à taxonomia de algumas espécies de cervídeos pertencentes ao gênero *Mazama*, especialmente na espécie *M. americana* (DUARTE et al. 2008). A primeira análise citogenética nesta espécie foi realizada por Taylor et al. (1969), o qual descreve uma fêmea com  $2n=68$  e  $NF=74$ , com 6 cromossomos metacêntricos ou submetacêntricos e 62 acrocêntricos, com quatro deles “*muito pequenos*” (cromossomos B).

Jorge e Benirschke (1977), descreveram o cariótipo de *Mazama americana temama*, uma subespécie de *M. americana* de Tamaulipas, México, com  $2n=49/50$  e  $NF=72$ , sendo destes, 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 é o menor do lote. Também foi descrita para estes animais uma fusão em tandem 4/24. As grandes diferenças entre os animais analisados por Jorge e Benirschke (1977) e Taylor et al. (1969) evidenciaram as dúvidas sobre a classificação da espécie.

Neitzel (1987) analisou uma fêmea proveniente do Paraguai e descreveu um outro padrão cromossômico para a espécie, com  $2n=52$ ,  $NF=56$  e de 4 a 5 cromossomos B. Esses resultados aumentaram as dúvidas quanto ao seu padrão cariotípico.

Duarte (1992) analisou quatro espécimes brasileiros, e obteve resultados conflitantes, os números diplóides variaram entre 48, 50, 52, e 54, e o número fundamental de braços entre 54, 54, 56 e 56 respectivamente. Estes resultados foram similares aos obtidos por Neitzel (1987). De acordo com Duarte e Merino (1997), este polimorfismo parece indicar a existência de várias espécies dentro dos veados vermelhos.

Com o avanço dos estudos citogenéticos, as variações envolvendo número e morfologia cromossômica passaram a ser observadas em várias espécies de mamíferos por meio da análise dos bandamentos que, por sua vez, fornecem importantes informações para determinadas homologias (PATAK e STOCK, 1974).

Estudos citogenéticos feitos com *M. americana* revelam variações cromossômicas que sugerem sua divisão em várias espécies (Figura 5). A descrição citogenética de 33 animais de várias localidades do Brasil feita por Duarte (1998) mostrou uma extensa variabilidade cariotípica ( $2n=42$  a  $53$ ;  $NF=48$  a  $57$ ), além da variação de cromossomos B supranumerários. Essa variação cromossômica teve correlação com a origem geográfica dos animais, ou seja, alguns cariótipos foram característicos de algumas regiões do Brasil. O autor chamou esses eventos de citótipos. Segundo White (1977), os rearranjos cromossômicos devem desempenhar um papel direto, ou indireto na especiação de espécies próximas.

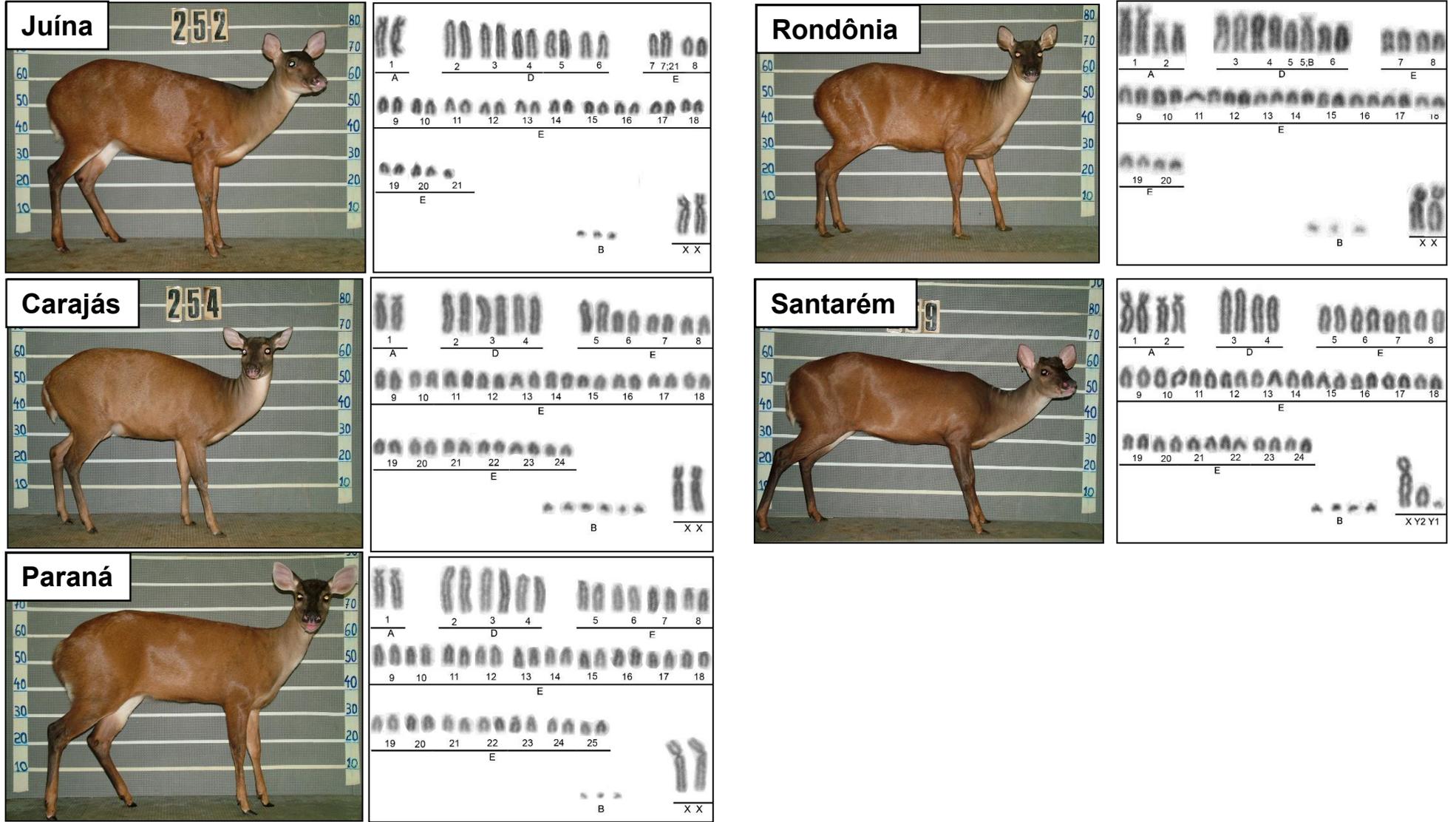


Figura 5. Citótipos de *M. americana* com seus respectivos cariótipos. Fonte: Abril et al. (2010). Fotos: J.M.B. Duarte.

## 2.5 Filogenia de *Mazama americana*

As técnicas moleculares estão se tornando ferramentas fundamentais em todas as áreas da biologia e frequentemente são utilizadas para a resolução de problemas taxonômicos, relações filogenéticas de populações, assim como em estudos sobre evolução de caracteres fisiológicos, morfológicos e comportamentais.

As espécies de cervídeos neotropicais se destacam pela pequena variabilidade morfológica e diversos problemas taxonômicos (GILBERT et al. 2006). A polifilia tem sido detectada para alguns gêneros da família Cervidae, mostrando assim a necessidade de uma reclassificação e revisão da sua nomenclatura. Os gêneros que apresentaram polifilia em estudos anteriores foram: *Mazama* (SMITH et al. 1986; GILBERT et al. 2006; DUARTE et al. 2008; HASSANIN et al. 2012), *Hippocamelus* (DUARTE et al. 2008) e *Odocoileus* (HASSANIN et al. 2012).

Análises filogenéticas para a família Cervidae feitos com genes mitocondriais (DUARTE et al. 2008; GILBERT et al. 2006) e nucleares (GILBERT et al. 2006) identificaram que o gênero *Mazama* é merofilético e que a semelhança morfológica entre *M. gouazoubira* e *M. americana* deve ter ocorrido por paralelismo evolutivo (DUARTE et al. 2008). Assim, esses autores sugerem que a hipótese deve ser corroborada por análises envolvendo todas as espécies do gênero *Mazama* com estudos de novos marcadores nucleares nessas espécies (GILBERT et al. 2006).

Carnelossi (2008), na intenção de estabelecer hipóteses filogenéticas para entender o complexo *Mazama americana*, amplificou genes mitocondriais e nucleares de indivíduos provenientes de diferentes localidades do Brasil para submetê-los a uma análise filogenética. Os resultados, a partir da análise com genes mitocondriais, indicaram a existência de duas linhagens evolutivas de veado-mateiro, uma da população da Bacia do Rio Paraná e a outra dos indivíduos do oeste da Bacia do Rio Amazonas. As duas linhagens indicadas por Carnelossi (2008), foram reconhecidas depois por Abril et al. (2010), confirmando assim os resultados encontrados em estudos citogenéticos anteriores. Os autores afirmam que há um maior grau de diferenciação genética dentro do veado-mateiro do que entre algumas espécies

diferentes do gênero *Mazama*, o que reforça ainda mais a hipótese de que existem espécies distintas dentro da espécie *M. americana*.

As análises com genes nucleares não permitiram a reconstrução filogenética a partir dos fragmentos *kapa-caseína*, *beta-caseína* e *SRY*, pois as sequências exibiram monomorfia (CARNELOSSI, 2008).

Maran (2016) estudou as relações filogenéticas entre citótipos de *M. americana*, com alto número cromossômico no intuito de compreender melhor sobre a história evolutiva da espécie e verificar a existência de unidades evolutivamente significativas dentro deste complexo específico. Os resultados obtidos mostraram que as topologias encontradas nas árvores dos genes *Cit-b* e *COI* individualmente não indicam agrupamento por citótipos e sim uma independência das características moleculares. Indivíduos dos citótipos Carajás e Paraná estão agrupados em um mesmo clado. Além disso, a árvore filogenética do gene *Cit-b* mostra agrupamento dos indivíduos do citótipo Santarém e Belém, mesmo apresentando conjuntos cromossômicos distintos.

Os resultados encontrados não corroboram a existência de unidades evolutivamente significativas dentro de citótipos de *M. americana*. Maran (2016) sugere que o isolamento seja recente e não tenha induzido mudanças no DNA detectáveis por meio dos marcadores utilizados.

## **2.6 Especiação e isolamento reprodutivo**

O conceito biológico de espécies é atualmente o mais aceito, o qual define espécie como membros de populações que cruzam, ou tem potencial para cruzar naturalmente, independentemente da morfologia. Espécies não são tipos morfológicos, mas sim, populações variáveis que são isoladas reprodutivamente de outras populações (FUTUYMA, 2002).

Sendo assim, existem pelo menos duas espécies dentro de *M. americana*. Segundo estudos de isolamento reprodutivo relatados por Salviano (2011) e Cursino et al. (2014), avaliando machos e fêmeas, respectivamente, os autores relatam a existência de barreiras biológicas que impedem o fluxo gênico entre populações

simpátricas (isolamento reprodutivo) entre os diferentes citótipos de *M. americana*. Machos híbridos resultantes entre cruzamentos intracitótipo tem, em geral, melhores qualidades seminais, seguidos pelos animais de cruzamentos intercitótipos da mesma linhagem, produzindo sêmen com qualidades semelhantes aos machos puros, embora com maior número de defeitos nos espermatozoides. Já os animais híbridos de cruzamentos intercitótipos com grandes diferenças cromossômicas (7 a 10 cromossomos), apresentam-se azoospérmicos com degeneração dos túbulos seminíferos (SALVIANO, 2011). Nas fêmeas, é possível observar que a fertilidade dos espécimes híbridos pode variar de estéril a subfértil, conforme o tipo de cruzamento realizado entre as linhagens (Linhagem A: citótipos de Rondônia e Juína; Linhagem B: citótipos de Paraná e Carajás). Cruzamentos entre machos da linhagem B com fêmeas da linhagem A produzem fêmeas estéreis com ausência de estruturas foliculares. Já o cruzamento entre machos da linhagem A com fêmeas da linhagem B produzem fêmeas subférteis, com presença de estruturas foliculares, em menor número que nas fêmeas puras (CURSINO et al. 2014). Apesar de ser o resultado de um cruzamento entre dois citótipos da mesma linhagem (JU x RO), Cursino et al. (2014) encontrou que um híbrido apresentou menor número de estruturas foliculares, sendo mais semelhante às fêmeas totalmente estéreis resultantes entre cruzamentos intercitótipos.

Frente às inúmeras dúvidas quanto à classificação da espécie, assim como as limitações de reconhecer qual de todas as variantes é *M. americana* e qual dessas variantes, poderiam ser consideradas novas espécies, o presente trabalho propõe um neótipo para *M. americana*. A partir daí permite-se a comparação com todas as variantes da espécie, abrindo assim a possibilidade de descrição de novas espécies do gênero *Mazama*.

### **III. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Propor um neótipo para a espécie *M. americana*.

### **3.2 Objetivos específicos**

- Descrever morfologicamente um topótipo de *M. americana*.
- Apresentar os padrões citogenéticos da espécie.
- Apresentar padrões moleculares (fragmentos mitocondriais e nucleares).
- Gerar hipóteses filogenéticas a partir de dados citogenéticos e moleculares.
- Comparar o topótipo com espécimes do banco de dados do Nupecce e com os padrões já descritos na literatura para outros espécimes considerados *M. americana*.
- Contribuir na nomenclatura do gênero *Mazama* a partir da neotipificação da espécie tipo, *M. americana*.

## **IV. MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção do animal e amostras**

Caiena, capital da Guiana Francesa, compreende agora uma região urbanizada e por este motivo foram identificados os locais mais próximos da região com a presença da espécie, sendo a localidade mais próxima a cidade de Regina a 70 Km de Caiena, onde foi coletado um macho adulto de *M. americana*. Após a coleta do indivíduo, foram realizadas tricotomia e antissepsia da região interna da coxa direita, onde foi excisado um fragmento de pele de 2x5 cm, que foi depositado em tubo contendo meio de transporte, Mc Coy's + 500mg/Lt de gentamicina + 20mg/Lt de anfotericina B, segundo Duarte et al. 1999. O fragmento de pele permaneceu em refrigeração até a chegada ao laboratório de campo, e posteriormente foi dividido em dez fragmentos pequenos que foram depositados em tubos criogênicos contendo meio de congelamento de pele (200mL de Mc Coy's + 40mL de soro equino + 12mL de Dimetil Sulfoxido + 24g de polyvinil + 10mL de antibiótico (sulfato de Gentamicina + Anfotericina), segundo o protocolo descrito por Duarte et al. (1999). Os fragmentos permaneceram por 3,5 horas sob refrigeração e 30 minutos no vapor do Nitrogênio Líquido, em seguida, foram submergidos e estocados em Nitrogênio Líquido (-196°C). As células, que

permaneceram vivas nessas condições, foram utilizadas posteriormente para os cultivos de fibroblastos e análises citogenéticas.

Foram obtidos dados biométricos do espécime (Tabela 3) para possibilitar a comparação com dados coletados em projetos com animais anestesiados. Foram coletados também fragmentos de aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de músculo, fígado, rim, baço e coração, mergulhados em etanol 100% a temperatura ambiente para análises moleculares, assim como fragmentos de fígado, baço, rim, coração e testículo conservados em formol 10% a temperatura ambiente para futuros estudos histológicos.

A pele (Figura 8) na sua íntegra, foi retirada do animal sendo então mergulhada em uma solução de limpeza (25mL de ácido acético glacial + 3Lt de água), onde permaneceu por 50 minutos e depois limpa com o uso de uma faca para retirar os resíduos musculares, gordura e fâscias. Posteriormente, a pele foi mergulhada em uma solução curtume para sua desidratação (500gr de sulfato de alumínio comercial + 500gr de cloreto de sódio + 3Lt de água), na qual permaneceu durante três dias. Depois do processo de curtume ela foi estendida na sombra e deixada para secar, massageando e esticando periodicamente para manter a flexibilidade. Depois de totalmente seca e amolecida, a superfície sem pelos da pele foi lixada para finalizar o processo.

O esqueleto completo (crânio e pós-crânio) foi extraído e limpo após cozimento em água, sendo então seco diretamente no sol e armazenado em caixas plásticas sob temperatura ambiente.

## **4.2 Morfologia, biometria, craniometria e morfometria geométrica**

### **4.2.1 Medidas corporais**

Os dados biométricos (Tabela 3) foram obtidos logo após o abate do animal com ajuda de uma fita métrica e um paquímetro (precisão 0,05 mm). No total foram tomadas 18 medidas biométricas do animal; largura da cabeça (LC), comprimento da orelha (CO), distância entre olhos (DEO), metacarpo (MTC), altura (ALT), comprimento do corpo (CCO), comprimento da cauda (CCA), metatarso (MTT),

perímetro do pescoço (PP), tórax (TX), abdômen (AB), distância entre chifres (DEC), circunferência do testículo (CT), comprimento do chifre esquerdo (CCE), comprimento do chifre direito (CCD), diâmetro do chifre esquerdo (DCE), diâmetro do chifre direito (DCD) e comprimento da cabeça (CCB).

Foi realizada uma análise estatística dos dados quantitativos das medidas corporais do topótipo junto com as de todos os indivíduos de *M. americana* (machos e fêmeas adultos) do banco de dados do NUPECCE mediante análise de componentes principais (HOTELLING, 1933), assim como também uma análise de cluster através do programa “Paleontological Statistics”, PAST, (HAMMER et al. 2001), sendo excluídas as medidas corporais presentes só nos machos como distância entre chifres (DEC), diâmetro do chifre esquerdo (DCE) e direito (DCD), circunferência do testículo (CT), comprimento do chifre esquerdo (CCE) e comprimento do chifre direito (CCD).

#### **4.2.2 Morfologia externa**

A análise da morfologia externa do espécime foi realizada a partir de critérios utilizados por Rossi (2000), observando-se as fotos tomadas logo após a coleta e a pele inteira taxidermizada. Foram examinadas a coloração geral, padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo, comprimento dos pelos nas regiões do corpo, ocorrência de faixa de pelos antevertidos, ocorrência de tufo arredondado de pelos na região tarsal. Além disso, foram analisados os campos cromogênicos da cabeça (faixas orbitais superior e inferior, mancha superciliar anterior, regiões auriculares anterobasal e posterobasal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular) e do corpo (região da cabeça e pescoço, linha média dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal posterior do corpo, região ventral do corpo, ventre da cauda, região distal dos membros), segundo a nomenclatura utilizada por Hershkovitz (1982).

### 4.2.3 Medidas cranianas

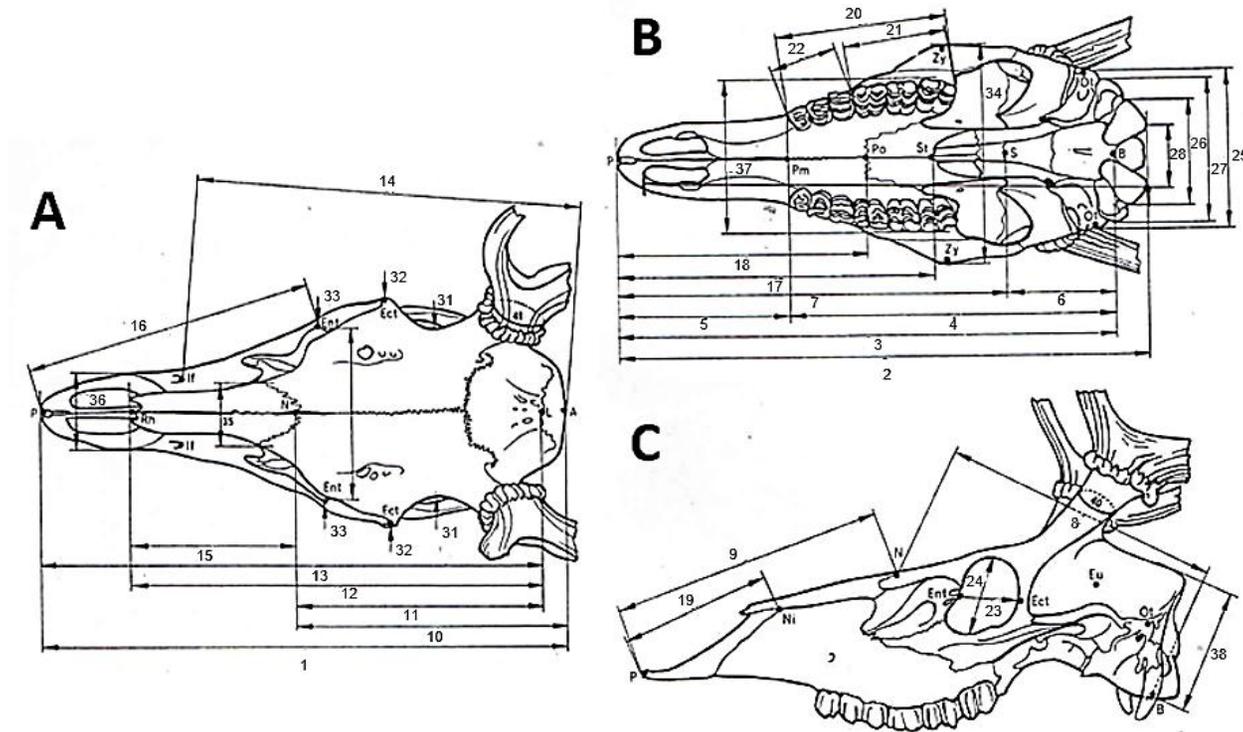
Foram registradas 36 medidas cranianas para o topótipo analisado neste estudo (Tabela 4) utilizando um paquímetro digital (precisão 0,01 mm), a partir dos critérios de Von Den Driesch (1976).

As medidas obtidas, ilustradas na Figura 6, foram as seguintes: comprimento total (CT), comprimento condilobasal (CCB), comprimento basal (CB), comprimento curto do crânio (CCC), premaxilar – prosthion (PP), eixo basecranial (EBC), eixo basefacial (EBF), comprimento vicerocraniano (CVC), comprimento frontal mediano (CFM), lambda – nasal (LN), lambda – região mais distal do osso nasal (LR), lambda – prosthion (LP), acrocânio (ACR), maior comprimento dos nasais (MCN), comprimento curto facial – lateral (CCFL), comprimento palatal oral (CPO), comprimento lateral do prémaxilar (CLP), distância corrida de dentes (DCD), comprimento da linha do molar (CLM), comprimento da linha pré-molar (CLP), maior comprimento interno da órbita (MCIO), maior altura interna da órbita (MAIO), maior largura do mastóide (MLM), maior largura dos côndilos oxipitais (MLCO), maior largura das bases do processo paraoccipital (MLPP), maior largura do forâmen magno (MLFM), altura do forâmen magno (CFM), maior largura neurocraniana (MLNC), largura frontal menor (LFM), maior largura entre as órbitas (MLEO), largura mínima entre as órbitas (LMEO), largura zigomática (LZ), maior largura entre os nasais (MLEN), maior largura entre o prémaxilar (MLPM), maior largura do palatal (MLP), basion – ponto mais alto da crista nugal superior (BCNS), capacidade neucraniana (CNC).

Foi realizada uma análise de clusters com ajuda do programa “PAST”, (HAMMER et al. 2001) a partir dos dados quantitativos das medidas cranianas do topótipo comparada com as medidas de 15 crânios de animais (machos e fêmeas adultos) considerados *M. americana* e 4 indivíduos de três espécies diferentes, foram utilizadas como grupo externo 1 *M. bororo*, 2 *M. gouazoubira* e 1 *M. nemorivaga*, (para esta análise foram excluídas 6 medidas cranianas, pois os ossos de alguns indivíduos não se encontravam em perfeitas condições). As medidas excluídas foram: maior largura do mastóide (MLM), maior largura dos côndilos oxipitais (MLCO), maior largura

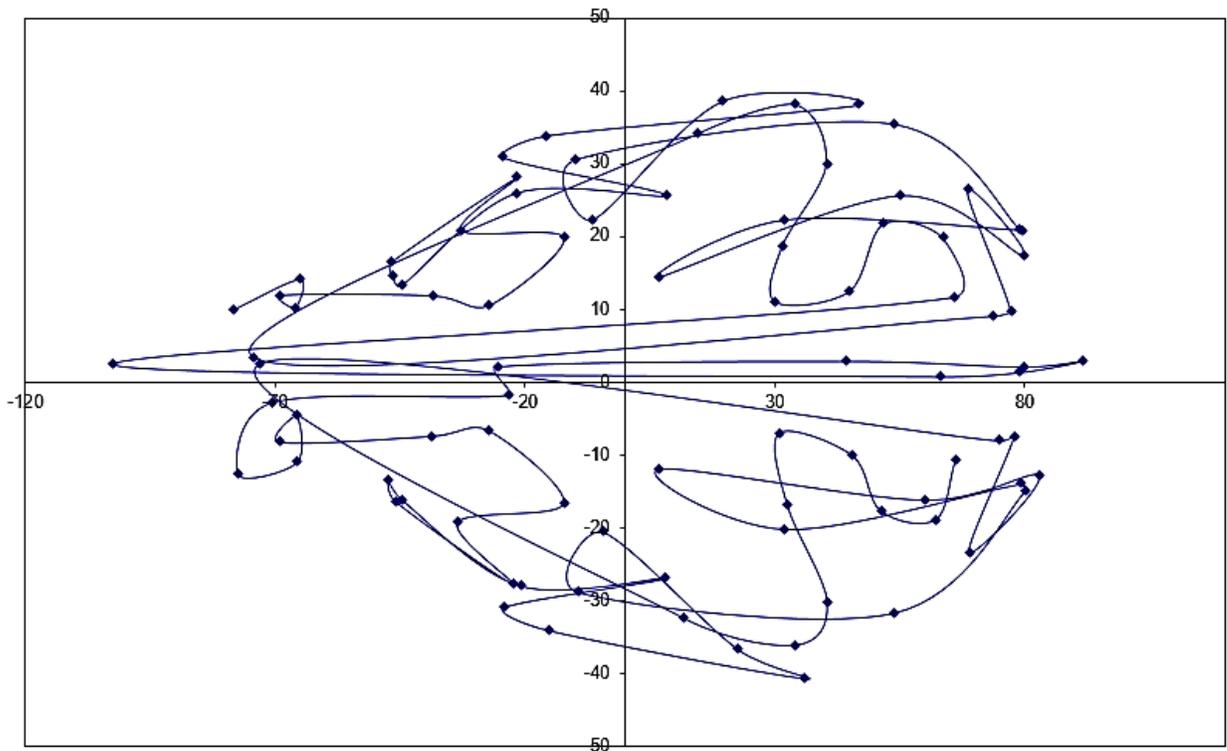
das bases do processo paraoccipital (MLPP), maior largura do forâmen magno (MLFM), altura do forâmen magno (CFM), maior largura neurocraniana (MLNC). Todos os indivíduos utilizados para comparações são pertencentes ao museu do NUPECCE.

**Figura 6.** Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vistas dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). (VON DEN DRIESCH, 1976).



A medida 1 representa o comprimento total (CT), 2 comprimento condilobasal (CCB), 3 comprimento basal (CB), 4 comprimento curto do crânio (CCC), 5 pré-molar – prosthion (PP), 6 eixo basecranial (EBC), 7 eixo basefacial (EBF), 9 comprimento vicerocraniano (CVC), 10 comprimento frontal mediano (CFM), 11 lambda – nasal (LN), 12 lambda – região mais distal do osso nasal (LR), 13 lambda – prosthion (LP), 14 acrocrânio (ACR), 15 maior comprimento dos nasais (MCN), 16 comprimento curto facial – lateral (CCFL), 18 comprimento palatal oral (CPO), 19 comprimento lateral do pré-maxilar (CLP), 20 distância corrida de dentes (DCD), 21 comprimento da linha do molar (CLM), 22 comprimento da linha pré-molar (CLP), 23 maior comprimento interno da órbita (MCIO), 24 maior altura interna da órbita (MAIO), 25 maior largura do mastóide (MLM), 26 maior largura dos côndilos occipitais (MLCO), 27 maior largura das bases do processo paraoccipital (MLPP), 28 maior largura do forâmen magno (MLFM), 29 altura do forâmen magno (CFM), 30 maior largura neurocraniana (MLNC), 31 largura frontal menor (LFM), 32 maior largura entre as órbitas (MLEO), 33 largura mínima entre as órbitas (LMEO), 34 largura zigomática (LZ), 35 maior largura entre os nasais (MLEN), 36 maior largura entre o pré-maxilar (MLPM), 37 maior largura do palatal (MLP), 38 basion – ponto mais alto da crista nugal superior (BCNS) e 42 capacidade neurocraniana (CNC).

Finalmente, as medidas de morfometria geométrica (Figura 7) foram tomadas com um braço portátil digitalizador de medidas (MicroScribe-MX), sendo descritas as coordenadas X, Y e Z de 89 “Landmarks” no total para o crânio do topótipo. Tais coordenadas estão apresentadas no Anexo 1.



**Figura 7.** Ilustração do crânio em vista dorsal evidenciando os pontos de “landmarks” tomados para o topótipo.

### **4.3 Caracterização citogenética**

#### **4.3.1 Cultivo de fibroblastos a partir de fragmentos de pele**

Para o cultivo de fibroblastos, as amostras de pele foram descongeladas em banho-maria (37°C) até o meio de congelamento atingir o estado líquido. Depois, foram colocadas em placas de Petri contendo solução salina tamponada com fosfato (PBS),

sendo então divulsionadas e divididas em pequenos fragmentos, os quais foram transferidos para as garrafas de cultivo com 1mL de meio de cultura DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco – Cutilab + 1L de água Milli Q + 3,7g de bicarbonato de sódio + 110mg de piruvato + 5mL de antibiótico (sulfato de Gentamicina + Anfotericina) suplementado com 50% de soro fetal bovino (SFB – Cutilab). Posteriormente, as garrafas de cultivo foram levadas para a estufa a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. Após da aderência das células nas garrafas, o meio foi trocado por 4mL de meio de cultura com 10% de soro fetal bovino.

Os cultivos foram monitorados diariamente e o meio foi trocado num intervalo de 2 dias até o crescimento adequado da monocamada. Em seguida, foi realizado o repique, que consistiu em retirar o meio das garrafas, as células lavadas três vezes com PBS e tratadas com 1mL de tripsina em cada garrafa e incubadas por 5 minutos na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, depois foram monitoradas no microscópio invertido para verificar se as células tinham soltado completamente das garrafas. Imediatamente, a tripsina foi inativada com 200µL de soro fetal bovino e 1,8mL de meio. Então, as células foram transpassadas para outras garrafas de cultivo (colocando 1mL em cada garrafa nova) onde foram realimentadas da mesma maneira até obter um número suficiente de cultivos secundários. Dessas garrafas, foi selecionada a que tinha maior crescimento celular e foi realizado o congelamento de fibroblastos em 5 microtubos e armazenados em Nitrogênio Líquido no banco de células vivas do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE). Os demais cultivos secundários que apresentavam ótimo crescimento celular, foram “pré-tripsinizados” um dia antes da colheita.

No dia da colheita, foram adicionados 60µL de colchicina em cada garrafa e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação foi realizada a tripsinização para que as células se dissociassem das garrafas. Em seguida, o conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubos de centrifuga cônicos e centrifugados por 6 minutos a 134,4 rcf, e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 8mL de solução hipotônica (2,78g de KCL em 500mL de água destilada) e incubadas no banho maria a uma temperatura de 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, foi feita a pré-fixação, com a adição de 3 gotas de fixador (solução de metanol e ácido acético 3:1

respectivamente), misturado e centrifugado novamente por 6 minutos a 134,4rcf e o sobrenadante descartado. Foi realizado três vezes o mesmo procedimento com 6mL, 4mL e 3mL de solução fixadora.

Finalmente as células foram fixadas com mais 1mL de solução fixadora e armazenadas a -5°C para depois preparar as lâminas e submetê-las as diferentes técnicas da citogenética clássica (análise convencional Giemsa, banca C, banda G e coloração Ag-NOR).

#### **4.3.2 Preparação das lâminas**

As lâminas foram preparadas pingando duas gotas de material em cada uma e deixando secar a temperatura ambiente. Para alguns procedimentos como bandamento G e bandamento C, estas foram envelhecidas a 60°C e 37°C respectivamente logo após da preparação.

#### **4.3.3 Coloração convencional Giemsa**

Uma vez que as lâminas foram preparadas, estas foram coradas pela metodologia convencional Giemsa (5mL de água destilada, 1mL de tampão fosfato 0,001M e 1mL de corante Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol) para cada uma). Foram analisadas 50 metáfases deste espécime para verificar o seu número cromossômico exato.

#### **4.3.4 Biometria cromossômica**

Para a classificação cromossômica, foi selecionada a melhor metáfase do animal por coloração convencional e, posteriormente, realizou-se as medidas utilizando o software Axiovision Release 4.8. As medidas de cada cromossomo foram feitas a partir do centrômero até o telômero, e de acordo com a sua razão de braços (RB) foram

classificados como metacêntricos, submetacêntricos, subtlocêntricos ou acrocêntricos (LEVAN et al. 1964).

De acordo com o comprimento relativo (CR), os cromossomos foram classificados como sendo do grupo A (grandes cromossomos de dois braços= $CR > 6\%$ ), C (pequenos cromossomos de dois braços= $CR < 6\%$ ), D (grandes cromossomos acrocêntricos= $CR > 5\%$ ), E (pequenos cromossomos acrocêntricos= $CR < 5\%$ ) e B (microcromossomos ou cromossomos supranumerários= $CR < 1,5\%$ ).

#### **4.3.5 Bandamento G (SEABRIGTH, 1971)**

No procedimento da Banda G, as lâminas foram previamente envelhecidas a  $60^{\circ}\text{C}$  “overnight” e mais um dia e meio na geladeira. Após o envelhecimento, estas foram mergulhadas em solução de tripsina (0,5%) a  $37^{\circ}\text{C}$  no banho maria durante 1, 2 ou 3 segundos, sendo, em seguida, lavadas 2 vezes com água destilada gelada. Finalmente, logo após as lâminas secarem, as mesmas foram coradas com solução corante Wright-Giemsa (2,5g de Wright + 0,85g de Giemsa + 500mL de glicerina) em tampão fosfato (0,06M pH 6,8) (2:1) durante 12 minutos.

#### **4.3.6 Bandamento C (SUMNER, 1972)**

As lâminas, após 5 dias de preparação e envelhecidas a  $37^{\circ}\text{C}$ , foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico, HCL, (16,6mL de HCL / 1L de água destilada) por vinte minutos a temperatura ambiente, em seguida foram lavadas com água destilada. Depois foram colocadas em solução de hidróxido de bário (1g de Ba (OH)<sub>2</sub> em 20mL de água destilada) a  $40^{\circ}\text{C}$  no banho maria durante 12 minutos e lavadas novamente com água destilada. Posteriormente, foram incubadas na solução 2 x SSC (17,53g de NaCl + 8,82g de Na<sub>3</sub>C<sub>6</sub> H<sub>5</sub>O<sub>7</sub> – 2H<sub>2</sub>O + 500mL de água destilada) por 1.5 horas a  $56^{\circ}\text{C}$ . Finalmente, as lâminas foram lavadas novamente com água destilada e coradas com Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol) a 10% em tampão fosfato (0,01M-ph:6,8) por 25 minutos.

#### **4.3.7 Coloração Ag-ROn (HOWELL e BLACK, 1980)**

A caracterização das regiões organizadoras de nucléolos foi feita pingando 2 gotas de solução aquosa de nitrato de prata a 50% (1gr de AgNO<sub>3</sub> / 2mL de água destilada) e uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina em 50 mL de água destilada mais 0,5 mL de ácido fórmico a 1%) sobre as lâminas previamente preparadas e posteriormente cobertas com uma lamínula sobre a preparação. As lâminas foram incubadas em uma câmara úmida (Placa de Petri com papel absorvente molhado com água destilada) a 60°C durante 5 minutos ou até obter uma cor salmão dourada. Em seguida, as lâminas foram mergulhadas em água destilada para retirar a lamínula naturalmente, sendo depois lavada novamente com água destilada e analisadas ao microscópio logo após a secagem.

#### **4.3.8 Construção de árvore de distância a partir de dados citogenéticos**

Para determinar as relações de parentesco entre os citótipos de *M. americana* já descritos no Brasil e o topótipo, foi realizada uma análise de “cluster” pelo método de “Ward’s” (WARD, 1963) utilizando como caracteres o número diplóide, e o número de cromossomos dos grupos A, D e E. Esta análise de distância foi feita por meio do programa PAST (HAMMER et al. 2001).

### **4.4 Filogenia molecular**

#### **4.4.1 Amostras**

Foram analisadas amostras da espécie *M. americana* de diferentes localidades do Brasil e que representam todos os citótipos encontrados dentro da espécie. Algumas sequências utilizadas para as análises filogenéticas foram geradas a partir de amostras que estão estocadas no NUPECCE e outras obtidas no GenBank, <[www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)> do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Para

enraizar as árvores filogenéticas foram utilizadas sequências de *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. nana*, *M. bororo*, *M. rufina*, *Pudu puda*, *Cervus elaphus*, *Hippocamelus antisensis*, *Capreolus capreolus*, *Alces alces*, *Odocoileus hemionus*, *Odocoileus virginianus*, *Rangifer tarandus* e *Blastocerus dichotomus* como grupos externos (Tabela 1). Algumas sequências dos grupos externos foram obtidas no GenBank e outras obtidas a partir de amostras estocadas no NUPECCE.

**Tabela 1.** Amostras utilizadas para as análises filogenéticas.

<b>ID. Nupecce</b>	<b>Espécie</b>	<b>Gene</b>	<b>Número acesso</b>	<b>Citótipo</b>
T70	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789230.0	Paraná
T40	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789224.2	Carajás
T36	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789222.2	Jarí
T34	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789220.2	Manaus
T31	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789219.2	Manaus
T28	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789218.2	Acre
T21	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789216.2	Rondônia
T18	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789211.2	Rondônia
T164	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789208.2	Carajás
T110	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>	DQ789201.2	Paraná
T269	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>		Rondônia
		<i>D-loop</i>	GU305932.1	
T258	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>		Santarém
		<i>D-loop</i>	GU305938.1	
T253	<i>Mazama americana</i>	<i>Cit-b</i>		Juína
		$\alpha$ -LAlb		
		<i>D-loop</i>	GU305937.1	
		IL16		
T260	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305939.1	Santarém
T252	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305936.1	Juína
T248	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305935.1	Juína
		IL16		
T247	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305934.1	Juína
T251	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305933.1	Juína
		IL16		
T211	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305931.1	Rondônia
T21	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305930.1	Rondônia
T259	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305929.1	Santarém
T274	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305928.1	Paraná
T255	<i>Mazama americana</i>	<i>D-loop</i>	GU305927.1	Paraná

T254	<i>Mazama americana</i>	D-loop	GU305926.1	Carajás
T257	<i>Mazama americana</i>	D-loop	GU305925.1	Paraná
T256	<i>Mazama americana</i>	D-loop	GU305924.1	Paraná
T235	<i>Mazama americana</i>	D-loop	GU305923.1	Paraná
T205	<i>Mazama americana</i>	D-loop	GU305922.1	Paraná
T33	<i>Mazama americana</i>	$\alpha$ -LAlb		Manaus
T18	<i>Mazama americana</i>	$\alpha$ -LAlb		Rondônia
T251	<i>Mazama americana</i>	$\alpha$ -LAlb		Juína
T32	<i>Mazama americana</i>	$\alpha$ -LAlb		Manaus
T30	<i>Mazama americana</i>	$\alpha$ -LAlb IL16		Carajás
T31	<i>Mazama americana</i>	$\alpha$ -LAlb		Manaus
T39	<i>Mazama americana</i>	$\alpha$ -LAlb		Carajás
	<i>Mazama gouazoubira</i>	$\alpha$ -LAlb	DQ379364.1	
	<i>Capreolus capreolus</i>	$\alpha$ -LAlb	AY122021.1	
	<i>Odocoileus hemionus</i>	$\alpha$ -LAlb	AY122022.1	
	<i>Rangifer tarandus</i>	$\alpha$ -LAlb	AY122019.1	
	<i>Cervus elaphus</i>	$\alpha$ -LAlb	AY122017.1	
	<i>Pudu puda</i>	$\alpha$ -LAlb	DQ379366.1	
	<i>Odocoileus virginianus</i>	$\alpha$ -LAlb	DQ379365.1	
	<i>Blastoceros dichotomus</i>	$\alpha$ -LAlb	DQ379361.1	
	<i>Alces alces</i>	$\alpha$ -LAlb	DQ379360.1	
	<i>Hipocamelus antisensis</i>	$\alpha$ -LAlb	DQ379362.1	
T25	<i>Mazama americana</i>	IL16		Acre
T28	<i>Mazama americana</i>	IL16		Acre
T329	<i>Mazama americana</i>	IL16		Acre
T34	<i>Mazama americana</i>	IL16		Manaus
T206	<i>Mazama americana</i>	IL16		Rondônia
T35	<i>Mazama americana</i>	IL16		Carajás
T41	<i>Mazama americana</i>	IL16		Carajás
T359	<i>Mazama nemorivaga</i>	IL16		

#### 4.4.2 Extração de DNA (SAMBROOK et al. 1989) com modificações

O DNA foi extraído a partir de amostras de músculo. O primeiro passo foi cortar o tecido com material estéril e colocar em um tubo de microcentrífuga (1.5 mL), em seguida, foi adicionado 500  $\mu$ l de TE-Tween seguido de incubação no banho-maria a 65°C por 1,5 horas com agitação periódica. O próximo passo foi adicionar 5  $\mu$ l de proteinase K, seguido de incubação a 55°C durante 6 horas com agitação periódica. Após as 6 horas, a temperatura foi reduzida para 37°C, permanecendo sob incubação

“overnight”. Em seguida, foi feito o processo de extração – precipitação do DNA pelo método do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), conforme segue:

Foi adicionado um volume de PCL (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) na mesma quantidade da amostra, agitando-se vigorosamente no vórtex por 10seg, seguido de centrifugação por 10 min, então o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A precipitação do DNA consistiu em adicionar 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0.3M (aproximadamente 300 µl), a qual foi misturada cuidadosamente e, em seguida, o volume foi completado com etanol absoluto gelado (2,5 x o volume da amostra), misturado por inversão e colocado em freezer -20°C durante 2 horas. Após este período, realizou-se a centrifugação a 4°C por 20 minutos a 134,4 rcf, sendo que o sobrenadante foi desprezado e o pellet, completamente seco. Por fim, o DNA foi ressuspenso em 100µl de TE-Tween.

#### **4.4.3 Quantificação do DNA**

Antes da amplificação da amostra de DNA, foi verificada sua pureza por meio de espectrofotometria. Neste procedimento, 1µl da amostra de DNA foi colocado no aparelho de quantificação (Eppendorf BioPhotometer®) para observar os valores da relação de absorbância do DNA extraído. Posteriormente, este foi diluído em uma solução de uso (50ng/µl) para sua amplificação e armazenamento em geladeira a 5°C.

#### **4.4.4 Amplificação do DNA**

As amostras foram submetidas à técnica de PCR (MULLIS, 1983) em termociclador convencional “Biometra T1 Thermocycler” para amplificação do DNA. Foram analisados três fragmentos de DNA mitocondrial: citocromo b (*Cit-b*), região controladora *D-loop* e citocromo oxidase I (*COI*), bem como três fragmentos do DNA nuclear: íntron 2 da  $\alpha$ -lactoalbumina ( $\alpha$ -*LAIb*), interleucina 16 (*IL16*) e fator de crescimento de mastócitos (*MGF*). As características dos marcadores são exibidos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Características gerais dos marcadores moleculares utilizados neste estudo.

Genes	Tamanho (pb)	“Primers” utilizados	Localização	T° de anelamento	Fonte dos “primers”
<i>CitB</i>	480 660	L14124 H15149 FARH FARL	Mitocondrial	54°C	KOCHER et al. (1989); DUARTE et al. (2008).
<i>COI</i>	658	LCO1490 HCO2198	Mitocondrial	54°C	FOLMER et al. (1994); HASSANIN e ROPIQUET (2004).
<i>D-Loop</i>	690	DL THR	Mitocondrial	54°C	VILÀ et al. (1999).
<i>α-LAIb</i>	462	α-LAIb-F α-LAIb-R	Nuclear	55°C	HASSANIN; DOUZERY, (2003).
<i>IL16</i>	392	IL16-F IL16-R	Nuclear	55°C	REZAEI et al. (2010)
<i>MGF</i>	850	MGF-F MGF-R	Nuclear	55°C	LYONS et al. (1997)

Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando uma reação de PCR (“Polymerase Chain Restriction”) que continha: 12, 0 µl de H<sub>2</sub>O, 1,0 µl de dNTP, 2,0µl de tampão de reação, 0,6 µl de MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µl de cada “primer” (“forward e reverse”), 0,4 µl de DNA “Taq polimerase” e 3,0 µl de DNA, para um volume total de 20 µl por amostra. O programa de amplificação utilizado no termociclador foi: ciclo inicial de 5 minutos a 94°C para desnaturar o DNA, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, temperatura de anelamento dos iniciadores (Tabela 2) por 1 minuto e por 10 minutos com temperatura a 72°C para extensão final, depois mantido a 4°C. Em todas as reações foram incluídos controles negativos para verificar a existência ou ausência de contaminação.

Os produtos de amplificação foram visualizados em gel de agarose 2% para verificar a quantidade e a qualidade do DNA a partir de um transiluminador de luz ultravioleta 302 nm “BioAgency”, as amostras foram coradas com “GelRed™” e, posteriormente, analisadas no programa “Image Analysis da Kodak”. O tamanho de cada fragmento, foi confirmado utilizando o marcador “TrackIt™” 50 pb DNA “Ladder” (Invitrogen). Todas as amostras foram armazenadas a -20°C.

#### **4.4.5 Purificação dos produtos amplificados e sequenciamento**

Para a purificação das amostras foi utilizado o protocolo com PEG (“Polyethylene Glycol”) e glicogênio azul (SAMBROOK, 1989) para os fragmentos mitocondriais e o protocolo de Etanol sem lavagem (DORADO-PÉREZ, 2012) para os fragmentos nucleares. Tais amostras purificadas foram sequenciadas em sequenciador automático 3730XL “Applied Biosystems”.

#### **4.4.6 Alinhamento e análises de sequências**

Para o topótipo foram sequenciadas as fitas senso e antiseno dos fragmentos mitocondriais e nucleares e, uma vez obtidas às sequências todos os eletroferogramas foram inspecionados para eliminar falsos polimorfismos e as possíveis ambiguidades corrigidas manualmente. Após a revisão de cada um dos eletroferogramas, as duas fitas complementares foram alinhadas para obter a sequência consenso com ajuda do programa Clustal W (HIGGINS et al. 1992) através do Bioedit (HALL, 1999). As sequências obtidas foram organizadas em uma matriz junto com todas as sequências da espécie *M. americana* publicadas atualmente nas bases de dados mundiais “GenBank” e “BOLD System”, e as sequências do grupo externo também com ajuda do programa Clustal W (HIGGINS et al. 1992) através do Bioedit (HALL, 1999).

Posteriormente, a matriz alinhada foi editada manualmente para excluir as extremidades das sequências, assim como falsas inserções-deleções (*indels*). Foi selecionado o melhor modelo de evolução molecular para o conjunto de dados de cada gene de acordo com os parâmetros de substituição nucleotídica mediante o programa jModelTest v. 0.1.1 (POSADA; CRANDALL, 1998), seguindo o critério de informação de Akaike corrigido, AICc (AKAIKE, 1973).

#### **4.4.7 Análises filogenéticas e construção das árvores**

As relações filogenéticas entre as diferentes populações de *M. americana* e o topótipo analisado foram estudadas mediante análises de máxima parcimônia (MP) (FARRIS et al. 1970), para os genes *D-loop* e *IL16* com o emprego do programa PAUP (SWOFFORD, 2002) e inferência bayesiana (IB) (HUELSENBECK e RONQUIST, 2001), para os genes *Cit-b*, *D-loop*, *COI*,  $\alpha$ -*LAlb* e *IL16* com o emprego do programa MrBayes on XSEDE 3.2.6 (RONQUIST e HUELSENBECK, 2003), através do programa “online” CIPRES Science Gateway (MILLER et al. 2010).

Nas análises de MP dos genes *D-loop* e *IL16* foi realizada uma busca heurística de 1.000 réplicas com adição aleatória de sequências e troca de ramos mediante o algoritmo “nearest-neighbor interchange”, NNI, (ROBINSON, 1971). O suporte dos ramos foi avaliado mediante análises de “bootstrap” (FELSENSTEIN, 1985) utilizando 2000 pseudoréplicas com adição aleatória de sequências e busca heurística com 100 réplicas para cada pseudoréplica. A partir da árvore mais parcimoniosa obtida na análise, foram calculados o número de caracteres informativos, comprimento da árvore e os índices de consistência, de homoplasia e de retenção. Foi gerada a árvore de consenso estrito e, posteriormente, foi visualizada e editada. As análises de inferência bayesiana (IB) foram feitas usando 50.000.000 gerações ao longo de quatro cadeias com duas repetições, adotando um descarte por “burn-in” de 25%. Para estimar a probabilidade posterior foi utilizado o método “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC). As árvores obtidas de todas as análises foram editadas com auxílio do programa FigTree v. 1.4.0 (RAMBAUT, 2012).

## V. RESULTADOS

### 5.1 Morfologia, biometria, craniometria e morfometria geométrica

**5.1.1 Descrição emendada de *Mazama americana* Erxleben, 1777 (MAMMALIA: CERVIDAE) baseada em 1 macho adulto:** Cervídeo com a cor geral da pelagem vermelha, assemelhando-se a cor de tijolo (Figura 8 (A)), cinza na região do rosto e pescoço (Figura 9 (B)). A região dorsal com tonalidade da cor mais intensa (Figura 8 (A)).

Região lateral da mesma tonalidade do dorso, levemente mais fraca (Figura 9 (A)). Região abdominal da mesma coloração que os flancos, levemente amarronzada (Figura 10 (A e B)). Cauda vermelha na região dorsal da mesma coloração do dorso, e branca na região ventral (Figura 10 (B)). Região inguinal, bucal, gular e interior das orelhas esbranquiçado (Figura 9 (B)). Membros posteriores pretos na região caudal, marrom na região cranial, região proximal externa da mesma coloração que a região lateral do corpo, região proximal interna branca, região distal externa castanha, levemente avermelhada na porção mais distal e a região distal interna também é castanha, levemente avermelhada na porção mais distal (Figura 9 (A)). As faixas orbitais inferior e superior levemente mais claras que o resto do rosto (Figura 9 (B)). Fossa lacrimal relativamente profunda (Figura 9 (B)). Superfície externa da orelha levemente coberta por pelos marrons (Figura 9 (B)). Pelos lisos com variação no comprimento segundo a região do corpo (Figura 11), os mais curtos e finos recobrem o focinho, a superfície externa e interna da orelha (esta última parcialmente nua), o queixo e a região distal dos membros anterior e posterior. Pelos um pouco mais longos nas ancas e a cauda. Faixa de pelos antevértidos na linha mediana dorsal do pescoço com faixa terminal mais pigmentada, enegrecida (Figura 8 (B)). Presença de um tufo de pelos no dorso da cabeça imediatamente anterior aos chifres (Figura 8 (B)). Chifres relativamente grandes e grossos, inclinados dorso-caudalmente, levemente curvados e paralelos entre si (Figura 12). Chifres encapados por velame (Figura 9 (B)).

**Localização do registro:** Guiana Francesa

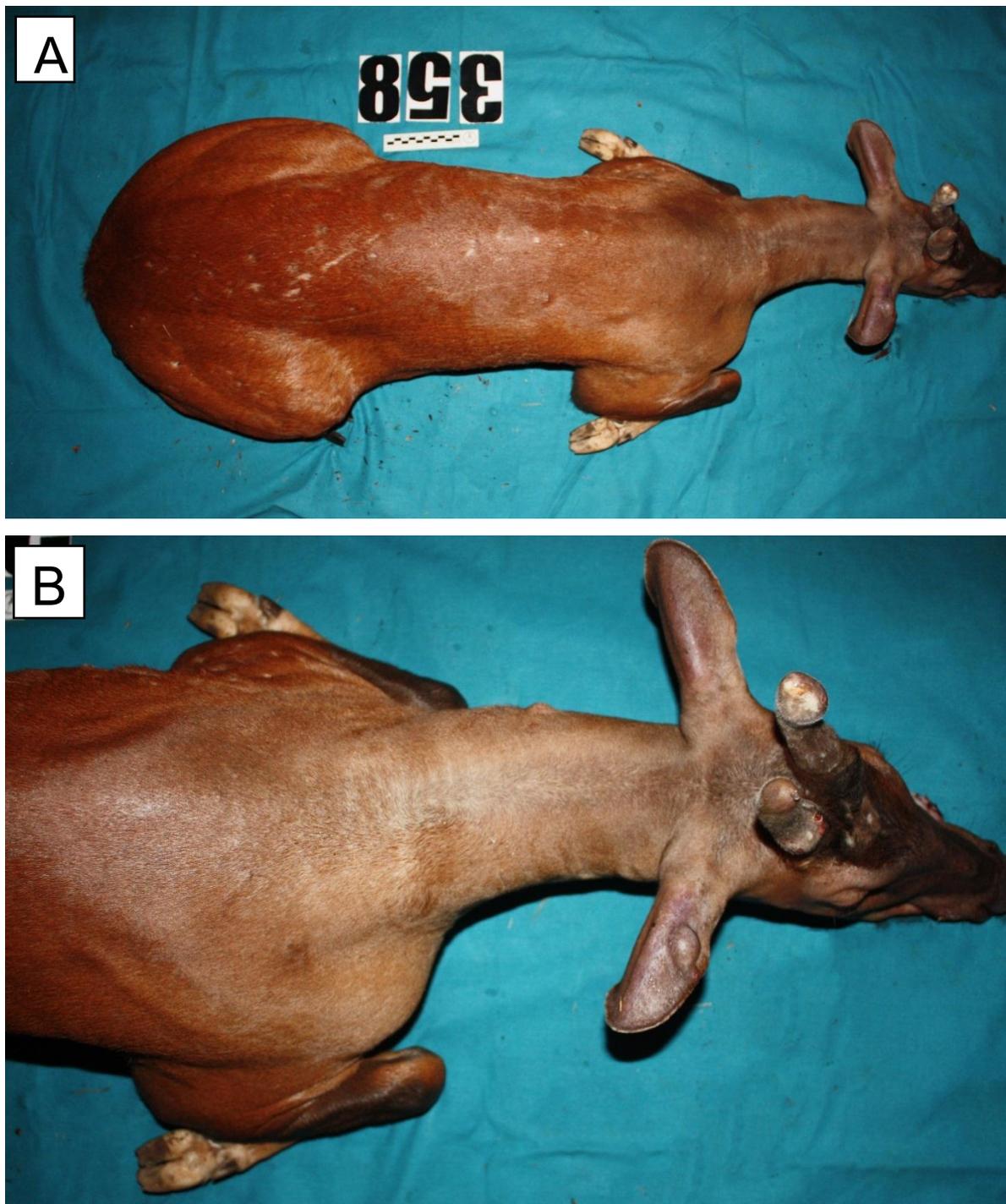
**Coordenadas aproximadas ao ponto de coleta:** 4°19'52"N e 52°07'22"W

**Depositado em:** Museu do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE)–FCAV-Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – Campus de Jaboticabal.

**No de tombo:** NPC079 (Crânio completo, pós-crânio e pele taxidermizada)

**Sinonímias:** Frente à grande possibilidade de que as sinonímias já descritas não pertençam à espécie *M. americana*, serão consideradas sinonímias somente nomes

dados a animais provenientes da Guiana Francesa, que são: *Cervus rufus* Cuvier, 1817 e *Mazama pita* Rafinesque, 1817.



**Figura 8.** Topótipo de *M. americana* em vista dorsal, corpo (A) e dorsal, cabeça (B).



**Figura 9.** Topótipo de *M. americana* em vista lateral esquerdo, corpo (A) e lateral esquerdo, cabeça (B)

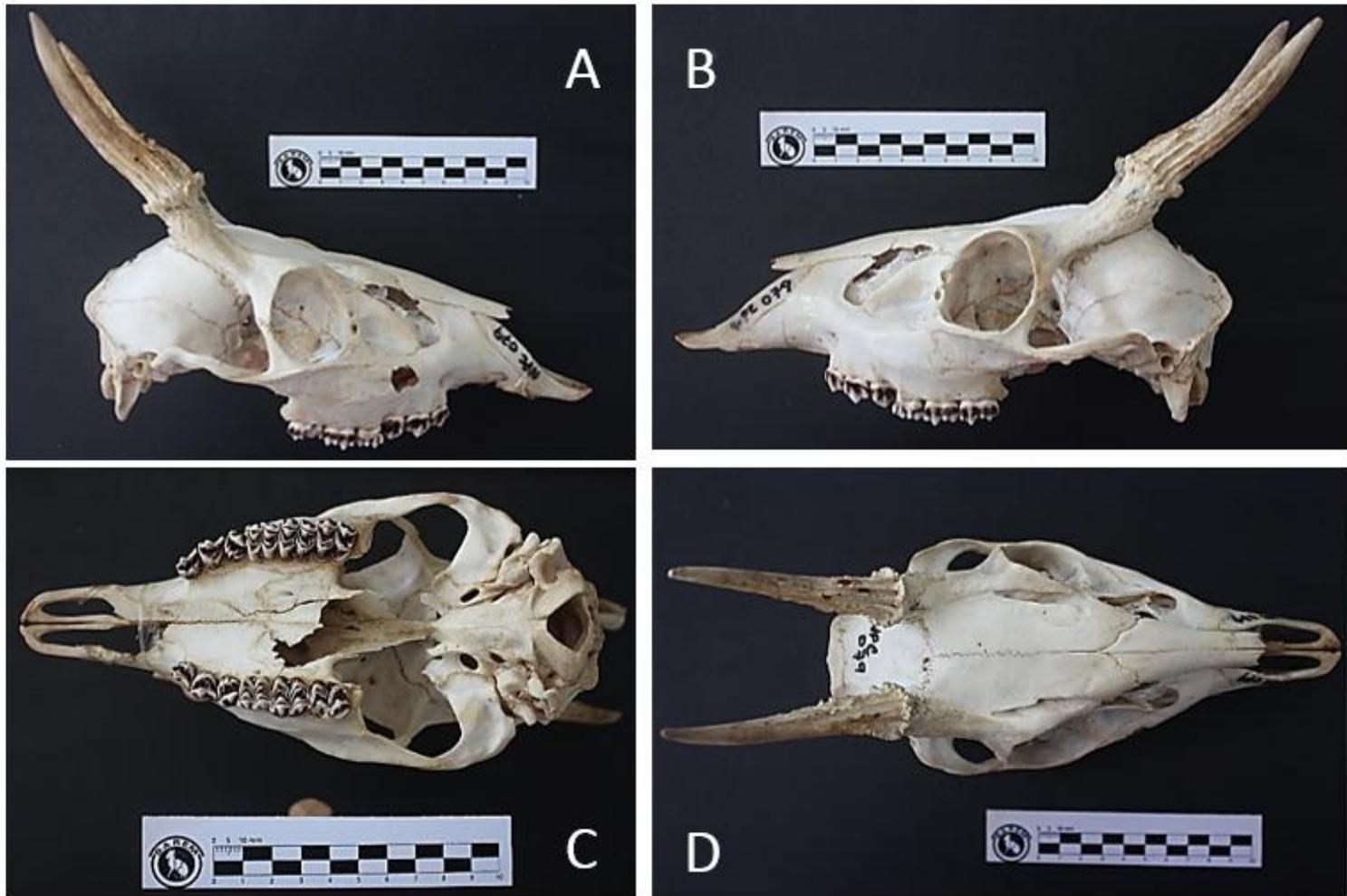


**Figura 10.** Topótipo de *M. americana* em vista ventral, região anterior (A) e ventral, região posterior (B).



**Figura 11.** Pele aberta taxidermizada do topótipo de *M. americana*

Os dados da biometria corporal estão apresentados na tabela 3 e foram comparados com os dados existentes no banco de dados do NUPECCE. O crânio do topótipo mostrando as quatro vistas é ilustrado na Figura 12 e as 36 medidas cranianas são mostradas na Tabela 4.



**Figura 12.** Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D) do crânio do topótipo de *M. americana*. A régua ilustra medida em centímetros.

**Tabela 3.** Medidas corporais do topótipo de *M. americana* analisado neste estudo.

<b>Parâmetros</b>	<b>Medidas (cm)</b>
Comprimento do chifre direito	2,35
Comprimento do chifre esquerdo	2,5
Diâmetro do chifre direito	2,35
Diâmetro do chifre esquerdo	2,5
Distância entre chifres	2,11
Comprimento da orelha	10,50
Distância entre olhos	6,00
Comprimento da cabeça	27,00
Largura da cabeça	10,00
Perímetro do pescoço	36,00
Comprimento do corpo	96,00
Tórax	78,00
Abdômen	91,50
Comprimento da cauda	12,50
Altura	71,00
Metacarpo	16,00
Metatarso	26,50
Peso	44,6

**Tabela 4.** Medidas cranianas do topótipo de *M. americana* representadas em milímetros (mm).

<b>Caracter</b>	<b>mm</b>	<b>caracter</b>	<b>mm</b>	<b>caracter</b>	<b>mm</b>	<b>caracter</b>	<b>mm</b>
CT	223,30	CLM	36,36	LR	171,53	LFM	67,40
CCB	211,15	CLP	30,33	LP	213,98	MLEO	67,00
CB	197,73	MCIO	35,43	ACR	151,70	LMEO	52,05
CCC	128,75	MAIO	36,43	MCN	70,53	LZ	101,86
PP	70,73	MLM	63,75	CCFL	118,17	MLEN	25,68
EBC	39,79	MLCO	41,50	CPO	99,66	MLPM	30,38
EBF	160,84	MLPP	57,15	CLP	66,38	MLP	41,39
CVC	117,59	MLFM	20,02	DCD	65,73	BCNS	51,03
CFM	115,94	AFM	18,49	LN	104,15	MLNC	63,42

Onde: CT= comprimento total, CCB= comprimento condilobasal, CB= comprimento basal, CCC= comprimento curto do crânio, PP= premaxilar – prosthion, EBC= eixo basecranial, EBF= eixo basefacial, CVC= comprimento vicerocraniano, CFM= comprimento frontal mediano, LN= lambda – nasal, LR=

lambda – região mais distal do osso nasal, LP= lambda – prosthion , ACR= acrocrânio, MCN= maior comprimento dos nasais, CCFL= comprimento curto facial – lateral, CPO= comprimento palatal oral, CLP= comprimento lateral do premaxilar, DCD= distância corrida de dentes, CLM= comprimento da linha do molar, CLP= comprimento da linha premolar, MCIO= maior comprimento interno da órbita, MAIO= maior altura interna da órbita, MLM= maior largura do mastoide, MLCO= maior largura dos côndilos occipitais, MLPP= maior largura das bases do processo paraoccipital, MLFM= maior largura do forâmen magno, AFM= altura do foramen magno, MLNC= maior largura neurocraniana, LFM= largura frontal menor, MLEO= maior largura entre as órbitas, LMEO= largura mínima entre as órbitas, LZ= largura zigomática, MLEN= maior largura entre os nasais, MLPM= maior largura entre o premaxilar, MLP= maior largura do palatal, BCNS= basion – ponto mais alto da crista nuchal superior, CNC= capacidade neurocraniana.

Foi comprovado mediante a análise de componentes principais (PCA) separados por sexo, que não existe dimorfismo sexual para a espécie *M. americana*. Os resultados da PCA (Tabela 5), feito com as medidas corporais, não revelou diferenças morfométricas entre grupos geográficos distintos.

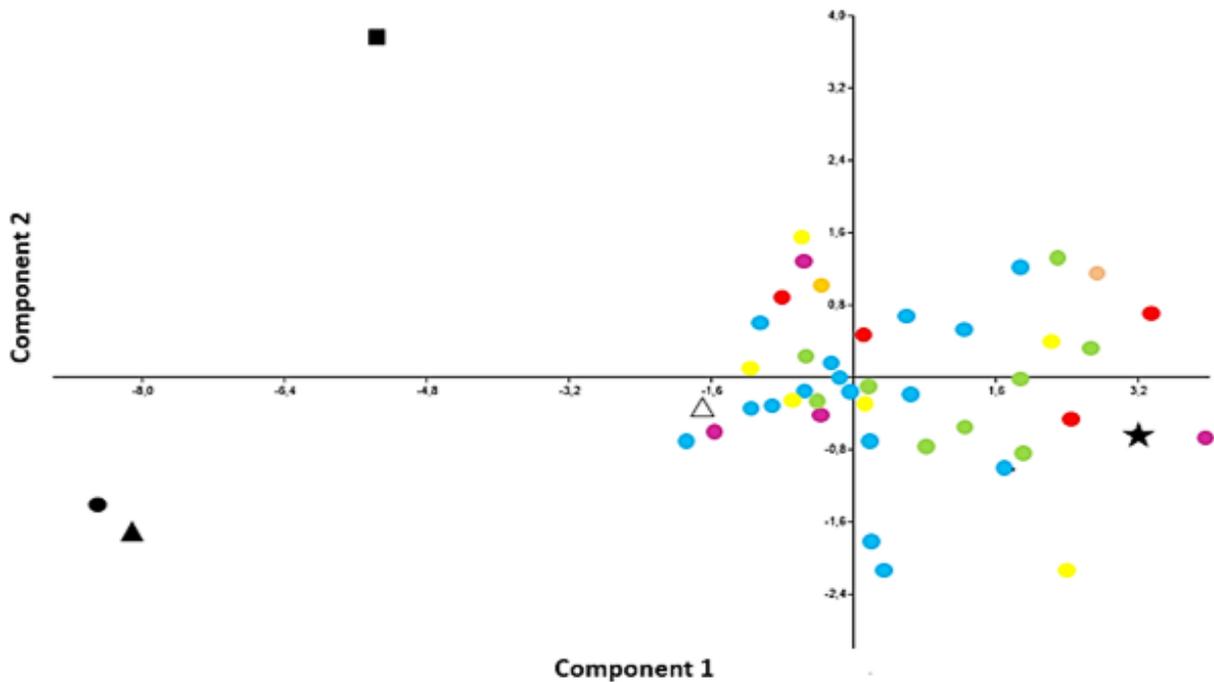
O primeiro e segundo componentes mostram 54,90% e 11,16% da variância, respectivamente. Pelo fato das cargas do primeiro componente (PC1) terem sido iguais (positivas), o PC1 é interpretado como um eixo que mostrou principalmente as diferenças de tamanho entre os indivíduos. Seis medidas (LC, ALT, MTT, PP, TX, AB) tiveram os maiores pesos em PC1. Algumas cargas sobre o segundo componente (PC2) são negativas e outras positivas, por esse motivo, o PC2 foi interpretado como um eixo que mostrou principalmente diferenças nas proporções corporais entre os espécimes. Neste componente (PC2), as medições com cargas maiores foram ALT e PP (cargas negativas) e DEO e CCA (cargas positivas).

**Tabela 5.** Resultados da análise de componentes principais com base em medições corporais de todos os indivíduos adultos do banco de dados do NUPECCE e o topótipo analisado neste estudo.

Medida	PC1	PC2	PC3	PC4	PC5
LC	0,3291	0,1859	-0,2489	-0,1502	0,345
CO	0,2602	-0,3283	-0,07154	0,6182	0,3559
DEO	0,1068	0,7686	-0,155	0,2151	0,2718
MTC	0,2155	-0,02739	0,7712	0,06779	0,4179
ALT	0,3501	-0,1756	0,03405	0,05012	-0,2881
CCO	0,329	0,1791	0,07193	-0,2651	-0,1616
CCA	0,2676	0,3032	0,05288	0,485	-0,5374
MTT	0,3605	-0,1263	0,1517	0,04603	-0,2502
PP	0,3019	-0,2445	-0,4855	0,008042	0,1995
TX	0,3557	-0,1461	-0,1586	-0,2378	-0,04755
AB	0,3406	0,1195	0,1451	-0,4215	0,05736
“Eigenvalue”	6,03982	1,22848	0,943974	0,748632	0,605614
% “variance”	54,907	11,168	8,5816	6,8057	5,5056

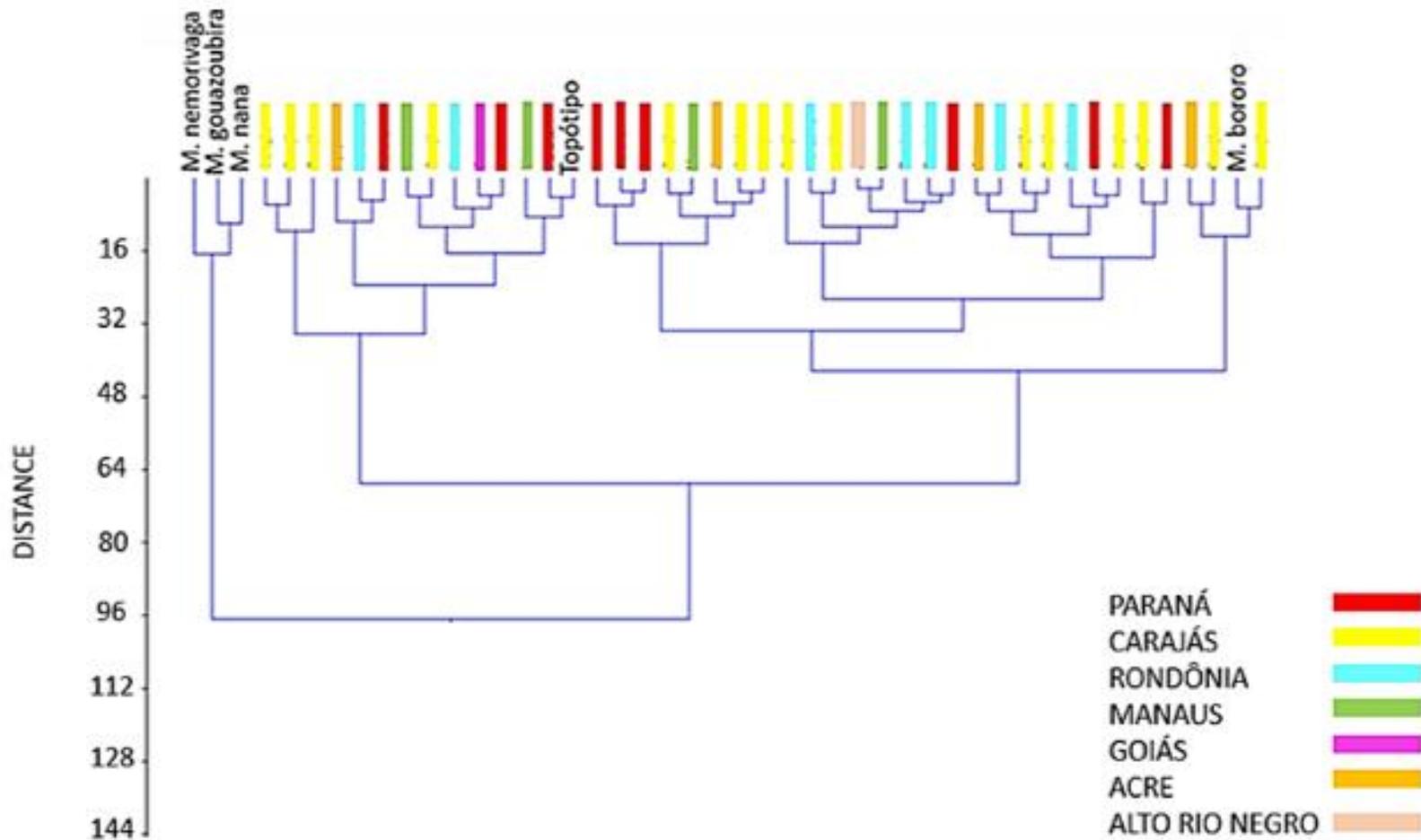
Componentes 6 - 11 representam um percentual da variância total muito baixo (<5%) e, por conseguinte, são omitidos. A medida LC representa a largura da cabeça, CO comprimento da orelha, DEO distância entre olhos, MTC metacarpo, ALT altura, CCO comprimento do corpo, CCA comprimento da cauda, MTT metatarso, PP perímetro do pescoço, TX tórax e AB abdômen.

O gráfico de dispersão (Figura 13), construído com a pontuação dos espécimes nos dois primeiros componentes, mostra sobreposição substancial entre os diferentes grupos geográficos. Espécimes das diferentes localidades do Brasil são amplamente espalhadas por PC1 e PC2, ainda sabendo que são citogeneticamente distintos. Alguns espécimes de *M. americana* ficam sobrepostos com a amostra de *M. bororo*, sendo esta última, classificada anteriormente como espécie distinta de *M. americana*, confirmando a dificuldade de diferenciar as espécies do gênero *Mazama* só pelos caracteres morfológicos.



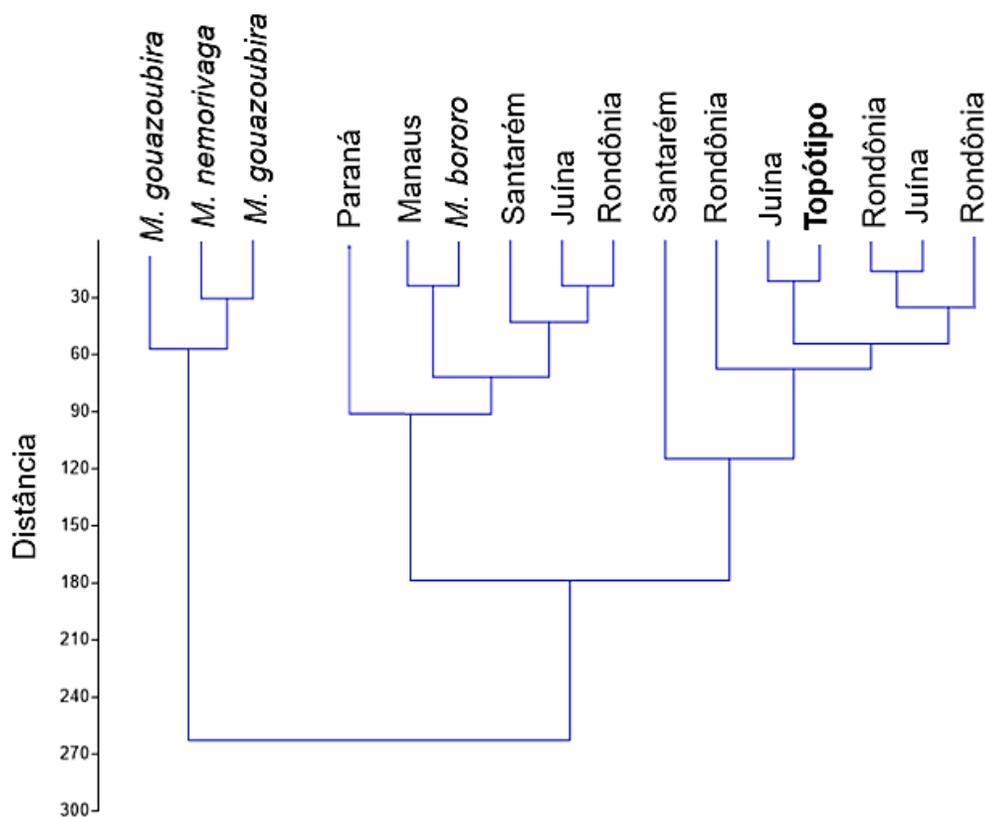
**Figura 13.** Diagrama dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas corporais de indivíduos de *M. americana* provenientes de diferentes localidades de Brasil com relação ao topótipo analisado neste trabalho (estrela preta) e um grupo externo composto pelas espécies *M. nana* (triângulo preto), *M. gouazoubira* (círculo preto), *M. nemorivaga* (quadrado preto), e *M. bororo* (triângulo branco). Os círculos de cor vermelha representam os espécimes de *M. americana* provenientes do Acre, verde Paraná, azul Carajás, amarelo Rondônia, roxo Manaus, laranja Goiás, e rosa Alto Rio Negro.

A árvore de distância morfológica feita a partir das medidas biométricas dos indivíduos (Figura 10) mostra claramente uma mistura entre todos os indivíduos que são citogenética e molecularmente distintos, evidenciando assim que a individualização das populações de veado-mateiro é impraticável pelos caracteres biométricos. Além disso, corrobora a incapacidade de diferenciar *M. bororo* de *M. americana*.



**Figura 14** Árvore de distância feita com as medidas biométricas dos diferentes citótipos de *Mazama americana* encontrados no Brasil (Paraná, Carajás, Rondônia, Manaus, Goiás, Acre e Alto Rio Negro) em comparação com o topótipo e um grupo externo (*Mazama nemorivaga*, *Mazama gouazoubira*, *Mazama nana* e *Mazama bororo*).

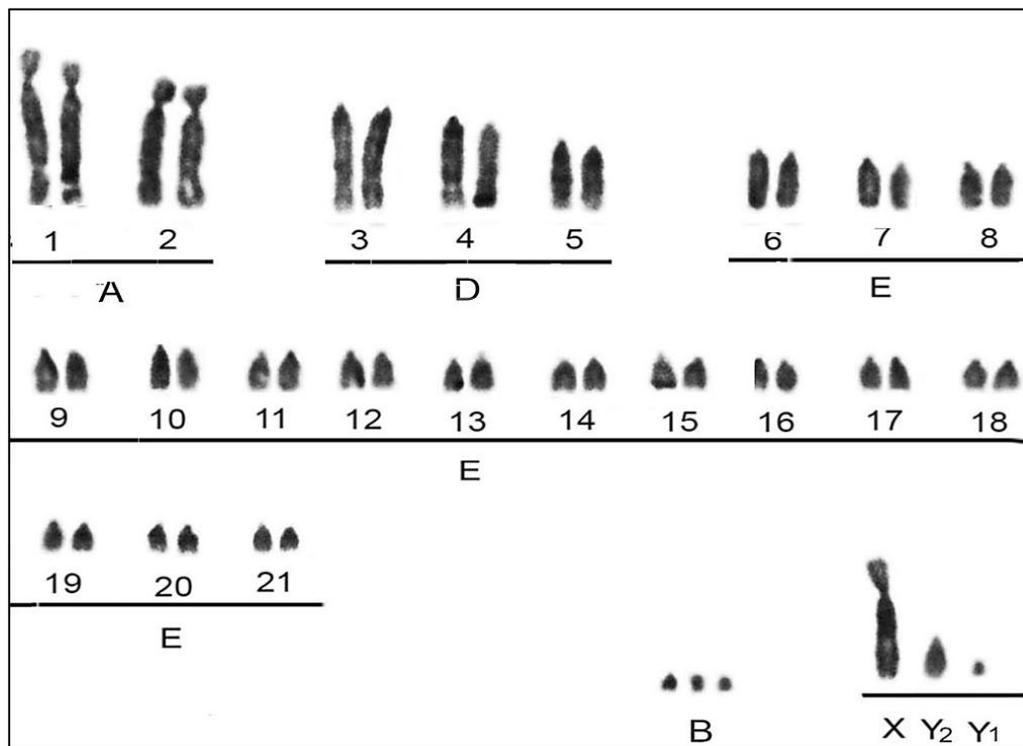
A árvore de distância morfológica feita a partir das medidas cranianas dos indivíduos de diferentes citótipos (Figura 12), mostra dois clados, um composto por indivíduos de Paraná, Manaus, Santarém, Juína, Rondônia e o indivíduo da espécie *M. bororo*, e outro composto por indivíduos de Santarém, Rondônia e Juína. Neste último clado encontra-se agrupado o topótipo, evidenciando novamente que os indivíduos não podem ser diferenciados morfológicamente de acordo ao seu padrão cariotípico, além disso, *M. bororo* não pode ser separado de *M. americana* pela craniometria.



**Figura 15.** Árvore de distância feita com as medidas cranianas de diferentes citótipos encontrados no Brasil (Paraná, Manaus, Santarém, Juína, e Rondônia) em comparação com o topótipo de *M. americana* e um grupo externo (*Mazama gouazoubira*, *Mazama nemorivaga* e *Mazama bororo*).

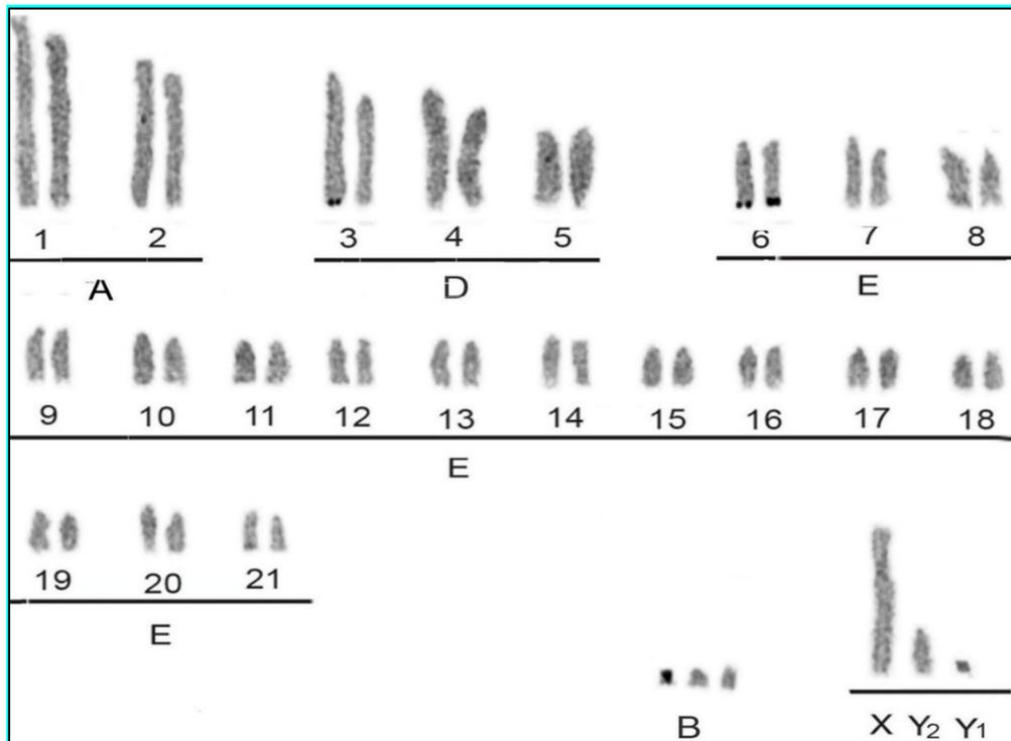
## 5.2 Citogenética

Por meio da coloração convencional Giemsa (Figura 16), foi possível obter uma visão básica do cariótipo deste espécime, permitindo assim seu correto pareamento. Segundo a biometria, os cromossomos foram classificados de acordo com o seu comprimento relativo (CR), sendo que o grupo A é composto pelos pares 1 e 2, o grupo D pelos pares 3, 4 e 5, e o grupo E pelos pares 6 a 21. Os cromossomos B não apresentaram variabilidade nenhuma entre todas as metáfases analisadas, se mostrando sempre com 3 cromossomos.



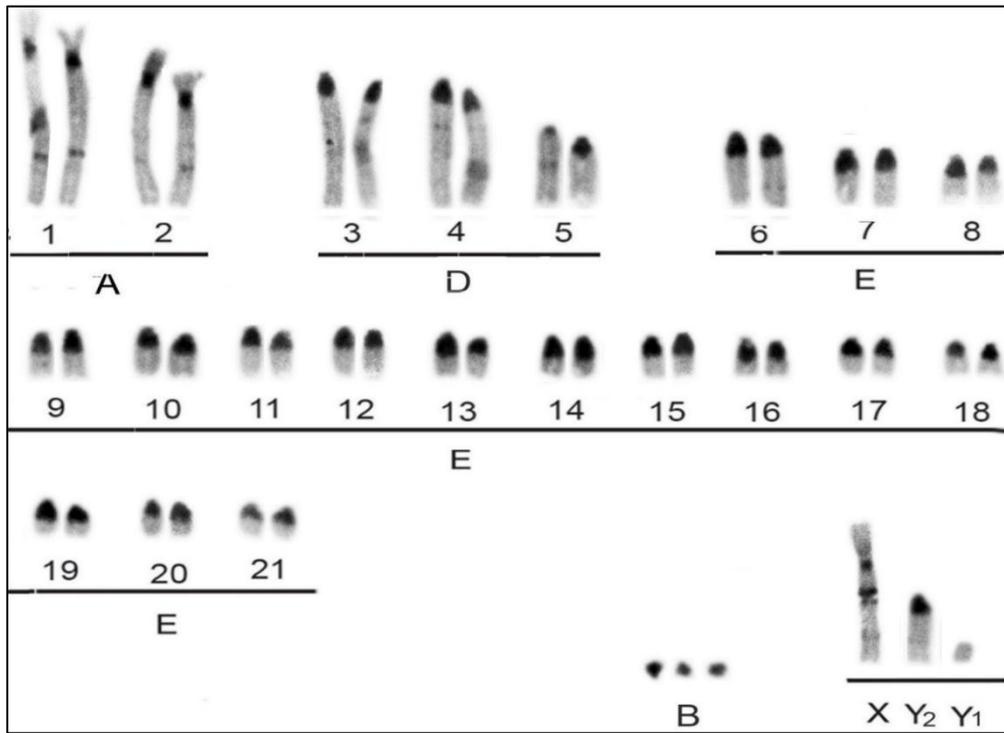
**Figura 16.** Cariótipo básico pertencente ao topótipo de *Mazama americana* ( $2n=45$  NF=50 +3Bs) sob coloração convencional Giemsa.

Com a coloração Ag-NOR foi observado que as regiões organizadoras de nucléolo estão localizadas na região telomérica de um cromossomo do par 3 e nos dois cromossomos do par 6 (Figura 17).

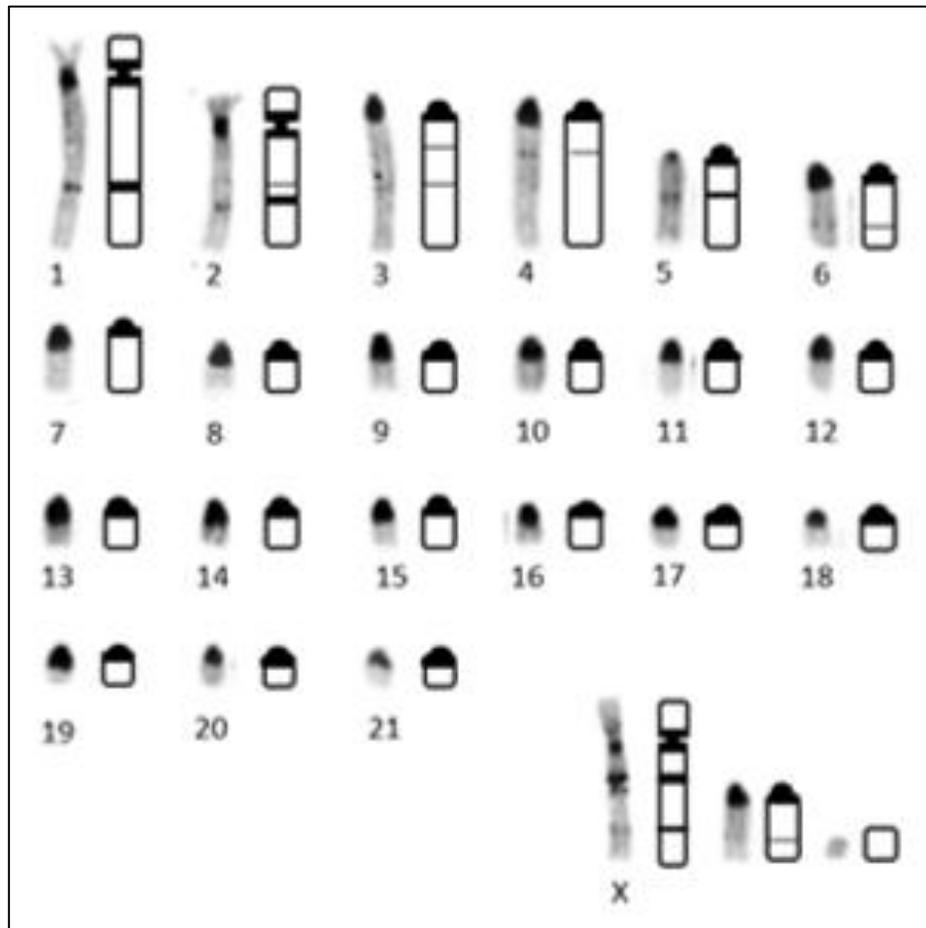


**Figura 17.** Cariótipo básico pertencente ao topótipo de *Mazama americana* ( $2n=45$  NF=50 +3Bs) sob coloração Ag-NOR

O bandamento C (Figura 18) mostrou blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos, uma banda heterocromática intersticial forte nos braços longos dos cromossomos 1 e 2 e bandas mais tênues nos cromossomos 3, 4, 5 e 6. O cromossomo X apresenta um grande bloco heterocromático na região intersticial do braço longo, enquanto o Y1 apresentou-se eucromático e os cromossomos B heterocromáticos. O padrão de Bandamento C é representado na Figura 19.

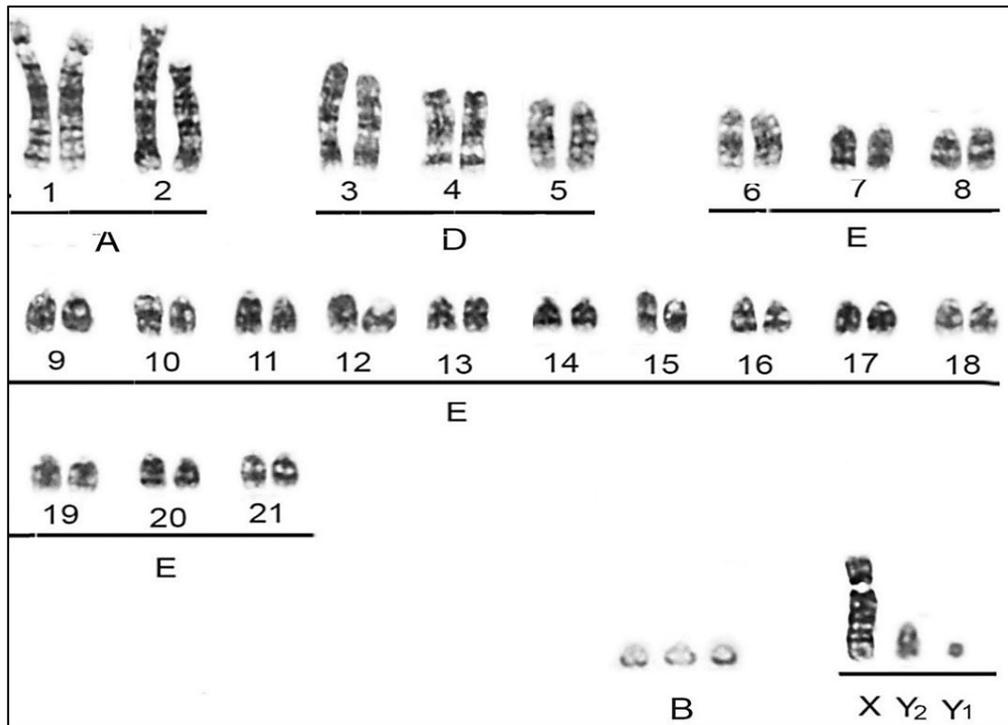


**Figura 18.** Cariótipo básico pertencente ao topótipo de *M. americana* ( $2n=45$  NF=50 +3Bs) sob bandamento C.

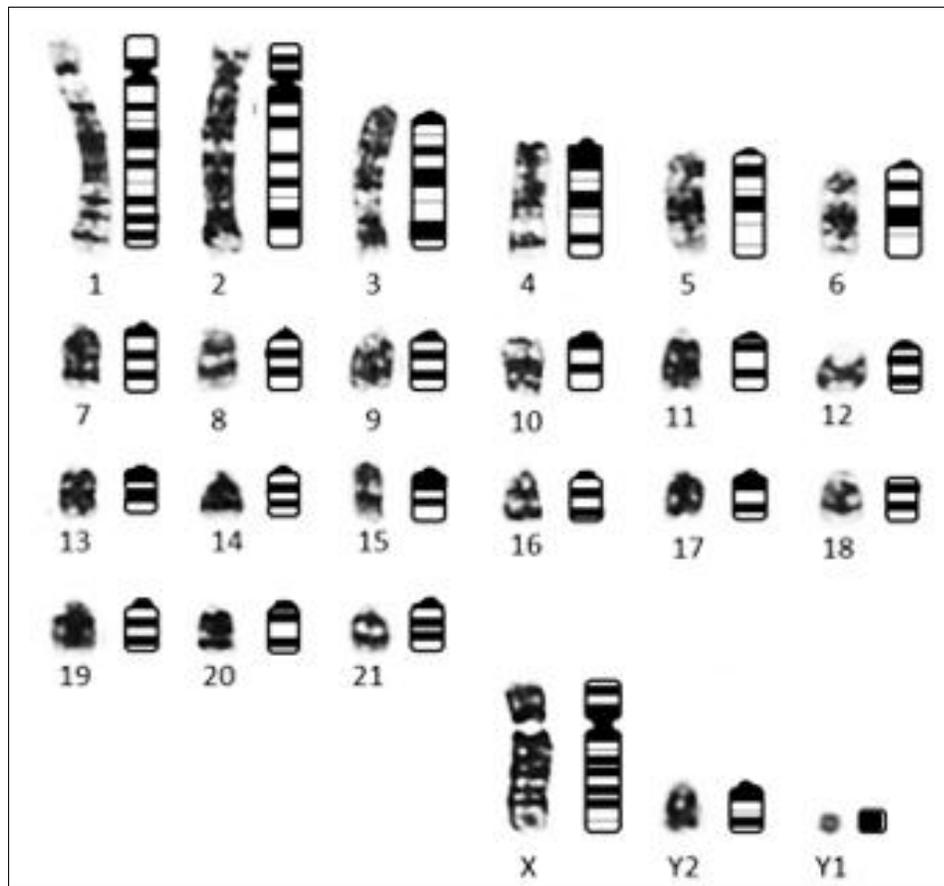


**Figura 19.** Representação esquemática do padrão de bandas C do topotipo de *M. americana*.

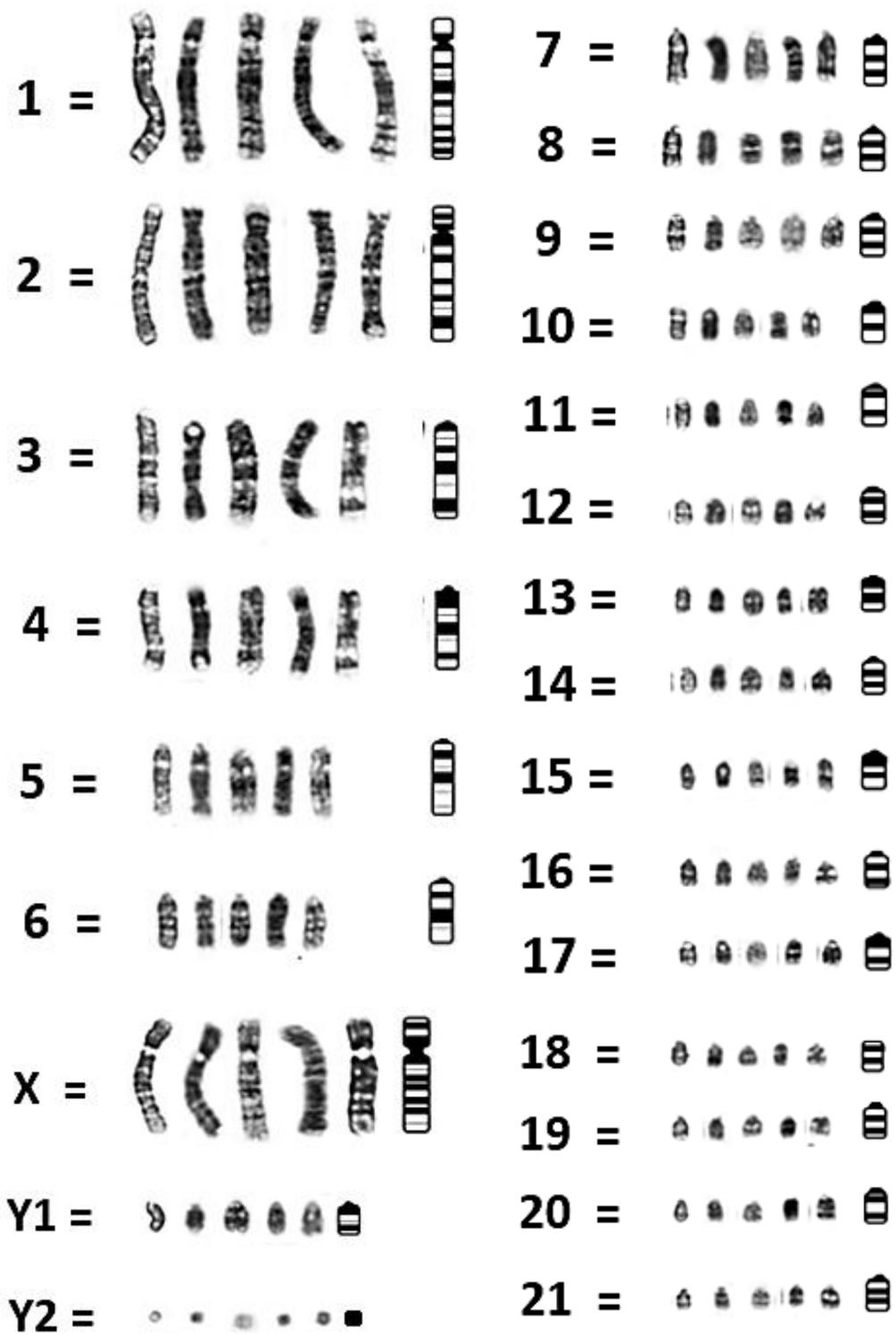
Os cromossomos sexuais da espécie *M. americana* formam um sistema sexual múltiplo XX/XY1/Y2 devido a uma fusão X-autossômica ancestral. O bandamento G (Figura 20) permitiu identificar corretamente a região do X homóloga a um cromossomo acrocêntrico do grupo E. Uma marcação da banda C na região intersticial do braço longo do cromossomo X coincide com o ponto de fusão em tandem entre este e o autossomo ancestral, homólogo ao Y2. O cromossomo Y1 é o menor do lote, metacêntrico e totalmente hererocromático. A representação esquemática do Bandamento G do topótipo de *M. americana* analisado neste estudo é o ponto de comparação de todas as variantes conhecidas e é representado nas Figuras 21 e 22.



**Figura 20.** Cariótipo básico pertencente ao topótipo de *M. americana* ( $2n=45$  NF=50 +3Bs) sob bandamento G.

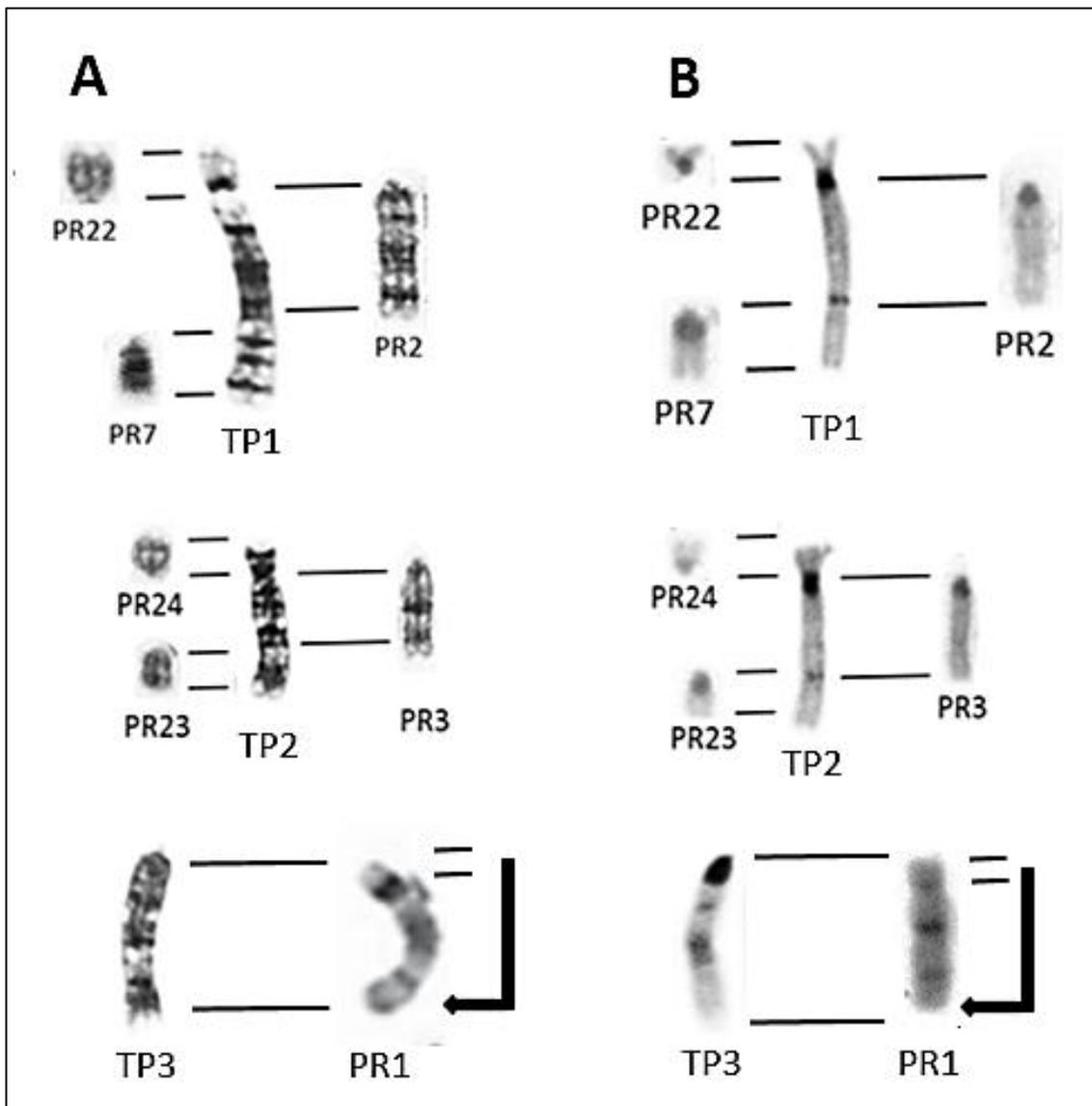


**Figura 21.** Representação esquemática do padrão de bandas G do topotipo de *M. americana*.



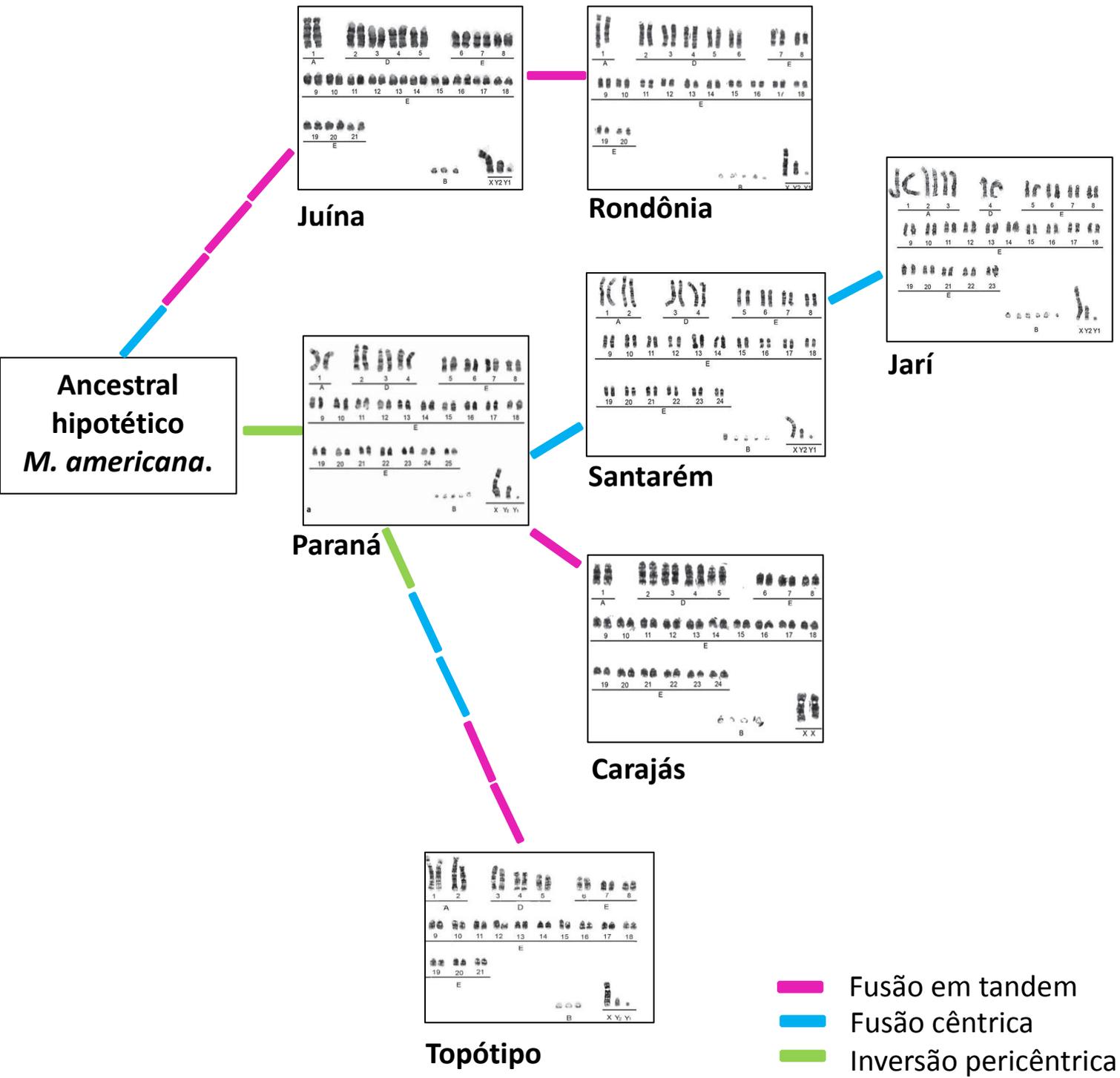
**Figura 22.** Representação esquemática do padrão de bandas G do Topótipo de *M. americana*. Cromossomos de cinco metáfases diferentes.

As análises comparativas foram feitas com o citótipo Paraná ( $2n=52/53$  e  $NF=56$ ). A partir dele ocorreram dois eventos independentes de fusão cêntrica e fusão em tandem, os quais deram origem aos pares 1 e 2 do topótipo. O par 1 do topótipo corresponde a uma fusão em tandem dos cromossomos 2 e 7 do citótipo Paraná, além de uma fusão cêntrica dos cromossomos 2 e 22. O par 2 do topótipo, surgiu pela fusão em tandem dos pares 3 e 23 do citótipo Paraná, além de uma fusão cêntrica dos cromossomos 3 e 24. O cromossomo 3 do Topótipo, pode ter sido produto de uma inversão pericêntrica do par 1 do citótipo Paraná, mostrando assim uma homologia entre o par 1 do topótipo e o par 1 do citótipo Paraná. (Figura 23). Os pares 4, 5 e 6 do topótipo apresentaram-se iguais aos pares 4, 5 e 6 do citótipo Paraná, da mesma forma que os pares 8 a 21 do topótipo que representam os pares 8 a 21 do citótipo Paraná.



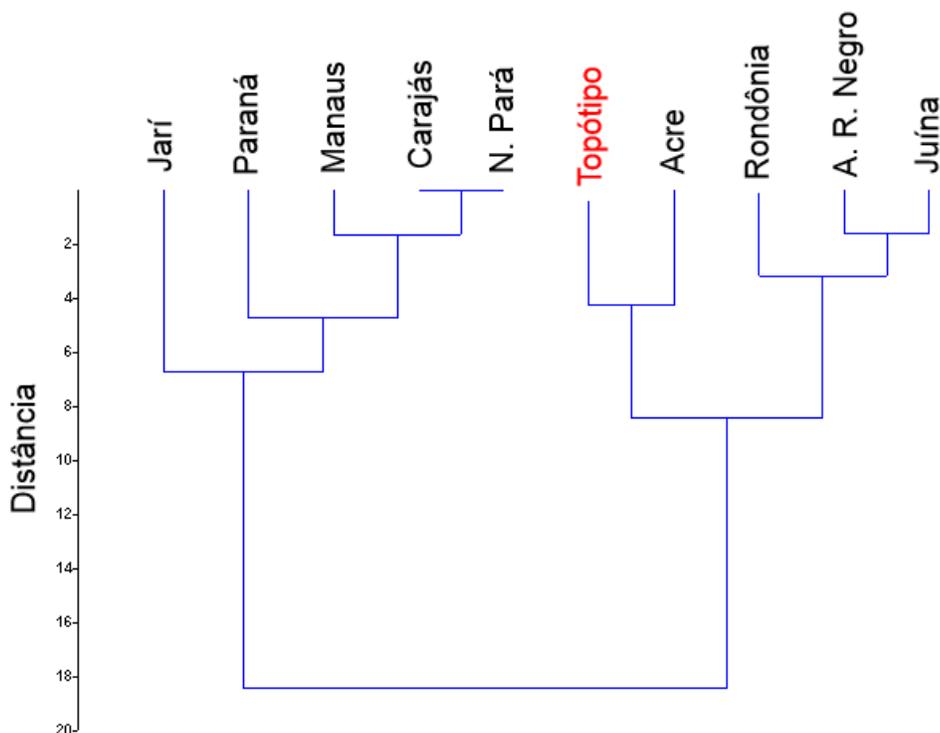
**Figura 23.** Cromossomos correspondentes entre o citótipo Paraná (PR) e o Topótipo (TP) sob bandamento G em (A) e Bandamento C em (B).

Para melhor interpretação dos rearranjos envolvidos na diferenciação das populações de *M. americana*, a Figura 24 ilustra cada um dos eventos que aconteceram para formar os diferentes cariótipos dentro desta espécie.



**Figura 24.** Evolução cromossômica mostrando as relações dos 6 citótipos em comparação com o topótipo de *M. americana*. **JU** $2n=44/45$ ; **NF**=48, **RO** $2n=42/43$ ; **NF**=46, **SA** $2n=50/51$ ; **NF**=56, **JA** $2n=48/49$ ; **NF**=56, **PR** $2n=52/53$ ; **NF**=56, **CA**  $2n=50/51$ ; **NF**=54, **topótipo**  $2n=45$ ; **NF**=50.

A análise de distância feita a partir de caracteres citogenéticos entre todos os citótipos encontrados no Brasil e o topotipo (Figura 25) evidencia claramente dois cladogramas, um composto pelos citótipos de menor número diplóide (Juína, Alto Rio Negro, Acre e Rondônia), no qual se situa o topotipo e outro constituído pelo citótipos de maior número cromossômico (Paraná, Carajás, Manaus, Jari e Norte do Pará).



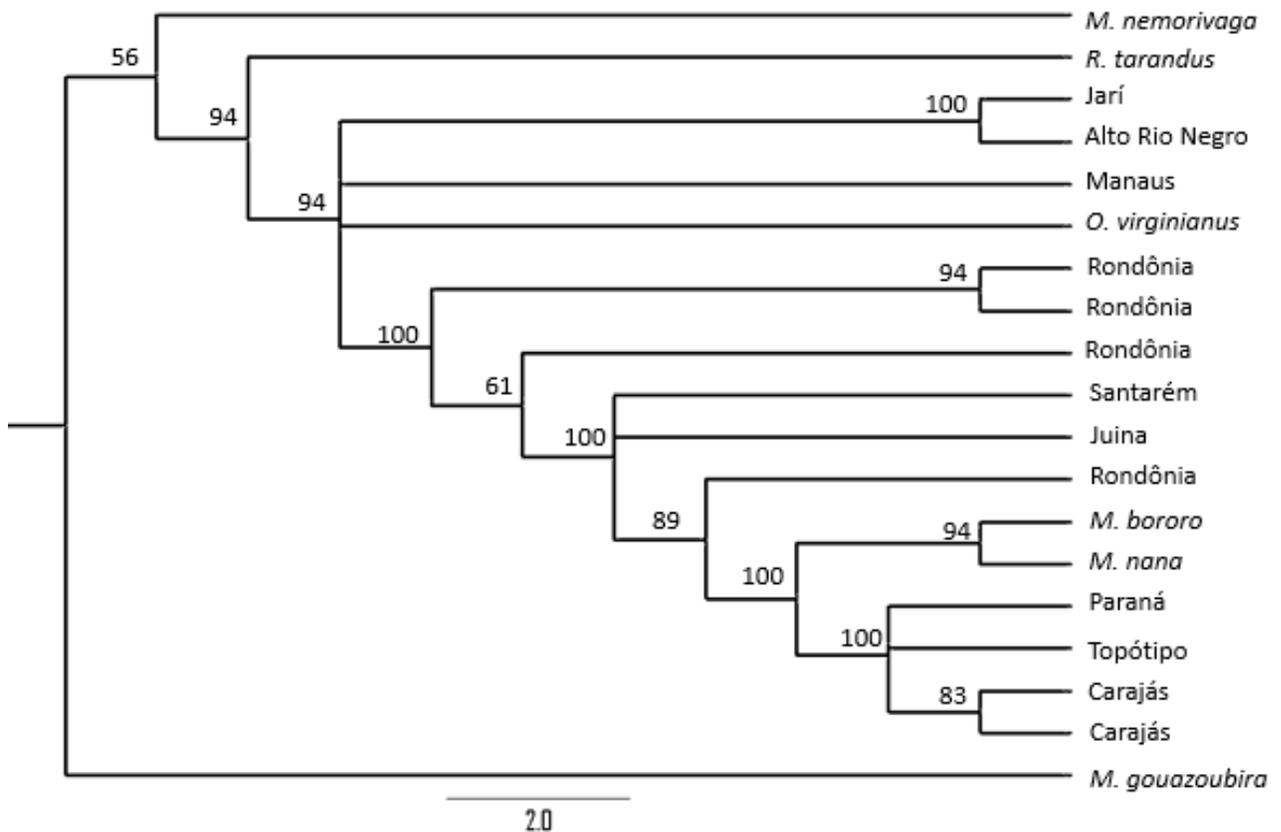
**Figura 25.** Árvore de distância a partir de caracteres citogenéticos de todos os citótipos conhecidos no Brasil em comparação ao topotipo analisado neste estudo.

### 5.3 Filogenia molecular

O DNA do topotipo apresentou uma concentração de 142ng/μl e uma relação 260/280=1,95.

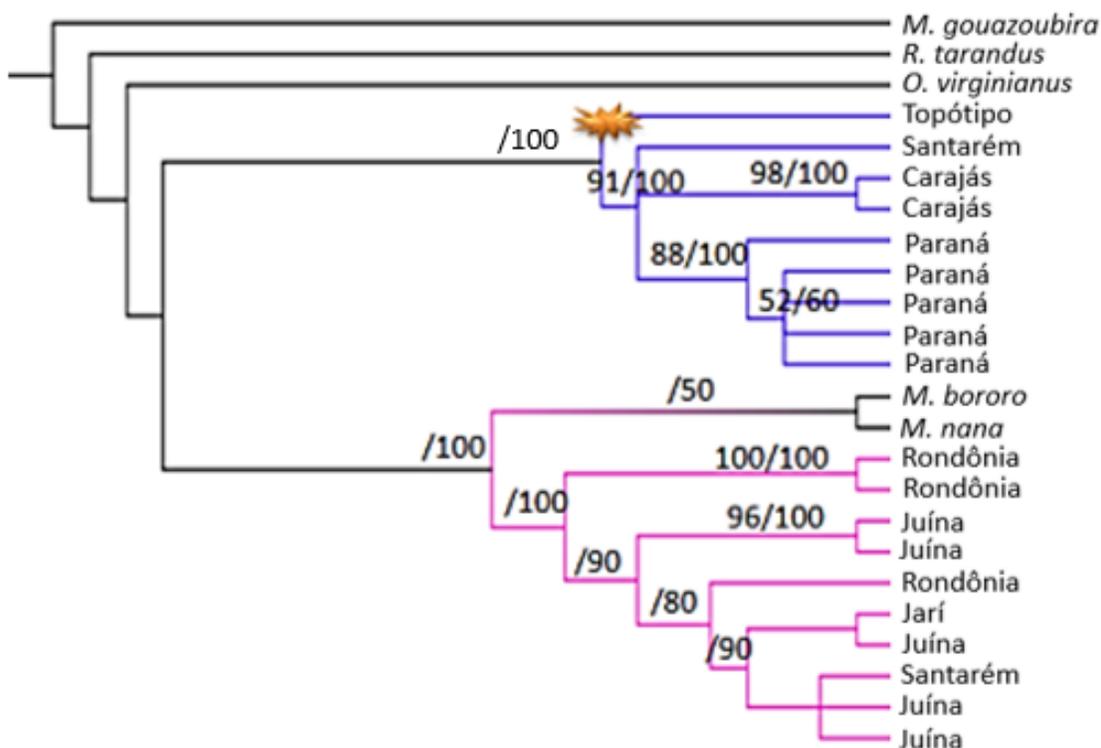
Para o gene *Cit-b* o melhor modelo evolutivo foi TN93+G, *D-loop*=TN93+G, concatenada *D-loop* + *Cit-b*=TIM3+I+G, *COI*=TN93+G,  $\alpha$ -*LALb*=TIM2+G, e *IL16*=TIM2+G, com parâmetros definidos de nst=6 para todos os genes.

A árvore gerada pela análise do gene mitocondrial *Cit-b* (Figura 26) evidencia as duas linhagens de *M. americana*, onde o topótipo é agrupado juntamente com os indivíduos de Paraná e Carajás, formando com eles um grupo monofilético com alta probabilidade posterior (100%). Um indivíduo de Alto de Rio e outro proveniente de Jarí também formam um grupo monofilético. As espécies *M. bororo* e *M. nana* posicionaram-se no meio da árvore, se mostrando mais próximos da linhagem dos citótipos Rondônia e Juina do que a distância existente entre as duas linhagens.



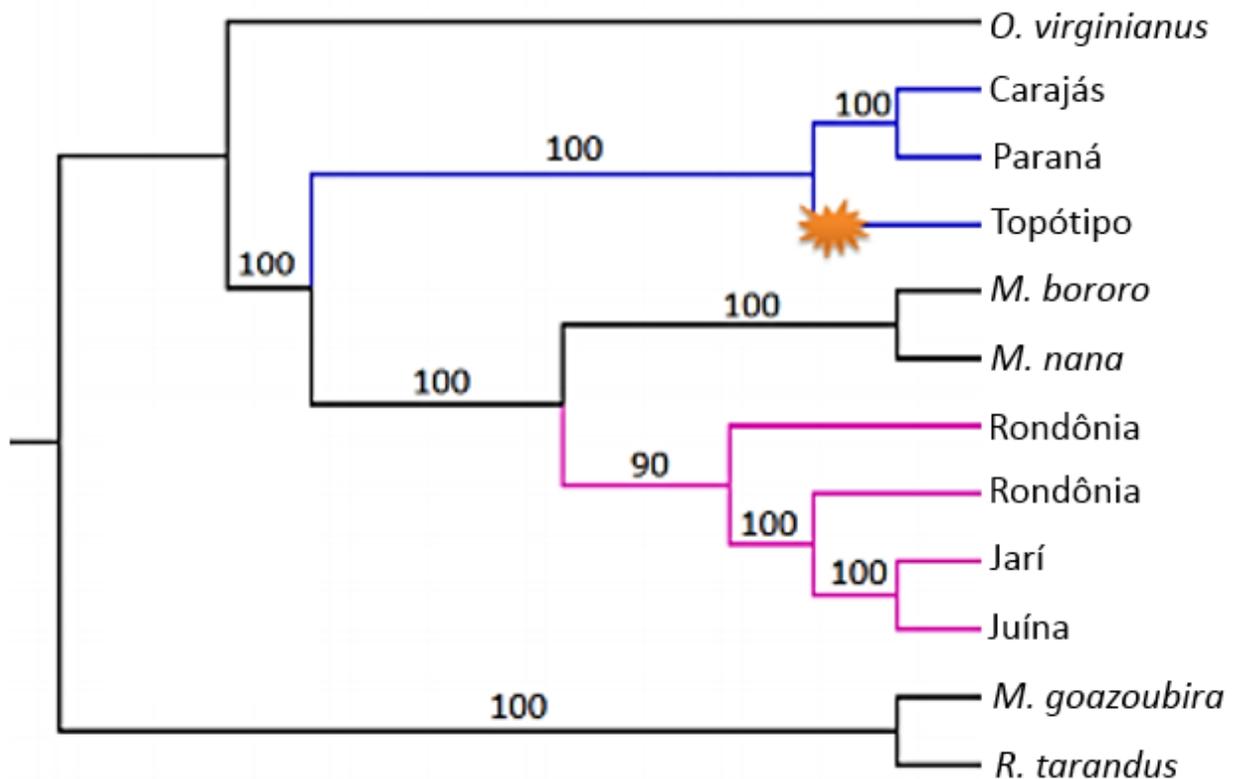
**Figura 26.** Árvore filogenética do gene *Cit-b*. Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *O. virginianus*, *R. tarandus*, *M. gouazoubira*, *M. bororo*, *M. nana* e *M. nemorivaga*.

As análises do *D-Loop* (Figura 27), apresentaram dois clados, um composto pelos táxons dos citótipos Paraná (PR) e Carajás (CA), e outro composto por indivíduos de Rondônia (RO), Juína (JU) e Jari (JA). Ambos clados separados por um forte suporte de “*bootstrap*” e probabilidade posterior, além de ser observada uma polifilia dos indivíduos do citótipo Santarem (SA), que se posicionam nos dois clados. Quanto aos métodos (Máxima Parcimônia e Inferência Bayesiana), ambos exibiram congruência nos agrupamentos. O espécime proveniente da localidade tipo (Topótipo\_T358) mostra uma posição interessante dentro da árvore, permanecendo no clado dos indivíduos de PA e CA. A árvore filogenética do gene *D-Loop* exibe uma estreita relação dos indivíduos do oeste da Bacia do Rio Amazonas (RO, JU, JA) com as espécies *M. bororo* e *M. nana* como grupos irmãos, mostrando assim que a linhagem formada por estes indivíduos é mais próxima filogeneticamente a estas duas espécies do que aos considerados também *M. americana* localizadas na outra linhagem evolutiva.



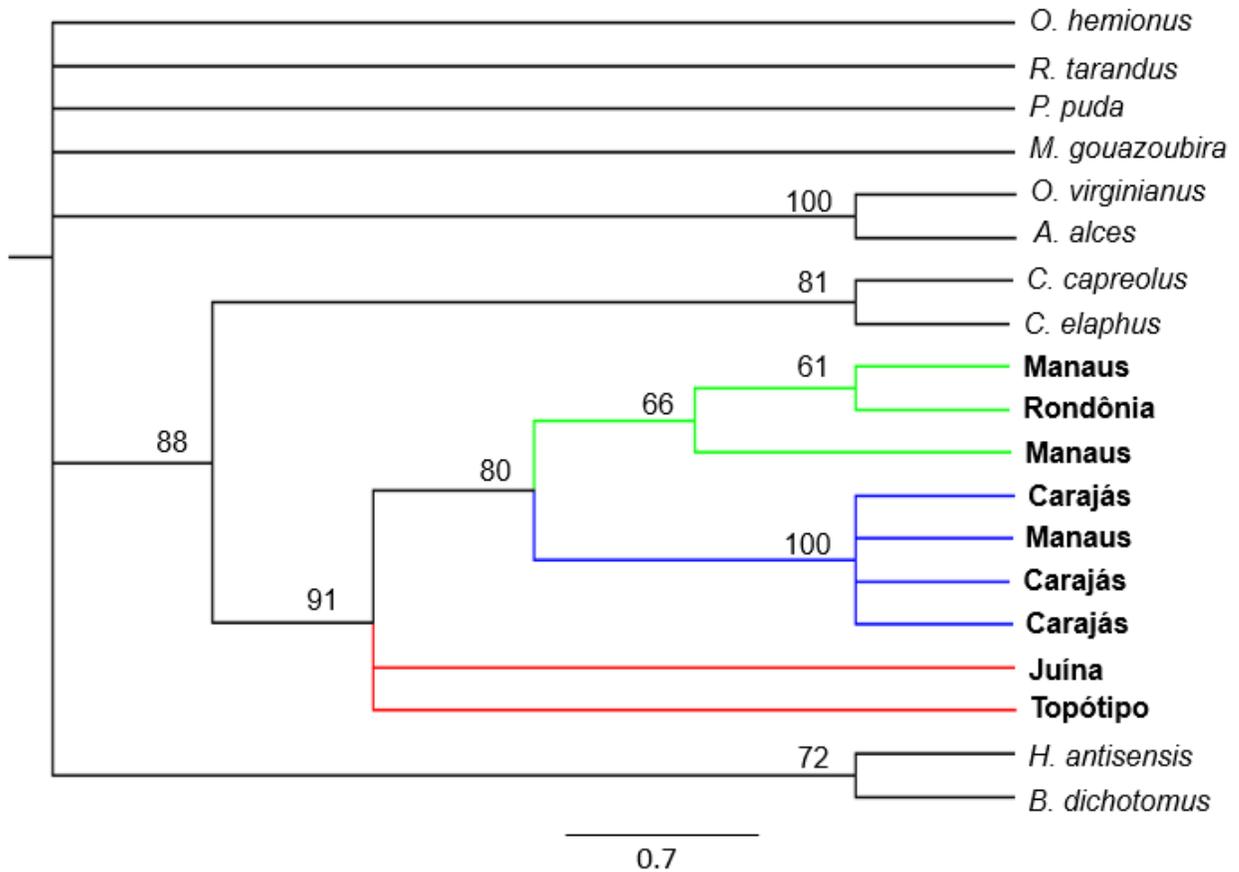
**Figura 27.** Árvore filogenética do gene *D-loop*. Análise de Máxima Parcimônia (MP) e IB. Os valores representam o “*bootstrap*” da análise de MP e a probabilidade posterior de IB. Grupo externo: *O. virginianus*, *R. tarandus*, *M. gouazoubira*, *M. bororo* e *M. nana*.

A árvore concatenada dos genes *Cit B* e *D-Loop* (Figura 28), acompanha os resultados obtidos com as análises do *D-Loop*, mesmo tendo menor número de amostras na análise, evidencia também os dois clados, um composto pelos táxons de PR e CA e o topótipo, sendo outro clado constituído por indivíduos de RO, JU e JA. Ambos clados separados por um forte suporte de probabilidade posterior, aqui novamente as espécies *M. bororo* e *M. nana* ficam mais próximas dos indivíduos de RO, JU e JÁ.



**Figura 28.** Árvore filogenética concatenada dos fragmentos da região controladora *D-loop* e o *Cit-b*. Análise de IB. Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *O. virginianus*, *R. tarandus*, *M. goazoubira*, *M. bororo* e *M. nana*.

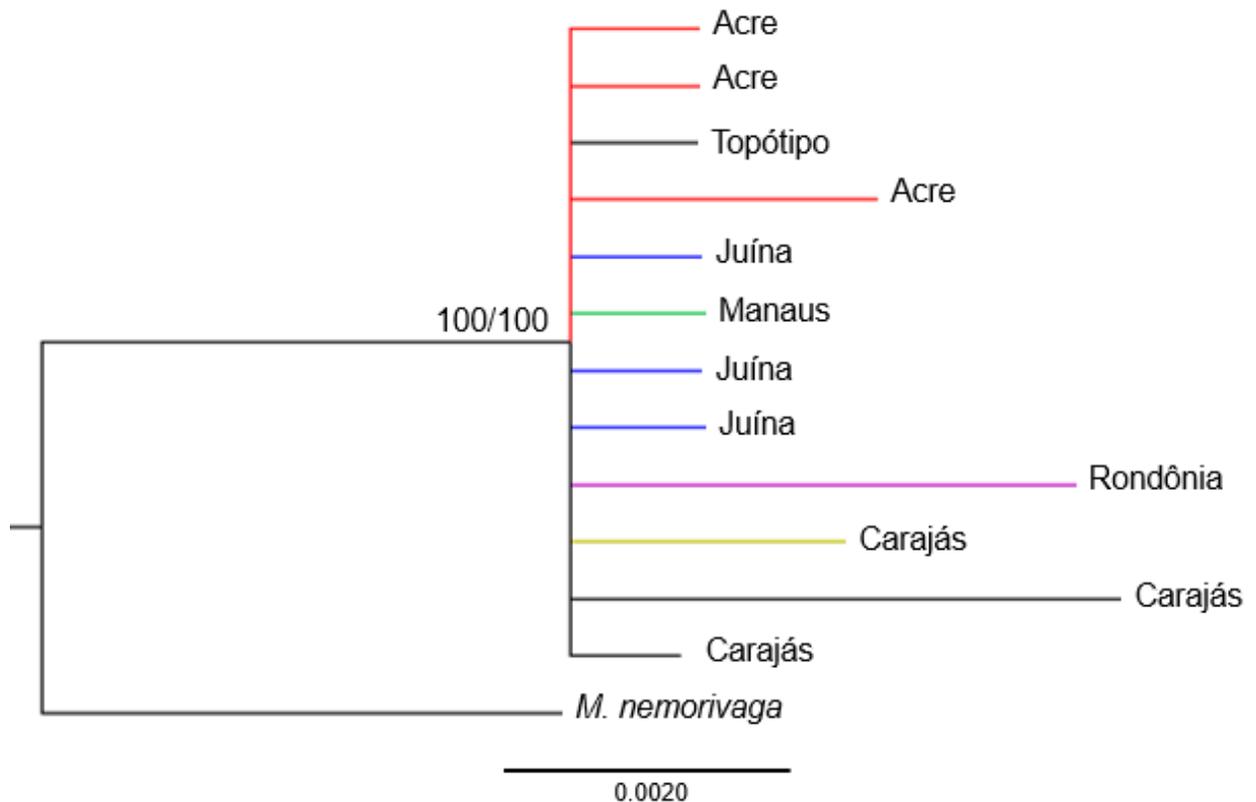
Na árvore filogenética gerada a partir do gene  $\alpha$ -LAIb (Figura 29) apresenta-se um clado composto pelos táxons dos citótipos AM e RO, uma politomia entre indivíduos de PA, AM e CA. O topótipo mateve-se separado deste clado bem como um indivíduo do citótipo JU.



**Figura 29.** Árvore filogenética do gene  $\alpha$ -LAIb. Análise de IB. Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *O. virginianus*, *R. tarandus*, *M. gouazoubira*, *P. puda*, *H. antisensis*, *B. dichotomus*, *O. hemionus*, *C. capreolus*, *C. elaphus*, *A. alces*.

As análises feitas com o gene nuclear *IL16* (Figura 30) não mostrou-se informativo, não formando agrupamentos nos indivíduos de diferentes citótipos de *M. americana*. Também não evidencia agrupamentos entre estes citótipos e o topótipo

analisado neste estudo, formando assim uma politomia com todos os indivíduos dos diferentes citótipos.



**Figura 30.** Árvore filogenética do gene *IL16*. Análise de MP e IB. Os valores representam o “bootstrap” e a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *M. nemorivaga*.

Devido à falta de sequências para o gene mitocondrial *COI* e o nuclear *MGF* de outros indivíduos de *M. americana* e do grupo externo, estes não foram submetidos a nenhuma análise filogenética. As sequências dos genes *COI* e *MGF* para o topotipo são exibidas no anexo 2 e 3 respectivamente.

## VI. DISCUSSÃO

### 6.1 Morfologia, biometria, craniometria e morfometria geométrica

O gênero *Mazama* é caracterizado pela rápida diversificação e paralelismo morfológico, gerando assim complexos de espécies como em *M. americana*, os quais representam grandes desafios para a ciência atual.

Os indivíduos pertencentes aos diferentes citótipos encontrados no Brasil para *M. americana* e o topótipo analisado neste estudo não puderam ser separados nas análises feitas com caracteres morfológicos, como anteriormente mencionado por Rossi (2000) e Duarte et al. (2008), onde se percebe que as diferentes espécies do gênero *Mazama* tem uma grande similaridade morfológica, tornando-se difícil diferenciar as espécies apenas pelos caracteres morfológicos.

Este trabalho corrobora a inexistência de dimorfismo sexual dentro de *M. americana* a partir de testes com caracteres morfométricos de biometria corporal e morfometria craniana de machos e fêmeas adultos. Esse evento também tinha sido anteriormente relatado por Rossi (2000), a partir de caracteres morfométricos cranianos.

Na árvore de distância gerada com as medidas cranianas dos diferentes citótipos de *M. americana*, evidenciam-se dois clados, onde indivíduos pertencentes ao mesmo citótipo são agrupados em ambos clados, mostrando assim que existe uma variação individual nos caracteres morfométricos cranianos entre espécimes de *M. americana*, como citado por Rossi (2000). Nesse trabalho, o autor mostra através de análises de variância, que apenas as medidas comprimento da série molariforme superior e comprimento da série molariforme inferior não variam significativamente ao longo da distribuição da espécie. Da mesma maneira, é apontada a dificuldade na detecção de qualquer padrão de semelhança entre amostras de *M. americana* segundo os caracteres morfológicos cranianos, devido às frequências de ocorrência de um determinado caráter que foram discordantes das frequências de ocorrência de outros caracteres.

Os resultados das análises com morfologia e morfometria revelam que há ainda paralelismo morfológico entre as variantes de *M. americana*, o que descreve o desenvolvimento de características em linhagens que são estreitamente relacionados, provavelmente pela recentemente diversificação de seu último ancestral comum.

## 6.2 Citogenética

O polimorfismo cromossômico encontrado nos veados vermelhos é surpreendente, evidenciando altos níveis de variação cromossômica intra e inter específica. Assim, o topótipo segundo seu padrão cariotípico não se enquadra em nenhuma das variantes conhecidas do veado-mateiro no Brasil, reconhecendo assim, que essas variantes devem ser consideradas outras espécies distintas de *M. americana*, conforme as evidências citogenéticas.

Uma característica encontrada no topótipo, que é comum à espécie *M. americana* é o sistema sexual múltiplo XX/XY1/Y2, proposto por Neitzel (1987), que sugeriu que este sistema sexual foi produto de uma fusão X-autossômica. Esta fusão em tandem ocorreu na região telomérica do braço longo do cromossomo X e a região centromérica de um autossomo. O bloco de heterocromatina constitutiva do autossomo foi demonstrada pela ocorrência de bandamento C na região intersticial do braço longo do cromossomo X, mas segundo Ashley (2002), a segregação sempre é balanceada e se produzem dois tipos de gametas, um é o X portador da fusão com o autossomo e o outro é o Y original (Y1) e o autossomo não translocado (Y2).

No topótipo, os blocos de heterocromatina constitutiva tornam-se evidentes nos cromossomos do grupo A, mais tênues nos do grupo D e quase imperceptíveis no primeiro par do grupo E. Segundo Neitzel (1987), em cromossomos formados a partir de fusões em tandem, com o passar do tempo, as bandas C intersticiais vão diminuindo em tamanho até ficarem tão tênues que podem chegar a sumir completamente.

Como anteriormente relatado por Sarria-Perea (2004), as análises citogenéticas dos citótipos de *M. americana* revelam um processo intenso de evolução cromossômica. A reorganização cromossômica deve-se principalmente a fusões entre

cromossomos do grupo E para formar novos cromossomos e conseqüente diminuição do número diploide (ABRIL et al. 2010). Segundo o seu número diploide, é possível observar a aproximação do topótipo ao grupo dos indivíduos de Rondônia e Juína, os quais apresentam menor número cromossômico (RO 2n=42/43; NF= 46 e JU 2n=44/45; NF=48). No entanto, as mudanças cromossômicas que ocorreram para a formação dos citótipos de Rondônia e Juína, não são as mesmas envolvidas na formação cariotípica do topótipo de *M. americana*, (Tabela 6) evidenciando claramente o isolamento das populações, o qual também é confirmado geograficamente com a existência do Rio Amazonas no meio delas, atuando como uma grande barreira geográfica.

**Tabela 6.** Cromossomos envolvidos na diferenciação dos citótipos de *M. americana*.

<b>Cromossomo</b>	<b> fusão em tandem</b>	<b> fusão cêntrica</b>	<b> inversão pericêntrica</b>
SA1		PR4 + PR11	
JA1		PR2 + PR5	
JA2		PR4 + PR11	
CA3	PR10 + PR5		
JU1	PR5 + PR23	PR5 + PR18	
JU6	PR14 + PR17		
JU7	PR11 + PR22		
RO1	PR5 + PR23	PR5 + PR18	
RO4	PR11 + PR22 + PR8		
RO7	PR4 + PR17		
TP1	PR2 + PR7	PR2 + PR22	
TP2	PR23 + PR3	PR3 + PR24	
TP3			PR1

Onde SA= Santarén, JA= Jarí, CA= Carajás, JU= Juína, RO= Rondônia, TP= Topótipo.

Mediante o uso das técnicas de bandamentos cromossômicos, foram gerados resultados importantes para o estudo cariotípico de *M. americana*. A partir da comparação destes, foi possível ver que existe uma diferença cromossômica entre os

seis citótipos de *M. americana* e o topótipo, por meio de inversões pericêntricas, fusões em tandem e fusões cêntricas como relatado anteriormente por Saria-Perea (2004) e Abril et al. (2010). Uma comparação mais robusta foi feita a partir do citótipo Paraná, já que ele é considerado o mais ancestral por ter um número cromossômico maior. Partindo do ancestral hipotético de *M. americana* proposto por Abril et al. (2010), os rearranjos envolvidos na formação cariotípica do topótipo foram duas inversões pericêntricas, duas fusões em tandem e duas fusões cêntricas, evidenciando assim a proximidade cariotípica do topótipo com a linhagem de *M. americana* com maior número cromossômico (Paraná, Santarém, Jarí e Carajás).

A grande variação cromossômica encontrada em *M. americana* pode ser explicada segundo a teoria da fragilidade cromossômica proposta por Duarte e Jorge (1998), a qual induziria à ocorrência de quebras e trocas cromossômicas. Esses rearranjos cromossômicos poderiam levar a formação de novas espécies em um tempo relativamente curto após um isolamento geográfico. Vargas-Munar et al. (2010) evidenciaram a tendência do gênero *Mazama* à fragilidade cromossômica, ao comparar três espécies (*M. gouazoubira*, *M. nana* e *M. americana*) com a espécie *B. dichotomus*, observando que *M. gouazoubira* apresenta as maiores frequências de fragilidade cromossômica. As espécies *M. nana* e *M. americana* apresentaram menores frequências que *M. gouazoubira* mas maiores que *B. dichotomus*, corroborando assim a teoria da fragilidade cromossômica proposta por Duarte e Jorge (1998).

Os cromossomos B são elementos genômicos dispensáveis que estão presentes em aproximadamente 15% dos eucariontes e sua interação com o genoma do hospedeiro determina a sua frequência na população, sendo que de um modo geral, os cromossomos B são altamente dinâmicos, e a ocorrência de populações com e sem cromossomos B é comum. (NUR e HARMFUL, 1966). No topótipo, os cromossomos B não apresentaram variação, mostrando sempre três cromossomos em todas as metáfases analisadas, mantendo sempre um padrão de bandas e um padrão morfológico igual.

Fica claro que o animal aqui analisado não pertence à mesma espécie de qualquer um dos citótipos de *M. americana* já estudados no Brasil (DUARTE et al. 2008;

ABRIL et al. 2010), uma vez que o número de pares cromossômicos envolvidos nestas diferenças (3) certamente gera uma barreira reprodutiva pós- zigótica intransponível, por conta da esterilidade do híbrido, como comprovado por Salviano (2011) e Cursino et al. (2014) no mesmo complexo específico. Desta maneira, a citogenética é o argumento mais potente para a classificação das variantes geográficas do grupo ao nível de espécies. Sendo *M. americana* de Caiena a primeira descrição (Erleben, 1777), torna-se necessário agora a nomeação de todas as demais espécies que se mostrarem distintas deste topótipo.

### 6.3 Filogenia molecular

A partir das análises filogenéticas não foi possível obter uma completa concordância nas análises feitas com todos os marcadores, isso pode ter acontecido por causa do número amostral diferente em cada uma das análises e, ainda pelo fato dos indivíduos utilizados para cada análise não terem sido os mesmos.

Na árvore gerada pela análise do gene mitocondrial *Cit-b* é possível observar a presença das duas linhagens evolutivas, como já relatado por Carnellosi (2008), onde o topótipo está posicionado juntamente com os indivíduos do Paraná e Carajás, formando com eles um grupo monofilético. Além disso, as espécies *M. bororo* e *M. nana* se posicionaram no meio da árvore formando um clado entre elas, se agrupando mais proximamente as espécies do clado dos citótipos Rondônia e Juína, corroborando assim os resultados obtidos por Abril et al. (2010) e Duarte et al. (2008).

A árvore do gene *D-loop* mostrou uma definição muito mais clara das duas linhagens, mostrando o mesmo resultado obtido por Carnellosi (2008), já que foram utilizadas as mesmas amostras para fazer a análise comparativa com o topótipo. Uma das linhagens é formada por indivíduos de Paraná, Carajás e o topótipo e a outra formada por indivíduos de Rondônia, Juína e Jarí.

O resultado da análise concatenada dos dois fragmentos de mtDNA (*Cit-b* e *D-loop*), acompanhou os resultados obtidos nas análises feitas com os genes em separado, evidenciando as duas linhagens evolutivas para *M. americana*.

A análise dos genes nucleares apresentou-se um pouco restrita, impedindo uma comparação robusta do topotipo de *M. americana* com indivíduos desta mesma espécie provenientes de diferentes regiões geográficas do Brasil. Além das escassas, quase nulas, sequências publicadas desses genes nas bases de dados mundiais (“GenBank e BOLD Systems”), soma-se a dificuldade na sua amplificação e a qualidade do sequenciamento, apresentando frequentemente sobreposição de picos de fluorescência. Segundo Bensasson et al. (2001) estes podem sugerir a presença de pseudogenes, que dificultam, podendo até impossibilitar a utilização dos marcadores moleculares.

A árvore feita a partir do gene  $\alpha$ -*LAlb* não conseguiu diferenciar completamente as populações possivelmente devido ao escasso número de amostras ou também às escassas mutações e polimorfismo dentro das sequências como relatado anteriormente por Cronin et al. (1996), que utilizaram o gene da  $\alpha$ -*LAlb* em ruminantes das famílias Bovidae, Cervidae, Giraffidae e Antilocapridae e encontraram ausência de polimorfismo nos fragmentos.

Com o gene nuclear *IL16*, não foi possível separar nenhuma das populações, formando uma politomia com todos os indivíduos de *M. americana*, provavelmente produto das escassas mutações e polimorfismo.

Estes genes nucleares devem ser melhor avaliados para serem utilizados em estudos futuros, já que os resultados obtidos sugerem que estes marcadores não são adequados para reconhecer as relações evolutivas dentro das populações de *M. americana*.

Pagès et al. (2008), na tentativa de esclarecer a história evolutiva dos Ursidae, analisaram catorze genes nucleares para as oito espécies existentes de ursos. Os autores conseguiram propor algumas hipóteses filogenéticas, no entanto, a combinação de 14 fragmentos de genes nucleares não foi suficientemente informativa para esclarecer as relações entre todos os representantes da família Ursidae. Como acontece com a família Cervidae, a falta de resolução dessas incertezas taxonômicas é provavelmente causada pela rápida diversificação das espécies durante a sua história evolutiva.

#### 6.4. Validade do neótipo

A proposta de um neótipo da espécie *M. americana* a partir da descrição detalhada de um topótipo atual, abre grandes possibilidades para descrição de novas espécies dentro do gênero *Mazama*.

Um neótipo é um táxon nominal ao nível de espécie, designado quando não existe o exemplar tipo portador do nome (holótipo, lectótipo, sintipo ou neótipo prévio), e um autor considere necessário estabelecê-lo. (ICZN, 1999). O exemplar de *M. americana* analisado neste estudo não corresponde às “circunstancias excluídas” e cumpre com todas as condições exigidas pelo Código Internacional de Nomenclatura Zoológica vigente, detalhadas a seguir:

- “*Declaração de que se designa com o propósito expresso de esclarecer a posição taxonômica*”. Neste caso a designação do neótipo, torna-se imprescindível para realizar comparações e tomar decisões sobre quais das espécies incluídas no gênero podem ser consideradas válidas e quais não.
- “*Declaração dos caracteres que o autor considere distintivos o uma referência bibliográfica a essa declaração*”. Esses caracteres são definidos na introdução.
- “*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 introdução.
- “*Evidencia de que o neótipo concorda com o que se sabe do material tipo original*”. Neste caso o exemplar coletado (topótipo) se ajusta a descrição original de Erxleben (1777).
- “*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 na região de Regina, a 70 Km de Caiena na Guiana Francesa (localidade tipo registrada na descrição original da

espécie). Foi necessário o deslocamento até Regina, porque Caiena é uma região urbanizada, sendo muito difícil a coleta do espécime.

- “*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*”. Desde sua coleta (Fevereiro de 2015) o neótipo encontra-se depositado no museu do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos, NUPECCE, (FCAV, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, câmpus de Jaboticabal). O NUPECCE possui atualmente uma grande coleção de cervídeos neotropicais, em especial do gênero *Mazama*, sendo hoje um dos museus com maior acervo de exemplares deste gênero no mundo (aproximadamente 100 exemplares).

O espécime analisado será considerado, por enquanto, como topótipo e não neótipo, até que seja aceito pela Comissão Internacional de Nomenclatura Zoológica, após a publicação do artigo. Topótipos são espécimes da mesma localidade do material tipo (holótipo), não necessariamente coletado ao mesmo tempo e que não são posicionados oficialmente dentro do código de nomenclatura zoológica (WINSTON, 1999).

Este trabalho conseguiu confirmar a existência de espécies diferentes dentro dos veado-mateiro como proposto anteriormente por Duarte et al. (2008), Carnelossi (2008), Abril et al. (2010), Salviano et al. (2011), e Cursino et al. (2014), uma vez que o topótipo não enquadra com nenhuma variante até agora conhecida.

Esta é a primeira referência disponível na literatura com respeito ao estabelecimento de um neótipo para *M. americana*, sendo o ponto de partida para a descrição de novas espécies e possível mudança completa da nomenclatura do gênero *Mazama*.

## VII. CONCLUSÕES

Propõe-se um neótipo da espécie *M. americana*.

Descreve-se morfologicamente o topótipo de *M. americana*.

Não é possível diferenciar as espécies do complexo *M. americana* por meio dos caracteres morfológicos do corpo nem do crânio.

Apresentam-se os padrões citogenéticos da espécie.

Citogeneticamente o topótipo não se assemelha a nenhuma variante de *M. americana* descrita até hoje no Brasil.

Os rearranjos cromossômicos mais envolvidos na diferenciação cariotípica do complexo *M. americana* são fusões em tandem e fusões cêntricas.

Apresentam-se os padrões moleculares de fragmentos de DNA mitocondrial (*Cit-b*, *D-loop* e *COI*) e DNA nuclear ( $\alpha$ -*LAIb*, *IL16* e *MGF*) para a espécie.

Considera-se que o gene mitocondrial *D-Loop* foi o mais informativo para separar as populações de *M. americana*.

Os genes nucleares  $\alpha$ -*LAIb* e *IL16* não se mostraram informativos ao ponto de diferenciar as espécies do complexo *M. americana*.

As populações brasileiras (citótipos) hoje consideradas como *M. americana* não pertencem a esse táxon.

## VIII. REFERÊNCIAS

ABRIL, V. V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZALES, S., DUARTE J. M. B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic Genome Research**, v. 128, p. 177–187, 2010.

AKAIKE, H. Information theory and an extension of the maximum likelihood principle. In: PETROV, B.N. and CSAKI, F. (Eds). **Second international symposium on information theory. Budapest: Akadémiai Kiadó**, p. 267-281, 1973.

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

ASHLEY, T. X-Autosome translocations, meiotic sinapsis, chromosome evolution and speciation. **Cytogenet. Genome Res**, Basel, v. 96, p. 33-39, 2002.

BENSASSON, D.; ZHANG, D.; HARTL, D. L.; HEWITT, G. Mitochondrial pseudogenes: evolutions misplaced witnesses. **Trends in Ecology & Evolution**, v.16, n.6, p.314-321, 2001.

CABRERA A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia**, Argentina, v. 4, p. 309–732, 1960.

CARNELOSSI, E. A. G. Diferenças moleculares entre citótipos de *Mazama americana* (Artiodactyla: CERVIDAE). **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2008.

CHANDRA, H. S.; HUGENFORD, D. A.; WAGNER, J. Chromosomes of five artiodactyls mammals. **Chromosoma**, Berlin, v. 2, p. 211-220, 1967.

CRONIN, M. A.; STUART, R.; PIERSON, B. J.; PATTON, J. C. *K*-Casein gene phylogeny of higher ruminants (Pecora, Artiodactyla). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 6, p. 295–311, 1996.

CURSINO, M. S.; SALVIANO, M. B.; ABRIL, V. V.; ZANETTI, E. S; DUARTE, J. M. B. 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, 2014.

CUVIER, G. L. C. F. D. Zoologie. Mammifères. F. G. **Dictionnaire des Sciences Naturels**. Levrault, Paris, v. 7, p. 1-534, 1817.

CZERNAY, S. Die Spiesshirsche und Pudus: die Gattungen Mazama und Pudu A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt. **Die Neue Brehm-Bucherei Heft**. v. 581, 84pp, 1987.

DOBIGNY, G.; DUCROZ, J.; ROBINSON, T.; VOLOBOUEV, V. Cytogenetics and Cladistics. **Society of Systematic Biologists**, 2004.

DORADO-PÉREZ, G. Prácticas generales de bioquímica y biología molecular. Departamento de bioquímica y biología molecular. **Universidad de Córdoba**, España. Disponível em: <<http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biolmol/pdfs/47%20SECUENCIACI%C3%93N%20DNA.pdf>>, 2012.

DUARTE, J. M. B. Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 1992.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer, Jaboticabal, Brazil: **Funep and Gland**, Switzerland, IUCN. 393pp, 2010.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 17–22, out. 2008.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Análise citotaxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*). in: Duarte, J.M.B. Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil. 1998. 45 f. **Tese (Doutorado em Genética)** - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1998.

DUARTE, J. M. B.; JORGE, W. Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, Córdoba, v. 45, p. 281-287, 1996.

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

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. Taxonomia e Evolução. In: Duarte, J.M.B. (Ed.), **Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: *Blastocerus*, *Ozotoceros* e *Mazama***. Jaboticabal: FUNEP, cap.1, p. 1-21, 1997.

EISEMBERG, J. F.; REDFORD, K. M. Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. **The University of Chicago Press**, Chicago, v. 3, 609pp, 1999.

EISENBERG, J. F. The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation, in **Biology and management of the Cervidae**, p.60–64, Washington, D.C, 1987.

EMMONS, L. H. e FEER, F. Neotropical rainforest mammals. A field guide. (Second edition). **The University of Chicago Press**, Chicago. 307pp, 1997.

ERXLEBEN J. C. P. Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates cum synonymia et history animalium, Classis 1. **Mammalia. Impensis Weygandianis**, Lipsiae, p. 1-636, 1777.

FARRIS, J. S.; KLUGE, A. G.; ECKHART, M. J. Anumerical approach to phylogenetic systematic. **Systematic Zoology**, v. 19, 172-189, 1970.

FELSENSTEIN, J. **Confidence intervals on phylogenies: an approach using the bootstrap**. *Evolution*, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FISCHER, G. W. Tabulis synopticas illustrata, **Zoognosia**, p. 3-24, 1814.

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, v. 34, p. 157-174, 1990.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH, W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial Cytochrome C oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology And Biotechnologyn**, v. 3, p. 294-299, 1994.

FUTUYMA, D. J. **Biologia Evolutiva** 2ªEdição. Ribeirão Preto: FUNPEC – RP, 2002.

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

GONZALEZ, S.; ALVAREZ-VALIN, F; and MALDONADO, J. E. Morphometric differentiation of endangered pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with description of new subspecies from Uruguay. **Journal of Mammalogy**, v. 83, p. 1127–1140, 2002.

GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J. M. B.; MALDONADO, J. E. Molecular Phylogenetics and Evolution. In: Duarte, J.M.B.; Gonzalez, S. (Org.). **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal/Gland: Funep/IUCN, p. 12-17.2010.

GRIFFITHS, R.; TIWARI, B. Primers for the differential amplification of the sexdetermining region Y gene in a range of mammal species. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 2, n. 6, p. 405-406, 1993.

GRUBB P. Order Artiodactyla. In: **Mammal species of the world**. Second edition. D. E. Wilson and D. M. Reeder, eds]. Smithsonian Institution Press, Washington D.C, p. 377-414, 1993.

GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C. O. 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, 1969.

HALL, T.A. Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp**, v. 4, p. 95-98, 1999.

HAMMER Ø.; HARPER D.A.T.; RYAN P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. 4(1): 9pp. Disponível em: <[http://palaeo-electronica](http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm)>, org/2001\_1/past/issue1\_01.htm, **Palaeontologia Electronica**, 2001.

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

HENSEL, R. Beiträge zur Kenntniss der Säugethiere Süd-Brasiliens. **Abhandl. König. Akad. Wiss**, p. 1-130, 1872.

HERSHKOVITZ, P. Neotropical deer (Cervidae). Part I. Pudus, genus *Pudu* Gray. **Fieldiana, Zoology, news series**, v. 11, p. 1-86, 1982.

HIGGINS, D. G.; BLEASBY, A.J.; FUCHS, R. CLUSTAL V: improved software for multiple sequence alignment. **Comput. Appl. Biosci**, v. 8, p. 189-191, 1992.

HOTELLING, H. Review of the triumph of mediocrity in business, by Horace Secrist. **Journal of American Statistical Association**, v. 28, p. 463-5, 1933.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Y. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

HUELSENBECK, J.; RONQUIST, F. MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics**, v. 17, p. 754–755, 2001.

IUCN Red List Categories And Criteria. Disponível em: [http://jr.iucnredlist.org/documents/redlist\\_cats\\_crit\\_en.pdf](http://jr.iucnredlist.org/documents/redlist_cats_crit_en.pdf), 2000.

IUCN. IUCN Red List Threatened Species. IUCN Red List Unit, International Union for **Conservation of Nature and Natural Resources**, Cambridge, United Kingdom, 2016. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>.

JORGE W, BENIRSCHKE K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer *Mazama americana* temama (Cervidae, Artiodactyla) with probable non-Robertsonian translocation. **Cytologia**, v. 42 p. 711–721, 1977.

JULIÁ, J. P. e RICHARD, E. Management of brown brocket deer (*Mazama gouazoubira*) under conditions of strict control in Reserva Experimental Horco Molle (Tucumán, Argentina). **Deer Specialist Group News** v. 16, p. 8–9, 2001.

KIKKAWA, Y.; TAKADA, T.; SUTOPO.; NOMURA, K.; NAMIKAWA, T.; YONEKAWA, H.; AMANO, T. Phylogenies using mtDNA and SRY provide evidence for male-mediated introgression in Asian domestic cattle. **Animal Genetics**, Oxford, v. 34, n. 2, p. 96-101, 2003.

KOCHER, D.; THOMAS, W. K.; MEYER, A.; EDWARDS, S. V.; PAABO, S.; VILLABLANCA, F. X.; WILSON, A. C. Dynamics of mitochondrial DNA evolution in animals: amplification and sequencing with conserved primers. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. USA, Washington, v. 86, p. 6196-6200, 1989.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-219, 1964.

MARAN, M. L. H. Filogenia molecular de *Mazama americana* (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) como auxílio na resolução das incertezas taxonômicas. **Dissertação**

**(Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2016.

MERINO, M. L.; MILNE, N.; VIZCAÍNO, S. F. A cranial morphometric study of deer (Mammalia, Cervidae) from Argentina using three-dimensional landmarks. **Acta Theriologica**, v. 50, p. 91-108, 2005.

MILLER, F. W. Notes on some mammals of southern Mato Grosso, Brazil. **Mammal. Greensboro**, v.11, p.10-22, 1930.

MILLER, G. H., ALLEY, R. B., BRIGHAM-GRETTE, J., FITZPATRICK, J. J., POLYAK, L., SERREZE, M., WHITE, J. W. C. Arctic Amplification: can the past constrain the future? **Quaternary Science Reviews**, v. 29, p. 1779-1790, 2010.

MIRANDA-RIBEIRO, A. Os veados do Brasilsegundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista**, v. 11, p. 209-308, 1919.

MMA (Ministério do Meio Ambiente). Fragmentação de ecossistemas: causas, efeitos sobre a biodiversidade e recomendações de políticas públicas. **Secretaria de Biodiversidade e Florestas (SBF)**, Brasília, 2003.

NEITZEL, H. Chromosomenevolution in der Familie der Hirsche (Cervidae). **Bongo, Berlin**, v. 3, p. 27-38, 1979.

NEITZEL, H. 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, 1987.

NOWAK, R. M. Walker's Mammals of the World, Fifth Edition. **The Johns Hopkins University Press**, Baltimore and London, v. 1, p. 1-642, 1991.

NUR U. HARMFUL. B chromosomes in a mealy bug population, **Genetics**, v. 5, p. 1225–38, 1966.

OTAVIANO, A. R. Polimorfismo dos genes das caseínas e sua utilização na detecção de misturas de leite bovino bubalina. 2006. 82 p. **Tese (Doutorado em Produção Animal)**. Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista, 2006.

PAGÈS. M.; CALVIGNAC, S.; KLEIN, C; PARIS, M. HUGHES, S.; HANNI, C. Combined analysis of fourteen nuclear genes refines the Ursidae phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 47, p. 73-83, 2008.

PATAK, S.; STOCK, A. D. The X chromosome of mammals: karyological homology as revealed by banding techniques. **Genetics**, v. 78, p. 703-714, 1974.

POSADA, D.; CRANDALL, K. A. Modeltest: testing the model of DNA substitution. **Bioinformatics**, v. 14, p. 817–818, 1998.

ROSSI, R. V. Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla; Cervidae). **Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas)**. Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 174, 2000.

SALVIANO, M. B. Avaliação da existencia de Isolamento Reprodutivo entre distintos Citótipos de Veado-Mateiro (*M. americana*) por meio de machos híbridos. **Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Reprodução Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Press**, New York, 1989.

SARRIA-PEREA, J. A. Comparação entre alguns citótipos de *Mazama Americana* (Artiodactyla; Cervidae): Quão grande é a diferença entre eles? 2004. 41 f. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2004.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **TheLancet**, v. 1, p. 971-972, 1971.

SMITH, M. H.; BRANAN, W. V.; MARCHINTON, L.; JOHNS, P. E.; WOOTEN, M. C. Genetic and morphologic comparisons of red brocket and white tailed deer. **Journal of Mammalogy**, v. 67, p. 103-111, 1986.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

SWOFFORD, D. L. PAUP\*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (\*and Other Methods). Version 4.0b10. **Sinauer Associates**, Sunderland, 1999.

RAMBAUT, A. FigTree v1.3.1. **Computer program and documentation**. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>>, 2012.

ROBINSON, D. “Comparison of labeled trees with valency three,” **Journal of Combinatorial Theory**, v. 11, p. 105–119, 1971.

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

TAYLOR, K. M.; HUNGERFORD, D. A.; SNYDER, R.L. Artiodactyl Mammals: their chromosome cytology in relation to patterns of evolution. In: Benirschke, K. Comparative Mammalian Evolution. **Berlin: Springer Verlag**, p. 346-356, 1969.

THOMAS, O. On certain of the smaller South American Cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, London, v. 11, p. 585-589, 1913.

VARELA, D. M., TROVAT, I. R. G., GUZMAN, K. R., ROSSI, R. V., DUARTE, J. M. B. Red brocket deer *Mazama americana* (Erleben 1777), in: Duarte, J. M. B., González, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology**. IUCN/FUNEP, Jaboticabal, p. 151-159, 2010.

VARGAS-MUNAR, D. S. F. Relação entre fragilidade cromossômica e trocas entre cromátides irmãs com a variabilidade cariotípica de cervídeos brasileiros. **Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal)**. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2003.

VILÀ, C.; AMORIM I. R.; LEONARD, J. A.; POSADA, D.; CASTROVIEJO, J.; PETRUCCI-FONSECA, F.; CRANDALL, K. A.; ELLEGREN, H.; WAYNE, R. K. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2089-2103, 1999.

VISLOBOKOVA, I. The basic features of historical development and classification of the Ruminantia. **Paleontol**, v. 4, p. 3–14, 1990.

VON DEN DRIESCH, A. A guide to the measurement of animal bones from archeological sites, as developed by the Institut für Palaeoanatomie, Domestikations forschung und Geschichte der Tiermedizin of the University of Munich. **Peabody Museum Bulletin**, Cambridge, Massachusetts, v. 1, p. 35–37, 1976.

WANG, Q.; YANG, C. The Phylogeny of the Cetartiodactyla Based on Complete Mitochondrial Genomes. **International Journal of Biology**, v. 5, p. 30-36, 1998.

WARD, J. H. Hierarchical grouping to optimize an objective function, **Journal of the American Statistical Association**, v. 58, p. 236–244, 1963.

WEKSLER, M. Phylogeny of Neotropical oryzomyine rodents (Muridae: Sigmodontinae) based on the nuclear IRBP exon. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v. 29, n. 2, p. 331-349, 2003.

WEMMER, C. Deer, Status Survey and Conservation Action Plan. **IUCN, the World Conservation Union**, Gland, Switzerland, 1998.

WHITE, M. J. D. Os Cromossomos. **Cia. Editora Nacional**, São Paulo, 196pp, 1977.

WINSTON, J. E. Describing Species Practical Taxonomic Procedure for Biologist, **Columbia University Press**. Nova York, p. 541, 1999.

WOLD, S.; ESBENSEN, K.; GELADI, P. Principal Component analysis. **Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems**, v. 2, p. 37-52, 1987.

ZELDITCH, M. L; SWIDERSKI, D. H; SHEETS, D.; FINK, W. L. Landmarks. In: **Geometric Morphometrics for Biologists**, p. 23-50, 2004.

**Anexo 1.** “Landmarks” tridimensionais do topótipo de *Mazama americana* (coordenadas X, Y e Z). colocar o artigo completo de Erxleben, 1777 nos anexos também.

Landmark	X	Y	Z	Definição landmark	lado
1	89,87585337	11,63188198	15,05839078	Sutura maxilloincisiva sobre o margo interalveolaris	Esquerdo
2	67,13309419	27,76943976	15,36421458	Ponto mais dorsocaudal da sutura maxilloincisiva	Esquerdo
3	67,08020513	36,90964798	8,152337913	Incisura nasoincisiva	Esquerdo
4	59,98554819	-37,3322731	8,630698386	Sutura maxilloincisiva sobre a borda anterior da abertura nasal	Esquerdo
5	35,81514206	40,08620267	-12,524354	Sutura nasal maxilar	Esquerdo
6	27,09786015	43,05401925	13,68941376	Ponto tripartito entre os nasais, frontal y maxillar	Esquerdo
7	-12,5098968	39,30343433	-22,1941198	Sutura frontolacrimalis sobre a borda da fenestra antorbital	Esquerdo
8	-37,264454	21,78708141	25,66535306	Sutura maxilolacrimalis sobre a borda da fenestra antorbital	Esquerdo
9	25,12315938	-17,6392644	29,78823662	Ponto mais anterior da sutura zygomaticolacrimalis	Esquerdo
10	52,78405485	-12,427338	20,70485324	Margo dorsal do foramen infraorbitale	Esquerdo
11	51,00765609	7,136942893	19,99641329	Margo ventral do foramen infraorbitale	Esquerdo
12	52,89392476	1,228849176	16,64112332	Margo alveolare mesial do P2	Esquerdo
13	26,24623895	8,809838405	31,55179891	Margo interalveolaris entre P4 y M1	Esquerdo
14	9,257823172	13,79647033	31,38490708	Margo alveolare distal do M3	Esquerdo
15	-32,5006216	9,238352005	35,41334485	Origem m. masseter	Esquerdo
16	9,910826098	14,16787853	41,54116221	Sutura zygomaticomaxillaris sobre a crista facialis	Esquerdo

17	45,82687622	4,090719315	49,16605405	Borde caudal lateral da crista facialis sobre a sutura zygomaticotemporale	Esquerdo
18	26,11798174	22,74218753	45,23239561	Sutura zygomaticofrontalis sobre a borda da orbita	Esquerdo
19	1,290461759	37,80183202	26,00203691	Sutura frontolacrimalis sobre a borda da orbita	Esquerdo
20	7,874902627	18,95109554	36,20854343	Dacryon (sutura zygomaticolacrimalis sobre a borda da orbita)	Esquerdo
21	65,73667102	2,840308001	37,27447033	Incisura timpánica	Esquerdo
22	93,68974538	6,636886268	19,21785377	Sutura temporooccipitalis sobre a crista supramastoidea	Esquerdo
23	92,66760167	15,51785352	16,54326084	Ponto tripartito entre os Parietal, Temporal y occipital	Esquerdo
24	42,73637817	14,23552872	23,52489361	Ponto tripartito entre os Parietal, Temporal y alisfeoides	Esquerdo
25	13,9312679	43,34392144	17,08704444	Forâmen frontal	Esquerdo
26	68,67455984	43,20858823	23,08578291	Stephanion (interseção entre a Sutura coronalis e a linea temporalis)	Esquerdo
27	95,51940045	20,76692961	11,60218416	Interseção entre a sutura occipitoparietalis e a linea temporalis	Esquerdo
28	78,35915843	12,88068326	-28,3414234	Borde dorso-caudal do proceso paraoccipitalis	Esquerdo
29	87,93810585	13,93403881	9,750268657	Borde ventral do cóndilo sobre o foramen magnum	Esquerdo
30	85,51719853	25,99154338	9,611553079	Borde dorsal do cóndilo sobre o foramen magnum	Esquerdo
31	79,45436585	39,69417125	1,132565138	Ponto mais rostral sobre os Nasais	Esquerdo
32	17,11901496	1,321338842	38,43271802	Sutura zygomaticopalatina sobre a borda da fosa maseterica	Esquerdo
33	41,91727554	3,296113247	46,23138853	Sutura zygomaticopalatina sobre a borda da fosa maseterica	Esquerdo
34	50,31585854	1,874578446	39,83367297	Borde caudal medial da crista facialis sobre a sutura zygomaticotemporale	Esquerdo
35	39,21815494	1,250034893	19,82713818	Sutura temporal alisfeoides sobre a cavidad glenoidea	Esquerdo
36	38,53679019	11,52858888	9,079679832	Forâmen rotundum	Esquerdo

37	53,29124319	2,958443265	13,57261725	-	Forâmen ovale posterior	Esquerdo
38	60,69828992	6,722215319	24,01637007	-	Borde ventral do proceso retroarticular	Esquerdo
39	74,81191253	28,85529167	21,94355964	-	Ponta ventral do proceso paraoccipital	Esquerdo
40	76,56568763	14,65980334	11,47871053	-	Forâmen hipoglosso	Esquerdo
41	121,0065484	11,08101238	0,148448139	-	Prosthion (sutura interincisiva sobre linea media)	
42	74,38395877	20,85807283	0,780646575	-	Margo dorsal foramen magnum sobre línea media	
43	90,40815961	11,93893877	0,443808101	-	Margo ventral foramen magnum sobre línea media	
44	101,076927	-12,0511469	1,124896425	-	Opistocranium	
45	92,01899508	-25,1619562	0,852670526	-	Lambda (sutura occipitoparietalis sobre o plano sagital)	
46	52,74049439	-49,9956247	0,983724931	-	Bregma (sutura coronalis sobre o plano sagital.)	
47	10,85280789	-47,6017549	0,773669003	-	Nasion (sutura frontonasalis sobre o plano sagital)	
48	23,84324553	3,062732889	-0,11329216	-	Sutura palatino-maxillar sobre o plano sagital do paladar	
49	79,64788846	9,722337069	1,487036898	-	Sutura maxilloincisiva sobre o paladar	
50	89,13352204	11,32022224	14,22656264	-	Sutura maxilloincisiva sobre o margo interalveolaris	Direito
51	66,74604554	28,32439723	13,41546429	-	Ponto mais dorsocaudal da sutura maxilloincisiva	Direito
52	65,07472716	35,62113199	6,859670763	-	Incisura nasoincisiva	Direito
53	59,84347143	-36,6021616	7,984446353	-	Sutura maxilloincisiva sobre a borda anterior da abertura nasal	Direito
54	34,03022371	39,22359231	12,34959052	-	Sutura nasal maxilar	Direito
55	26,47844511	42,49981227	12,98575612	-	Ponto tripartito entre os nasais, frontal e maxillar	Direito
56	-8,30040095	41,02535934	22,28915405	-	Sutura frontolacimalis sobre a borda da fenestra antorbital	Direito

57	- 37,09469183	- 22,19715417	24,60229104	Sutura maxilolacrimalis sobre a borda da fenestra antorbital	Direito
58	- 24,27594895	- 18,26668573	30,03569639	Ponto mais anterior da sutura zygomaticolacrimalis	Direito
59	- 51,45846448	- 12,21817898	21,28925661	Margo dorsal do foramen infraorbitale	Direito
60	- 51,28638131	- 6,413836384	20,36323703	Margo ventral do foramen infraorbitale	Direito
61	- 53,16736741	- 1,17505805	15,93218129	Margo alveolare mesial do P2	Direito
62	- 26,45940229	- 10,18444553	31,49555251	Margo interalveolaris entre P4 e M1	Direito
63	- 8,002782254	- 14,6604665	32,20298343	Margo alveolare distal do M3	Direito
64	- -32,5006216	- 9,238352005	35,37124769	Origem m. masseter	Direito
65	- -10,0415391	- 14,85286445	42,43864516	Sutura zygomaticomaxillaris sobre a crista facialis	Direito
66	- 42,44066273	- 4,643043221	50,5553178	Borde caudal lateral da crista facialis sobre a sutura zygomaticotemporale	Direito
67	- 24,58412765	- 23,93596952	45,94730261	Sutura zygomaticofrontalis sobre a borda da orbita	Direito
68	- 2,056172163	- -38,7720392	25,95613481	Sutura frontolacrimalis sobre a borda da orbita	Direito
69	- 7,642620027	- 19,26222634	36,09196722	Dacryon (sutura zygomaticolacrimalis sobre a borda da orbita)	Direito
70	- 65,66733305	- 3,280897451	38,33162289	Incisura timpânica	Direito
71	- 91,01348247	- 4,858509078	20,56358135	Sutura temporooccipitalis sobre a crista supramastoidea	Direito
72	- 91,80827467	- 15,59818726	17,62975305	Ponto tripartito entre os Parietal, Temporal y occipital	Direito
73	- 41,66666308	- 13,71070651	24,05764484	Ponto tripartito entre os Parietal, Temporal y alisfeoides	Direito
74	- 14,73920619	- 43,21274948	16,52487894	Forâmen frontal	Direito
75	- 66,95568948	- 43,85274725	22,22996569	Stephanion (interseção entre a Sutura coronalis e a linea temporalis)	Direito
76	- 92,13561035	-	11,45073872	Interseção entre a sutura occipitoparietalis ea linea temporalis	Direito

		23,54239674			
77	78,76725689	11,41581641	28,37163774	Borde dorso-caudal do proceso paraoccipitalis	Direito
78	87,67208845	13,17009699	11,56672622	Borde ventral do cóndilo sobre o foramen magnum	Esquerdo
79	84,99117697	25,99069191	11,34423791	Borde dorsal do cóndilo sobre o foramen magnum	Esquerdo
80	78,37659901	40,70399019	0,870994879	Ponto mais rostral sobre os Nasais	Direito
81	17,06048948	2,087878962	39,4752812	Sutura zygomaticopalatina sobre a borda da fosa maseérica	Direito
82	40,94330327	4,953920295	46,03294554	Sutura zygomaticopalatina sobre a borda da fosa maseérica	Direito
83	49,55918168	2,682305668	38,92726409	Borda caudal medial da crista facialis sobre a sutura zygomaticotemporale	Direito
84	40,08457123	-0,88386801	19,34244336	Sutura temporal alisfeoides sobre a cavidad glenoidea	Direito
85	38,31582531	11,87189407	9,951460737	Forâmen rotundum	Direito
86	53,87654607	3,737035816	13,95862475	Forâmen ovale posterior	Direito
87	60,15146894	6,263499785	24,74877622	Borda ventral do proceso retroarticular	Direito
88	75,53647865	28,98368992	23,01248604	Ponta ventral do proceso paraoccipital	Direito
89	77,46074033	13,91045909	12,47713111	Forâmen hipoglosso	Direito

**Anexo 2.** Sequência nucleotídica do fragmento mitocondrial Citocromo Oxidase I (*COI*) para o topotipo analisado neste estudo.

-----AT-----TC---GGTGCTTGAGCAGGTATAGTAGGAACTGCCTTAAGCCTA  
CTAATCCGTGCTGAACTGGGNCNACCTGGA ACTCTACT—CGGAGATGATCA-----A  
ATTTATAATGT-AATTGT---AACTGCACATGCA-TTTGTAATGATTTTCTTTATAGTTAT  
GC—CAATTATAAT-TGGAGGAT—TCGGTAATTGACTTGTTCCATTAATAATTGGTGC  
TCCAG-----ATATAGCATTTCGCCGAATAAATAACATAAGCTTTTGACTTCTCCCTCCC  
TCTT-----TTCTATTGCTTCTAGCATCATCTATAGTTGAAGCCGGA---GCAGGGACAGG  
-----CTG---AACTGTTTATCCCCCTCTAGCTGGAAACCTAGCTCACGCGGGAGC-TTC  
AGTAGACTTAACTATTTTTTC---TCTTCATTTGGCGGGT-ATTTCTCGATTTTAGGAG  
CTATCAACTTTATTACAACAATTATCAATATAAAGCCTCCTGCCATATCACAGTATCA  
AACCCCTTTATTTGGATGATCTGTATTAATTACGGCCGTATTACTACTTCTCTCACTC  
CCCGTATTAGC----AGCTGGAATCACAATACTATTAACAGACCGAAATTT-----AAAC  
ACAACCTTTT-TCGATCCAGCAGGAGGC-GGAGATCCCATCCTATATCAACA-CCTG

**Anexo 3.** Sequência nucleotídica do fragmento nuclear fator de crescimento de mastócitos (*MGF*) para o topotipo analisado neste estudo.

TCCTGACAAAGGTAAGACATACAAGCATTCCCTAATATAAATGTA AAAAAGCAAGATTG  
AATCTTTTATGTGTAGGTAAGAATCTACTTCTGACTCAAATATATATGTAGATAGAAA  
AAAGACATGTGTGTGTGTATGTCTAATATAAAAAGCAAATATCAGTGGCATGAAAGAA  
AAAAACAGTTACATATCTGCTGGTGTTC AAGCCCAGACAACACTTAACCATCTTCAA  
AGTACAGAATTGCGCATGGGTAAATGATATATGAGATAGTCACTCATTTCACCTGA  
TATTTACCAGTAATATTACAATTACATTCTTCTTCACTTCCAGTCTTCTTAATGTCCCC  
TTCTCAAATCTTTTTCTTAAGGGTCTAACTCTGAGTCATGAATTCTCATCTTCACCAC  
CCTGTGCTGAGACTTCCTCCCCGCTACCATCCCTATGATACAAAATTTTAATTCATC  
ACTTATTTTGAAAAAGTGACCAATTGCCAACTGTTTGCATTATTTACATTTATAGCGG  
TGTAGACAGTGAATCTTTGTCCTGTAAGGTGACTTTGGTGAATTTCTTAATAAAAATA  
GAATAGCAGGACCCAGTATAAAAATAAATAGGATCTGAATAAATAGGATTTGGGAACA

GGCCTGGAAAGTACTCTGATATTGCACTTCACCTTTTGAGGACTCTTTAATTTATGT  
CGCCATGCAACACTGACACATTATTGCTTTCTATTTAGATTCCAGAGTCAGTGTCAC  
AAAACCATTTCTGTTACCCCCTGTTGCAGCCAGCTCCCTA

### Anexo 3. Démonstrations de l'absence du holotype de *M. americana*.

Information Holotype !!! Urgente !!!



Entrada x



**Lorena Cifuentes** <lorenacifuentesmvz@gmail.com>

01/07/15 ☆



para callou ▾

Madame Caillou,

Je suis Lorena, faisant actuellement un travail de recherche taxonomique sur l'espèce *Mazama americana*, décrite par Erxleben en 1777 à partir d'un spécimen de Cayenne en Guyane Française. Pour mon groupe de recherche, il est essentiel de trouver cet holotype, et dans le cas où il n'existe plus, nous pourrions en décrire un nouveau qui a déjà été collecté. Cependant, nous avons besoin de savoir rapidement si ce spécimen décrit en 1777 existe toujours, s'il est au **museum** ou s'il a été perdu.

Je vous remercie de votre collaboration pour cette information.

Cordialement,



**Cécile Callou** <callou@mnhn.fr>

03/07/15 ☆



para mim ▾



français ▾



português ▾

[Traduzir mensagem](#)

[Desativar para: français](#) x

Chère collègue,

Après vérification dans nos collections, nous n'avons pas de spécimen de *Mazama americana* antérieur à 1777. Le spécimen type ne paraît donc pas être dans les collections du Muséum de Paris. Bonne continuation dans vos recherches

bien cordialement,  
Cécile Callou



**Lorena Cifuentes** <lorenacifuentesmvz@gmail.com>

03/07/15 ☆



para Cécile ▾

Il est un animal appelé *Cervus rufus* déposée par F. Cuvier en 1817. Il est un mâle Guyane , par POITEAU (1822) et une féminine do Brésil, par Delalande, 1817.  
Je dois savoir comment l'échantillon est identifié , si l'animal a été caractérisé comme la nouvelle holotype de l'espèce *Mazama americana* , ou si elle est juste un topotype .



**Cécile Callou** <callou@mnhn.fr>

03/07/15 ☆



🔒 para mim ▾



français ▾ > portugês ▾ Traduzir mensagem

Desativar para: francês ×

Voici les spécimens anciens dans les collections.

*/Cervus rufus/*, femelle, collectée par Pierre-Antoine Delalande au Brésil en 1817 (MNHN-ZM-2014-41). Ce spécimen est noté "n°290-525" dans le catalogue de Rode

*/Cervus rufus/*, mâle juvénile, collectée par Pierre-Antoine Delalande au Brésil en 1817 (MNHN-ZM-2014-39)  
inscription sous le socle : "Faon du Guazou-pita Mâle azzara aquis sur échange à M. Temminck, mai 1822 / cet individu est un des deux qui a servi de type au *Moschus velicatus* (?) fr.Cuv

*/Cervus rufus/*, mâle juvénile, collecté par Pierre-Antoine Delalande au Brésil en 1816 (MNHN-ZM-2014-40)

Le spécimen mentionné par Rode sous le "n° 294-532" est mentionné dans le catalogue comme étant un */Mazama simplicicorni//s/*, collecté par M. Poiteau en Guyane en 1822

J'espère que ces éléments pourront vous aider



Mover para a Caixa de Entrada



Mais ▾

62 de aproximad

**Subject:** Mazama information

Dear Professor Colin Groves,

I am a PHD student, supervised by Professor Maurício Barbanti Duarte and my work involves collecting Mazama's paratopotypes for taxonomic revision by morphological, molecular and cytogenetic data.

I was surprised to learn that the holotype of Mazama Americana can not be Guyana, but its Suriname, according to his studies. I would ask if Mr. can assist me in finding this information so that we can collect material most likely region of the holotype of M. americana.

Glad to know you.

Not such a difference – Guyana and Suriname are, after all, neighbours!

The first description of *Mazama americana* was:

Erxleben, Jonann Christian Polycarp. 1777, *Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates: cvm synonymia et historia animalivm: Classis I. Mammalia*. Leipzig: Weygand.

On page 324 you will find the description (in Latin) of *Moschus americanus*. I am sending you separately a copy of this. You will see that he had not seen any specimens himself, but he refers to a number of authors as the basis for his description:

Des Marchais. He was a sea captain who wrote an account of his voyages, and I cannot find the third volume of this book anywhere on the web (only the first volume is available). But he does call it "Biche de Guinee" (the doe of Guinea) – I am not sure of the exact meaning of "Guinea" in those days, it probably does not mean the same as the modern Guyana, but probably includes all of the countries that used to be called British, Dutch and French Guiana. I will see if I can find any more.

Seba. He was a collector who had an enormous "Cabinet of curiosities" in the 1730s, and he produced a book called *Thesaurus* illustrating them. I possess a modern version of this, and I have found the picture, but it is no great help – it simply illustrates an ordinary red brocket, a neonate I think, and there seems no information about its origin. I will follow it up and see if I can find information, and I will let you know. It is, of course, perfectly possible that Des Marchais brought back a specimen of a brocket, and that Seba acquired it. I know that Linnaeus acquired some of Seba's specimens, but as he never mentioned it, I suppose in this case that he did not acquire the "Ceruula [=cervula] surinamenis". Probably this specimen of Seba's is now lost.

Klein, Brisson, etc. – the mention of Suriname suggests that they are basing themselves on Seba's plate.

I will continue trying to search for Des Marchais, as this was Erxleben's primary reference, but in the meantime it does rather look as if Suriname was the origin of the deer that formed the basis of his description.

Regards

yours

Colin Groves

---

Clique aqui para [Responder](#), [Responder a todos](#) ou [Encaminhar](#)

## Anexo 4. Permissão de coleta



PREFET DE LA REGION GUYANE

Direction de  
l'Environnement,  
de l'Aménagement  
et du Logement

Cayenne, le 25 NOV. 2014

Service Milieux  
Naturels, Biodiversité,  
Sites et Paysages  
2014-936  
PME Biodiversité, sites  
et paysages

Monsieur José Mauricio BARBANTI DUARTE,

Vous avez effectué le 4 septembre 2014 une demande de dérogation à la réglementation pour la capture, le prélèvement, le transport et la naturalisation de deux espèces : *Mazama americana* et *Mazama nemorivaga*.

La réglementation française interdit uniquement le transport hors de Guyane.

Les autorisations vous permettant ce transport vous seront envoyées d'ici la fin de l'année 2014.

Je vous prie d'agréer, Monsieur BARBANTI DUARTE, mes salutations distinguées.

[The 4 september 2014, you made a request for exemption to the regulation for capture, collection, transport and naturalization of two species : *Mazama americana* et *Mazama nemorivaga*.  
The French legislation prohibits only the transport out of French Guiana. Capture and collection do not require permit.  
Permits for the transport and naturalization will be sent by the end of 2014.  
Please accept, Sir BARBANTI DUARTE, sincerely.]

Le Chef du Service Milieux Naturels  
Biodiversité, Sites et Paysages

Arnaud KNSILLIN

José Mauricio BARBANTI DUARTE  
UNESP – NUPECCE  
Campus de Jabotical  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n  
14884-900 JABOTICABAL  
Brésil

Direction de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de la Guyane, Pointe Buzaré - BP 6003 - 97306 Cayenne  
CEDEX - téléphone : 0594 29 66 50 - télécopie : 0594 29 89 81 - Courriel : myriam.virevaire@developpement-durable.gouv.fr  
Adresse mail : mnsbp.deal-guyane@developpement-durable.gouv.fr



PREFET DE LA REGION GUYANE

Direction  
de l'Environnement,  
de l'Aménagement  
et du Logement

Service Milieux  
Naturels, Biodiversité,  
Sites et Paysages

Pôle Biodiversité,  
Sites et Paysages

**ARRETE n° 2014328-0018**

**portant autorisation de naturalisation et de transport de spécimens d'espèces animales protégées –  
BARBANTI DUARTE José Mauricio - NUPECCE**

LE PREFET DE LA REGION GUYANE  
CHEVALIER DE LA LEGION D'HONNEUR  
CHEVALIER DE L'ORDRE NATIONAL DU MERITE

- VU le Code de l'environnement, notamment ses articles L.411-1 à L.412-1, R.411-1 à R.411-14, et R.412-1 à R.412-7 ;
- VU le Code rural et de la pêche maritime et ses articles R. 214-87 à R. 214-137 ;
- VU la loi n° 46-451 du 19 mars 1946 érigeant en départements la Guadeloupe, la Martinique, la Guyane Française et La Réunion ;
- VU le décret n° 47-1018 du 7 juin 1947 relatif à l'organisation départementale et à l'institution préfectorale dans les nouveaux départements de la Guadeloupe, de la Martinique, de la Guyane et de La Réunion ;
- VU le décret n° 2010-146 du 16 février 2010 modifiant le décret n°2004-374 du 29 avril 2004 modifié relatif aux pouvoirs des préfets, à l'organisation et à l'action des services de l'État dans les régions et départements ;
- VU le décret n° 97-1204 du 19 décembre 1997 pris pour l'application au ministre chargé de l'environnement du 1° de l'article 2 du décret n° 97-34 du 15 janvier 1997 relatif à la déconcentration des décisions administratives individuelles ;
- VU le décret du 5 juin 2013 portant nomination du préfet de la région Guyane, préfet de la Guyane – M. Eric SPITZ ;
- VU l'arrêté ministériel du 15 mai 1986 fixant sur tout ou partie du territoire national des mesures de protection des mammifères représentés dans le département de la Guyane ;
- VU l'arrêté ministériel du 19 février 2007 fixant les conditions de demande et d'instruction des dérogations définies au 4° de l'article L.411-2 du code de l'environnement portant sur des espèces de faune et flore sauvages protégées ;
- VU l'arrêté ministériel du 26 novembre 2013 fixant les conditions et limites dans lesquelles des dérogations à l'interdiction de naturalisation de spécimens d'espèces animales protégées peuvent être accordées par les préfets ;
- VU l'arrêté ministériel du 30 janvier 2013 nommant Monsieur Denis GIROU, directeur de la Direction de l'Environnement, de l'Aménagement, et du Logement de Guyane ;
- VU l'arrêté préfectoral n°1025-2013 du 25 juin 2013 portant délégation de signature administrative et financière à Monsieur Denis GIROU, directeur de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement ;
- VU l'arrêté préfectoral n°2014134-0001 du 14 mai 2014 portant délégation de signature administrative et

financière à Monsieur ANSELIN chef du service Milieux naturels, Biodiversité, Sites et Paysages et à Madame DEBRIS Myriam adjointe au chef de service Milieux Naturels, Biodiversité, Sites et Paysages ;

VU la demande présentée par José Mauricio BARBANTI DUARTE pour le NUPECCE en date du 4 septembre 2014 ;

VU l'avis favorable émis par le Conseil scientifique régional du patrimoine naturel de Guyane consulté par courriel le 4 septembre 2014 ;

VU l'avis favorable émis par le Conseil national de protection de la nature le 8 octobre 2014;

VU l'absence d'observation à l'issue de la mise en ligne pour la participation du public au sujet de la demande sur le site Internet de la DEAL Guyane du 15 au 28 septembre 2014 inclus ;

**CONSIDERANT** que l'autorisation ne nuit pas au maintien des populations des espèces concernées dans leur aire de répartition naturelle ;

**CONSIDERANT** que la naturalisation est pratiquée à des fins de recherches scientifiques et de constitution de collections destinées à l'éducation du public sur les animaux de la faune sauvage ;

**SUR** proposition de Monsieur le Directeur de l'environnement, de l'aménagement et du logement de la Guyane.

## **ARRETE**

### **Article 1 : terminologie**

Au sens du présent arrêté, on entend par « spécimen » tout ou partie des espèces mentionnées à l'article 4.

### **Article 2 : objet de l'autorisation**

Le présent arrêté constitue une autorisation pour réaliser le transport et la naturalisation.

Le transport sera effectué du point de capture en Guyane vers : **UNESP – NUPECCE, Campus de Jaboticabal, Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane s/n, 14884-900 JABOTICABAL, Brésil.**

Les spécimens seront capturés en dehors de tout espace protégé en respectant une zone franche d'un kilomètre autour de ces espaces.

L'autorisation pour le transport est valable pour l'année 2015.

L'autorisation de naturalisation et d'exposition est valable sans limite de durée si les conditions particulières énoncés à l'article 5 sont respectées.

### **Article 3 : personnes autorisées**

Dr. José Mauricio BARBANTI DUARTE, NUPECCE (Nucleo Pesquisa e Conservação de Cervídeos), FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brésil.

Dra. Susana GONZALES, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable Facultad de Ciencias, UDELAR – Uruguay.

Dra. Vanessa VELTRINI ABRIL, NUPECCE, Campus de Jaboticabal, Brésil.

Dr. José Eduardo GARCIA, Centro Academico Vitoria, Universidade Fed. Pernambuco, Brésil.

Aline MEIRA BONFIM MANTELATTO, doctorante, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brésil.

Iara MALUF TOMAZELLA, doctorante, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brésil.

Louise Helena MARTINS MARAN, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brésil.

Janaina COSTA PERES, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brésil.

Mirela PELIZARO VALERI, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brésil.

Thais COELHO THOMAZINI, FCAV/UNESP, Campus de Jaboticabal, Brésil.

#### Article 4 : spécimens

NOM LATIN	QUANTITE	DESCRIPTION
<i>Mazama americana</i> Daguet rouge, Cariacou	1	Spécimen entier pour étude scientifique et naturalisation, comprenant des échantillons biologiques (tissus, os, peau, organes)
<i>Mazama nemorivaga</i> Petit daguet brun d'Amazonie	1	Spécimen entier pour étude scientifique et naturalisation, comprenant des échantillons biologiques (tissus, os, peau, organes)

#### Article 5 : conditions particulières

L'obtention des autorisations nécessaires de la part des propriétaires et/ou gestionnaires de terrain sur lesquels seront réalisés les captures.

Un rapport de mission devra être adressé au Directeur de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Guyane précisant les dates de capture, son origine géographique et les dates de naturalisation.

Les résultats d'études et l'ensemble des publications scientifiques ou parutions devront être transmis au Directeur de l'Environnement, de l'Aménagement et du Logement de Guyane qui transmettra au Conseil National du Patrimoine Naturel.

Dans le cadre de la mise en œuvre du Système d'Information sur la Nature et les Paysages (SINP) en Guyane, le titulaire s'engage à renseigner l'Inventaire des Dispositifs de Collecte sur la Nature et les Paysages (IDCNP) en collaboration avec le chargé de mission compétent à la DEAL Guyane.

#### Conditions particulières de naturalisation :

La naturalisation des spécimens doit être réalisée conformément aux prescriptions techniques suivantes :

- les procédés de tannage et de mannequinage doivent garantir la conservation pérenne du spécimen. A cette fin il convient de procéder à un tannage réel et non pas à un mégissage et le mannequin doit être réalisé selon la technique traditionnelle ou par sculpture d'un matériau polymère. L'armature doit être réalisée avec des matériaux et des procédés pérennes et correctement mis en œuvre ;
- le choix des matériaux de second œuvre tels que les yeux artificiels, les pâtes de comblement, les pigments et les peintures doivent également garantir la conservation pérenne du spécimen ;
- il doit y avoir une bonne adaptation entre le mannequin et la peau ;
- les proportions du spécimen doivent être respectées ;
- les caractéristiques biologiques de l'espèce à laquelle appartient le spécimen doivent être respectées y compris dans la scénographie ;
- les attitudes de l'animal, en particulier dans ses appuis, doivent être respectées ;
- les différentes étapes du travail de naturalisation et en particulier le tannage et le mannequinage à l'aide de matériaux polymères doivent être réalisées dans le respect de l'environnement avec mise en œuvre d'une filière d'évacuation des déchets biologiques et chimiques clairement identifiée ;
- les sous-produits animaux doivent être utilisés et détruits, après leur utilisation, dans les conditions prévues par la réglementation.

Les pièces naturalisées doivent être placées sur un socle indissociable sur lequel figure :

- de façon apparente, les noms vernaculaire et scientifique de l'espèce et la forme de protection juridique dont elle bénéficie ;
- sous le socle :
  - le nom du bénéficiaire de la dérogation à l'interdiction de naturalisation et la date de la dérogation ;
  - le lieu, la date de découverte du spécimen et, si elle est connue, la cause de la mort ;
  - le nom du taxidermiste ayant effectué la naturalisation et le numéro d'inscription de celui-ci au répertoire des métiers ou au registre du commerce ou à tout autre registre officiel dans le cas de pays étrangers ;
  - le numéro d'inventaire qui doit être reporté sur un registre d'inventaire de la collection où doivent figurer,

---

en face de chaque numéro, les noms vernaculaire et scientifique de l'espèce ainsi que l'origine du spécimen.

Lorsque les spécimens naturalisés sont inclus dans une collection destinée à l'éducation du public, ils doivent être présentés dans des conditions de scénographie respectant la biologie des espèces dans leur milieu et la réalité de la cohabitation des espèces entre elles, ou destinée à donner une information scientifique cohérente.

Les expositions permanentes de spécimens naturalisés doivent disposer de systèmes de protection des spécimens contre le vol, la destruction et les effets des rayonnements solaires et ultraviolets ainsi que de systèmes permettant le maintien de conditions de température et d'hygrométrie ambiantes compatibles avec leur conservation de longue durée.

**Article 6 : sanctions**

Sans préjudice des sanctions de toute nature prévues par les règlements en vigueur, toute infraction aux dispositions du présent arrêté peut entraîner la suspension ou la révocation, les bénéficiaires entendus, de la présente autorisation.

**Article 7 : publicité**

Le présent arrêté est notifié intégralement aux personnes listées à l'article 3 du présent arrêté.

**Article 8 : voies de recours**

Dans les deux mois à compter de sa notification – pour le tiers intéressé – ou, de sa publication – pour les personnes ayant intérêt à agir – au recueil des actes administratifs de la préfecture de la Guyane, le présent arrêté peut faire l'objet de recours amiable et contentieux :

- un recours gracieux est à adresser à M. le préfet de la région Guyane – Rue Fiedmond – BP 7008 – 97307 Cayenne Cedex.

- un recours hiérarchique est à adresser à Mme la ministre de l'Écologie du Développement Durable et de l'Énergie – Bureau des Contentieux – Arche Sud – 92055 La Défense CEDEX

- un recours contentieux est à adresser à M. le président du tribunal administratif – 7 rue Schoelcher – BP 5030 – 97305 Cayenne Cedex.

Tout recours amiable (recours gracieux et/ou hiérarchique) doit être adressé en recommandé avec accusé de réception.

L'exercice d'un recours amiable a pour effet d'interrompre le délai de recours contentieux. Le délai recommence à courir à compter de la réception du rejet explicite ou implicite (en l'absence de réponse de l'Administration au terme du même délai de deux mois, la décision est juridiquement qualifiée de rejet implicite).

**Article 9 : exécution**

Le secrétaire général de la Préfecture de la Guyane, le Commandant de Gendarmerie de la Guyane, le directeur de l'environnement, de l'aménagement et du logement de la Guyane, le délégué régional à l'outremer de l'Office National de la Chasse et de la Faune Sauvage, le Directeur de l'agriculture et de la forêt de la Guyane, le Directeur Régional des Douanes, sont chargés chacun en ce qui le concerne de l'exécution du présent arrêté, qui est publié au recueil des actes administratifs de la préfecture de la Guyane.

Fait à Cayenne le 24 NOV. 2014

Pour le Préfet, et par délégation  
Le chef du Service Milieux Naturels,  
Biodiversité, Sites et Paysages,



Arnaud ANSELIN