

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

**Análise citogenética e molecular do veado-roxo (*Passalites
nemorivagus*) do Brasil**

Raquel Mühlbeier Bonato

Médica Veterinária

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

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO VEADO-ROXO
(*Passalites nemorivagus*) DO BRASIL

Discente: Raquel Mühlbeier Bonato

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

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

B699a Bonato, Raquel Mühlbeier
Análise citogenética e molecular do veado-roxo (*Passalites nemorivagus*) do Brasil / Raquel Mühlbeier Bonato. --
Jaboticabal, 2025
91 p. : il., tabs., fotos, mapas

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

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Cervidae. 2. Filogeografia. 3. Cromossomos Polimorfismo.
4. Biodiversidade Conservação. I. Título.

Impacto potencial desta pesquisa

Este estudo aprofunda o conhecimento sobre a diversidade genética dos cervídeos neotropicais, com destaque para o veado-roxo, e se caracteriza pela abordagem inédita dos cromossomos B no grupo, ampliando a compreensão da evolução cromossômica em Artiodactyla. A pesquisa se insere em temas de relevância global, como evolução cromossômica, delimitação de espécies e conservação de mamíferos, e seus resultados têm potencial para integrar bases científicas internacionais e estimular parcerias com grupos estrangeiros especializados em citogenômica e filogeografia, fortalecendo o intercâmbio e a projeção da ciência nacional. Ao investigar espécies presentes em biomas brasileiros, este trabalho produz conhecimento diretamente aplicável à conservação da fauna nativa. Os dados obtidos podem apoiar instituições de pesquisa, órgãos ambientais e centros de conservação na construção de estratégias de monitoramento e manejo de populações de cervídeos, contribuindo para políticas públicas em nível regional e nacional. Além disso, a pesquisa se alinha aos Objetivos do Desenvolvimento Sustentável, especialmente no que se refere à proteção da vida terrestre, à preservação da biodiversidade e ao fortalecimento da capacidade científica. A clarificação taxonômica e o avanço na compreensão da variabilidade genética apresentados neste estudo são fundamentais para práticas sustentáveis de manejo e para a conservação de ecossistemas ameaçados, reforçando a importância do conhecimento científico para a gestão da biodiversidade.

Potential Impact of this Research

This study deepens the understanding of genetic diversity in Neotropical deer, with emphasis on the Amazonian brown brocket deer, and is characterized by the unprecedented investigation of B chromosomes in the group, expanding knowledge on chromosomal evolution in Artiodactyla. The research addresses topics of global relevance, such as chromosomal evolution, species delimitation, and mammal conservation, and its results have the potential to integrate international scientific databases and stimulate collaborations with foreign research groups specializing in cytogenomics and phylogeography, thereby strengthening scientific exchange and enhancing the visibility of national research. By examining species found in Brazilian biomes, this work generates knowledge directly applicable to the conservation of native fauna. The data obtained can support research institutions, environmental agencies, and conservation centers in developing strategies for monitoring and managing deer populations, contributing to public policies at regional and national levels. Furthermore, the study aligns with the Sustainable Development Goals, particularly those related to terrestrial life protection, biodiversity conservation, and the strengthening of scientific capacity. The taxonomic clarification and advances in understanding genetic variability presented here are essential for sustainable management practices and for the conservation of threatened ecosystems, reinforcing the importance of scientific knowledge in biodiversity management.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO VEADO-ROXO
(Passalites nemorivagus) DO BRASIL

AUTORA: RAQUEL MÜHLBEIER BONATO

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

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

Documento assinado digitalmente
 **JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE**
Data: 06/11/2025 22:54:36-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

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

Documento assinado digitalmente
 **ANA CAROLINA D OLIVEIRA PAVAN**
Data: 04/11/2025 17:41:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Pesquisadora Dra. ANA CAROLINA D OLIVEIRA PAVAN (Participação Virtual)
Instituto Tecnológico Vale, Genômica Ambiental / Belém/PA

Documento assinado digitalmente
 **DIOGO TERUO HASHIMOTO**
Data: 05/11/2025 08:12:32-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Prof. Dr. DIOGO TERUO HASHIMOTO (Participação Virtual)
Centro de Aquicultura UNESP / Jaboticabal/SP

Jaboticabal, 04 de novembro de 2025.

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Raquel Mühlbeier Bonato – Nascida em 26 de janeiro de 1998, na cidade de Toledo, PR, Brasil. Graduada em Medicina Veterinária em julho de 2022, pela Faculdade Estadual do Centro-Oeste (UNICENTRO), campus Cedeteg, em Guarapuava, PR. Foi bolsista de Iniciação Científica no Laboratório de Doenças Infecciosas e Parasitárias (LADIP) pela Fundação Araucária. No mesmo laboratório, participou como executora de Prestação de Serviço Extensionista entre 2019 e 2021. Foi bolsista de Treinamento Técnico nível 3 (TT-3) pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), de outubro a dezembro de 2022. Ingressou no mestrado em janeiro de 2023 no Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, da Universidade Estadual Paulista, campus Jaboticabal, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte. Foi bolsista de mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES; 01/2023 – 03/2023) e pela FAPESP (04/2023 - 07/2025). Durante a execução deste trabalho, usufruiu de Bolsa Pesquisa Estágio no Exterior (BEPE), desenvolvendo parte da pesquisa no Veterinary Research Institute em Brno, República Tcheca, do período de agosto de 2024 a janeiro de 2025.

Epígrafe

Como é bom chegar a este ponto de olhar em torno e se sentir maior e mais orgulhoso
porque já conhece outras vidas...

Como é bom se lembrar da viagem, dos primeiros dias na cidade,

Da primeira vez que olhou o mar, da impressão de atordoamento.

Como é bom olhar para aquelas bandas e depois comparar.

Ver que está tão diferente, e que já sabe tantas novidades...

Como é bom ter vindo de tão longe, estar agora caminhando

Pensando e respirando no meio de pessoas desconhecidas

Como é bom achar o mundo esquisito por isso, muito esquisito mesmo

E depois sorrir levemente para ele com os seus mistérios...

Que coisa maravilhosa, exclamar. Que mundo maravilhoso, exclamar.

Trecho do poema "Olhos parados" de Manoel de Barros

Dedicatória

Dedico este trabalho ao meu Deus,
Criador de todas as coisas,
Que me mostra constantemente a beleza em sua Criação.
Que me adotou como filha,
E me mostrou que o amor, alegria, força e provisão vêm dele.
Que esteve comigo e nunca deixou eu me sentir só,
Que me deu um propósito para viver.
Nada do que sou, tenho ou faço é por mim mesma,
Pois dele, por Ele e para Ele são todas as coisas.
Dele é a Glória para sempre.

AGRADECIMENTOS

Da mesma forma que dedico este trabalho a Deus, também preciso agradecê-lo em primeiro lugar. Sou grata por ter me conduzido até aqui e por me presentear com experiências e crescimento sempre muito maiores do que eu poderia pedir ou imaginar.

Registro minha sincera gratidão ao meu orientador, Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, cuja trajetória consolidada na conservação de cervídeos no Brasil sempre representou uma referência científica para mim. Agradeço por ter-me acolhido no NUPECCE, pela oportunidade de desenvolver este trabalho sob sua orientação e pelo suporte científico e intelectual que tanto contribuíram para a minha formação.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento do meu projeto de mestrado e de intercâmbio, processos nº 2022/14370-3 e 2024/06211-8, bem como pelo contínuo apoio científico e financeiro ao NUPECCE, que tem possibilitado a realização de pesquisas de excelência e a justa valorização de inúmeros colegas

Agradeço à minha mãe Tatiane, que mesmo com seu instinto mamãe coruja sempre me apoia em todas as minhas decisões loucas - que geralmente envolvem eu ir para bem longe. Que fica feliz quando estou feliz, me acalma e escuta quando estou triste (mesmo a mais de 9 mil quilômetros de distância), e sempre me recebe de braços abertos quando volto para casa.

Agradeço ao meu pai André, por seu interesse nos meus interesses, por me apoiar e me estimular a crescer, e por acreditar em mim quando muitos não o fazem.

Agradeço as minhas irmãzinhas Júlia e Malu, que me encham de orgulho e alegria, me matam de saudade, e são um estímulo a tentar ser a irmã mais velha mais legal do mundo.

Agradeço às minhas avós Angelina e Marina, por serem meu refúgio graças aos seus infinitos mimos. Agradeço ao meu avô Sady pela sua luz e bom humor que sempre encheu meu coração de alegria, e que é o motivo da minha maior saudade – aquela que não será sanada. Você estará na minha memória pra sempre.

Agradeço à minha tia Jô, ao meu cunhado Gabriel, e ao meu primo Davi pelas risadas e conversas descontraídas nos encontros de família.

Agradeço à minha tia Vânia, minha referência de mulher pesquisadora e profissional de excelência, e a que mais comemora nas minhas pequenas vitórias acadêmicas, por realmente entender o que cada uma delas significam.

Agradeço à minha “filha” felina Leia, por não deixar de me amar mesmo quando fui para longe, e sempre me receber com muitos ronrons e fofura quando retorno.

A todos os meus colegas nupeccianos, deixo também meu profundo agradecimento. Sem as relações que pude cultivar no NUPECCE, dentro e fora do laboratório, minha experiência não teria sido tão boa e memorável. Obrigada pelas discussões científicas, pelos cafés da tarde com bolo, pelas conversas no RU, pelas confraternizações e parcerias.

Agradeço à Agda, Eluzai, e Pedro pelos ensinamentos, inúmeras ajudas e paciência. Sem vocês meu trabalho teria sido muito mais difícil. Obrigada Lola, Bianca e Juan por além de colegas de trabalho, serem meus companheiros de Brookes, desabafos e treinos. À Laís, Valdir, Bruno e Jeferson pela amizade e bons momentos. À Eveline, Luciana, Chico, Eduard e Mariana, obrigada pela parceria. À IC Giulia por ter paciência com essa mestrandia meio maluca aqui. Um agradecimento especial também ao João, nosso técnico de laboratório por sua ajuda inestimável e paciência invejável.

Agradeço às pesquisadoras do Veterinary Research Institute (VRI) na República Tcheca: Miluse, Halina, Svatava, Vera, Petra e Ivana por me receberem de braços abertos, me mostrarem sua cultura e costumes, e por sua parceria científica inestimável - *Moc děkuji!*

Agradeço às minhas amigas e irmãs de coração Gabrieli e Kettlen, que mesmo à distância são minhas confidentes e apoiadoras, dos assuntos mais sérios aos mais bobos. E à Beatriz e Paula, pelas conversas leves e descontraídas que muitas vezes alegram meus dias.

Agradeço às minhas roommates Nicole e Thalia pelos bons momentos e convivência em casa, vocês são incríveis.

Agradeço a todos que passaram pela minha vida nesses anos de mestrado e que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento pessoal e profissional.

SUMÁRIO

RESUMO.....	IV
ABSTRACT	V
CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. A FAMÍLIA CERVIDAE.....	3
2.2 OS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS – UMA ABORDAGEM GENÉTICA	6
2.3 A ESPÉCIE <i>Passalites nemorivagus</i> (CUVIER, 1817)	13
3 OBJETIVO GERAIS.....	18
4 REFERÊNCIAS.....	19
CAPÍTULO 2 - ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO VEADO-ROXO (<i>PASSALITES NEMORIVAGUS</i>) DO BRASIL.....	27
RESUMO	27
ABSTRACT	28
1 INTRODUÇÃO	29
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAL E MÉTODOS	31
3.1. INDIVÍDUOS E AMOSTRAS.....	31
3.2 CITOGENÉTICA	32
3.2.1 Cultivo Celular de Fibroblastos e Preparações Cromossômicas	32
3.2.2 Sondas	34
3.2.3 Hibridização <i>in situ</i> fluorescente.....	35
3.3 GENÉTICA MOLECULAR.....	37
3.3.1 Obtenção das sequências de DNA	37
3.3.2 Amplificação e sequenciamento de genes mitocondriais	37
3.3.3 Análise Molecular por DNA mitocondrial	38
3.3.4 Delimitação Molecular de Espécies.....	40
3.3.5 Distância genética.....	41
3.3.6 Rede de haplótipos	42
4 RESULTADOS	43
4.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA	43
4.2 ANÁLISE MOLECULAR	46
5 DISCUSSÃO	52
5.1 CITOGENÉTICA	52
5.2 GENÉTICA MOLECULAR.....	55
5.3 REVISÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE <i>P. nemorivagus</i>	58
6 CONCLUSÃO	60
7 REFERÊNCIAS	61
CAPÍTULO 3 - COMPARATIVE STUDY OF B CHROMOSOMES IN NEOTROPICAL DEER	68
ABSTRACT	68
1 INTRODUCTION	69
2 OBJECTIVES.....	72
3 METHODOLOGY	72
3.1. MATERIAL	72
3.2. CHROMOSOME PREPARATION AND MICRODISSECTION OF Bs.....	73

3.3.	<i>PREPARATION OF FISH PROBES AND FISH ANALYSIS</i>	74
3.4.	<i>CLONING AND SEQUENCING</i>	74
4	RESULTS AND DISCUSSION	75
4.1.	<i>MICRODISSECTED BS AND FISH</i>	75
4.2.	<i>B CHROMOSOMES SEQUENCING</i>	80
4.2.1.	<i>Assembly</i>	80
4.2.2.	<i>RepeatMask</i>	82
4.2.3.	<i>BLAST</i>	82
5	CONCLUSIONS	87
6	REFERENCES	88

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 16 de maio de 2019.

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

ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO VEADO-ROXO (*Passalites nemorivagus*) DO BRASIL

RESUMO

A família Cervidae, a segunda mais diversa da ordem Artiodactyla, destaca-se pela ampla variabilidade cromossômica, o que torna várias de suas espécies modelos relevantes para estudos evolutivos. Na região Neotropical, os cervídeos florestais brasileiros (gêneros *Mazama*, *Subulo* e *Passalites*) apresentam notável polimorfismo cromossômico associado à elevada convergência morfológica, fatores que dificultam a delimitação e o reconhecimento de espécies. Um aspecto citogenético particular dos cervídeos neotropicais florestais é a presença de cromossomos B, que foram descritos em apenas outras duas espécies de cervídeos do mundo (*Capreolus pygargus* e *Moschus sibiricus*), e até o momento foram pouco estudados, limitando a discussão e o avanço do conhecimento neste tópico. Além disso, o veado-roxo (*P. nemorivagus*) apresenta variações cromossômicas e uma estruturação filogeográfica em quatro clados distintos, achados que levam à hipótese de a espécie representar um complexo críptico. Neste contexto, técnicas de citogenética molecular, como a Hibridização *in situ* fluorescente (FISH), e de genética molecular, como as análises de DNA mitocondrial e nuclear, são essenciais na compreensão da diversidade do táxon. O presente trabalho teve como objetivos: (i) mapear as variações cromossômicas de *P. nemorivagus* e investigar sua associação com dados genéticos obtidos a partir de DNA mitocondrial; e (ii) analisar a composição dos cromossomos B em *Mazama juncunda* e *P. nemorivagus*, por meio de FISH e sequenciamento, estendendo as análises comparativas a diferentes espécies de cervídeos neotropicais. Os resultados contribuem para o entendimento da evolução cromossômica e para o esclarecimento das relações taxonômicas no grupo.

Palavras-chave

Cervidae, Filogeografia, Polimorfismo cromossômico, Cromossomos B

CYTOGENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF AMAZONIAN BROWN BROCKET DEER (*Passalites nemorivagus*) FROM BRAZIL

ABSTRACT

The family Cervidae, the second most diverse in the order Artiodactyla, is notable for its wide chromosomal variability, making several of its species relevant models for evolutionary studies. In the Neotropical region, Brazilian forest deer (genera *Mazama*, *Subulo*, and *Passalites*) exhibit notable chromosomal polymorphism associated with high morphological convergence, factors that hinder species delimitation and recognition. A particular cytogenetic aspect of Neotropical forest deer is the presence of B chromosomes, which have been described in only two other deer species worldwide (*Capreolus pygargus* and *Moschus sibiricus*) and have been little studied to date, limiting discussion and the advancement of knowledge on this topic. Furthermore, the Amazonian brown brocket deer (*P. nemorivagus*) exhibits chromosomal variations and a phylogeographic structure in four distinct clades. These findings lead to the hypothesis that the species represents a cryptic complex. In this context, molecular cytogenetic techniques, such as fluorescence in situ hybridization (FISH), and molecular genetics, such as mitochondrial and nuclear DNA analyses, are essential for understanding the taxon's diversity. Therefore, the present study aimed to: (i) map the chromosomal variations of *P. nemorivagus* and investigate their association with genetic data obtained from mitochondrial DNA; and (ii) analyze the composition of B chromosomes in *Mazama jucunda* and *P. nemorivagus* using FISH and sequencing, extending the comparative analyses to different Neotropical deer species. The results contribute to the understanding of chromosomal evolution and to clarifying the taxonomic relationships within the group.

Keywords

Cervidae, Phylogeography, Chromosome polymorphism; B chromosomes

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1 INTRODUÇÃO GERAL

A família Cervidae é constituída por animais ungulados pertencentes à ordem Artiodactyla, subordem Ruminantia (Zurano et al., 2019). Os cervídeos Neotropicais, alocados na subfamília Capreolinae, tribo Odocoileini, se diversificaram rapidamente na América do Sul há cerca de 2,5 milhões de anos, originando ainda as subtribos Odocoileina e Blastocerina (Heckeberg et al., 2016; Heckeberg, 2020). Dentro das subtribos são reconhecidas duas formas morfológicas principais, diferenciadas principalmente pelo tamanho dos animais: veados de médio a grande porte (gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus*), e veados de médio a pequeno porte (gêneros *Pudu*, *Pudella*, *Bisbalus*, *Mazama*, *Subulo* e *Passalites*) (González e Duarte, 2020).

Estudos recentes sugerem que os chifres simples nos cervídeos representem o estado ancestral, a partir da qual estruturas de chifres mais complexas evoluíram (Samejima e Matsuoka, 2020; Oliveira et al., 2025). Dentre os cervídeos florestais da região Neotropical, três gêneros têm ocorrência no Brasil: *Mazama*, *Subulo* e *Passalites*. Apesar da alta similaridade morfológica entre os táxons, é vista uma grande diferença genética principalmente no gênero *Mazama*, refletida tanto em nível cromossômico, por meio de rearranjos frequentes, quanto em nível molecular, por meio de polimorfismos nas sequências de DNA (Duarte et al., 2008; Heckeberg et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020).

Um aspecto citogenético particular dos cervídeos neotropicais florestais é a presença de cromossomos B, que foram descritos em apenas outras duas espécies de cervídeos do mundo (*Capreolus pygargus* e *Moschus sibiricus*) (Neitzel, 1987; Sokolov e Prikhod'ko, 1998). Por serem considerados cromossomos supranumerários, até o momento foram pouco estudados, limitando a discussão e o avanço do conhecimento neste tópico.

Além disso, o veado-roxo (*P. nemorivagus*), presente na Floresta Amazônica e Mata Atlântica, apresenta variações cromossômicas e uma estruturação filogeográfica em quatro clados distintos, correlacionados a diferentes regiões (Oliveira et al., 2020;

Morales-Donoso et al., 2023). Esses achados levam à hipótese de a espécie seja na verdade um complexo críptico de espécies.

Neste contexto, técnicas de estudo como a citogenética molecular juntamente com análises do DNA tornaram-se chave nas resoluções taxonômicas entre grupos (Peres et al., 2021; Bernegossi et al., 2022a, 2024). As análises moleculares de DNA são essenciais para a elucidação das relações filogenéticas entre táxons (Escobedo-Morales et al., 2016; Heckeberg, 2020). Paralelamente, a citogenética molecular tem se mostrado uma ferramenta crucial na identificação de variações cariotípicas entre populações de espécies próximas, as quais podem refletir barreiras reprodutivas significativas (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021).

Por meio de técnicas como a Hibridização in situ Fluorescente (FISH) e do uso de sondas derivadas de clones BAC bovinos, a citogenética molecular tem sido utilizada para identificar rearranjos cromossômicos entre diferentes espécies de cervídeos neotropicais, contribuindo para a compreensão das relações entre os táxons e sua rápida evolução cromossômica (Ferguson-Smith; Trifonov, 2007; Graphodatsky; Trifonov; Stanyon, 2011; González; Duarte, 2020; Bernegossi et al., 2022a). Graças a esta metodologia, foi possível elaborar o mapa cariotípico de *S. gouazoubira*, espécie que reteve o cariótipo ancestral dos cervídeos neotropicais ($2n = 70$), utilizando 108 sondas BAC (Bernegossi et al., 2022b). Com base nesse mapa, outros estudos de mapeamento cariotípico foram realizados em indivíduos de diferentes espécies, como o topótipo de *P. nemorivagus* (Morales-Donoso et al., 2023).

No campo da genética molecular, os métodos de delimitação de espécies baseados em coalescência, como o GMYC (*Generalized Mixed Yule-Coalescent*) e o PTP (*Poisson Tree Processes*), têm se mostrado eficazes na identificação de linhagens evolutivamente significativas e de unidades moleculares que representem espécies em potencial (Floyd et al., 2002; Esselstyn et al., 2012; Abreu et al., 2025). Uma das principais vantagens desses métodos está na capacidade de testar hipóteses alternativas de independência evolutiva por meio da aplicação de modelos probabilísticos. Estas técnicas contribuem para o aumento do rigor estatístico e da objetividade nos processos de delimitação taxonômica (Fujita et al., 2012; Fujisawa e Barraclough, 2013; Dellicour e Flot, 2015).

Assim, técnicas de citogenética molecular e de genética molecular, quando abordadas em conjunto, são essenciais na compreensão da relação entre os táxons e das alterações cromossômicas estruturais com a especiação dos cervídeos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A FAMÍLIA CERVIDAE

A ordem Artiodactyla representa um exemplo impressionante de radiação adaptativa, pois compreende, até o momento, 23 famílias e mais de 330 espécies (IUCN, 2018). Dentro dela, a subordem Ruminantia (Tragulida + Pecora) se diversificou rapidamente durante a transição Oligoceno-Mioceno em diferentes famílias: Antilocapridae, Giraffidae, Cervidae, Moschidae e Bovidae (Zurano et al., 2019). A família Cervidae é também dividida em duas subfamílias: Capreolinae (tribos Alceini, Capreolini, Odocoileini e Rangiferini), e Cervinae (tribos Cervini e Muntiacini) (Gilbert et al., 2006; Heckeberg et al., 2016; Zurano et al., 2019; Heckeberg, 2020).

Estudos apontam que os primeiros representantes de Cervidae surgiram em florestas tropicais da Europa no início do Mioceno, há cerca de 15 milhões de anos (mya) (Heckeberg, 2017; Mennecart et al., 2017). Através do Estreito de Bering, os cervídeos teriam chegado à América do Norte por volta de 5 mya, na transição do Mioceno-Plioceno. Posteriormente, com a formação do istmo do Panamá, estes expandiram sua distribuição para a América do Sul, processo que ocorreu na transição do Plioceno-Pleistoceno, há cerca de 2,5-3 mya (Webb, 2000).

Os cervídeos representam o segundo grupo mais diverso entre os ruminantes, englobando espécies amplamente distribuídas e adaptadas a distintas zonas climáticas, dos trópicos às regiões árticas, e a uma variedade de habitats, incluindo tundras, pradarias, pântanos, florestas, bosques e ecótonos (Mattioli, 2011). Como consequência, quando considera-se a família como um todo, nota-se intensa variação morfológica, com animais de até 2,3 metros de altura e pesando 700kg (*Alces alces*), até animais de 25 cm de altura e 5kg (*Pudella mephistophiles*) (Escamilo et al., 2010; Niedziałkowska et al., 2022; Barrio et al., 2024). Uma característica fenotípica única da família é a presença de um par de chifres nos machos, estruturas ósseas que se

desenvolvem a partir do osso frontal e são periodicamente perdidas e regeneradas. A exceção é a espécie *Hydropotes inermis*, na qual ambos os sexos são desprovidos de chifres, apresentando, em contrapartida, caninos superiores alongados (Merino e Rossi, 2010; Heckeberg et al., 2016).

Como herbívoros, os cervídeos exercem um papel fundamental na dinâmica ecológica, contribuindo diretamente para a manutenção da estrutura e da biodiversidade dos ecossistemas (Gordon et al., 2004). Contudo, grande parte das espécies apresenta populações em declínio devido a ameaças crescentes, como as mudanças climáticas, a intensificação das atividades humanas e a disseminação de doenças (Linnell et al., 2020). Além disso, observa-se uma disparidade na quantidade de informações disponíveis entre os representantes desta família: enquanto espécies como *Cervus elaphus*, *Odocoileus hemionus*, *O. virginianus* e *Rangifer tarandus* são amplamente estudadas, outras, como os cervídeos neotropicais florestais, ainda carecem de dados sobre aspectos ecológicos, genéticos, fisiológicos e morfológicos, o que compromete o desenvolvimento de estratégias eficazes de conservação (Heckeberg et al., 2016; González et al., 2018; IUCN, 2025).

Um aspecto marcante dos cervídeos é sua filogenia complexa de difícil resolução (Hu et al., 2019). Inicialmente baseada em características morfológicas, a sistemática do grupo apresentou divergências entre hipóteses publicadas, devido ao uso de diferentes matrizes de caracteres e metodologias pouco definidas, o que dificultava a avaliação da confiabilidade dos estudos (Meijaard e Groves, 2004; Groves e Grubb, 2011). Além disso, o uso exclusivo de caracteres morfológicos passou a ser questionado pelo alto grau de homoplasia em Ruminantia, que sofreu diversas radiações evolutivas durante a transição de habitats florestais para ambientes mais abertos no Terciário, levando ao desenvolvimento paralelo de características semelhantes em diferentes famílias (Janis e Scott, 1987).

Apesar do avanço das metodologias moleculares e dos extensos estudos realizados, ainda persistem delimitações controversas de espécies e afiliações incertas entre táxons (Heckeberg, 2020). As análises filogenéticas baseadas em genes abordam essa problemática de maneiras variadas - abrangendo desde toda a família Cervidae (Gilbert et al., 2006; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020), passando por estudos focados em algumas espécies de um único gênero (Lorenzini

e Garofalo, 2015; Hu et al., 2019), até pesquisas dedicadas a espécies específicas (Kumar et al., 2017), mas sem resolução completa. Além disso, a utilização de diferentes marcadores moleculares e genes em cada estudo pode gerar filogenias conflitantes (Mackiewicz et al., 2022). A relação filogenética entre as tribos de Capreolinae ainda possui lacunas a serem preenchidas, enquanto que da subfamília Cervinae já é melhor compreendida, salvo algumas excessões (Duarte; González; Maldonado, 2008a; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg, 2020).

Ainda no contexto evolutivo, a citogenética demonstra que o número diploide em Cervidae é bastante variado: de $2n=6$ na fêmea de muntjac indiano (*Muntiacus muntjak vaginalis*) até $2n=70$ em diferentes espécies, como do veado-catingueiro (*Subulo gouazoubira*) (Fontana e Rubini, 1990; Duarte e Jorge, 2003). Acredita-se que o cariótipo do ancestral mais recente da família tenha sido composto por cromossomos acrocêntricos e $2n=70$, e que através de fusões recorrentes evoluíram para a diversidade vista atualmente (Rubes et al., 2012). Variações estruturais em cromossomos devido a rearranjos como deleções, fusões, fissões, inversões e translocações são consideradas uma importante fonte de variação genética e estão bem estabelecidas como um fator determinante da especiação (Rieseberg, 2001; Damas et al., 2021).

Graças aos avanços técnicos e ao surgimento da genômica, a citogenética molecular permitiu estudar e comparar os cromossomos em nível de DNA (Frohlich et al., 2017; Graphodatsky et al., 2011). A técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH) tornou-se ferramenta fundamental para compreender a relação dos táxons na rápida evolução cromossômica vista no cervídeos, pois permite a detecção de homologias e auxilia no entendimento das divergências cariotípicas (Graphodatsky et al., 2011; González e Duarte, 2020). Hoje sabe-se que as fusões Robertsonianas são o tipo mais comum de rearranjo cromossômico em Cervini, enquanto as fusões em tandem são os principais rearranjos cromossômicos envolvidos na diversificação cariotípica de Muntiacini (Fontana e Rubini, 1990; Bonnet-Garnier et al., 2003; Chi et al., 2005).

Devido às questões genéticas citadas e conseqüentemente à difícil compreensão de sua história evolutiva, os cervídeos passaram e ainda passam por recorrentes alterações no seu arranjo taxonômico (Duarte et al., 2008; Merino e Rossi,

2010; González e Duarte, 2020). Com a evolução das técnicas citogenéticas e moleculares, que complementam os dados morfológicos, a taxonomia da família tem sido reavaliada nas últimas décadas, permitindo um melhor entendimento do contexto por trás das complexas relações entre os táxons (Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010; Gutiérrez et al., 2017; Cifuentes-Rincón et al., 2020; González e Duarte, 2020; Heckeberg, 2020).

2.2 OS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS – UMA ABORDAGEM GENÉTICA

Os cervídeos ancestrais que imigraram ao Novo Mundo correspondiam a gêneros da tribo Odocoileini, e irradiaram à América do Sul durante o Grande Intercâmbio Americano em diferentes momentos durante o Plioceno (Gilbert et al., 2006). De acordo com a datação molecular feita por Duarte et al. (2008), conforme figura 1, a colonização da região ocorreu por aparentemente oito formas diferentes: 1) ancestral de *S. gouazoubira*; 2) ancestral de *H. bisulcus*; 3) ancestral de *B. dichotomus*; 4) ancestral de *O. bezoarticus*; 5) ancestral de *H. antisensis*; 6) ancestral de *P. nemorivagus*; 7) ancestral de *P. puda*; e 8) ancestral das espécies dos gêneros *Mazama* e *Odocoileus* (Duarte et al., 2008). Estes se fixaram e se expandiram de forma bem sucedida, devido à riqueza de biomas da região e à ausência de outros ruminantes ocupando o mesmo nicho ecológico, e passaram por intensa radiação evolutiva que promoveu a especiação ao longo do tempo (Myers et al., 2000; Webb, 2000).

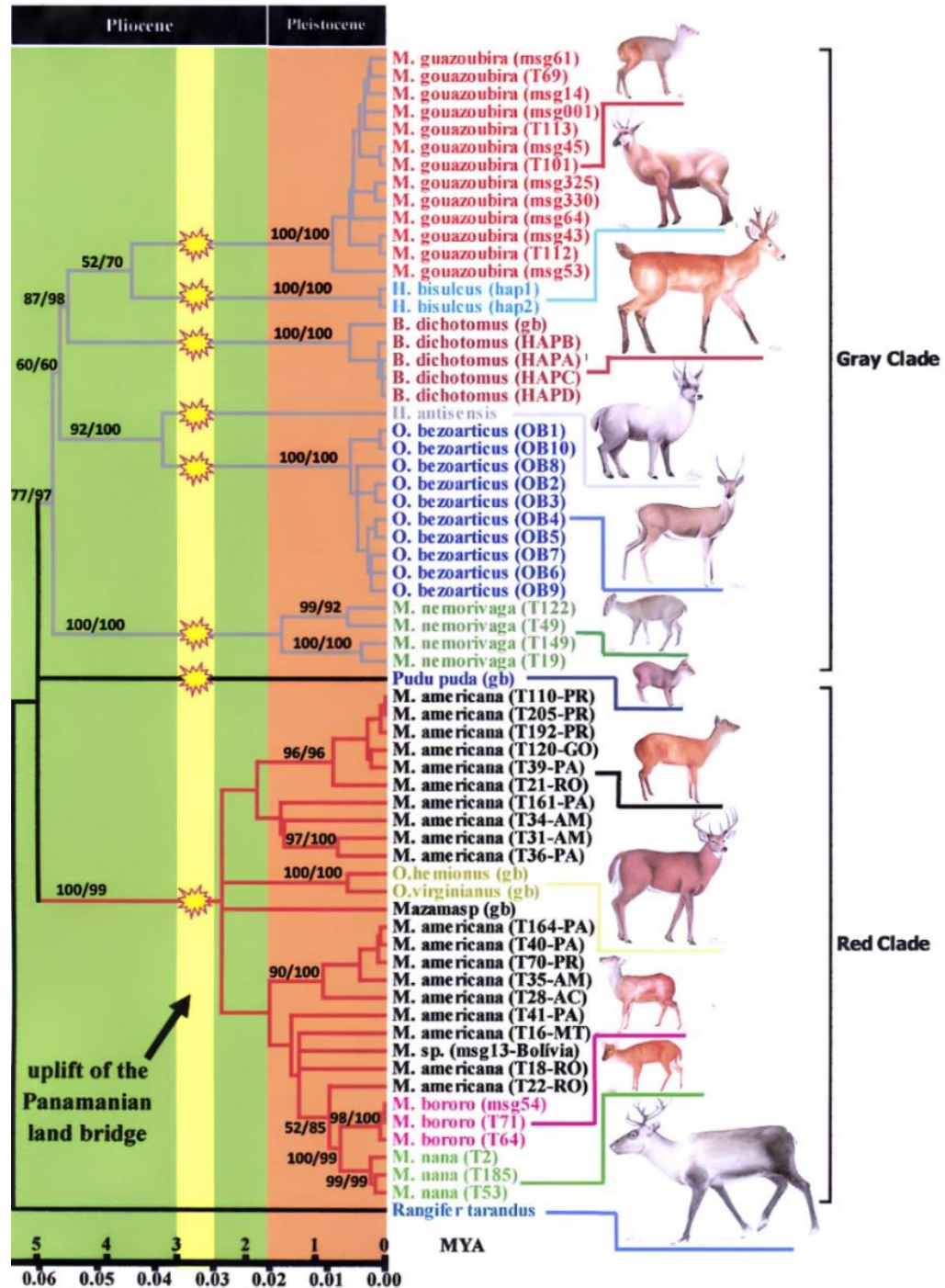


Figura 1. Árvore filogenética com escala temporal. A barra amarela refere-se ao período da ocorrência do Istmo do Panamá (Fonte: Duarte et al., 2008).

A tribo Odocoileini, que representa os cervídeos da região Neotropical, é dividida em duas subtribos, Odocoileina e Blastocerina (Heckeberg et al. 2016). Dentro de ambos os grupos são reconhecidas duas formas morfológicas principais, diferenciadas principalmente pelo tamanho dos animais: Espécies de cervos de médio

a grande porte, pesando mais de 25 kg, típicas de áreas de vegetação mais abertas, onde os machos apresentam chifres ramificados (gêneros *Odocoileus*, *Hippocamelus*, *Ozotoceros* e *Blastocerus*); e Veados de pequeno porte, com menos de 60 cm de altura na cernelha e menos de 25 kg, chifres curtos e não ramificados nos machos, adaptados morfológica e ecologicamente a florestas e outros habitats de vegetação fechada (gêneros *Pudu*, *Pudella*, *Bisbalus*, *Odocoileus*, *Mazama*, *Subulo* e *Passalites* (Gonzalez e Duarte, 2020). Os gêneros *Mazama*, *Subulo* e *Passalites* são também chamados de “*brockets*”.

Foi hipotetizado, com base em registros fósseis, que o tamanho pequeno e chifres simples dos cervídeos florestais da América do Sul foram adquiridas de forma independente, como resultado de uma rápida radiação adaptativa. Os estudos apontam que os ancestrais presentes na região eram grandes e possuíam chifres mais desenvolvidos, que teriam evoluído durante o Plio-Pleistoceno até chegar aos pequenos cervídeos de hoje (Webb, 2000; Gilbert et al., 2006). Por outro lado, estudos mais recentes sugerem que os chifres simples nos cervídeos representem o estado ancestral, a partir da qual estruturas de chifres mais complexas evoluíram (Samejima e Matsuoka, 2020; Oliveira et al., 2025).

A alta similaridade morfológica entre os *brockets* não corresponde à diversidade genética observada (Duarte et al., 2008). Uma das características mais marcantes dessas espécies é a variabilidade cariotípica, evidenciada por polimorfismos e rearranjos cromossômicos frequentes (Duarte et al., 2008; Galindo et al., 2021). O número diploide destas espécies varia desde $2n=32$ em *M. jucunda* até $2n=70$ em *S. gouazoubira* (Duarte e Jorge, 2003; Bernegossi et al., 2022b). Também são relatados polimorfismos cromossômicos significativos intraespecíficos em *M. americana* ($2n= 42$ a 53) (Bernegossi et al., 2024), *M. nana* ($2n= 36$ a 39) (Abril e Duarte, 2008), *M. jucunda* ($2n= 32$ a 34) (Duarte e Jorge 2003), *M. temama* ($2n= 44$ a 47) (Sandoval et al., 2024a), *P. nemorivagus* ($2n= 66$ a 69) (Fiorillo et al., 2013), e *S. gouazoubira* ($2n= 69$ a 70) (Valeri e Tomazella; Duarte, 2018), sendo possíveis indícios da existência de processos de especiação (Abril et al., 2010; Galindo et al., 2021).

Outra grande variação é vista pela presença ou ausência de cromossomos B, tanto inter quanto intraespecíficas. Todas as espécies dentro do gênero *Mazama* demonstram variabilidade de 0 a 6 Bs. O mesmo ocorre em *P. nemorivagus* e em *S.*

gouazoubira (Abril et al. 2010; Bernegossi et al., 2022; Sandoval et al. 2022; Morales-Donoso et al. 2023). A presença de Bs foram descritos em apenas outras duas espécies em Artiodactyla, o Veado-Siberiano (*Capreolus pygargus*) e o Veado-Almiskarado-Siberiano (*Moschus sibiricus*) (Neitzel, 1987; Sokolov e Prikhod'ko, 1998). Tais cromossomos são conhecidos como supranumerários, apresentam herança não mendeliana, e permanecem um mistério em termos de sua composição genética, função e se conferem alguma vantagem evolutiva as espécies que os possui (Camacho et al., 2000).

Polimorfismos cromossômicos intraespécie podem representar importantes barreiras reprodutivas devido à influência na produção de gametas, ocasionando isolamento e especiação (Faria e Navarro, 2010). A magnitude da diferença cariotípica entre dois indivíduos reprodutores está diretamente associada ao grau de desbalanceamento cromossômico nos gametas formados no zigoto. Tal desbalanceamento eleva substancialmente a probabilidade de produção de híbridos com infertilidade ou subfertilidade, decorrente de anomalias na segregação cromossômica e nos eventos de crossing-over durante a meiose (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021). A redução da aptidão reprodutiva dos híbridos em comparação com as espécies parentais é um importante mecanismo de isolamento pós-zigótico, que pode desempenhar papéis importantes não apenas nos estágios iniciais, mas também tardios da especiação (Coyne e Orr, 2004; Seehausen et al., 2014).

Para investigar a evolução cromossômica dos cervídeos neotropicais, são essenciais sondas direcionadas a regiões cromossômicas específicas, possibilitando a construção de mapas citogenéticos de diversas espécies (Pedrosa-Harand, 2012). A microdissecção de cromossomos inteiros ou de regiões específicas, ou ainda o uso de DNA clonado, como nos cromossomos artificiais de bactérias (BACs), permite gerar sondas eficientes para experimentos de FISH (Rocchi et al., 2012). Com essa metodologia, foi produzido um mapa cariotípico de *S. gouazoubira* ($2n=70$), espécie que preserva o cariótipo ancestral dos cervídeos, utilizando 106 sondas BAC de bovinos (Bernegossi et al., 2022a). Esse estudo fez de *S. gouazoubira* uma espécie de referência para pesquisas citogenéticas comparativas entre cervídeos neotropicais.

Até recentemente os *brockets* eram representados apenas pelo gênero *Mazama*, devido a sistemática baseada apenas em características morfológicas. Entretanto, através de análises filogenéticas utilizando genes mitocondriais e nucleares, o gênero mostrou-se polifilético, com espécies tanto na subtribo Odocoileina quanto em Blastocerina, conforme visto na figura 1 (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2011; Gutiérrez et al., 2015; Heckeberg et al., 2016). Isto levou a uma série de estudos genéticos para a revisão taxonômica do gênero.

Graças a estudos de análises filogenéticas, as espécies do gênero alocadas em Blastocerina passaram por reposicionamentos taxonômicos. Assim, foram revalidados os gêneros *Subulo* Smith, 1827 para *M. gouazoubira*, e *Passalites* Gloger, 1841 para *M. nemorivaga*, dado que não compartilham um mesmo ancestral comum exclusivo com *Mazama* (Bernegossi et al., 2022b; Morales-Donoso et al., 2023) (Figura 2). A espécie *M. chunyi* ainda deverá ser transferida para o gênero *Subulo* (Bernegossi et al., 2022b), mantendo apenas as espécies de *brockets* de Odocoileina dentro do gênero *Mazama*, cuja espécie tipo é *M. rufa* (Erxleben, 1777) (Peres e Duarte, 2025).

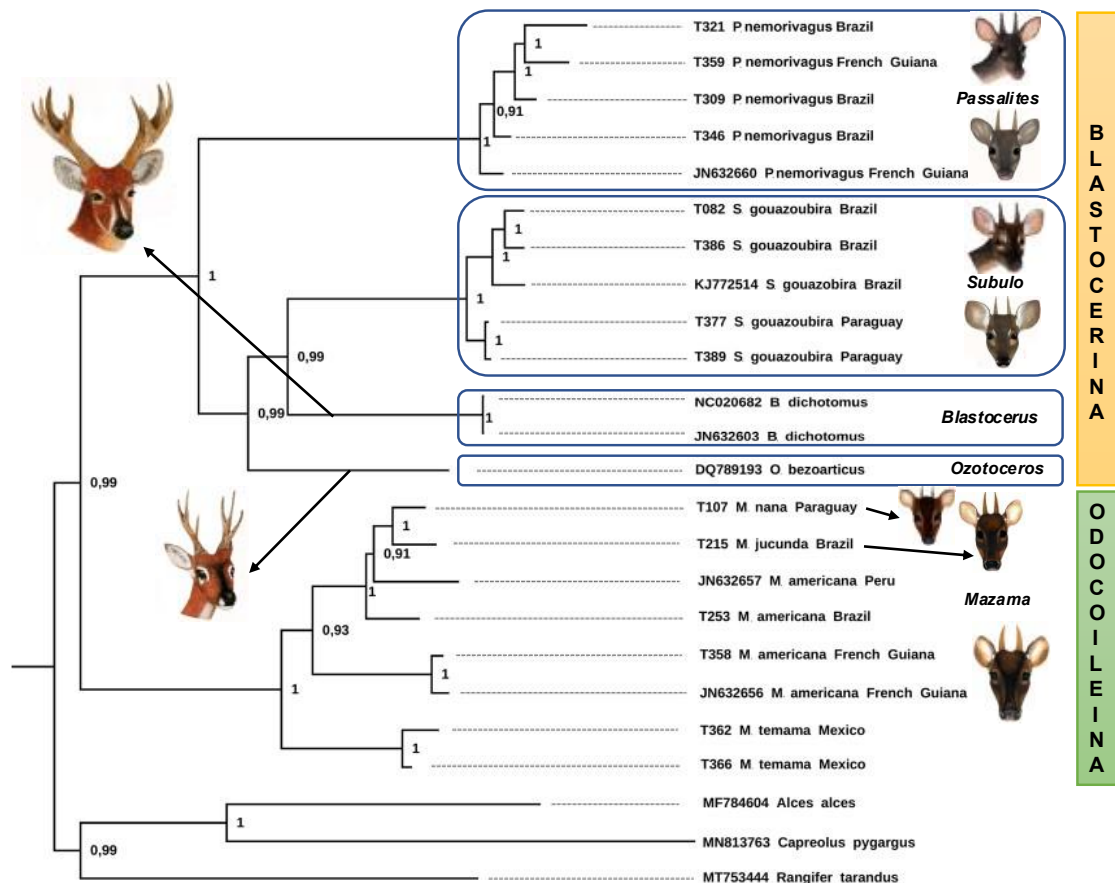


Figura 2. Árvore filogenética mais atual dos cervídeos neotropicais contendo os dois novos gêneros. Foi produzida baseada na inferência bayesiana de regiões de DNA mitocondrial concatenadas do citocromo b (Cyt-B, 920 pb), subunidade I do citocromo c oxidase (COI, 658 pb) e região controle (D-loop, 610 pb) (Fonte: Morales-Donoso et al., 2023).

Além da resolução do caráter polifilético do gênero *Mazama*, dois outros gêneros foram recentemente revalidados ou sugeridos para espécies de cervídeos neotropicais florestais. Por meio de análises morfológicas e avaliação da variação genética, Barrio et al. (2024) sugeriram o gênero *Pudella* Thomas, 1913, revalidado para abrigar as duas espécies distintas identificadas do Pudu-do-norte (*Pudu mephistophiles*), incluindo uma espécie recém-descrita e nomeada como *P. carlae*. Isso porque o Pudu-do-sul (*P. puda*), espécie-tipo do gênero *Pudu*, não é irmã das duas espécies do Pudu-do-norte. Além disso, Sandoval et al., (2024b) sugeriram a reclassificação de *Mazama americana citus* Osgood, 1912, uma espécie venezuelana da subtribo Blastocerina, em um novo gênero, *Bisbalus*, devido a seu cariótipo distinto e filogenia que o separa dos gêneros *Passalites* e *Subulo*. Assim, essa espécie passou a ser denominada *Bisbalus citus*.

O gênero *Mazama* é o que mais demonstra variação cariotípica e inconsistências filogenéticas, e dois complexos de espécies crípticas foram identificadas (*M. americana* e *M. temama*), compostos por animais morfologicamente indistinguíveis, mas geneticamente muito diferentes (Duarte et al., 2008; Sandoval et al., 2024a). O caso mais marcante é o do complexo *M. americana*, no qual estudos associando a citogenética molecular, filogenética e reprodução revelaram a presença de três linhagens citogenéticas distintas dentro da espécie (Figura 4), caracterizadas por divergência cariotípica significativa, e demonstrando a existência de barreiras pós-zigóticas eficientes (Abril et al., 2010; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021; Peres et al., 2021; Bernegossi et al., 2024). Uma das linhagens mostrou-se tão divergente, separada das demais por pelo menos 15 rearranjos cromossômicos, que foi revalidada como uma espécie distinta – *M. rufa*, com seu cariótipo como principal característica diagnóstica (Figura 3) (Peres et al., 2021).

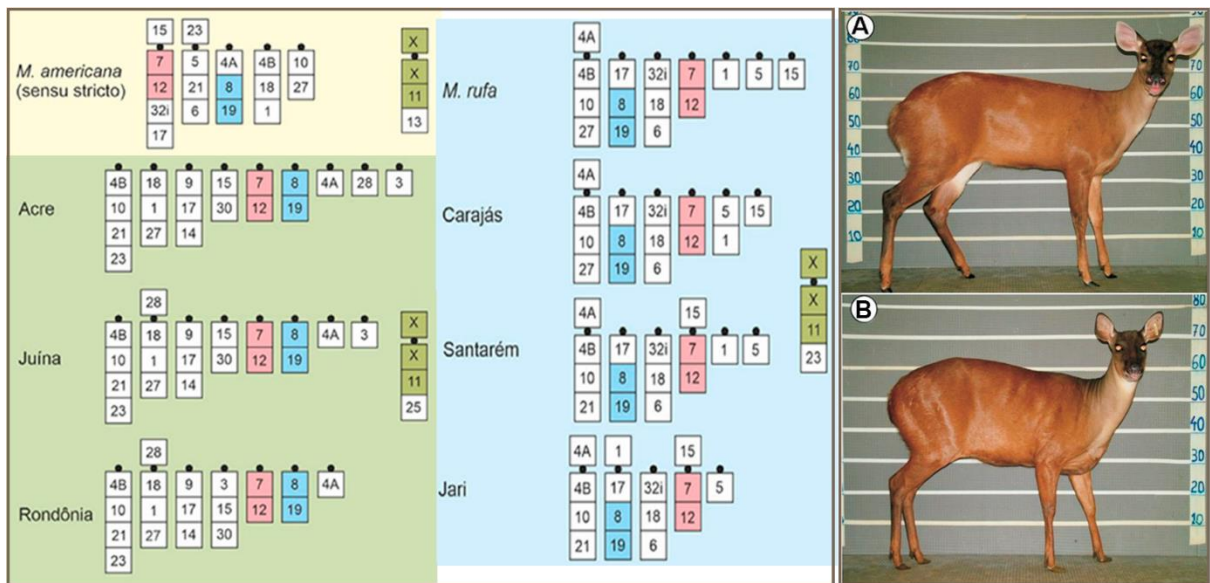


Figura 3. À direita, variação cariotípica observada nas três linhagens de *M. americana* e em *M. rufa*, por meio de uma representação esquemática das fusões evolutivas dos cromossomos ancestrais ortólogos em *S. gouazoubira*. As fusões compartilhadas por todas as linhagens cromossômicas aparecem nas cores rosa, azul-claro e verde (adaptado de BERNEGOSSI et al., 2024). À esquerda, duas fêmeas de veado-mateiro, sendo (A) *M. rufa* e (B) *M. americana* citótipo Rondônia, morfologicamente indistinguíveis (adaptado de Duarte et al., 2008).

Além destes casos, em *M. nana* foram identificados oito variantes cariotípicas diferentes, sugerindo a existência de polimorfismos cromossômicos que podem refletir

a presença de mais de uma espécie ou populações geneticamente distintas dentro da espécie, sendo necessário ainda mais estudos para a confirmação da hipótese (Abril e Duarte, 2008; Nogueira Neto, 2023).

Neste sentido, o primeiro passo para definir planos de conservação eficientes é de se obter a correta descrição taxonômica das espécies, para que não seja negada proteção a espécies em perigo, e nem esforços sejam perdidos com espécies abundantes (Frankham et al., 2008). Segundo a União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), grande parte das espécies de cervídeos estão com suas populações em declínio e muitas possuem dados insuficientes, fatores que dificultam na formulação de ações para sua conservação. Estudos sobre esses animais são difíceis de serem executados, e os aspectos ecológicos, genéticos, fisiológicos e morfológicos ainda são pobremente conhecidos (Chiarello, 2000; González et al., 2018; Oliveira et al., 2025).

2.3 A ESPÉCIE *Passalites nemorivagus* (CUVIER, 1817)

Popularmente conhecida como Veado-roxo, Veado-da-Amazônia e Veado-fuboca, a espécie *P. nemorivagus* foi descrita pela primeira vez como *Cervus nemorivagus* por Cuvier (1817), a partir de animais coletados por Poiteau e Martin em Caiena, capital da Guiana Francesa, e armazenados no museu Nacional de História Natural de Paris. Cuvier a descreveu com as seguintes características morfológicas: 100 cm de comprimento e 60 cm de altura, chifres de 5 a 7,5cm de comprimento, cor da pelagem marrom-acinzentada, cauda branca na parte inferior, lábios e a parte inferior da garganta esbranquiçadas, e cor branco canela no contorno dos olhos, parte interna das patas dianteiras, peito até as coxas. Ele também descreve que se trata de animais de hábitos solitários, vivendo em matas fechadas, mas também sendo encontrado em áreas alagadas e perto do litoral (Cuvier, 1817).

Como os demais *brockets*, o Veado-roxo apresenta médio porte, com peso variando de 14 a 15 kg, chifres simples e uma pelagem cinza (Rossi et al., 2010). Sua pelagem marrom-acinzentada a marrom-chocolate, sem nenhum traço de tom avermelhado, é a principal característica diagnóstica desta espécie, e é útil pois permite distingui-la de outros cervídeos simpátricos como *M. americana* (Rossi et al.,

2010). Desde sua descrição, a espécie foi considerada válida até 1960, quando Cabrera a classificou como subespécie de *S. gouazoubira* (Cabrera, 1960). No entanto, em 2000, uma revisão baseada em padrões morfológicos reconfirmou a espécie como um táxon válido, sob o nome *Mazama nemorivaga* (Rossi, 2000). Em 2023, após a coleta de um topotipo e subseqüentes análises morfológicas, citogenéticas e moleculares, a espécie foi realocada para o gênero *Passalites* (Gloger, 1842), voltando a concordar com o gênero masculino formando a combinação *P. nemorivagus* (Morales-Donoso et al., 2023).

O Veado-roxo tem hábitos diurnos e habita florestas tropicais e subtropicais úmidas de folha larga, não sujeitas a alagamentos, sendo os frutos e as folhas os principais componentes de sua dieta (Rossi et al., 2010; Oliveira et al., 2016). Sua distribuição geográfica abrange diversos países, incluindo Guiana, Guiana Francesa, Suriname, Venezuela, Colômbia, Panamá, Equador, Peru, Brasil e provavelmente Bolívia, de acordo com estudos de campo e espécimes de museu (Rossi et al., 2010). Inicialmente restrito à região amazônica, a presença dessa espécie na Mata Atlântica foi sugerida por Miranda-Ribeiro (1919) e Rossi (2000) devido a um espécime no Museu Paulista de *Mazama rondoni* (sinônimo de *P. nemorivagus*) proveniente do estado do Espírito Santo. Mais recentemente, sua presença nesta região foi confirmada graças à identificação de populações na costa leste do Brasil através de armadilhas fotográficas e sequenciamento de DNA fecal (Oliveira et al., 2020). A distribuição da espécie até o momento pode ser considerada disjunta, pois foi registrada exclusivamente em áreas florestadas, com poucas probabilidades de ocorrer em regiões de vegetação aberta, como a Caatinga e o Cerrado (Rossi, 2000).

Dados populacionais sobre a espécie são conhecidos apenas no Peru, Suriname, Venezuela e Guiana Francesa (Duarte et al., 2012). No entanto, tratam-se de estudos realizados há mais de 20 anos, podendo não representar o status populacional atual nestes países. No Brasil, não há estudos sobre distribuição e densidade populacional de *P. nemorivagus*, ou como a espécie responde a mudanças e fragmentações de habitat (Duarte et al., 2012). As populações da espécie estão em declínio devido principalmente à perda e fragmentação do habitat, especialmente no “arco do desmatamento” no sul da Amazônia brasileira, região que se estende do Acre até Pará e Maranhão (Rossi e Duarte, 2016). A espécie é avaliada como Pouco

Preocupante (LC) pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), e não consta na lista oficial brasileira de espécies ameaçadas de extinção, por possuir dados insuficientes (Duarte et al., 2012).

Um dos motivos que dificultam a avaliação geral do risco de extinção é sua inconsistência taxonômica. Análises filogenéticas a partir do DNA mitocondrial (genes Cytb e COI) de indivíduos que habitam a Floresta Amazônica demonstram uma estruturação da espécie em três clados diferentes, com alto suporte estatístico (Figura 4). Estes clados apresentam forte correlação geográfica, sendo alocados separadamente por regiões de endemismo da Amazônia: o clado Norte formado por animais provenientes dos Estados do Amapá e Guiana Francesa, clado Oeste por animais dos Estados do Acre, Rondônia e Mato Grosso, e clado Leste com aqueles provenientes do Pará e Maranhão (Duarte et al., 2008; Figueiredo, 2014; Morales-Donoso, 2017). A população da Mata Atlântica forma também um clado isolado mais próximo das populações do leste e oeste do que do norte, e foi compreendida como uma Unidade Evolutiva Significativa (Oliveira et al., 2020).

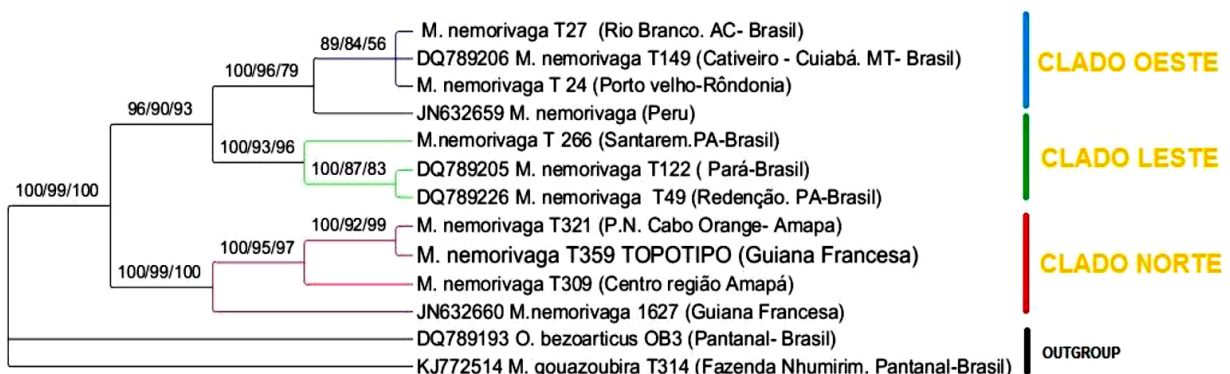


Figura 4. Árvore filogenética do gene mitocondrial Cyt-B (920 pb), por meio de análises Bayesianas, Máxima Verossimilhança, e Parcimônia para o topotipo da espécie *Mazama nemorivaga* proveniente da Guiana Francesa (Fonte: Morales-Donoso, 2017).

Conjuntamente, estudos de citogenética clássica demonstraram variações do $2n$ de 66 a 70, e NF de 69 a 72, além de múltiplos cromossomos B. A primeira descrição citogenética da espécie se deu através de seis espécimes provenientes de diferentes localidades do Brasil, relatando-se então $2n$ de 67 a 70 e FN de 69-72 (Duarte e Jorge, 1996). Posteriormente um indivíduo do estado de Rondônia foi descrito apresentando $2n=66$. Em ambas publicações os espécimes foram

classificados como *Mazama rondoni*, hoje considerada sinônimo de *P. nemorivagus* (Duarte e Merino, 1997; Rossi, 2000).

Trabalhos posteriores com bandamentos clássicos permitiram demonstrar que as variações cariotípicas observadas ocorrem devido a duas fusões específicas: uma cêntrica/Robertsoniana entre autossomos, e uma X-autossômica (Resende, 2012; Fiorillo et al., 2013; Morales-Donoso, 2017). A fusão X-autossômica presente em alguns indivíduos resulta em um sistema sexual múltiplo (XX/XY_1Y_2), em que o Y_2 é um autossômico homólogo ao fusionado com o X, e não um Y verdadeiro. Por outro lado, os indivíduos sem a fusão apresentam um sistema sexual simples (XX/XY) (Resende, 2012; Fiorillo et al., 2013; Galindo et al., 2021; Morales-Donoso et al., 2023).

No entanto, os dados baseados em bandamentos clássicos de cromossomos podem conter imprecisões, e quando o conhecimento cariotípico aprofundado é importante nas análises filogenéticas, a citogenética molecular torna-se fundamental (Cernohorska et al., 2012). Utilizando FISH com sondas BAC de bovinos, e baseado no cariótipo ancestral de *S. gouazoubira* (Bernegossi et al., 2022a), Morales-Donoso et al. (2023) mapeou o cariótipo do topotipo de *P. nemorivagus*, coletado na Guiana Francesa, e analisou outros três espécimes, identificando que a fusão cêntrica envolve os pares cromossômicos 7 e 27 (Figura 5). Todos os indivíduos deste estudo apresentaram sistema sexual simples. Galindo et al., (2021) estudou através de FISH e sperm-FISH um espécime macho com sistema sexual múltiplo e identificou que a fusão X-autossômica ocorre com o cromossomo 15.

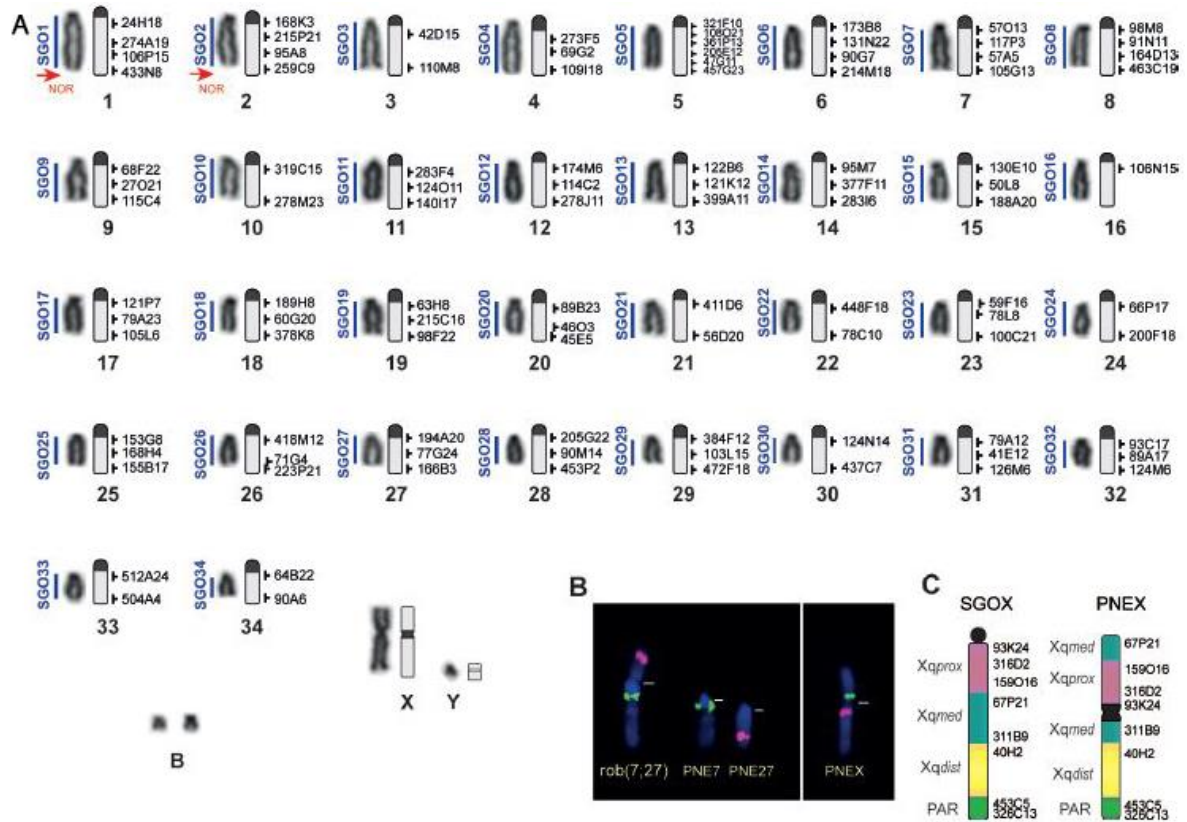


Figura 5. A) Comparação entre cromossomos de *S. gouazoubira* (SGO) e do topotipo de *P. nemorivagus* (PNE) sob coloração convencional de Giemsa, idiograma de bandas C, e marcação de sondas BAC. As setas indicam a coloração Ag-NOR. B) FISH mostrando os cromossomos envolvidos na translocação Robertsoniana (rob)7;27, e sondas 311B9 (rosa) e 316D2 (verde) no PNE. C) Comparação esquemática das marcações da sonda BAC no cromossomo X entre SGO e PNE (Fonte: Morales-Donoso et al., 2023).

Filogeneticamente o topotipo da espécie é alocado no clado norte, apresenta $2n = 69$, $NF = 72$, todos os cromossomos autossômicos são acrocêntricos, com exceção a um submetacêntrico devido à fusão cêntrica em heterozigose. O sistema sexual é simples e os cromossomos sexuais são submetacêntricos (Morales-Donoso et al., 2023). Até o momento, não foi possível coletar amostras de tecido vivo de indivíduos da população da Mata Atlântica, em razão da dificuldade de localização e captura dos animais em vida livre. Consequentemente, ainda não foram realizados estudos citogenéticos que possibilitem a comparação com as demais populações.

A existência de sistemas complexos de cromossomos sexuais é considerada rara na ordem Artiodactyla, apenas as famílias Bovidae e Cervidae possuem representantes com essas variações (Hughes et al., 2024). Nos cervídeos, o sistema

XY₁Y₂ foi documentado nos gêneros *Muntiacus* (Pathak; Lin, 1981), *Elaphodus* (Cao et al., 2005), *Odocoileus* (Sandoval et al., 2023), *Mazama* (Aquino et al., 2013; Bernegossi et al., 2024), *Bisbalus* (Sandoval et al., 2024b) e *Passalites*, devido a fusões X-autossômicas. No entanto, apenas em *P. nemorivagus* e em *E. cephalophus* foi documentado a existência de dois sistemas sexuais em uma mesma espécie (Cao et al., 2005; Shi et al., 2008; Fiorillo et al., 2013), mas os efeitos em híbridos ainda são desconhecidos. A variação cromossômica e filogenética observada entre as populações de *P. nemorivagus* pode estar associada a um possível isolamento reprodutivo dentro da espécie, e sugere a existência de um complexo de espécies crípticas (Fiorillo et al., 2013).

Portanto, é crucial aprofundar o estudo das variações cariotípicas de *P. nemorivagus* por meio da citogenética molecular, com o objetivo de investigar a relação entre a estrutura filogenética e as diferenças cromossômicas observadas entre os clados geograficamente isolados. Esse estudo visa compreender as variações genéticas nas populações, o que contribuirá para a resolução taxonômica da espécie, um passo essencial para o desenvolvimento de estratégias de conservação eficazes e para a avaliação precisa de seu status de conservação.

3 OBJETIVO GERAIS

- Verificar se a espécie *P. nemorivagus* se trata de um complexo de espécies crípticas, através de análises de citogenética e genética molecular.
- Analisar e comparar a composição genética dos cromossomos B dos cervídeos neotropicais através de citogenética e genética molecular.

4 REFERÊNCIAS

Abreu EF, Prado JR, Maldonado JE, Wilson DE, Percequillo AR, Pavan SE (2025) Recent, Intricate Speciation in Amazonia Uncovered by a Multilayered Genomic Analysis of Tree Squirrels. **Systematic Biology**.

Abril VV, Carnelossi EAG, González S, Duarte JMB (2010) Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research**, 128:177–187.

Abril VV, Duarte JMB (2008) Chromosome Polymorphism in the Brazilian Dwarf Brocket Deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, 31:53–57.

Aquino CI, Abril VV, Duarte JMB (2013) Meiotic Pairing of B Chromosomes, Multiple Sexual System, and Robertsonian Fusion in the Red Brocket Deer *Mazama americana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Research**, 12: 3566–3574.

Barrio J, Gutiérrez EE, D'elfa G (2024) The First Living Cervid Species Described in the 21st Century and Revalidation of *Pudella* (Artiodactyla). **Journal of Mammalogy**, p. gyae012.

Bernegossi AM, Cartes JL, Cernohorska H, Kubickova S, Vozdova M, Caparroz R, González S, Duarte JMB (2022a) Resurrection of the Genus *Subulo* Smith, 1827 for the Gray Brocket Deer, with Designation of a Neotype. **Journal of Mammalogy**, 104:619–633.

Bernegossi AM, Galindo DJ, Peres PHF, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2024) Comparative karyotype analysis of the red brocket deer (*M. americana* sensu lato and *M. rufa*) complex: evidence of drastic chromosomal evolution and implications on speciation process. **Journal of Applied Genetics**, 65: 601–614.

Bernegossi AM, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Galindo DJ, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2022b) Cytogenetic Mapping of Cattle BAC Probes for the Hypothetical Ancestral Karyotype of the Family Cervidae. **Cytogenetic and Genome Research**, 162:140–147.

Bonnet-Garnier A, Claro F, Thévenon S, Gautier M, Hayes H (2003) Identification by R-Banding and FISH of Chromosome Arms Involved in Robertsonian Translocations in Several Deer Species. **Chromosome Research** 11:649–663.

Cabrera A (1960) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista del Museo Argentino Bernardino Rivadavia** 4:309–732.

Camacho JP, Sharbel TF, Beukeboom LW (2002) B-chromosome evolution. Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, **Biological Sciences** 355:163–178.

Cao X, Jiang H, Zhang X (2005) Polymorphic Karyotypes and Sex Chromosomes in the Tufted Deer (*Elaphodus cephalophus*): Cytogenetic Studies and Analyses of Sex Chromosome-Linked Genes. **Cytogenetic and Genome Research** 109:512–518.

Cernohorska H, Kubickova S, Vahala J, Rubes J (2012) Molecular Insights into X;BTA5 Chromosome Rearrangements in the Tribe Antilopini (Bovidae). **Cytogenetic and Genome Research** 136:188–198.

Chi JX, Huang L, Nie W, Wang J, Su B, Yang F (2005) Defining the orientation of the tandem fusions that occurred during the evolution of Indian muntjac chromosomes by BAC mapping. **Chromosoma** 114:167–172.

Chiarello AG (2000) Density and Population Size of Mammals in Remnants of Brazilian Atlantic Forest. **Conservation Biology** 14:1649–1657.

Cifuentes-Rincón A, Morales-Donoso JA, Sandoval EDP, Tomazella IM, Mantellatto AMB, de Thoisy B, Duarte JMB (2020) Designation of a Neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla, Cervidae) Reveals a Cryptic New Complex of Broomtail Deer Species. **ZooKeys** 958:143–164.

Coyne JA, Orr HA (2004) Speciation. Sunderland: Sinauer.

Cursino MS, Salviano MB, Abril VV, Zanetti ES, Duarte JMB (2014) The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology** 14:40.

Cuvier GLCFD (1817) Dictionnaire des Sciences Naturelles. **Zoologie. Mammifères. Paris**. 7485 p.

Damas J, Corbo M, Lewin HA (2021) Vertebrate Chromosome Evolution. **Annual Review of Animal Biosciences** 9:1–22.

Dellicour S, Flot JF (2015) Delimiting Species-Poor Data Sets Using Single Molecular Markers: A Study of Barcode Gaps, Haplowebs and GMYC. **Systematic Biology** 64:900–908.

Dobigny G, Britton-Davidian J, Robinson TJ (2017) Chromosomal Polymorphism in Mammals: An Evolutionary Perspective. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society** 92:1–21.

Duarte JMB, González S, Maldonado JE (2008) The Surprising Evolutionary History of South American Deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49:17–22.

Duarte JMB, Jorge W (2003) Morphologic and Cytogenetic Description of the Small Red Brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia** 67:403–410.

Duarte JMB, Jorge W (1996) Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Cytogenetics and Cell Genetics** 73:145–150.

Duarte JMB, Merino ML (1997) Taxonomia e Evolução. In: Duarte JMB (Ed.) **Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama**. Jaboticabal: FUNEP, p. 1–21.

Duarte JMB, Vogliotti A, Zanetti ES, Oliveira ML, Tiepolo LM, Rodrigues LF, Almeida LB (2012) Avaliação do Risco de Extinção do Veado-roxo *Mazama nemorivaga* Cuvier, 1817, no Brasil. **Biodiversidade Brasileira** 2:68–73.

Escamilo L, Barrio J, Benavides J, Tirira D (2010) Northern Pudu *Pudu mephistophiles* (De Winton 1896). In: Duarte JMB, Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Neotropical Deer**. Jaboticabal, FUNEP, p. 133–139.

Esselstyn JA, Evans BJ, Sedlock JL, Khan FA, Heaney LR (2012) Single-Locus Species Delimitation: A Test of the Mixed Yule-Coalescent Model, with an Empirical Application to Philippine Round-Leaf Bats. **Proceedings. Biological Sciences** 279:3678–3686.

Faria R, Navarro A (2010) Chromosomal Speciation Revisited: Rearranging Theory with Pieces of Evidence. **Trends in Ecology & Evolution** 25:660–669.

Ferguson-Smith MA, Trifonov V (2007) Mammalian Karyotype Evolution. **Nature Reviews Genetics** 8:950–962.

Figueiredo MG (2014) **Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*)**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – UNESP, Jaboticabal, Brasil.

Fiorillo BF, Sarria-Perea JA, Abril V, Duarte JMB (2013) Cytogenetic Description of the Amazonian Brown Brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla, Cervidae). **Comparative Cytogenetics** 7:25–31.

Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M (2002) Molecular Barcodes for Soil Nematode Identification. **Molecular Ecology** 11:839–850.

Fontana F, Rubini M (1990) Chromosomal Evolution in Cervidae. **Bio Systems** 24:157–174.

Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de Genética da Conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética (SBG), p. 103–208.

Frohlich J, et al. (2017) Karyotype relationships among selected deer species and cattle revealed by bovine FISH probes. **PLoS ONE** 12:e0187559.

Fujisawa T, Barraclough TG (2013) Delimiting Species Using Single-Locus Data and the Generalized Mixed Yule Coalescent Approach: A Revised Method and Evaluation on Simulated Data Sets. **Systematic Biology** 62:707–724.

Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, McGuire JA, Moritz C (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution** 27:480–488.

Galindo DJ, Martins GS, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Bernegossi AM, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JM (2021) Chromosomal Polymorphism and Speciation: The Case of the Genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). **Genes** 12:2.

Gilbert C, Ropiquet A, Hassanin A (2006) Mitochondrial and Nuclear Phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, Morphology, and Biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40:101–117.

González S, Duarte JMB (2020) Speciation, Evolutionary History and Conservation Trends of Neotropical Deer. **Mastozoología Neotropical** 27(SI):35–46.

González S, Mantellatto AMB, Duarte JMB (2018) Craniometrical Differentiation of Gray Brocket Deer Species from Brazil. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales** 20:179–183.

Gordon IJ, Hester AJ, Festa-Bianchet M (2004) REVIEW: The management of wild large herbivores to meet economic, conservation and environmental objectives. **Journal of Applied Ecology** 41:1021–1031.

Graphodatsky AS, Trifonov VA, Stanyon R (2011) The Genome Diversity and Karyotype Evolution of Mammals. **Molecular Cytogenetics** 4:22.

Groves C, Grubb P (2011) Ungulate Taxonomy. Johns Hopkins University Press, Baltimore, **Maryland**. **Journal of Mammalogy** 94:245–246.

Gutiérrez EE, Helgen KM, McDonough MM, Bauer F, Hawkins MT, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, Maldonado JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** 697:87–131.

Gutiérrez EE, Maldonado JE, Radosavljevic A, Molinari J, Patterson BD, Martínez-C JM, Rutter AR, Hawkins MT, Garcia FJ, Helgen KM (2015) The Taxonomic Status of *Mazama bricenii* and the Significance of the Táchira Depression for Mammalian Endemism in the Cordillera de Mérida, Venezuela. **PLOS ONE** 10:e0129113.

Hassanin A, Delsuc F, et al. (2011) Pattern and Timing of Diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as Revealed by a Comprehensive Analysis of Mitochondrial Genomes. **Comptes Rendus Biologies** 335:32–50.

Heckeberg NS (2017) Origination of Antlerogenesis. **Journal of Morphology** 278:182–202.

Heckeberg NS (2020) The Systematics of the Cervidae: A Total Evidence Approach. **PeerJ** 8:e8114.

Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rößner GE (2016) Systematic Relationships of Five Newly Sequenced Cervid Species. **PeerJ** 4:e2307.

Hu P, Shao Y, et al. (2019) Genome-wide study on genetic diversity and phylogeny of five species in the genus *Cervus*. **BMC Genomics** 20:384.

Hughes, J. J., Lagunas-Robles, G., & Campbell, P. (2024). The role of conflict in the formation and maintenance of variant sex chromosome systems in mammals. **The Journal of heredity**, 115(6), 601–624.

IUCN (2025) The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <<https://www.iucnredlist.org/>>. Acesso em: 31 mar. 2025.

Janis CM, Scott KM (1987) The interrelationships of higher ruminant families with special emphasis on the members of the Cervoidea. **American Museum Novitates** 2893:1–85.

King M (1993) Species Evolution: The Role of Chromosome Change. Cambridge: Cambridge University Press.

Kumar VP, Thakur M, Rajpoot A, Joshi BD, Nigam P, Ahmad K, Kumar D, Goyal SP (2017) Resolving the phylogenetic status and taxonomic relationships of the Hangul (*Cervus elaphus hanglu*) in the family Cervidae. **Mitochondrial DNA Part A** 28:835–842.

Linnell JDC, Cretois B, et al. (2020) The challenges and opportunities of coexisting with wild ungulates in the human-dominated landscapes of Europe's Anthropocene. **Biological Conservation** 244:108500.

Lorenzini R, Garofalo L (2015) Insights into the evolutionary history of *Cervus* (Cervidae, tribe Cervini) based on Bayesian analysis of mitochondrial marker sequences, with first indications for a new species. **Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research** 53:340–349.

- Mackiewicz P, Matosiuk M, et al. (2022) Phylogeny and evolution of the genus *Cervus* (Cervidae, Mammalia) as revealed by complete mitochondrial genomes. **Scientific Reports** 12:16381.
- Mattioli S (2011) Family Cervidae (Deer). In: Wilson DE, Mittermeier RA (Eds.) **Handbook of the Mammals of the World**. Volume 2. Barcelona: Lynx Edicions.
- Meijaard E, Groves CP (2004) A taxonomic revision of the *Tragulus* mouse-deer (Artiodactyla). **Zoological Journal of the Linnean Society** 140:63–102.
- Mennecart B, Demiguel D, Bibi F, Rößner GE, Métais G, Neenan JM, Wang S, Schulz G, Müller B, Costeur LB (2017) Bony labyrinth morphology clarifies the origin and evolution of deer. **Scientific Reports** 7:13176.
- Merino ML, Rossi RV (2010) Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: Duarte JMB, Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, FUNEP, p. 2–11.
- Miranda-Ribeiro A (1919) Os veados do Brasil segundo as coleções de Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista** 11:276–308.
- Morales-Donoso JA (2017) **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817) a partir de um topótipo atual**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – UNESP, Jaboticabal, Brasil.
- Morales-Donoso JA, Vacari GQ, Bernegossi AM, Sandoval EDP, Peres PHF, Galindo DJ, de Thoisy B, Vozdova M, Kubickova S, Barbanti Duarte JM (2023) Revalidation of *Passalites* Gloger, 1841 for the Amazon Brown Brocket Deer *P. nemorivagus* (Cuvier, 1817) (Mammalia, Artiodactyla, Cervidae). **ZooKeys** 1167:241–264.
- Myers N, Mittermeier RA, Mittermeier CG, da Fonseca GAB, Kent J (2000) Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature** 403:853–858.
- Neitzel, H. (1987). Chromosome evolution of cervidae: karyotypic and molecular aspects. **Cytogenetics**, 90-112.
- Niedziałkowska M, et al. (2022) Moose *Alces alces* (Linnaeus, 1758). In: Hackländer K, Zachos FE (Eds.) **Handbook of the Mammals of Europe**. Cham: Springer.
- Nogueira Neto MVV (2023) **Polimorfismo cromossômico intraespecífico em *Mazama nana* (Hensel, 1872)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – UNESP, Jaboticabal, Brasil.
- Oliveira ML, et al. 2025) Eco-morphological convergence among Neotropical deer. **Biological Journal of the Linnean Society**, 144(3): blaf008.

- Oliveira ML, et al. (2025) Lower ungulate population density in rainforests under anthropogenic influences. **Journal of Applied Ecology** 62:470–479.
- Pathak S, Lin CC (1981) Synaptonemal complex of the sex-autosome trivalent in a male Indian muntjac. **Chromosoma** 82:367–376.
- Pedrosa-Harand A (2012) Hibridização in situ de BACs. In: Guerra M (Ed.) **Citogenética Molecular: Protocolos Comentados**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 35–58.
- Peres PHF, Duarte JMB. Taxonomy of Broomclad Deer (*Mazama*, *Subulo* and *Passalites*). In: Melletti M, Focardi S (ed.). **Deer of the World**. Cham: Springer, 2025. 545-554. (Fascinating Life Sciences).
- Peres PHF, Luduvério DJ, et al. (2021) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (Artiodactyla: Cervidae) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). *Frontiers in Genetics* 12:742870.
- Resende JP de A (2012) **Comparação cariotípica entre *Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga***. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – UNESP, Jaboticabal, Brasil.
- Rieseberg LH (2001) Chromosomal Rearrangements and Speciation. **Trends in Ecology & Evolution** 16:351–358.
- Rocchi M, Archidiacono N, Schempp W, Capozzi O, Stanyon R (2012) Centromere Repositioning in Mammals. **Heredity** 108:59–67.
- Rossi RV (2000) **Taxonomia de *Mazama Rafinesque, 1817* do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. Tese (Doutorado em Zoologia) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociências, São Paulo.
- Rossi RV, Bodmer R, Duarte JMB, Trovati RG (2010) Amazonian Brown Broomclad Deer *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817). In: Duarte JMB, Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP, p. 202–210.
- Rossi RV, Duarte JMB (2016) *Mazama nemorivaga*. Disponível em: <<https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T136708A22158407.en>>. Acesso em: 25 maio 2025.
- Rubes J, Musilova P, Kopečna O, Kubickova S, Cernohorska H, Kulemsina AI (2012) Comparative Molecular Cytogenetics in Cetartiodactyla. **Cytogenetic and Genome Research** 137:194–207.

Salviano MB, Cursino MS, Zanetti ES, Abril VV, Duarte JMB (2017) Intraspecific Chromosome Polymorphisms Can Lead to Reproductive Isolation and Speciation: An Example in Red Brocket Deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction** 96:1279–1287.

Samejima Y, Matsuoka H (2020) A new viewpoint on antlers reveals the evolutionary history of deer (Cervidae, Mammalia). **Scientific reports**, 10(1), 8910.

Sandoval EDP, Bernegossi AM, Gallina S, Reyna-Hurtado R, Duarte JM (2024a) Molecular cytogenetics markers reveal the existence of a cryptic complex of *Mazama temama* species. **Therya** 15:2.

Sandoval EDP, Bernegossi AM, Gallina S, Reyna-Hurtado R, Duarte JMB (2023) Cytogenetic, molecular, and morphological characterization of *Odocoileus pandora* (Merriam, 1901) (Artiodactyla, Cervidae). **Canadian Journal of Zoology** 101:967–979.

Sandoval EDP, Jędrzejewski W, Molinari J, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Bernegossi AM, Caparroz R, Duarte JMB (2024b) Description of *Bisbalus*, a New Genus for the Gray Brocket, *Mazama cita* Osgood, 1912 (Mammalia, Cervidae), as a Step to Solve the Neotropical Deer Puzzle. **Taxonomy** 4:10–26.

Seehausen O, et al. (2014) Genomics and the Origin of Species. **Nature Reviews Genetics** 15:176–192.

Shi L, Yang F, Kumamoto A (2008) The chromosomes of tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). **Cytogenetics and Cell Genetics** 56:189–192.

Sokolov, V. E., & Prihod'ko, V. I. (1997). Sistematika kabargi (Artiodactyla, Mammalia) [The taxonomy of the musk deer (Artiodactyla, Mammalia)]. *Izvestiia Akademii nauk. Seriya biologicheskaya*, (6), 677–687.

Valeri MP, Tomazella IM, Duarte JMB (2018) Intrapopulation Chromosomal Polymorphism in *Mazama gouazoubira* (Cetartiodactyla; Cervidae): The Emergence of a New Species? **Cytogenetic and Genome Research** 154:147–152.

Webb DS (2000) In: Vrba ES, Schaller GB (Eds.) **Antelopes, deer and relatives: fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation**. New Haven and London: Yale University Press, p. 38–64.

Zurano JP, Magalhães FM, Asato AE, Silva G, Bidau CJ, Mesquita DO, Costa GC (2019) Cetartiodactyla: Updating a time-calibrated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 133:256–262.

CAPÍTULO 2 - ANÁLISE CITOGENÉTICA E MOLECULAR DO VEADO-ROXO (*Passalites nemorivagus*) DO BRASIL

RESUMO

O Veado-roxo *Passalites nemorivagus* (Cuvier, 1817) passou por recente reposicionamento taxonômico em função da polifilia do gênero *Mazama*. Trata-se de um cervídeo de médio porte, de hábitos florestais e distribuição abrangente na Amazônia, com registros também confirmados na Mata Atlântica. Apesar de classificado como Pouco Preocupante (LC) pela IUCN, a avaliação de seu status de conservação é dificultada pela existência de variações genéticas e cromossômicas expressivas que levam à uma incerteza taxonômica. Estudos genéticos e citogenéticos revelaram a ocorrência de diferentes clados com forte correlação geográfica e polimorfismos cromossômicos, sugerindo a possibilidade de um complexo de espécies crípticas dentro do táxon. Diante disso, neste estudo foram analisados indivíduos de diferentes regiões da Floresta Amazônica do Brasil, através do mapeamento citogenético por FISH das variações cromossômicas vistas na espécie, e por meio de análises filogeográficas e de distância genética. Os resultados obtidos revelam uma estruturação genética de três clados monofiléticos correlacionados a regiões de endemismo da Floresta Amazônica, com significativa distância genética entre as populações do norte, leste e oeste do rio Amazonas. Além disso, os achados citogenéticos corroboram com os dados filogeográficos, mostrando que a população ao norte do rio tenha retido o X ancestral, e as populações ao sul (clados leste e oeste) estejam passando por um processo de fixação de um neo-X. Assim, propõe-se neste trabalho a delimitação de três Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs) em *P. nemorivagus* na Floresta Amazônica, o que representa um avanço fundamental para o desenvolvimento de estratégias de conservação mais eficazes e baseadas em dados genéticos confiáveis.

Palavras-chave

Amazônia, Evolução, Mamíferos, Unidades Evolutivamente Significativas

CHAPTER 2 - CYTOGENETIC AND MOLECULAR ANALYSIS OF AMAZONIAN BROWN BROCKET DEER (*Passalites nemorivagus*) FROM BRAZIL

ABSTRACT

The Amazonian brown brocket deer *Passalites nemorivagus* (Cuvier, 1817) underwent a recent taxonomic reassessment due to the polyphyly of the genus *Mazama*. It is a medium-sized cervid with forest-dwelling habits and a broad distribution across the Amazon, with confirmed records also in the Atlantic Forest. Although classified as Least Concern (LC) by the IUCN, evaluating its conservation status is challenging due to substantial genetic and chromosomal variation that leads to taxonomic uncertainty. Genetic and cytogenetic studies have revealed the occurrence of distinct clades with strong geographic correlation and chromosomal polymorphisms, suggesting the possibility of a cryptic species complex within the taxon. In this context, individuals from different regions of the Brazilian Amazon Forest were analyzed through cytogenetic FISH mapping of the chromosomal variants observed in the species, as well as through phylogeographic and genetic distance analyses. The results reveal a genetic structure comprising three monophyletic clades corresponding to regions of endemism within the Amazon Forest, with significant genetic divergence among populations from the northern, eastern, and western portions of the Amazon River. Additionally, the cytogenetic findings align with the phylogeographic data, showing that the northern population retained the ancestral X chromosome, whereas the southern populations (eastern and western clades) are undergoing a fixation process of a neo-X. Accordingly, this study proposes the delimitation of three Evolutionarily Significant Units (ESUs) in *P. nemorivagus* within the Amazon Forest, representing a fundamental step toward the development of more effective conservation strategies based on robust genetic evidence.

Key-words

Amazon, Evolution, Mammals, Evolutionary Significant Unit

1 INTRODUÇÃO

O Veado-roxo passou recentemente por reposicionamento taxonômico devido à polifilia do gênero *Mazama*, no qual foi originalmente descrito. Atualmente é reconhecido o nome *Passalites nemorivagus* (Cuvier, 1817), proposto a partir da coleta e análise de um espécime de sua localidade tipo, em Caiena, Guiana Francesa (Morales-Donoso et al., 2023). É caracterizado por possuir médio porte, com peso variando de 14 a 15kg, chifres simples nos machos, e pelagem marrom-acinzentada a marrom-chocolate, sem nenhum traço de tom avermelhado (Rossi et al., 2010).

Popularmente conhecido também como Veado-da-Amazônia, trata-se de um cervídeo de comportamento predominantemente diurno e hábitos florestais, ocupando florestas tropicais e subtropicais úmidas de folhas largas (Rossi et al., 2010; Oliveira et al., 2020). Está presente na região Amazônica e em áreas de transição, provavelmente com distribuição geográfica abrangendo todos os países com o bioma Amazônico. Registros recentes também confirmaram sua ocorrência na Mata Atlântica (Oliveira et al., 2020).

A espécie é classificada como Pouco Preocupante (LC) pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), embora sua avaliação seja dificultada por incertezas taxonômicas que comprometem a delimitação precisa do táxon (Rossi e Duarte, 2016). Análises filogenéticas a partir de DNA mitocondrial identificaram quatro clados que apresentam forte correlação geográfica, sendo três alocados separadamente por regiões de endemismo da Amazônia, e um compreende a população da Mata Atlântica (Duarte et al., 2008; Oliveira et al., 2020; Morales-Donoso et al., 2023).

Conjuntamente, estudos de citogenética clássica revelaram variações no número diploide de cromossomos ($2n = 67$ a 69), associados a ocorrência de fusões Robertsonianas entre autossomos, e de uma fusão X-autossômica, com alguns indivíduos exibindo um sistema de cromossomos sexuais múltiplos (XX/XY_1Y_2), e outros sistema sexual simples (XX/XY) (Duarte e Jorge, 1996; Fiorillo et al., 2013; Morales-Donoso et al., 2023). Essa variação cromossômica e a estruturação dos clados sugerem que o rio Amazonas atue como barreira geográfica entre as

populações de *P. nemorivagus* e levanta a hipótese de que talvez a espécie seja um complexo de espécies crípticas.

Diante disso, objetivou-se neste projeto realizar um estudo de citogenética molecular, utilizando a técnica de Hibridização *in situ* Fluorescente (FISH), e novas análises moleculares com um número maior de genes e animais, para avaliar a possível existência de um complexo de espécies crípticas dentro do que hoje se denomina *P. nemorivagus*, e verificar se existe correlação entre as mudanças cromossômicas e as árvores filogenéticas obtidas.

2 OBJETIVOS

O objetivo desse estudo foi avaliar a possível existência de um complexo de espécies crípticas dentro do que hoje se denomina *P. nemorivagus*, associando análises de citogenética molecular e filogenia do DNA mitocondrial. Para isso os seguintes objetivos específicos foram determinados:

- Mapear e caracterizar os sinais de hibridização de sondas de clones BAC da espécie *Bos taurus* nos cromossomos de indivíduos *P. nemorivagus* provenientes de diferentes localidades;
- Mapear a ocorrência dos rearranjos cromossômicos já descritos na literatura para a espécie nas suas diferentes populações e avaliar a existência ou não de correlação geográfica entre os rearranjos observados;
- Realizar uma análise filogenética de DNA mitocondrial para observar a estruturação espacial da espécie;
- Verificar se existe correlação entre as mudanças cromossômicas e a distância genética.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. INDIVÍDUOS E AMOSTRAS

Para este trabalho foram selecionados 12 espécimes de *P. nemorivagus* que fazem parte do banco de animais e amostras coletados pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (FCAV, UNESP). Todos eles haviam sido previamente obtidos de origem selvagem conhecida e provenientes de diferentes localidades do Brasil, de zoológicos, criadouros, apreensões ou atendimentos veterinários (Tabela 1, Figura 1).

Tabela 1. Número de identificação individual (ID), espécie, sexo e localidade a que pertencem os animais que foram analisados.

ID	Espécie	Sexo	Origem
T20	<i>P. nemorivagus</i>	F	Ji-Paraná, Rondônia
T23	<i>P. nemorivagus</i>	F	Rondônia
T24	<i>P. nemorivagus</i>	M	Porto Velho, Rondônia
T49	<i>P. nemorivagus</i>	M	Redenção, Pará
T149	<i>P. nemorivagus</i>	F	Comodoro, Mato Grosso
T275	<i>P. nemorivagus</i>	F	Açailândia, Maranhão
T309	<i>P. nemorivagus</i>	M	Amapá
T321	<i>P. nemorivagus</i>	F	Macapá, Amapá
T322	<i>P. nemorivagus</i>	F	Macapá, Amapá
T346	<i>P. nemorivagus</i>	F	Jurupari, Pará
T370	<i>P. nemorivagus</i>	F	Vitória do Xingu, Pará
T371	<i>P. nemorivagus</i>	M	Vitória do Xingu, Pará

Para o cultivo celular e análise citogenética, foram utilizadas amostras de pele dos indivíduos listados, que estavam armazenadas em nitrogênio líquido (-196°C) no banco criogênico do NUPECCE. Para as análises moleculares de DNA, as matrizes biológicas variaram entre amostras de pelo e anel leucocitário de sangue total coletado. Todos os espécimes contam com esse material armazenado em álcool absoluto (tecido morto) e nitrogênio líquido (tecido vivo).

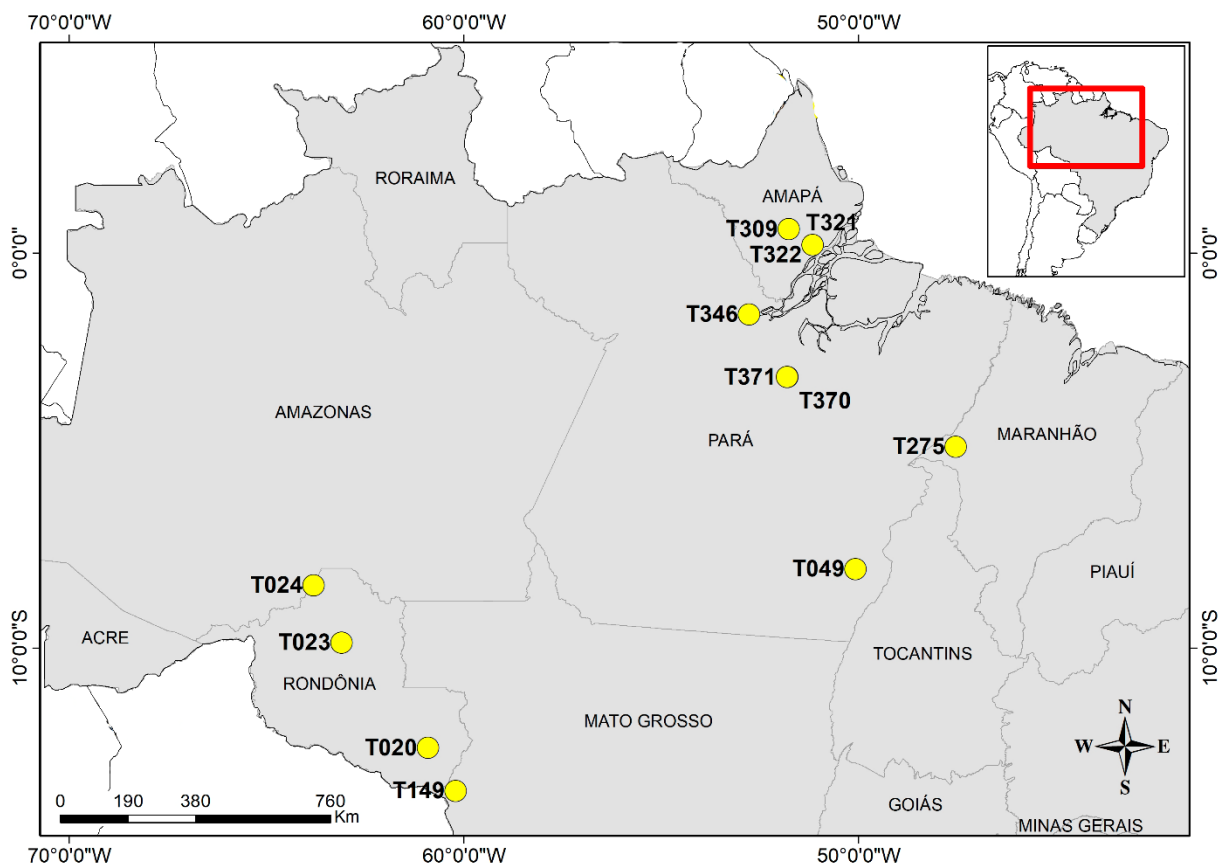


Figura 1. Distribuição geográfica dos indivíduos amostrados de acordo com suas localizações aproximadas de origem.

3.2 CITOGENÉTICA

3.2.1 Cultivo Celular de Fibroblastos e Preparações Cromossômicas

3.2.1.1 Semeadura

As amostras de pele foram descongeladas em banho-maria a 37°C. Em fluxo laminar, o fragmento era lavado duas vezes em 2,0 mL de PBS (10g NaCl/L + 0,25g KCl/L + 1,44g Na₂HPO₄.12H₂O/L + 0,25g KH₂PO₄/L) em placas de Petri descartáveis. O material era então divulsionado com lâmina de bisturi em placa de Petri contendo 1,0 mL de meio de cultivo DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco Cultilab™/L + 3,7 g de bicarbonato/L + 1,0 mL de sulfato de gentamicina/L + 2,0 mL de anfotericina B/L, pH 6,8-7,1). Os diversos fragmentos eram transferidos para frascos de cultivo T25 (TPPTM) com 1,0 mL de meio DMEM e 1,0 mL de soro

fetal bovino (SFB) Cultilab TM. Os frascos eram então levados para estufa a 5% CO₂ e 37°C por 48 horas sem qualquer movimento (Verma; Babu, 1995). A cultura era monitorada diariamente e o meio trocado a cada 48 horas. Após a aderência dos fragmentos de pele, o cultivo era mantido com uma quantidade de 2,5 mL de DMEM e 0,75ml de SFB até a formação de uma monocamada de células no fundo do frasco.

3.2.1.2 *Repique*

Após o crescimento adequado da monocamada de células, foi realizado o repique dos cultivos. O método consistiu em desprezar o meio presente nas garrafas, e lavá-las 3 vezes com 2,0 mL de PBS. Para soltura das células aderidas a monocamada, as garrafas foram tripsinizadas com 1,0 mL de tripsina (8,0g NaCl/L + 0,4g KCl/L + 0,58 g NaHCO₃/L + 1 g glucose/L + 0,005 g vermelho fenol/L + 0,2 g EDTA/L + 0,5 g tripsina/L, pH 7,2-7,4). A cultura foi monitorada em microscópio invertido para verificar se as células soltaram do fundo do frasco e então, imediatamente, a tripsina foi inativada com 200 µL de SFB e 800 µL de DMEM. Dividiu-se o material da garrafa mãe entre novos frascos, as quais foram monitoradas e tratadas como descrito anteriormente até obter um número suficiente de cultivos secundários.

3.2.1.3 *Colheita*

Um dia antes da colheita, era realizada a pré- tripsinização das garrafas. Após 24 horas da pré-tripsinização e trinta minutos antes da colheita, adicionava-se 60 µL de colchicina (0,016%) CultilabTM em cada frasco, os quais permaneciam incubados a 37°C e 5% de CO₂. Depois, era realizada a tripsinização para que as células se desprendessem dos frascos. O conteúdo dos frascos era transferido para tubos de centrifuga cônico e, então, centrifugados por cinco minutos a 167,6 g, e o sobrenadante descartado. Após o descarte do sobrenadante, os sedimentos eram ressuspensos em 10 mL de solução hipotônica KCl 0,067M e incubados no banho-maria a 37°C por vinte minutos. Os sedimentos eram ressuspensos em três ocasiões (6,0, 3,0 e 1,0 mL) com solução fixadora. As preparações cromossômicas obtidas a partir dos cultivos de fibroblastos eram gotejadas em lâminas para posterior uso na técnica de hibridização *in situ* fluorescente.

3.2.2 Sondas

As sondas utilizadas neste trabalho foram desenvolvidas em um projeto anterior, a partir de clones de regiões cromossômicas de bovino (Bernegossi et al., 2022b). Esses clones foram adquiridos da biblioteca bovina CHORI-240, com base nos dados do NCBI ARS-UCD1.2 Assembly, e obtidos do BACPAC Genomics, Emeryville, CA, EUA. As sondas estavam disponíveis no NUPECCE para uso e foram desenvolvidas e marcadas de acordo com Bernegossi et al., (2022b). Com base no mapeamento do topotipo de *P. nemorivagus* (Morales-Donoso et al., 2023), foram selecionadas nove sondas de regiões dos cromossomos 7, 19, 23 e X de bovino, que marcam por homologia respectivamente os cromossomos 7, 15, 27 e X de *P. nemorivagus*. As nove sondas disponíveis no NUPECCE e utilizadas para cada cromossomo de interesse são apresentadas no quadro 1.

Quadro 1. Lista dos clones BAC disponíveis para os cromossomos de interesse envolvidos em fusões em *P. nemorivagus*, e suas respectivas marcações pelos diferentes nucleotídeo-dUTP, e coloração observada no microscópio de fluorescência após hibridização e detecção.

Cromossomo Bovino	Clone BAC	Cromossomo de <i>P. nemorivagus</i>	Região em PNE	Marcação e cor
BTA 7	57A5	PNE 7	Distal	<i>Green-dUTP (verde)</i>
	117P3		Proximal	<i>Digoxigenina (rosa)</i>
BTA 19	130E10	PNE 15	Centrômero	<i>Green-dUTP (verde)</i>
	188A20		Telômero	<i>Digoxigenina (rosa)</i>
BTA 23	77G24	PNE 27	Medial	<i>Digoxigenina (rosa)</i>
	166B3		Telômero	<i>Biotina (verde)</i>
BTA X	159O16	PNE X	Braço p	<i>Digoxigenina (rosa)</i>
	311B9		Braço q proximal	
	93K24		Braço p proximal	<i>Green-dUTP (Verde)</i>

A figura 2 representa a posição das sondas utilizadas nos cromossomos de *P. nemorivagus* envolvidos em fusões.

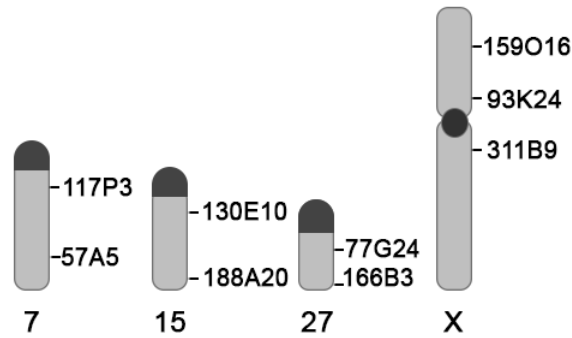


Figura 2. Idiograma de banda C dos cromossomos 7, 15, 27 e X do topotipo de *P. nemorivagus*, demonstrando blocos de heterocromatina, e a marcação das sondas BAC selecionadas da biblioteca CHORI-240 para utilização neste projeto (adaptado de Morales-Donoso et al., 2023).

3.2.3 Hibridização *in situ* fluorescente

As lâminas com preparações cromossômicas foram incubadas em solução de 2xSSC a 70 °C em banho-maria por 30 minutos e, após esse período, deixadas para esfriar em temperatura ambiente por 20 minutos. Subsequentemente, foram lavadas em 0,1xSSC por 1 minuto e desnaturadas em solução de 0,07M NaOH por 1 minuto. Após desnaturação, as lâminas foram incubadas em solução 0,1xSSC e 2xSSC, a 4°C por 1 minuto cada e, finalmente, em série alcoólica (70%, 80%, 96%) em temperatura ambiente, 1 minuto cada novamente.

Concomitantemente, foi preparado o mix de hibridização (Quadro 2), utilizando DNA Cot bovino (Hybloc™ Competitor DNA, Applied Genetics Laboratories Inc. Melbourne, USA) e DNA de esperma de salmão (Ultrapure™ Salmon Sperm DNA Solution, Invitrogen®) como DNA supressores a fim de se inibir a hibridização de sequências repetitivas.

Quadro 2. Mistura de hibridização para volume final de 10 µl.

Reagente	Volume
Master Mix*	7 µl
DNA Cot bovino	1 µl
DNA de esperma de Salmão	0.6 µl
Sonda	0,7 µl - 1,4 µl

(*5ml formamida+1g Sulfato de dextrano+ 1 ml 20xSSC)

A mistura de hibridização foi aquecida a 92 °C por 10 minutos e incubada a 37°C por 30 minutos, e posteriormente adicionada às lâminas que foram cobertas por lamínula e incubadas em câmara úmida a 37 °C por 40 horas. Para a lavagem pós-hibridização, as lâminas foram incubadas em solução 0,7xSSC por 2 minutos a 70°C e em 2xSSC por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, incubadas em câmara úmida a 37°C com 100 µL de solução bloqueio (0,1g de solução bloqueio Sigma- Aldrich®, dissolvido em 9 ml H₂O + 1 ml solução TN) por 10 minutos. A detecção era realizada com Streptavidine-Cy5 (Invitrogen/Molecular Probes, Camarillo, USA), para as sondas marcadas com biotina-16-dUT, e com antidigoxigenina-rodamina (Roche Diagnostics, Indianapolis, USA) para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP. Para isso, adicionava-se 0,25 µl de cada anticorpo diluído em 100 µl de solução bloqueio a cada lâmina, as quais eram incubadas em câmara úmida por 45 minutos. Após a detecção, as lâminas foram lavadas em solução 1xTNT três vezes por 5 minutos cada. Por fim, utilizava-se DAPI para contrastar os cromossomos (Vozdova et al., 2019).

As preparações submetidas à FISH foram analisadas na microscopia de fluorescência, e para cada conjunto de sondas hibridizada com sucesso, 10 metáfases eram fotografadas para posterior análise. As fotos foram tiradas utilizando-se uma câmera Zeiss AxioCam MRm acoplada ao microscópio Olympus BX60 (objetiva de 100x), com auxílio do programa Axio Vision Release 4.8.2. As imagens foram então editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS6 Portable, e triadas para verificação dos cromossomos envolvidos nos rearranjos cromossômicos. Os resultados de hibridização foram utilizados para verificação de um padrão cromossômico populacional e para comparação com as análises filogenéticas.

3.3 GENÉTICA MOLECULAR

3.3.1 Obtenção das sequências de DNA

Dentre os 12 indivíduos previamente selecionados para este trabalho (Tabela 1), seis já possuíam mitogenomas completos sequenciados e montados (T24, T321, T322, T346, T370 e T371). A extração de DNA dos outros seis indivíduos (T20, T23, T49, T149, T275, T309), foi realizada pelo protocolo de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989), para amostras de pelo, e através do kit de extração *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (Promega), para amostras de anel leucocitário do sangue. Após a extração, a qualidade e a quantidade dos ácidos nucleicos foram avaliadas por três métodos complementares. A quantificação fluorimétrica foi realizada com o equipamento Qubit™ 4.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific), utilizando o kit específico para DNA (Qubit™ dsDNA HS Assay Kit), de acordo com as instruções do fabricante. Paralelamente, a concentração e a pureza foram estimadas por espectrofotometria (NanoDrop™ 2000, Thermo Fisher Scientific), e a integridade das amostras foi avaliada por eletroforese em gel de agarose a 1%, permitindo a observação de fragmentação ou degradação do DNA.

3.3.2 Amplificação e sequenciamento de genes mitocondriais

Foram utilizados fragmentos dos seguintes genes mitocondriais: 1) citocromo B (Cytb, 1140 pb) utilizando os primers L14124/H15149 (Irwin *et al.*, 1991) e FARH/FARL (Duarte *et al.*, 2008); 2) dehydrogenase subunidade 5 (ND5, 1821 pb) utilizando os primers ND5-13167/ND5-13709 e ND5-12326/ND5-12988 (Caparroz *et al.*, 2015); 3) Região controle do DNA mitocondrial (D-loop) de 660pb (primer Thr-L15926/DL-H16340) (Vila *et al.*, 1999).

Os fragmentos de DNA foram amplificados em termociclador Biorad™ usando uma reação de PCR padrão, conforme segue: 600µM de dNTPs, 1mM de MgCl₂, 1,33mg/ml de BSA, tampão 1x (200 mM Tris-HCL pH 8,4; 500 mM KCL), 1U Taq DNA polimerase (Platinum™, Thermo Fisher Scientific), 0,5pM do iniciador forward, 0,5 pM do iniciador reverse, 50 ng/µL de DNA, em um volume final de 30 µL. O

programa de temperaturas da reação foi: ciclo inicial de 2 min a 94°C para a desnaturação do DNA; 35 ciclos de: 94°C por 1 min, 55°C por 30 seg, 30 seg a 72°C e uma extensão final de 72°C por 10 min. Em todas as reações foram incluídos controles negativos para verificar a possibilidade de contaminação. Após a amplificação, 4µL de cada produto da PCR era corado com Gel Red™ (Biotium), e submetido à eletroforese em gel de agarose 2% sob transiluminador de luz ultravioleta 302 nm (BioAgency), fotodocumentados e analisados. Os produtos amplificados por PCR foram purificados utilizando o ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent (Thermo Fisher™), conforme as instruções do fabricante. Posteriormente, o sequenciamento foi realizado em um sequenciador automático ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems™), através de serviço prestado pelo Instituto de Biotecnologia (IBTEC) da UNESP, campus Botucatu.

3.3.3 Análise Molecular por DNA mitocondrial

Além dos espécimes analisados neste estudo, o conjunto final de amostras de referência incluiu sequências obtidas da base de dados GenBank (NCBI). Visando representar ainda mais a variabilidade geográfica da espécie *P. nemorivagus*, foram incorporadas sequências correspondentes ao topótipo da espécie, proveniente da Guiana Francesa, bem como de outro indivíduo oriundo da mesma região (acesso JN632660), e um do Peru (acesso JN632659), ambos sem informações citogenéticas associadas. Adicionalmente, foi incluída a sequência do topótipo de *Mazama gouazoubira medemi* (Barriga Bonilla, 1966), atualmente considerada sinônimo de *P. nemorivagus*, coletado na Colômbia e com dados citogenéticos disponíveis (Moreno, 2022). Para a composição do ingroup da análise, foram utilizadas também sequências de outras espécies da subtribo Blastocerina, a qual *P. nemorivagus* pertence. Para composição do *outgroup*, foram selecionadas sequências da subtribo Odocoileina, uma sequência da espécie *Alces alces* (tribo Alceini) e uma sequência de *Capreolus capreolus* (tribo Capreolini), que são tribos irmãs em relação à Odocoileini (Quadro 3).

Quadro 3. Espécimes componentes do *ingroup* e *outgroup* das análises filogenéticas.

ID	Acesso GenBank	Espécie	Origem
T20	*	<i>P. nemorivagus</i>	Rondônia, Brasil
T23	*	<i>P. nemorivagus</i>	Rondônia, Brasil
T24	MZ350861	<i>P. nemorivagus</i>	Rondônia, Brasil
T49	*	<i>P. nemorivagus</i>	Pará, Brasil
T149	*	<i>P. nemorivagus</i>	Mato Grosso, Brasil
T275	*	<i>P. nemorivagus</i>	Maranhão, Brasil
T309	*	<i>P. nemorivagus</i>	Amapá, Brasil
T321	*	<i>P. nemorivagus</i>	Amapá, Brasil
T322	*	<i>P. nemorivagus</i>	Amapá, Brasil
T346	MZ350867	<i>P. nemorivagus</i>	Pará, Brasil
T370	*	<i>P. nemorivagus</i>	Pará, Brasil
T371	*	<i>P. nemorivagus</i>	Pará, Brasil
T359	*	<i>P. nemorivagus</i> (neotipo)	Guiana Francesa
T433	*	<i>M. g. medemi</i>	Colômbia
-	JN632660	<i>P. nemorivagus</i>	Guiana Francesa
-	JN632659	<i>P. nemorivagus</i>	Perú
T377	MZ350858	<i>S. gouazoubira</i>	São Paulo, Brazil
T389	MZ350866	<i>S. gouazoubira</i>	Puerto Arecutacuá, Paraguay
-	JN632692	<i>P. puda</i>	Desconhecida
-	JN632603	<i>B. dichotomus</i>	Bolívia
-	OQ198442	<i>B. dichotomus</i>	Mato Grosso do Sul, Brasil
-	MZ350860	<i>O. bezoarticus</i>	Parque Nacional das Emas, Brasil
T358	MZ350857	<i>M. americana</i> (SS)	Guiana Francesa
T424	*	<i>M. americana</i> (SS)	Roraima, Brasil
T253	MZ350856	<i>M. americana</i> (JU)	Mato Grosso do Sul, Brasil
T385	OQ198444	<i>M. rufa</i>	Paraná, Brasil
T107	MZ350863	<i>M. nana</i>	Paraná, Brasil
T215	MZ350859	<i>M. jucunda</i>	São Paulo, Brasil
-	MN813763	<i>C. pygargus</i>	-
-	MF784604	<i>A. alces</i>	-

*Não publicado; - Indisponível; SS: *Sensu Strictu*; JU: citótipo Juína.

Obtidas as matrizes de cada gene, as sequências foram alinhadas no servidor on-line Mafft (Kato et al., 2019), com o alinhamento revisado e delimitado através do aplicativo Bioedit 7.2.6. (Hall, 1999). O programa Geneious Prime 2023.1.1 foi utilizado para traduzir as sequências de DNA dos genes *Cytb* e *ND5* em sequência de aminoácidos para busca por *stop codons* prematuros. Esse procedimento indicaria possíveis pseudogenes, e possibilitou o ajuste do alinhamento ao *frame* correto de

códons, ideal para futuras análises de saturação e partição. Uma vez alinhadas, as sequências foram concatenadas através do programa Mega 11 (Tamura et al., 2021), gerando uma matriz de 2838pb, sendo contabilizados os sítios variáveis (sítios com mutação em ao menos um animal) e os sítios parcimoniosamente informativos (PICs; sítios com mutações presentes em ao menos dois indivíduos). Foi então selecionado o melhor modelo evolutivo (menor AIC).

A hipótese filogenética foi estimada através de uma análise de máxima verossimilhança (ML) com uso do servidor on-line IQTree, inferida com uma corrida e 1.000 réplicas de bootstrap ultrarrápidas para avaliar o suporte dos nós (Trifinopoulos et al., 2016). As análises de inferência bayesiana (IB) foram realizadas no programa MR. BAYES 3.2.7a (Ronquist et al., 2012), implementada através do servidor on-line CIPRES *Science Gateway* (Miller et al., 2011). A IB foi conduzida por duas corridas independentes, cada uma com 4 cadeias de “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) de 10 milhões de gerações, e posteriormente foi aplicado um *burn-in* de 25% para inferir a melhor árvore consenso. O modelo de substituição utilizado foi de GTR + I + G, selecionado através do aplicativo MrModeltest 2.4 (Nylander, 2004).

As árvores obtidas de todas as análises foram então editadas com auxílio do programa FigTree v.1.4.4 (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). O suporte dos agrupamentos filogenéticos foi estimado pelas probabilidades posteriores.

3.3.4 Delimitação Molecular de Espécies

Foi utilizado o método coalescente *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC) para identificação de *molecular operational taxonomic units* (MOTUs) através do pacote SPLITS (SPecies Limits by Threshold Statistics; Monaghan et al., 2009) no programa R (R Core Team, 2017). Tal abordagem avalia a taxa de cladogênese ao longo de uma árvore ultramétrica gerada por IB, identificando um limiar em que há uma mudança significativa dessa taxa. A mudança indica a transição do processo de cladogênese entre espécies para intra-espécie (Fujita et al., 2012). Para essa análise, foi criada uma matriz apenas com as sequências de *P. nemorivagus*, e uma análise filogenética foi executada no pacote BEAST 1.10.4 (Suchard et al., 2018). O modelo evolutivo selecionado e os parâmetros de corrida foram implementados por meio do

aplicativo BEAUti do pacote BEAST para gerar o arquivo de entrada da análise, implementada através do servidor on-line CIPRES. A análise de MCMC (*Monte Carlo Markov Chains*) contou com 10 milhões de gerações, e teve a amostragem a cada mil gerações. Foram realizadas três corridas distintas. Foi utilizado o modelo de relógio *lognormal uncorrelated relaxed clock*, que não assume uma taxa de substituição constante. Os dados das três corridas independentes foram combinados através do aplicativo LogCombiner do pacote BEAST. As árvores geradas foram sumarizadas na melhor árvore através do aplicativo TreeAnnotator também do pacote, sendo aplicado um *burn-in* de 25%. A convergência da análise foi verificada por intermédio do aplicativo Tracer v.1.7, e foi considerada satisfatória quando apresentou valores de ESS (*Estimated Sample Size*) maiores que 200. As árvores finais foram visualizadas e editadas pelo aplicativo FigTree 1.4.4.

A hipótese do modelo GMYC foi testada com um e com múltiplos limiares. Na análise, a probabilidade do modelo GMYC é comparada perante a probabilidade de um modelo nulo, no qual apenas uma unidade é identificada (ausência de unidades dentro do grupo analisado), retornando um valor de significância da análise comparativa. A hipótese de que os modelos eram diferentes foi aceita quando apresentaram $p < 0,05$.

3.3.5 Distância genética

Foi também obtido um valor médio de distância genética intra e entre as populações já hipotetizadas (leste, oeste, norte amazônico) para a espécie, sendo o valor entre populações também comparado com os valores de distância entre as espécies da subtribo Blastocerina. Para as estimativas de distância genética foi utilizado o programa Mega 11, que identificou o modelo Tamura-Nei como melhor para a matriz em questão. O programa utiliza um algoritmo onde as sequências nucleotídicas são comparadas duas-a-duas entre si, gerando, desta forma, um valor numérico para a distância genética entre elas.

3.3.6 Rede de haplótipos

Uma rede de haplótipos foi gerada com as matrizes de sequências concatenadas dos genes Cytb e ND5 dos doze indivíduos analisados, a partir do software Pop Art 4.8.4 (Leigh e Bryant, 2015). A construção da rede de haplótipos foi aplicada pelo *median-joining* que se baseia no critério de redes com mínima abrangência (*minimum spanning network*) e utiliza *median vectors* (mv) para conectar os haplótipos observados (Sober, 1983). Os haplogrupos foram baseados na radiação da rede, avaliando-se a distância entre os haplótipos e entre os haplótipos derivados e, quando possível com o do centro do grupo. A rede foi colorida manualmente através do próprio programa PopArt conforme a região de origem da amostra.

4 RESULTADOS

4.2 ANÁLISE CITOGENÉTICA

A análise dos resultados de hibridização *in situ* fluorescente nas metáfases dos doze indivíduos de *P. nemorivagus* revelou uma variação do número diploide de 66 a 69, e número fundamental de 70 a 72. A fusão cêntrica entre os cromossomos 7 e 27 esteve ausente em três animais, e presente em nove, seis em heterozigose, e três em homozigose (Figura 3). A fusão em tandem entre o cromossomo X e o autossomo 15 esteve presente em sete animais (Figura 4), todos provenientes de regiões sul do rio Amazonas. Esta fusão mostrou-se envolver a região centromérica do cromossomo 15, que é homóloga ao BTA19, e a região terminal do braço p do cromossomo X ancestral, e pode ser considerada origem de um neo-X na espécie, que leva à ocorrência de sistema sexual múltiplo (XX/XY₁Y₂) nos indivíduos portadores, sendo o Y₂ o autossomo homólogo ao 15 fusionado ao X. Todos os indivíduos provenientes de localidades acima do rio Amazonas (Amapá - T309, T321, T322, Pará - T346), e um único indivíduo de uma localidade abaixo do rio (Maranhão - T275), não apresentam a fusão X-15, mantendo o X ancestral, com sistema sexual simples (Tabela 2).

Tabela 2. Resultados da FISH, demonstrando a presença ou ausência das fusões testadas nos animais selecionados.

Tese	Sexo	Origem	2n	NF	Fusão cêntrica 7;27	Fusão em tandem X;15
T20	F	Rondônia	66	70	++	+
T23	F	Rondônia	68	70	--	+
T24	M	Rondônia	68	70	+-	+
T149	F	Mato Grosso	67	70	+-	+
T49	M	Pará	68	70	+-	+
T275	F	Maranhão	69	72	+-	-
T370	F	Pará	68	70	--	+
T371	M	Pará	68	70	--	+
T346	F	Pará	68	72	++	-
T309	M	Amapá	68	71	++	-
T321	F	Amapá	69	72	+-	-
T322	F	Amapá	69	72	+-	-

Fusão 7;27: ++ (Homozigose), +- (Heterozigose), -- (Ausente). Fusão X;15: + (Presente), - (Ausente).

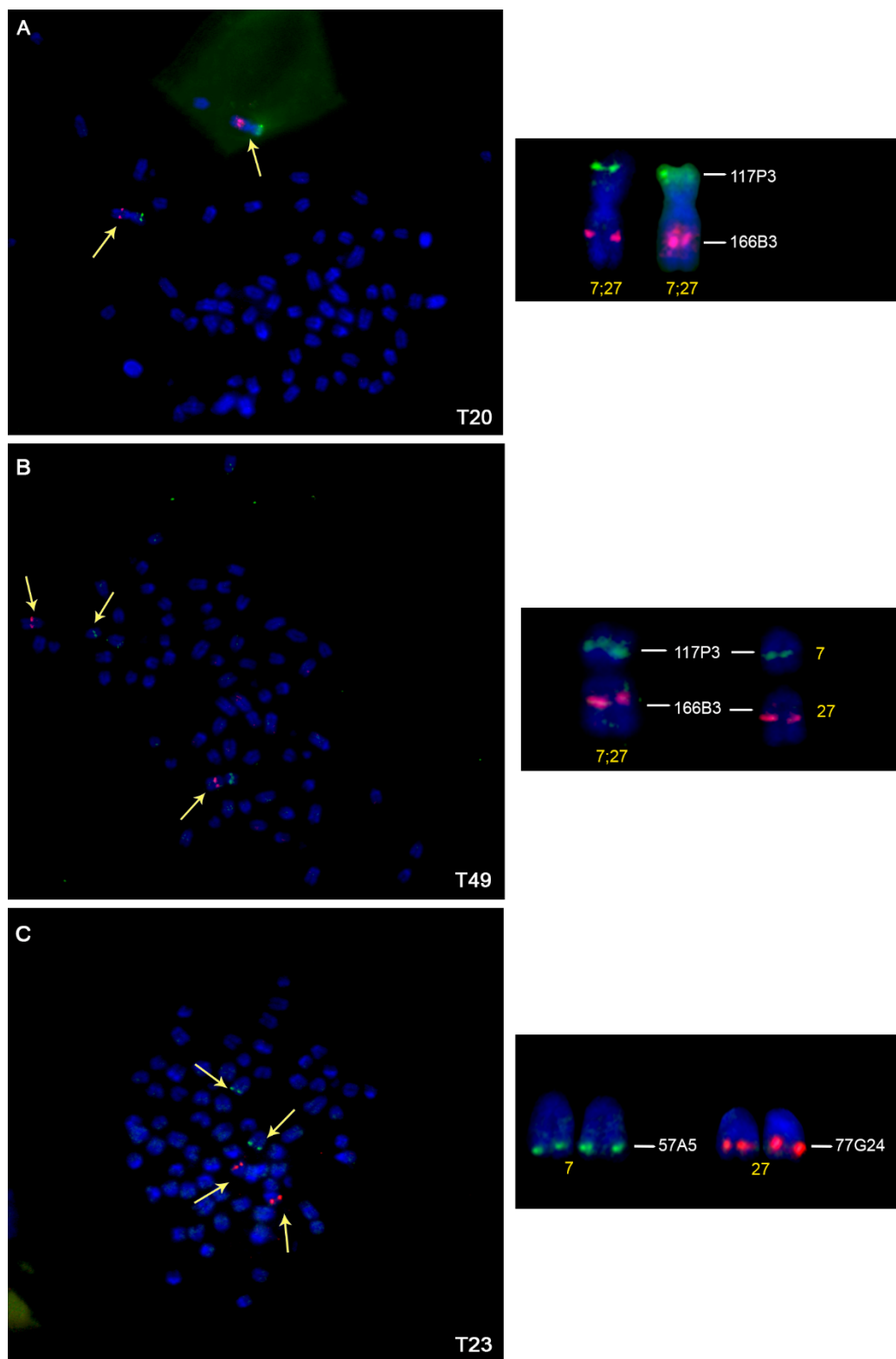


Figura 3. Resultados da análise de FISH para a fusão cêntrica entre os cromossomos 7 e 27 de *P. nemorivagus*. A) Fusão 7;27 em homozigose, mostrado pela sonda 117P3 (verde) no cromossomo 7 e sonda 166B3 (rosa) no cromossomo 27 de T20. B) Fusão 7;27 em heterozigose, mostrado pela sonda 117P3 (verde) no cromossomo 7 e sonda 166B3 (rosa) no cromossomo 27 de T49. C) Fusão 7;27 ausente, mostrado pela sonda 57A5 (verde) marcando o cromossomo 7 e sonda 77G24 (rosa) marcando o cromossomo 27 de T23.

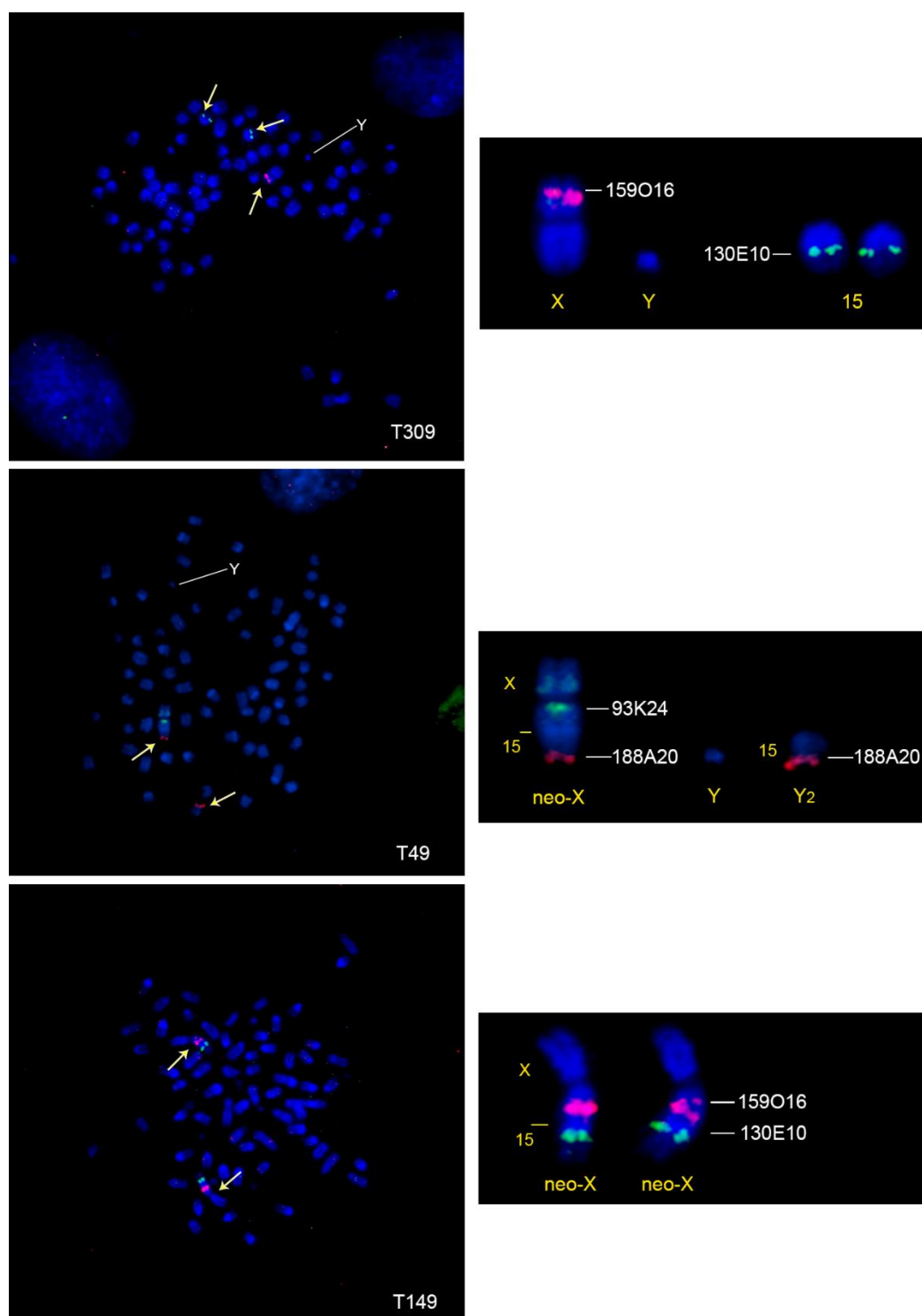


Figura 4. Resultados da análise de FISH para a fusão em tandem entre os cromossomos 15 e X de *P. nemorivagus*. A) Fusão ausente, mostrada pela sonda 159O16 (rosa) em X e 130E10 (verde) em 15 de T309 (macho, XY). B) Fusão presente, mostrada pela sonda 93K24 em X, e a sonda 188A20 em um cromossomo 15 e na região telomérica do braço q de X do indivíduo T49 (macho, XY1Y2). C) Fusão presente, sonda 159O16 (rosa) de X e 130E10 (verde) de 15 ambas presentes nos cromossomos X de T149 (fêmea).

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

A matriz de referência final com os cinco fragmentos concatenados de Cytb, ND5 e D-loop foi composta por 30 animais. Ela totalizou 2837pb, dentre eles foram contabilizados 938 sítios variados e 724 sítios parcimoniosamente informativos (35% em Cytb, 42% em ND5, 22% em D-loop).

As inferências filogenéticas em ambas as abordagens de IB e MV indicaram topologias convergentes e com três clados bem suportados em *P. nemorivagus*. O clado que agrupa as amostras de *S. gouazoubira*, *B. dichotomus* e *O. bezoarticus* na subtribo Blastocerina apresentou valores menores de suporte (Figura 5).

Os resultados da análise de delimitação molecular de espécies indicaram que o modelo GMYC de limiar único foi significativamente melhor que o modelo nulo ($p=0.00273$), sugerindo a presença de estrutura de espécies no conjunto de dados. Por outro lado, o modelo de múltiplos limiares não apresentou diferença significativa em relação ao nulo ($p=0,0945$), o que indica que a introdução de múltiplos pontos de transição não melhora substancialmente a delimitação das entidades evolutivas. O modelo de limiar único identificou quatro MOTUs (“*molecular operational taxonomic units*”) (Figura 6), que corroboram os clados recuperados nas análises de inferência filogenética, e separa *M. g. medemi* como uma MOTU distinta no clado Norte.

Em *P. nemorivagus*, cada clado exibiu correlação geográfica a uma região distinta de amostragem da floresta Amazônica, classificadas como: Oeste (Brasil - Rondônia e Mato Grosso, Peru), Leste (Brasil - Pará e Maranhão), e Norte (Brasil – Amapá, Guiana Francesa, Colômbia) (Figura 7).

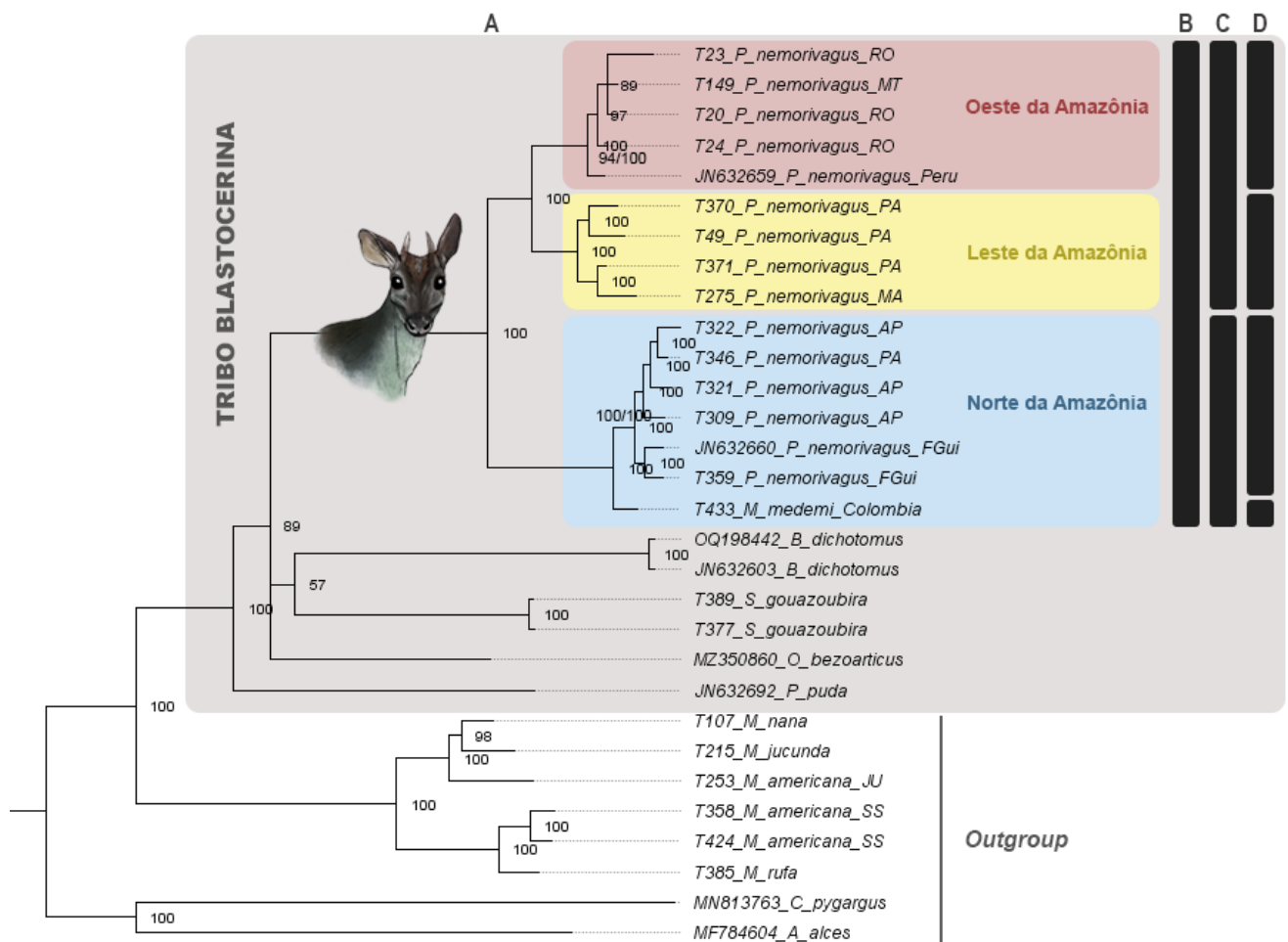


Figura 5. Resumo dos resultados da inferência filogenética e delimitação molecular de *P. nemorivagus*. (A) Árvore de hipótese filogenética gerada por Inferência Bayesiana pelo MrBayes, os valores representam a probabilidade posterior (%). (B) Hipótese taxonômica atualmente considerada. (C) Hipótese taxonômica de acordo com as variantes citogenéticas. (D) Hipótese taxonômica molecular representada pelas Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares obtidas pelo método de coalescência GMYC de limiar único. As sequências identificadas com T#### representam os animais amostrados e as sequências identificadas com ##### são aquelas obtidas do GenBank.

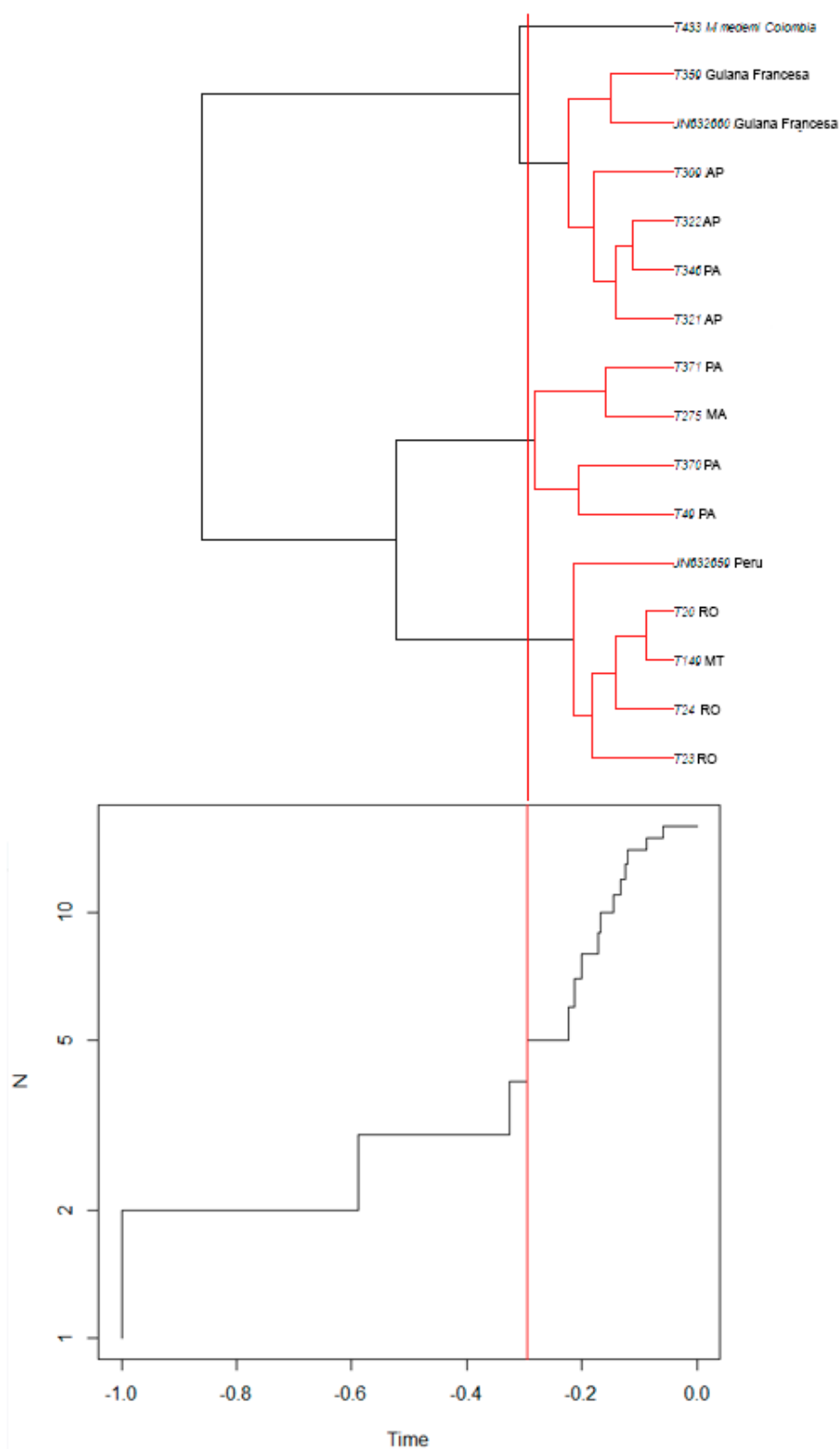


Figura 6. Análise de delimitação molecular de espécies dentro de *P. nemorivagus* pelo método GMYC. O primeiro gráfico mostra a hipótese filogenética com as 3 MOTUs identificadas pela análise destacadas em vermelho e o segundo mostra a cladogênese em função do tempo, ambos os gráficos com o limiar único significativo do modelo GMYC em vermelho ($p=0.00273$).

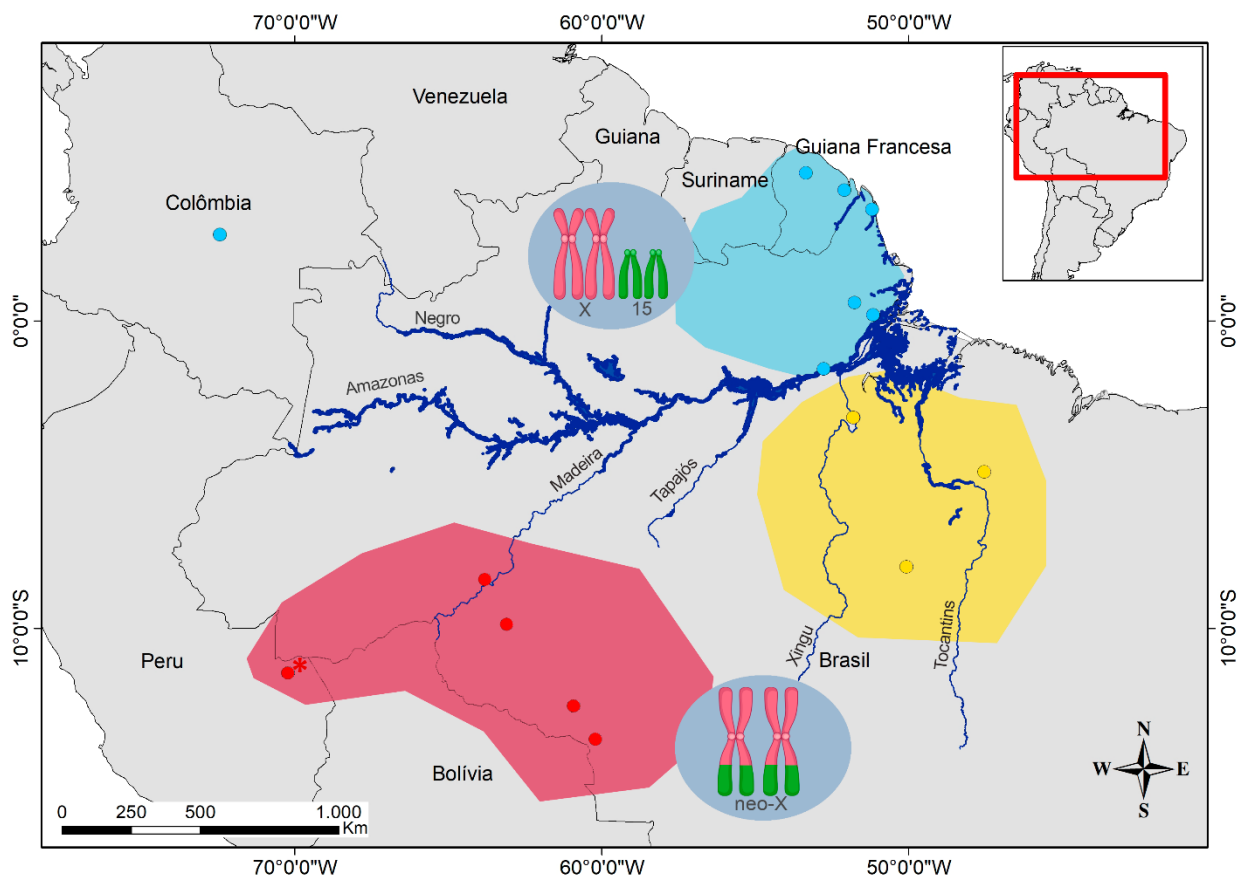


Figura 7. Mapa de procedência das 16 sequências incluídas na análise molecular, com indicação dos agrupamentos filogenéticos e biogeográficos identificados: Oeste (vermelho) – Rondônia, Mato Grosso e Peru* (este último não possui localização exata); Leste (amarelo) – Pará e Maranhão; Norte (azul) – Amapá, Guiana Francesa e Colômbia, e os dois citótipos distintos identificados: sistema sexual simples (XX) no norte do rio Amazonas, e sistema sexual múltiplo (neo-X) devido à fusão X-autossômica presente nas populações do sul do rio. O mapa também apresenta a hidrografia da região, incluindo o rio Amazonas e seus principais afluentes.

A rede de haplótipos gerada através do método median-joining, com base nos fragmentos concatenados dos genes Cytb e ND5, revelou 16 haplótipos representados um por cada animal, sem nenhum haplótipo compartilhado entre eles (Figura 8). Apesar de únicos, os haplótipos foram agrupados de forma semelhante à árvore filogenética, com correlação geográfica, mostrando similaridade maior de herança materna nos indivíduos dentro dos grupos das localidades correspondentes aos clados filogenéticos norte, oeste e leste. As amostras do Norte foram agrupadas juntas, com algumas variações genéticas menores observadas entre elas. O grupo do Oeste é conectado com o grupo do Norte por uma maior divergência, indicado por ramos mais longos e a

presença de vários *median vectors*. A região Leste apresenta conexão com o Oeste, mas não com Norte.

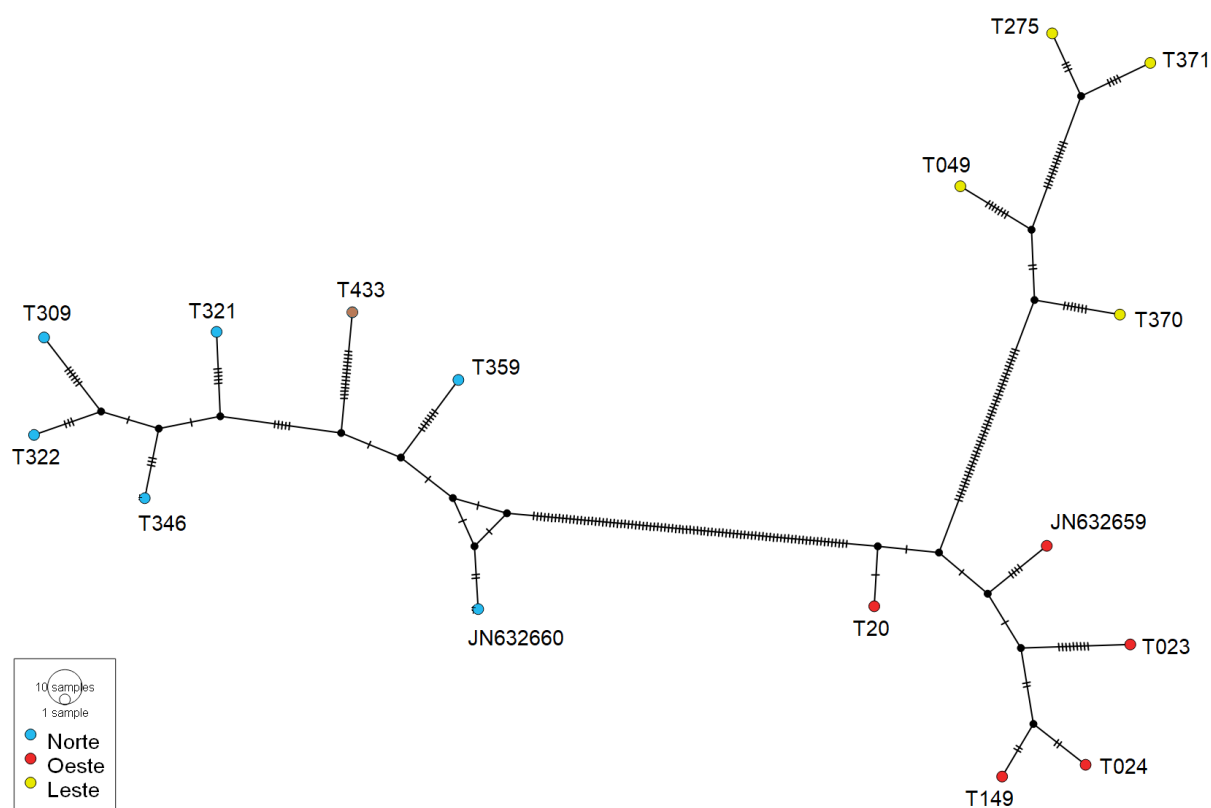


Figura 8. Rede de haplótipos dos fragmentos dos genes concatenados (Cytb + ND5) das amostras de *P. nemorivagus* reproduzida pelo método *median-joining*. Os números nos ramos indicam passos mutacionais entre os haplótipos relacionados. Os pontos pretos são os *median vectors*, representações de haplótipos intermediários e faltantes à rede gerada. Os haplótipos estão representados por círculos coloridos, onde cada cor corresponde a uma região geográfica distinta: azul para a região Norte (marrom – T433 sendo *M.g. medemi* da Colômbia), vermelho para a região Oeste, e amarelo para a região Leste.

As análises de distância genética foram realizadas entre todos os indivíduos (Quadro 4), bem como entre os grupos Norte, Leste e Oeste, e entre os indivíduos dentro de cada grupo. A distância genética média entre todos os indivíduos foi de 0,04. Dentro dos grupos e entre grupos, foram obtidas a distância máxima, mínima e média, e plotadas em um gráfico (Gráfico 1). A distância média dentro do grupo Norte foi de 0,007, e tanto dentro de Leste e quanto de Oeste foram iguais a 0,01. É possível notar que a distância genética entre o grupo Norte dos demais é maior ($\approx 0,06$) do que entre Leste e Oeste (0,03), o que condiz com a análise filogenética e rede haplotípica, uma vez que o clado Norte é isolado, enquanto Leste e Oeste são clados irmãos.

Quadro 4. Distância genética entre dezesseis indivíduos de *P. nemorivagus*, sendo doze deles componentes deste estudo, três originados do GenBank, e *M. g. medemi* não publicado. A proporção no número de substituições de bases por sítio entre as sequências é mostrado, de acordo com o modelo Tamura-Nei.

	GF*	T359*	T322	T346	T321	T309	T433*	Peru*	T020	T023	T149	T024	T370	T049	T371	T275
GF*																
T359*	0,007															
T322	0,012	0,011														
T346	0,011	0,009	0,007													
T321	0,009	0,008	0,005	0,004												
T309	0,007	0,006	0,006	0,004	0,003											
T433*	0,008	0,007	0,012	0,011	0,009	0,007										
Peru	0,061	0,059	0,065	0,058	0,062	0,062	0,057									
T020	0,058	0,056	0,062	0,055	0,060	0,057	0,055	0,007								
T023	0,061	0,059	0,065	0,058	0,063	0,058	0,057	0,017	0,015							
T149	0,048	0,049	0,055	0,047	0,052	0,048	0,049	0,007	0,001	0,012						
T024	0,063	0,061	0,067	0,059	0,064	0,062	0,059	0,009	0,008	0,020	0,006					
T370	0,055	0,053	0,059	0,052	0,056	0,054	0,051	0,030	0,028	0,034	0,026	0,026				
T049	0,059	0,057	0,063	0,055	0,060	0,056	0,055	0,037	0,033	0,035	0,029	0,034	0,011			
T371	0,055	0,053	0,059	0,051	0,056	0,052	0,051	0,033	0,030	0,037	0,029	0,029	0,008	0,014		
T275	0,059	0,057	0,062	0,055	0,060	0,056	0,055	0,032	0,029	0,039	0,028	0,027	0,010	0,014	0,004	

*GF: indivíduo da Guiana Francesa JN632660; T359: Neótipo de *P. nemorivagus*; T433: Neótipo de *M. g. medemi*; Peru: Indivíduo JN632659.

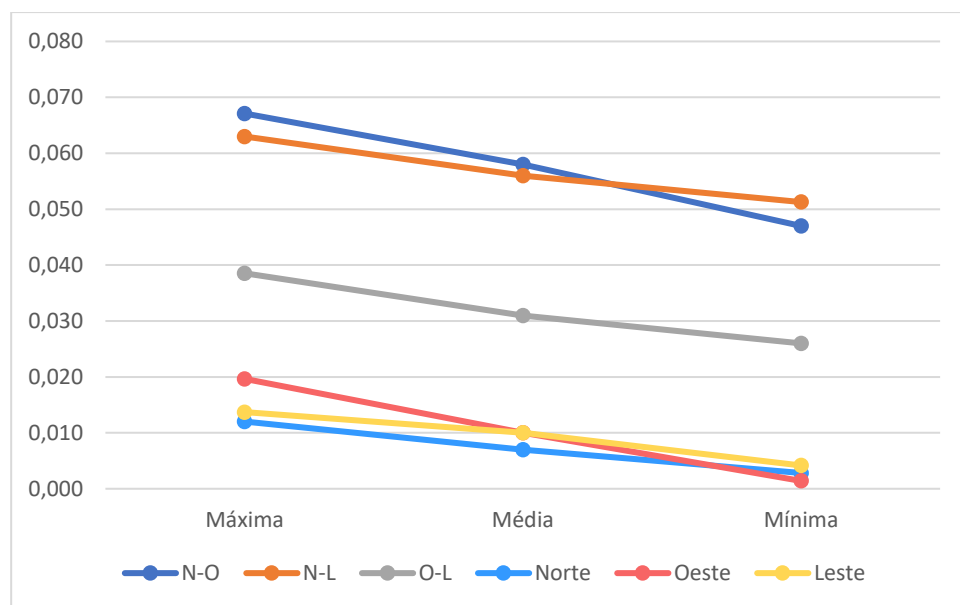


Gráfico 1. Distâncias média, máxima e mínima calculadas dentro e entre grupos.

5 DISCUSSÃO

5.1 CITOGENÉTICA

Os resultados citogenéticos obtidos corroboram a descrição cariotípica previamente feita de *P. nemorivagus*, cuja variação em $2n$ e NF é devido a duas fusões distintas (Fiorillo et al., 2013; Morales-Donoso et al., 2023). Todos os indivíduos analisados apresentaram cromossomos X e Y submetacêntricos e múltiplos cromossomos B. As variações foram vistas no sistema sexual, podendo ser simples ou múltiplo, dependendo da presença ou ausência da fusão em tandem X;15, e nos autossomos em sua maioria acrocêntricos, com a presença de um ou dois cromossomos submetacêntricos em caso de ocorrência da fusão cêntrica 7;27, observadas em heterozigose ou homozigose em diferentes indivíduos.

Não foi observada correlação entre as fusões cromossômicas, indicando que a presença de uma fusão não está associada à outra, ocorrendo de forma independente. A fusão cêntrica 7;27, em particular, não apresentou correlação geográfica, ocorrendo de maneira aleatória nas três populações analisadas. Em contrapartida, a fusão em tandem X-autossômica parece seguir um padrão específico, com animais do clado Norte apresentando o cromossomo X ancestral, e portanto sistema sexual simples, enquanto os do clado Leste e Oeste possuem o X fusionado e sistema sexual múltiplo. A única exceção foi o indivíduo T275, que filogeneticamente e geograficamente pertence ao clado Leste, mas citogeneticamente possui sistema sexual simples. A presença deste animal sugere a existência de mais indivíduos com sistema sexual simples nas populações dos clados Leste e Oeste, embora talvez de forma menos frequente, permitindo a coexistência de ambos os sistemas sexuais nessas regiões.

O papel dos rearranjos cromossômicos na evolução e especiação de mamíferos é amplamente discutido, e fusões são frequentemente encontradas em diversas espécies de Cervidae (Duarte e Jorge, 2003; Abril et al., 2010; Rubes et al., 2012; Dobigny et al., 2017; Frohlich et al., 2017; Damas et al., 2021; Proskuryakova et al., 2023). O modelo de disfunção híbrida propõe que indivíduos heterozigotos para fusões cromossômicas apresentariam fertilidade reduzida devido à formação de gametas desbalanceados, o que resultaria em isolamento reprodutivo entre populações, até que

os rearranjos se tornassem fixos (White, 1978; Rieseberg, 2001). Dentre os cervídeos Neotropicais, o complexo *Mazama americana* é caracterizado por possuir três linhagens citogenéticas devido a fusões cêntricas e em tandem, correlacionadas com a localização geográfica, que ajudariam a promover adaptações locais e especiação (Bernegossi et al., 2024).

No entanto, contrariando expectativas, ruminantes heterozigotos para fusões cêntricas não demonstraram sinais de erros na meiose, nem efeitos adversos na aptidão reprodutiva (Kingswood et al., 1994; Vozdova et al., 2014; Galindo et al., 2021). Ademais, uma fusão cêntrica homozigótica sugere maior estabilidade durante a segregação na meiose, sem implicações negativas para o fitness reprodutivo, além de aumentar as chances de fixação em populações (Galindo et al., 2021). Diante disso, a falta de correlação geográfica sugere que a fusão 7;27 em *P. nemorivagus* seja um polimorfismo com efeitos limitados, não influenciando diretamente a dinâmica populacional ou a capacidade de adaptação da espécie.

Já fusões em tandem foram consideradas mais impactantes. Em híbridos entre os citótipos de *Mazama americana*, o acúmulo de fusões em tandem em heterozigose envolvendo cromossomos autossomos está associado à subfertilidade ou infertilidade completa, configurando uma barreira reprodutiva clara (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021). No entanto, em machos, uma única fusão em tandem não impediu a reprodução entre indivíduos, embora tenha causado uma diminuição na qualidade espermática (Galindo et al., 2021). Quanto a fusões envolvendo cromossomos sexuais, foi relatado que vacas heterozigotas para uma translocação X-autossômica apresentam taxas significativamente mais baixas de bezerros nascidos vivos e maiores taxas de aborto em comparação com fêmeas cromossomicamente normais (Basrur et al., 2001).

Apesar de o cromossomo X ser considerado altamente preservado, uma revisão identificou mais de 150 espécies, a maioria em Artiodactyla e Rodentia, que possuem sistemas cromossômicos sexuais variados, devido a translocações, inversões, e mudanças na posição do centrômero (Graphodatsky, 1989; Hughes et al., 2024). Comparado ao cromossomo X ancestral de Artiodactyla, o X da subordem Ruminantia ainda possui grandes segmentos conservados em seu genoma, mas sofreu múltiplos rearranjos (Proskuryakova et al., 2017). Na família Cervidae há uma grande variação

morfológica no X, com relatos de fusões X-autossômicas em diferentes gêneros (Huang et al., 2006; Cifuentes-Rincón et al., 2020; Peres et al., 2021; Yin et al., 2021). Diferentes espécies de cervídeos neotropicais são caracterizadas por possuírem sistemas sexuais múltiplos devido ao neo-X, incluindo o complexo Veado-mateiro (*Mazama americana* e *M. rufa*), *Odocoileus pandora*, *Bisbalus citus*, e *Mazama temama* (Peres et al., 2021; Sandoval et al., 2023, 2024b, 2024a; Bernegossi et al., 2024).

Embora translocações X-autossômicas sejam comuns na ordem Artiodactyla, a presença de dois sistemas cromossômicos sexuais em uma mesma espécie é rara, tendo sido relatada apenas em *P. nemorivagus*, *Elaphodus cephalophus*, e *Nanger soemmerringii* (Cao et al., 2005; Shi et al., 2008; Fiorillo et al., 2013; Povill et al., 2023). No entanto, em mamíferos roedores este tipo de sistema polimórfico é mais comum. O *Reithrodon typicus*, um roedor cricetídeo sul-americano, apresenta uma variação nos cromossomos sexuais geograficamente correlacionados: populações argentinas têm cromossomos XY padrão, enquanto populações brasileiras abrigam fusões distintas de autossomos X e Y (Steinberg et al., 2022; Di-Battista et al., 2023). Apesar disso, estudos sobre as implicações no balanceamento gamético e no fitness reprodutivo em híbridos resultantes do cruzamento de indivíduos de sistemas sexuais diferentes são escassos, e carece de investigação (Hughes et al., 2024).

A identificação de dois sistemas cromossômicos sexuais em *P. nemorivagus* com aparente correlação geográfica, pode ser um indicativo da ocorrência de histórias cromossômicas evolutivamente diferentes entre as populações. Em primatas do gênero *Alouatta*, diferentes espécies apresentam variações cromossômicas marcantes, incluindo translocações envolvendo os cromossomos sexuais, tanto o X quanto o Y. Notavelmente, espécies que possuíam mais de um sistema cromossômico sexual foram posteriormente subdivididas em subespécies e, em alguns casos, reconhecidas como táxons distintos, como observado no grupo *Alouatta seniculus* (De Oliveira et al., 2002; Hughes et al., 2024).

A coexistência de dois citótipos em uma mesma região (XX/XY e XX/XY₁Y₂), revelado pelo indivíduo T275, indica a possível ocorrência de híbridos. No NUPECCE, um macho de *P. nemorivagus* com sistema simples (XY) foi pareado com uma fêmea de sistema múltiplo (neo-X), e a prole feminina resultante apresentou uma fusão X-autossômica em heterozigose. Porém, ao contrário do que se imaginava, as filhas deste

caso apresentaram estro, copularam e ambas deram à luz descendentes saudáveis. Este fato revela que, apesar dos diferentes sistemas cromossômicos sexuais, não existe barreira pré-zigótica total entre os indivíduos. Apesar disso, não se pode excluir a existência de um declínio na fertilidade dessas fêmeas, devido a possíveis taxas maiores de erros na divisão meiótica na oogênese, ou maiores riscos de nascimento de filhotes com síndromes cromossômicas (Bonato et al., 2025).

Neste contexto, fusões X-autossômicas são um dos mecanismos pelos quais neo-X evoluem, e podem trazer vantagens adaptativas quando promovem a supressão da recombinação entre loci adaptativos e genes ligados ao sexo (Rieseberg, 2001). Essa restrição na recombinação pode também contribuir para o acúmulo de incompatibilidades genéticas entre populações, reforçando o isolamento reprodutivo e promovendo a diferenciação evolutiva (Faria e Navarro, 2010). Portanto, diante dos resultados deste trabalho, é possível inferir que a população de *P. nemorivagus* de regiões acima do rio Amazonas tenha retido o X ancestral, e as populações abaixo do rio estejam passando por um processo de fixação do neo-X, embora evidências mais robustas, como o aumento do número amostral e a incorporação de dados genômicos, devam ser avaliadas.

5.2 GENÉTICA MOLECULAR

Os resultados aqui observados reforçam a estruturação genética de *P. nemorivagus*, como já havia sido apontado em trabalhos anteriores (Duarte et al., 2008; Figueiredo, 2014; Morales-Donoso, 2017). As informações obtidas através do DNA mitocondrial dos animais estudados, e subsequentes análises filogenéticas, de delimitação de espécies, de distância genética e de rede de haplótipos mostraram diferenças notáveis entre as populações analisadas. O DNA mitocondrial é amplamente empregado em estudos de reconstrução da história evolutiva e de processos de especiação, pois apresenta alta variabilidade intra- e interespecífica, não sofre recombinação e, por esse motivo, é considerado mais neutro (Taberlet et al., 1996; Galtier et al., 2009).

Todas as metodologias de análises moleculares utilizadas neste trabalho agrupam igualmente a espécie em três clados distintos, correspondentes a regiões da floresta Amazônica distantes entre si. Oliveira et al. (2020) utilizando sequências de DNA mitocondrial provenientes de amostras fecais demonstrou que a população de *P. nemorivagus* da Mata Atlântica forma ainda um quarto clado, isolado dos demais da Floresta Amazônica. O resultado do modelo GMYC indicou quatro diferentes MOTUs, coerentes com os três clados recuperados nas árvores filogenéticas, separando apenas *M. g. medemi* como uma MOTU isolada. O método GMYC é utilizado como incremento à análises genéticas tradicionais, pois permite identificar unidades moleculares que representam espécies em potencial (Fujita et al., 2012).

Ainda, a distância genética intra-grupos foi menor (0,7% no Norte, 1% em Leste e Oeste) do que entre grupos (N-L e N-O de 6%, L-O de 3%), que apresentou distância significativa. Gutiérrez et al. (2017) ao analisar 192 sequências de Cytb de cervídeos Neotropicais (tribo Odocoileini), obteve uma distância de 5,9% entre indivíduos de *P. nemorivagus* do grupo 1 (Guiana) e grupo 2 (Brasil e Peru), e uma distância intra-grupo de 3,5%, considerando em um mesmo grupo animais de diferentes regiões. Em contrapartida, no mesmo estudo a distância genética entre as espécies irmãs *M. nana* e *M. jucunda* foi de apenas 1,3%, e entre diferentes espécies irmãs (gêneros *Hippocamelus*, *Subulo* e *Odocoileus*) variou de 1,8% a 6,2%. Estes achados confirmam e reforçam a estruturação genética divergente entre os diferentes clados de *P. nemorivagus*.

A Floresta Amazônica é uma das maiores e mais diversas florestas do mundo, estando presente em nove países, e não é homogênea em sua riqueza. É um mosaico de diferentes áreas de endemismo, separadas por seus principais rios, cada um com diferentes grupos de espécies devido a histórias evolutivas isoladas (Morrone e Crisci, 1995; Silva et al., 2005). Estudos baseados na distribuição geográfica de espécies de vertebrados terrestres e de aves hipotetizam oito regiões de endemismo: Guiana, Imeri e Napo (Equador), Peru, e o Brasil sendo dividido em Rondônia, Belém, e Pará, este ainda dividido em Tapajós e Xingu (Cracraft, 1985; Avila Pires, 1995; Silva e Oren, 1996; Ron, 2000; Haffer e Prance, 2001; Silva et al., 2002).

Os clados monofiléticos com correlações geográficas demonstram populações distintas de *P. nemorivagus* em regiões diferentes de endemismo. O rio Amazonas

parece ser uma forte barreira geográfica entre clados Norte e Leste-Oeste, mas é necessário outras análises, além das linhagens mitocondriais, para avaliar fluxo e migração entre as populações de Leste e Oeste, e se rios menores seriam barreiras ou não para a espécie. Padrões semelhantes já foram vistos em outras espécies brasileiras (Ribas et al., 2012; Abreu et al., 2025). Nos esquilos do gênero *Guerlinguetus*, análises genéticas de DNA mitocondrial e nuclear mostram uma separação entre três populações: leste da Amazônia (Pará), restante da Amazônia, e Mata Atlântica (Abreu et al., 2025). Já nas aves do gênero *Psophia*, foram identificadas oito espécies, cada uma endêmica a uma área de endemismo da Amazônia, sendo filogeneticamente distribuídas em dois clados: clado das populações acima do rio Amazonas e clado das populações abaixo do rio (Ribas et al., 2012).

Nesse contexto, duas teorias principais ajudam a explicar a origem e manutenção da elevada biodiversidade amazônica: a teoria das barreiras fluviais e a teoria dos refúgios. Ambas apontam que, em distintos momentos do tempo geológico, barreiras ambientais limitaram a migração e o fluxo gênico entre populações, favorecendo o isolamento geográfico e, conseqüentemente, a especiação (Wallace, 1852; Haffer, 1969; Ayres e Clutton-Brock, 1992). A especiação tem maior probabilidade de ser desencadeada em ambientes onde o isolamento genético ocorre muito rapidamente, motivado por barreiras recentemente estabelecidas à migração (Abreu et al., 2025).

De acordo com a datação molecular de Duarte *et al.* (2008), os clados norte e “sul” de *P. nemorivagus* teriam se diversificado por volta de 2 milhões de anos atrás. Já Figueiredo (2014) sugere uma diversificação ainda mais recente, estimada em aproximadamente 1,62 milhões de anos. Assim, a separação entre populações e a cladogênese vista nas análises filogenéticas do presente estudo tem coerência temporal com as teorias de diversificação da Amazônia. Elas teriam ocorrido durante o Pleistoceno (2,6 - 0,01 MA), período caracterizado por intensas flutuações climáticas, que resultaram em ciclos de contração e expansão das florestas tropicais, formação de refúgios e isolamento de populações. Essas dinâmicas ocorreram após o estabelecimento das grandes bacias hidrográficas da Amazônia, cuja origem está associada à elevação da Cordilheira dos Andes no final do Mioceno (Costa et al., 2001; Hoorn et al., 2010; Kern et al., 2023; Abreu et al., 2025). As flutuações climáticas do

Pleitoceno também são sugeridas como causadoras da diversificação da biota na Mata Atlântica (Carnaval e Moritz, 2008).

Assim, embora o rio Amazonas revela-se uma forte barreira geográfica para a espécie, os fatores distância e habitat também devem ser considerados no isolamento das populações. Gutiérrez et al. (2017) discute que a espécie é predominantemente associada a florestas úmidas, o que pode explicar o padrão filogeográfico identificado. Oliveira et al., (2020) reforça o argumento ao demonstrar uma maior proximidade genética entre as populações de *P. nemorivagus* na Mata Atlântica com as populações do sul do rio Amazonas. Estas duas florestas são separadas por regiões de clima seco e de vegetação florestal reduzida. A espécie pode ter se dispersado para esta região através de corredores florestais contínuos entre as duas florestas (Batalha Filho et al., 2013; Oliveira et al., 2020). Para avaliar se a divergência genética observada entre Leste e Oeste é devido a distância, seria necessário uma amostragem mais ampla nas regiões intermediárias.

Entre os cervídeos neotropicais, além de *P. nemorivagus*, outras espécies também apresentam populações geneticamente divergentes. O veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) possui populações geograficamente isoladas, com elevada diferenciação genética que se correlaciona com variações morfológicas, tendo sido reconhecidas sete subespécies distintas (González et al., 1998; González et al., 2002). Já o complexo *M. americana* exibe não apenas ampla variação cariotípica, mas também um padrão filogenético polifilético, no qual diferentes clados estão associados a citótipos específicos. O citótipo Paraná foi revalidado como um táxon único, nomeado *M. rufa*, utilizando achados citogenéticos e moleculares (Peres et al., 2021).

5.3 REVISÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE *P. nemorivagus*

A delimitação de espécies que se diversificaram de forma recente e rápida é um desafio, dificultando a definição de limites precisos entre linhagens e a reconstrução da sequência de eventos de diversificação (Revell et al., 2008). Em contraste com variações cromossômicas intensas e claras barreiras reprodutivas identificadas no gênero *Mazama*, os resultados citogenéticos encontrados em *P. nemorivagus* não são suficientes para separar os citótipos em dois táxons, mas a existência de dois sistemas

cromossômicos sexuais demonstram sinais de evolução cariotípica distintas entre o norte e sul do rio Amazonas. Por outro lado, no aspecto da genética molecular e biogeográfico, a espécie é muito bem separada em três clados correlacionados a regiões de endemismo.

Os resultados obtidos neste estudo ainda não oferecem evidências suficientes para reconhecer formalmente o táxon como mais de uma espécie, apesar da hipótese de um possível complexo de espécies crípticas. No entanto, os dados disponíveis sustentam a interpretação de que suas populações apresentam diferenciação relevante no contexto conservacionista. Assim, propõe-se o reconhecimento de três unidades evolutivamente significativas (ESUs) distintas na Floresta Amazônica - Norte, Leste e Oeste, somadas à ESU já proposta por Oliveira et al. (2020) para a população da Mata Atlântica.

O termo ESU surgiu com o objetivo de melhor caracterizar a gama de diversidade encontrada entre populações conspecíficas, com base em várias métricas, incluindo história natural, morfometria, distribuição e genética, conforme revisado por Hoelzel, 2023. Na Lei das Espécies Ameaçadas (*Endangered Species Act* - ESA) dos Estados Unidos, por exemplo, uma ESU pode ser considerada como uma espécie para fins de proteção e conservação (Waples, 1998, 1991).

O reconhecimento de ESUs é importante pois ao considerar as histórias evolutivas distintas entre populações, permite estimar níveis de diversidade genética, fluxo gênico, introgressão, e evitar depressão endogâmica ou exogâmica entre elas, importantes na tomada de decisões para conservação (Groves et al., 2017; Barbosa et al., 2018). Assim, para fins de manejo, recomenda-se evitar o contato entre as ESUs Norte, Leste, Oeste e Mata Atlântica, uma vez que essas unidades apresentam diferenças genéticas associadas ao isolamento geográfico. Além disso, destaca-se a importância da realização de novos estudos com maior abrangência amostral, incluindo regiões da floresta Amazônica ainda não exploradas para a espécie, tanto no Brasil quanto em outros países amazônicos, a fim de elucidar de forma mais completa a complexidade citogenética e molecular de suas populações.

6 CONCLUSÃO

Com o uso integrado de duas abordagens genéticas robustas, este estudo forneceu evidências mais consistentes sobre a variação genética entre populações de *P. nemorivagus*. Os resultados sustentam a delimitação de Unidades Evolutivamente Significativas (ESUs), o que representa um avanço fundamental para o desenvolvimento de estratégias de conservação mais eficazes e baseadas em dados genéticos confiáveis, contribuindo também para uma avaliação mais precisa do status de conservação da espécie.

Além disso, os dados revelaram que o rio Amazonas atua como uma barreira geográfica relevante para a ESU Norte das ESUs Leste e Oeste, e levantam a hipótese de que fatores como isolamento por distância possam estar atuando na divergência entre as ESUs Leste e Oeste. Esses achados destacam a complexidade dos fatores históricos e geográficos que moldam a diversidade genética da espécie, reforçando a necessidade de uma abordagem conservacionista regionalizada e informada por dados filogeográficos.

7 REFERÊNCIAS

- Abreu EF, Prado JR, Maldonado JE, Wilson DE, Percequillo AR, Pavan SE (2025) Recent, Intricate Speciation in Amazonia Uncovered by a Multilayered Genomic Analysis of Tree Squirrels. **Systematic Biology**. syaf013.
- Abril VV e Duarte JMB. (2008) Chromosome Polymorphism in the Brazilian Dwarf Brocket Deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**. 31(1):53–57.
- Abril VV, Carnelossi EAG, González S, Duarte JMB (2010) Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 128(1–3):177–187.
- Avila Pires TCS. (1995) Lizards of Brazilian Amazonia. **Zoologische Verhandelingen**. 299:1–706.
- Ayres JM e Clutton-Brock TH. (1992) River Boundaries and Species Range Size in Amazonian Primates. **The American Naturalist**. 140(3):531–537.
- Baker RJ e Bradley RD. (2006) Speciation in Mammals and the Genetic Species Concept. **Journal of Mammalogy**. 87(4):643–662.
- Barbosa S, Mestre F, White TA, Paupério J, Alves PC, Searle JB (2018) Integrative approaches to guide conservation decisions: Using genomics to define conservation units and functional corridors. **Molecular Ecology**. 27(17):3452–3465.
- Barriga Bonilla E. (s.d.) Estudios Mastozoológicos Colombianos, II. URL: <https://revistas.unal.edu.co/index.php/cal/article/view/33708>. Acesso em: 31 jul. 2025.
- Basrur PK, Reyes ER, Farazmand A, King WA, Popescu PC (2001) X-Autosome Translocation and Low Fertility in a Family of Crossbred Cattle. **Animal Reproduction Science**. 67(1–2):1–16.
- Batalha Filho H, Fjeldså J, Fabre PH, Miyaki, CY (2013) Connections between the Atlantic and the Amazonian forest avifaunas represent distinct historical events. **Journal of Ornithology**. 154:41–50.
- Bernegossi AM, Galindo DJ, Peres PHF, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte, JMB (2024) Comparative karyotype analysis of the red brocket deer (*M. americana* sensu lato and *M. rufa*) complex: evidence of drastic chromosomal evolution and implications on speciation process. **Journal of Applied Genetics**. 65(3):601–614.
- Bernegossi AM, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Galindo DJ, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2022) Cytogenetic Mapping of Cattle BAC Probes for the Hypothetical Ancestral Karyotype of the Family Cervidae. **Cytogenetic and Genome Research**. 162(3):140–147.
- Bonato RM, Bernegossi AM, Sandoval EDP, Cernohorska H, Vozdova M, Duarte JMB (2025) Neo-X-Linked Chromosome Polymorphism: Cytogenetic Insights from *Passalites nemorivagus* (Mammalia, Cervidae). **Animals**. 15(17):2557.

- Cao X, Jiang H, Zhang X (2005) Polymorphic Karyotypes and Sex Chromosomes in the Tufted Deer (*Elaphodus cephalophus*): Cytogenetic Studies and Analyses of Sex Chromosome-Linked Genes. **Cytogenetic and Genome Research**. 109(4):512–518.
- Caparroz R, Mantellatto AMB, Bertoli DJ, Figueiredo MG, Duarte JMB (2015) Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. **Genetics and Molecular Biology**. 38(3):338–345.
- Carnaval AC e Moritz C. (2008) Historical climate modelling predicts patterns of current biodiversity in the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Biogeography**. 35(7):1187–1201.
- Cernohorska H, Kubickova S, Vahala J, Rubes J (2012) Molecular Insights into X;BTA5 Chromosome Rearrangements in the Tribe Antilopini (Bovidae). **Cytogenetic and Genome Research**. 136(3):188–198.
- Cifuentes-Rincón A, Morales-Donoso JA, Sandoval EDP, Tomazella IM, Mantellatto A MB, De Thoisy B, Duarte JMB (2020) Designation of a neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla, Cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. **ZooKeys**. 958:143–164.
- Costa JBS, Bemerguy RL, Yociteru H, Borges MS (2001) Tectonics and paleogeography along the Amazon river. **Journal of South American Earth Sciences**. 14(4):335–347.
- Cracraft J. (1985) Historical biogeography and patterns of differentiation within the South American avifauna: areas of endemism. **Ornithological Monographs**. 49–84.
- Cursino MS, Salviano MB, Abril VV, Zanetti ES, Duarte JMB (2014) The role of chromosome variation in the speciation of the red brocket deer complex: the study of reproductive isolation in females. **BMC Evolutionary Biology**. 14(1):40.
- Damas J, Corbo M, Lewin HA (2021) Vertebrate Chromosome Evolution. **Annual Review of Animal Biosciences**, 9:1-27.
- De Oliveira EHC, et al. (2002) The phylogeny of howler monkeys (*Alouatta*, Platyrrhini): reconstruction by multicolor cross-species chromosome painting. **Chromosome Research**. 10(8):669–683.
- Di-Battista A, et al. (2023) Premature ovarian insufficiency is associated with global alterations in the regulatory landscape and gene expression in balanced X-autosome translocations. **Epigenetics & Chromatin**. 16(1):19.
- Dobigny G, Britton-Davidian J, Robinson TJ (2017) Chromosomal polymorphism in mammals: an evolutionary perspective. **Biological Reviews**. 92(1):1–21.
- Duarte J e Jorge W. (2003) Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**. 67:403–410.
- Duarte JMB, González S, Maldonado JE (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 49(1):17–22.
- Faria R e Navarro A. (2010) Chromosomal speciation revisited: rearranging theory with pieces of evidence. **Trends in Ecology & Evolution**. 25(11):660–669.

- Figueiredo MG. (2014) **Filogenia e taxonomia dos veados cinza (*Mazama gouazoubira* e *M. nemorivaga*)**. Dissertação de Mestrado na área de Genética Animal, UNESP Jaboticabal.
- Fiorillo BF, Sarria-Perea JA, Abril V, Duarte JMB (2013) Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla, Cervidae). **Comparative Cytogenetics**. 7(1):25–31.
- Frohlich J, et al. (2017) Karyotype relationships among selected deer species and cattle revealed by bovine FISH probes. **PLoS ONE**. 12(11):e0187559.
- Fujita MK, et al. (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology & Evolution**. 27(9):480–488.
- Galindo DJ, et al. (2021) Chromosomal polymorphism and speciation: the case of the genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). **Genes**. 12(2).
- Galtier N, Nabholz B, Glémin S, Hurst GDD (2009) Mitochondrial DNA as a marker of molecular diversity: a reappraisal. **Molecular Ecology**. 18(22):4541–4550.
- González S, Álvarez-Valín F, Maldonado JE (2002) Morphometric differentiation of endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*), with description of new subspecies from Uruguay. **Journal of Mammalogy**. 83(4):1127–1140.
- González S, et al. (1998) Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). **Molecular Ecology**. 7(1):47–56.
- Graphodatsky AS. (1989) Conserved and variable elements of mammalian chromosomes. In: **Cytogenetics of Animals**. CAB International. 95–124.
- Groves CP, Cotterill FPD, Gippoliti S, Robovský J, Roos C, Taylor PJ, Zinner D (2017) Species definitions and conservation: a review and case studies from African mammals. **Conservation Genetics**. 18(6):1247–1256.
- Gutiérrez EE, Helgen KM, McDonough MM, Bauer F, Hawkins MTR, Escobedo-Morales LA, Patterson BD, Maldonado JE (2017) A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys**. 697:87–131.
- Haffer J. (1969) Speciation in Amazonian forest birds. **Science**. 165(3889):131–137.
- Haffer J; Prance GT. (2001) Climatic forcing of evolution in Amazonia during the Cenozoic: on the refuge theory of biotic differentiation. **Amazoniana**. 16:579–607.
- Hall TA. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucleic Acids Symposium Series. 41:95–98.
- Hoelzel AR. (2023) Where to now with the evolutionarily significant unit? **Trends in Ecology & Evolution**. 38(12):1134–1142.
- Hoorn C, Wesselingh FP et al. (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. **Science**. 330(6006):927–931.

- Huang L, Chi J, Wang J, Nie W, Su W, Yang F (2006) High-density comparative BAC mapping in the black muntjac (*Muntiacus crinifrons*): dissection of the origin of MCR 1p+4 in the X1X2Y1Y2Y3 sex chromosome system. *Genomics*. 87(5):608–615.
- Hughes JJ, Lagunas-Robles G, Campbell P (2024) The role of conflict in the formation and maintenance of variant sex chromosome systems in mammals. **Journal of Heredity**. 115(6):601–624.
- Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution**. 32(2):128–144.
- Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics**. 20(4):1160–1166.
- Kern AK, Akabane TK, et al. (2023) A 1.8-million-year history of Amazon vegetation. **Quaternary Science Reviews**. 299:1–18.
- Kingswood SC, Kumamoto AT, Sudman PD, Fletcher KC, Greenbaum IF (1994) Meiosis in chromosomally heteromorphic goitered gazelle, *Gazella subgutturosa* (Artiodactyla, Bovidae). **Chromosome Research**. 2(1):37–46.
- Leigh JW, Bryant D. (2015) POPART: full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**. 6(9):1110–1116.
- Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2011) The CIPRES science gateway: a community resource for phylogenetic analyses. Proceedings of the 2011 TeraGrid Conference.
- Monaghan MT, Wild R, et al. (2009) Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic Biology**. 58(3):298–311.
- Morales-Donoso JA. (2017) **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama nemorivaga* a partir de um topótipo atual**. Dissertação de Mestrado na área de Genética Animal, UNESP Jaboticabal.
- Morales-Donoso JA, Vacari GQ, et al. (2023) Revalidation of *Passalites* Gloger, 1841 for the Amazon brown brocket deer *P. nemorivagus* (Cuvier, 1817). **ZooKeys**. 1167:241–264.
- Moreno LMG. (2022) **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama gouazoubira medemi* a partir de um topótipo atual**. Dissertação de Mestrado na área de Genética Animal, UNESP Jaboticabal.
- Morrone JJ, Crisci JV. (1995) Historical biogeography: introduction to methods. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 26:373–401
- Nylander JAA. (2004) MrModeltest v2. Evolutionary Biology Centre, Uppsala University.
- Oliveira ML, et al. (2020) Faecal DNA and camera traps detect an evolutionarily significant unit of the Amazonian brocket deer in the Brazilian Atlantic Forest. **European Journal of Wildlife Research**. 66(2):28.

- Peres PHF, Luduv rio DJ, et al. (2021) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) as a distinct species out of the complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). **Frontiers in Genetics**. 12:742870.
- Povill C, De Oliveira MB, De Abreu FVS, De Oliveira RL, Perini FA, Monticelli C, Bueno C, Dos Santos E, Pissinatti A, Bonvicino CR (2023) Genetic diversity and insights into the distribution of brown howler monkeys (*Alouatta guariba* group). **International Journal of Primatology**. 44(3):517–539.
- Proskuryakova AA, Ivanova, ES, Makunin AI, Larkin DM, Ferguson-Smith MA, Yang F, Uphyrkina OV., Perelman PL, Graphodatsky AS (2023) Comparative studies of X chromosomes in Cervidae family. **Scientific Reports**. 13(1):11992.
- Proskuryakova AA, Kulemzina AI, et al. (2017) X chromosome evolution in Cetartiodactyla. **Genes**. 8(9).
- R Core Team. (2017) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna.
- Revell LJ, Harmon LJ, Collar DC (2008) Phylogenetic signal, evolutionary process, and rate. **Systematic Biology**. 57(4):591–601.
- Ribas CC, Aleixo A, Nogueira ACR, Miyaki CY, Cracraft JA (2012) A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. **Proceedings of the Royal Society B**. 279(1729):681–689.
- Rieseberg LH. (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology & Evolution**. 16(7):351–358.
- Ron SR. (2000) Biogeographic area relationships of lowland Neotropical rainforest based on raw distributions of vertebrate groups. **Biological Journal of the Linnean Society**. 71(3):379–402.
- Ronquist F, Teslenko M, et al. (2012) MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model selection across a large model space. **Systematic Biology**. 61:539–542.
- Rossi RV, Duarte JMB. (2016) *Mazama nemorivaga*. The IUCN Red List of Threatened Species. e.T136708A22158407. URL: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-1.RLTS.T136708A22158407.en>. Acesso em: 29 ago. 2025.
- Rossi RV. (2000) **Taxonomia de *Mazama Rafinesque, 1817* do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas na área de Zoologia, USP, São Paulo.
- Rubes J, Musilova P, Kopeck  O, Kubickova S, Cernohorska H, Kulemsina AI (2012) Comparative molecular cytogenetics in Cetartiodactyla. **Cytogenetic and Genome Research**. 137(2–4):194–207.
- Salviano MB, Cursino MS, Zanetti EDS, Abril VV, Duarte JMB (2017) Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction**. 96(6):1279–1287.

- Sandoval EDP, Bernegossi AM, Gallina S, Reyna-Hurtado R, Duarte JM (2024a) Molecular cytogenetics markers reveal the existence of a cryptic complex of *Mazama temama* species. **Therya**. 15(2).
- Sandoval EDP, Bernegossi AM, Gallina S, Reyna-Hurtado R, Duarte JMB (2023) Cytogenetic, molecular, and morphological characterization of *Odocoileus pandora* (Merriam, 1901). **Canadian Journal of Zoology**. 101(11):967–979.
- Sandoval EDP, Jędrzejewski W, et al. (2024b) Description of *Bisbalus*, a new genus for the gray brocket, *Mazama cita* Osgood, 1912. **Taxonomy**. 4(1):10–26.
- Shi L, Yang, F, Kumamoto A (2008) The chromosomes of tufted deer (*Elaphodus cephalophus*). **Cytogenetics and Cell Genetics**. 56(3–4):189–192.
- Silva JMC da, et al. (2002) Differentiation of Xiphocolaptes across the river Xingu, Brazilian Amazonia. **Bulletin of the British Ornithologists' Club**. 122:185–194.
- Silva JMC da, Rylands Ab, da Fonseca Gab (2005) The fate of the Amazonian areas of endemism. **Conservation Biology**. 19(3):689–694.
- Silva JMCD, Oren DC. (1996) Application of parsimony analysis of endemism in Amazonian biogeography: an example with primates. **Biological Journal of the Linnean Society**. 59(4):427–437.
- Sober E. (1983) Parsimony in systematics: philosophical issues. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**. 14, 335–357.
- Steinberg ER, Bressa MJ, Mudry MD (2022) Sex chromosome systems in Neotropical primates: what have we learnt so far from cytogenetics and genomics? **Journal of Evolutionary Biology**. 35(12):1589–1600.
- Suchard MA, et al. (2018) Bayesian phylogenetic and phylodynamic data integration using BEAST 1.10. **Virus Evolution**. 4(1):vey016.
- Swofford DL. (2003) PAUP 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony. Sinauer Associates. Sunderland.
- Taberlet P, et al. (1996) Reliable genotyping of samples with very low DNA quantities using PCR. **Nucleic Acids Research**. 24(16):3189–3194.
- Tamura K, et al. (2021) MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 11. **Molecular Biology and Evolution**. 38(7):3022–3027.
- Trifinopoulos J, et al. (2016) W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis. **Nucleic Acids Research**. 44(W1): W232–W235.
- Valeri MP, Tomazella IM, Duarte JMB (2018) Intrapopulation chromosomal polymorphism in *Mazama gouazoubira*: the emergence of a new species? **Cytogenetic and Genome Research**. 154(3):147–152.
- Vilà C, Amorim IR, et al. (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. **Molecular Ecology**. 8(12):2089–2103.

Vozdova M, Sebestova H, et al. (2014) Impact of Robertsonian translocation on meiosis and reproduction: an impala (*Aepyceros celampus*) model. **Journal of Applied Genetics**. 55(2):249–258.

Wallace AR (1852) **On the monkeys of the Amazon**. In: Alfred Russel Wallace Classic Writings.

Waples RS. (1991) Definition of “species” under the Endangered Species Act: application to Pacific salmon. NOAA Technical Memorandum NMFS F/NWC-194.

Waples RS. (1998) Evolutionarily significant units and the conservation of biological diversity under the Endangered Species Act. **Conservation Biology**. 12(3):718–721.

White MJD. (1978) Speciation: Modes of Speciation. **W. H. Freeman**. San Francisco.

Yin Y, Fan H, et al. (2021) Molecular mechanisms and topological consequences of drastic chromosomal rearrangements of muntjac deer. **Nature Communications**, 2:6858.

CAPÍTULO 3 - COMPARATIVE STUDY OF B CHROMOSOMES IN NEOTROPICAL DEER

ABSTRACT

The Neotropical brocket deer, represented by *Mazama*, *Subulo*, and *Passalites* genera in Brazil, display notable karyotypic diversity, with frequent polymorphisms and chromosomal rearrangements. A significant variation is the presence of B chromosomes, which are supernumerary chromosomes that do not produce visible phenotypic effects and follow non-Mendelian inheritance. B chromosomes have been observed in only two other Artiodactyla species: the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) and the Siberian musk deer (*Moschus sibiricus*). Regarding Neotropical deer, the molecular content of B chromosomes of species from the genus *Mazama* and *Passalites* was never studied before, and the limited number of studies hampers discussions on these topics. Because of that, the aim of the project was to bring unique information and shed light on the sequence composition of their B chromosomes, using methodologies involving isolating Bs via microdissection, followed by sequencing and employing reverse painting with FISH (Fluorescent in situ Hybridization). The results obtained through FISH showed irregular signals in pericentromeric regions and autosomal chromosome fusion points, suggesting shared heterochromatic sequences on B chromosomes and autosomes. Sequencing identified repetitive DNA, revealing various repeat families, including long interspersed nuclear elements (LINE) and LTR retrotransposons. Comparisons with the NCBI database through BLAST revealed homologous sequences to centromeric satellite DNA, mRNAs, and gene regions from other ruminants. These findings support the concept that B chromosomes are complex mosaics and reinforce the theory that they could contain active genes with potential functional roles in the genome.

Keywords: Cervidae; Cytogenetics; Supernumerary chromosomes.

1 INTRODUCTION

Among the Artiodactyla order and Cervidae family, brockets are grouped into Odocoileini tribe, inhabiting forests from southeastern Mexico to northern Argentina. They are forest deer characterized by a particular morphotype, with small to medium-size (13 to 40 kg), and short and unbranched antlers in males (Weber e Gonzalez, 2003). Being taxonomically allocated into subtribe Odocoileina and subtribe Blastocerina (Heckeborg et al., 2016), they are represented by the genera *Mazama*, *Subulo* and *Passalites* (Abril et al., 2010; Bernegossi et al., 2022a; Morales-Donoso et al., 2023; Sandoval et al., 2024b).

The brocket deer species are remarkable for their pronounced karyotypic diversity, frequently exhibiting polymorphisms due to structural chromosome rearrangements (Duarte et al., 2008). Intra-specific polymorphism is present in different *Mazama* species (*M. nana* $2n = 36-39 + Bs$; *M. americana* $2n = 42-51 + Bs$, *M. jucunda* $2n = 32-34 + Bs$), and also in *Passalites nemorivagus* ($2n = 67-69 + Bs$) and *Subulo gouazoubira* ($2n = 69-70 + Bs$) (Duarte e Jorge, 2003; Abril et al., 2010; Bernegossi et al., 2022a; Morales-Donoso et al., 2023). Another major variation is seen by the presence or absence of B chromosomes, both inter- and intraspecies. All species within the genus *Mazama* demonstrate intraindividual variability from 0–6 Bs. The same occur in *P. nemorivagus*, where all studied animals had 0–7 Bs, and in *S. gouazoubira*, where they have 0-3 Bs (Abril et al., 2010; Bernegossi et al., 2022b; Sandoval et al., 2022; Morales-Donoso et al., 2023). B chromosomes have been described in only other two species of Artiodactyla, the Siberian roe deer (*Capreolus pygargus*) and Siberian musk deer (*Moschus sibiricus*) (Neitzel, 1987; Sokolov e Prihod'ko, 1998).

B chromosomes are known as supernumerary chromosomes, that show non-Mendelian inheritance and do not produce visible phenotypic effect (Camacho; Sharbel; Beukeboom, 2000). Unlike autosomal and sex chromosomes, they can vary in number between individuals and populations of the same species, between tissues and cells of the same individual, and also in size between species (Jones, 1995). This type of chromosome has already been reported in different animals, plants and fungi (Makunin et al., 2016; D'Ambrosio et al., 2017; Vujošević et al., 2018; Pokorná e Reifová, 2021).

Since they were discovered more than a hundred years ago (Wilson, 1907), this group of chromosomes has remained a mystery in terms of their genetic composition,

function, and whether they confer any evolutionary advantage to the species that possess them. Despite the increase in reports of B chromosomes in different species of eukaryotes, few of these species have had their Bs fully studied, but the number of research articles about them is on the rise, driven by advances in molecular cytogenetics and genomics (D'Ambrosio et al., 2017; Vujošević et al., 2018; Ahmad e Martins, 2019).

Regarding their morphology, B chromosomes were classified into three categories based on their size in relation to the standard set chromosomes. Ungulates, including brocket deer, have only Bs from the category I, being consistently smaller than the smallest chromosomes in set A (Vujošević et al., 2018). Previous research has revealed significant variability in the size, morphology, C- and G-banding patterns, Ag-NOR staining, and telomeric repeat positioning of B chromosomes among Neotropical deer species, as well as within individuals of the same species (Abril e Duarte, 2008; Sarria-Perea, 2004; Tomazella, 2016). Despite their predominantly heterochromatic composition, B chromosomes can also exhibit euchromatic characteristics (Abril e Duarte, 2008).

Initially considered completely heterochromatic and genetically inactive, now the view of B chromosomes is changing due to the identification of repetitive elements, transposable elements, genes, and pseudogenes. In mammals, the first autosomal gene found on Bs was proto-oncogene receptor tyrosine kinase (C-KIT), in the red fox (*Vulpes vulpes*), the Japanese racoon dog (*Nyctereutes procyonoides*), and in the grey brocket deer (*Subulo gouazoubira*) (Graphodatsky et al., 2005; Yudkin et al., 2007; Makunin et al., 2016). In the Siberian deer, Trifonov et al. (2013) discovered a 2 Mbp region homologous to cattle chromosome 3 containing segments of complete and partial genes. They also discovered some B chromosome-specific mutations in protein-coding genes, and a B-derived transcript in fibroblasts, which implies that these protein coding sequences are not fully inactivated. Similar findings have been reported in fish, insects, and plants (Banaei-Moghaddam et al., 2015).

As B chromosomes possess DNA sequences similar to those found in standard chromosomes, it is widely acknowledged that they have origins from both autosomes and sex chromosomes, as well as from plastid and mitochondrial DNA (Camacho et al., 2000; Ruban et al., 2014; Makunin et al. 2016). Rubtsov and Borisov, (2018) proposed their origin from a loss in an ancestor autosome's q arm followed by additional

rearrangements. (Makunin et al., 2014) reviewed that B chromosomes likely originate from regions prone to non-homologous recombination or evolutionary breakpoints. They suggest further research on amplification region borders and their comparison with autosomal homologs to elucidate ancient rearrangement events.

Methodologies used to study these chromosomes involve isolating Bs via microdissection or flow sorting, which allow reliable selection of B-derived DNA, followed by sequencing and employing reverse painting with Fluorescent *in situ* Hybridization (FISH) (Klemme et al., 2013; Silva et al., 2014; Cernohorska et al., 2020, 2023). As reviewed by Vujošević et al (2018), these techniques have been utilized across diverse mammalian species to investigate their B chromosomes, and helped to discover genes, pseudogenes and different regions in at least Bs of 20 species. Other studies involve also comparative genomics, transcriptomics and epigenetic analysis (Ahmad e Martins, 2019).

As mentioned previously, Neotropical cervids belonging to the genera *Mazama*, *Subulo*, and *Passalites* have shown significant numerical and morphological variability in their B chromosomes. In a study performing intra- and inter-neotropical deer species comparisons of four main groups of cervid satellite DNA sequences (satI-IV) and their physical localization on metaphase chromosomes using FISH, satI probe marked Bs of all animals, and satII marked Bs only in *M. jucunda*. This could suggest either a separate origin or an earlier developmental stage of the B chromosomes within these species (Vozdova et al., 2021).

Therefore, it can be inferred that variations in sequence composition among these genera could shed light on the origin, evolution, and phylogenetic relationships of B chromosomes across deer species. However, the limited number of individual B chromosomes studied in detail in deer species hampers discussions on these topics (Rubtsov e Borisov, 2018). Because of that, the aim of the project is to bring unique information and shed light on the sequence composition of their B chromosomes, using molecular methods to increase the knowledge about these components in cervids.

2 OBJECTIVES

To reveal and compare the sequence composition of B chromosomes and their hybridization patterns in Neotropical deer species using Sanger sequencing and FISH, to elucidate their origin and evolution.

3 METHODOLOGY

3.1. MATERIAL

The selection of individuals for this study was based on the availability of materials (skin and fibroblasts) stored in the cryogenic bank of the Deer Research and Conservation Center (NUPECCE). Fibroblast tissue cultures for metaphase chromosomes were prepared according to standard protocols (Verma; Babu, 1995). In cases where high-quality chromosome preparations from previous research was available, they were also utilized. Consequently, some adjustments were made to the selection of animals compared to those originally listed in the project proposal.

Three females of two different species representing Neotropical deer (*M. jucunda* and *P. nemorivagus*), known to possess B chromosomes in their karyotypes, were used to obtain the Bs and create FISH probes (Table 1). Male individuals were not used to avoid doubts between the B chromosomes and the Y sexual chromosome, as they are easily confused.

Table 1. NUPECCE individual identification number, species, diploid and fundamental number of the animals utilized for the Bs acquisition.

Identification number (Tese)	Species	2n	FN	Bs
T334	<i>M. jucunda</i>	32	46	3 - 4
T336	<i>M. jucunda</i>	32	46	3 - 4
T373	<i>M. jucunda</i>	33	46	3 - 4
T20	<i>P. nemorivagus</i>	66	70	1 - 5
T321	<i>P. nemorivagus</i>	69	72	1 - 5
T370	<i>P. nemorivagus</i>	68	70	1 - 5

The FISH probes obtained were tested on metaphases of individuals of different species and cytotypes of Brazilian neotropical deer (Table 2).

Table 2. NUPECCE individual identification number, species, origin, diploid, fundamental and B chromosomes number of the animals where FISH probes were tested.

Tese	Sex	Species	2n	FN	Bs	Origin
T326	M	<i>M. americana</i> CA*	50	54	3	Imperatriz/MA
T251	M	<i>M. americana</i> JU*	45	48	2 - 5	Juína/MT
T269	M	<i>M. americana</i> RO*	42	46	03 - 5	Buritís/RO
T424	M	<i>M. americana sensu stricto</i>	46	50	3	Rorainópolis/RO
T416	M	<i>M. nana</i>	38	57	0 - 4	Telêmaco Borba/PR
T304	M	<i>M. nana</i>	39	57	0 - 3	Guaporé/RS
T385	F	<i>M. rufa</i>	52	56	4	Pq. Nac. Iguaçu/PR
T426	F	<i>M. rufa</i>	52	56	4	Pq. Nac. Iguaçu/PR
T341	F	<i>S. gouazoubira</i>	69	70	0 - 3	Sorocaba/SP
T300	M	<i>S. gouazoubira</i>	69	70	0 - 3	Corumbá/MT

**M. americana* cytotypes; CA=Carajás; RO=Rondônia; JU=Juína.

3.2. CHROMOSOME PREPARATION AND MICRODISSECTION OF Bs

The procedures for microdissection of B chromosomes were executed according to Kubickova et al. (2002). The fibroblast suspensions were dropped on a polyethylene naphthalate membrane (P.A.L.M. GmbH, Bernried, Germany) which was attached to a glass slide. In order to avoid DNA contamination, membranes were treated with ultraviolet light for 30 minutes prior to use. To identify the chromosomes of interest G-banding were performed.

The B chromosomes were then isolated by laser microdissection using the PALM® MicroLaser system (P.A.L.M. GmbH, Bernried, Germany). One slide per individual from Table 1 was selected for microdissection. A minimum of 100 metaphases were identified and mapped. From the well-spread metaphases, where chromosomes were clearly identifiable, approximately 30 B chromosomes were randomly collected and dissolved in 7 µl 10 mmol/L Tris-HCl pH8.8. For *P. nemorivagus* T20, it was selected one metaphase containing five Bs and collected only one B in each sample, to see if one B would be enough for creating probes and sequencing.

We also could calculate the approximate size of the B chromosomes in *M. jucunda*. According to the NCBI data, the smallest chromosome in the *Bos taurus* karyotype (BTA) is chromosome 25. Therefore, we decided to measure the size of the BTA25 homologue (without centromeric region), which is included in chromosome MJU8 (unpublish data). This chromosome was formed by tandem fusion of homologous chromosomes BTA25, BTA13 and BTA14 (arranged from MJU8qcen to MJU8qter). We used a special part of the MetaSystems program, to measure homologs of BTA25 and all Bs in 15 metaphases and obtained an arithmetic mean of 2.25 μm for BTA25 and 1.73 μm for all B chromosomes. According to the NCBI data, the size of BTA25 without centromere is 42 Mbp, and according to the calculation, the average size of Bs (1.73 μm) would correspond to 32.3 Mbp.

3.3. PREPARATION OF FISH PROBES AND FISH ANALYSIS

The microdissected B chromosomes were amplified by degenerate oligonucleotide-primed PCR (DOP-PCR), and the product was fluorescently labelled in a secondary PCR using SpectrumOrange-dUTP, as previously described by Kubickova et al. (2002). FISH analysis was performed following the protocol described by Vozdova et al. (2019). Each probe generated from the six individuals listed in Table 1 was tested on metaphase spreads from its respective source animal, and three of these individuals were selected for their probes to be further tested in the additional species listed in Table 2. The FISH experiments were evaluated using the Zeiss Axio Imager.Z2 fluorescence microscope equipped with the Metafer Slide Scanning System (MetaSystems, Altlussheim, Germany). The selected good-quality mitoses were scanned by a CCD camera and evaluated using image analysis software (ISIS 3, MetaSystems).

3.4. CLONING AND SEQUENCING

The amplification products from DOP-PCR of the microdissected Bs were also purified with MinElute PCR Purification Kit and then were cloned into a pDrive vector (Qiagen, Hilden, Germany). Plasmid DNA of clones were subsequently isolated and

amplified by PCR. The PCR products were characterized by electrophoresis on a 2% agarose gel. For each sample, an average of 50 clones were selected for sequencing. The samples were prepared in special plates of 96 wells and sent for sequencing (Pauciullo et al., 2006).

The sequences were then trimmed to remove primers and vector sequences using BioEdit. Subsequently, a dataset was generated for each animal's set of sequences using Geneious Prime to eliminate redundant sequences and construct contigs. The assembled sequences were then subjected to RepeatMasker to identify repetitive elements, and to BLAST analysis to compare and assess sequence similarity both among the different groups and against the NCBI database, applying a filter for Ruminantia.

4 RESULTS AND DISCUSSION

4.1. MICRODISSECTED BS AND FISH

Upon analyzing the G-banding from the six individuals in this study, it was observed that many metaphases of individual T334 (*M. jucunda*) displayed a B chromosome that was morphologically distinct from the others - slightly larger and containing a less stained region (Figure 1). Consequently, three different samples were collected from this animal: in one sample, only the distinct B chromosome (here referred to as "B1") was microdissected; in the second, all B chromosomes except B1 were microdissected (referred as "B-"); and in the third, all Bs were microdissected without distinction (referred as "Bs"). No morphological differences were observed between the B chromosomes of the other individuals.



Figure 1. Two metaphases of individual T334 in G-band staining. The yellow arrows indicate the morphologically different B (B1), and the red arrows indicate the other Bs.

The B chromosome content of the microdissected material was confirmed by FISH. Both in *M. jucunda* and in *P. nemorivagus*, the probes marked all B chromosomes, with stronger signals detected on Bs of T370 and T321 (Figure 2). Furthermore, all probes revealed irregular signals in pericentromeric regions and fusion points of the autosomal chromosomes. Interestingly, T373 and T334 exhibited stronger signals in the pericentromeric region of autosomal chromosome 1 of *M. jucunda*, in comparison with other autosomes, suggesting a higher degree of homology in this region for the Bs of the species (Figure 2b, white arrows).

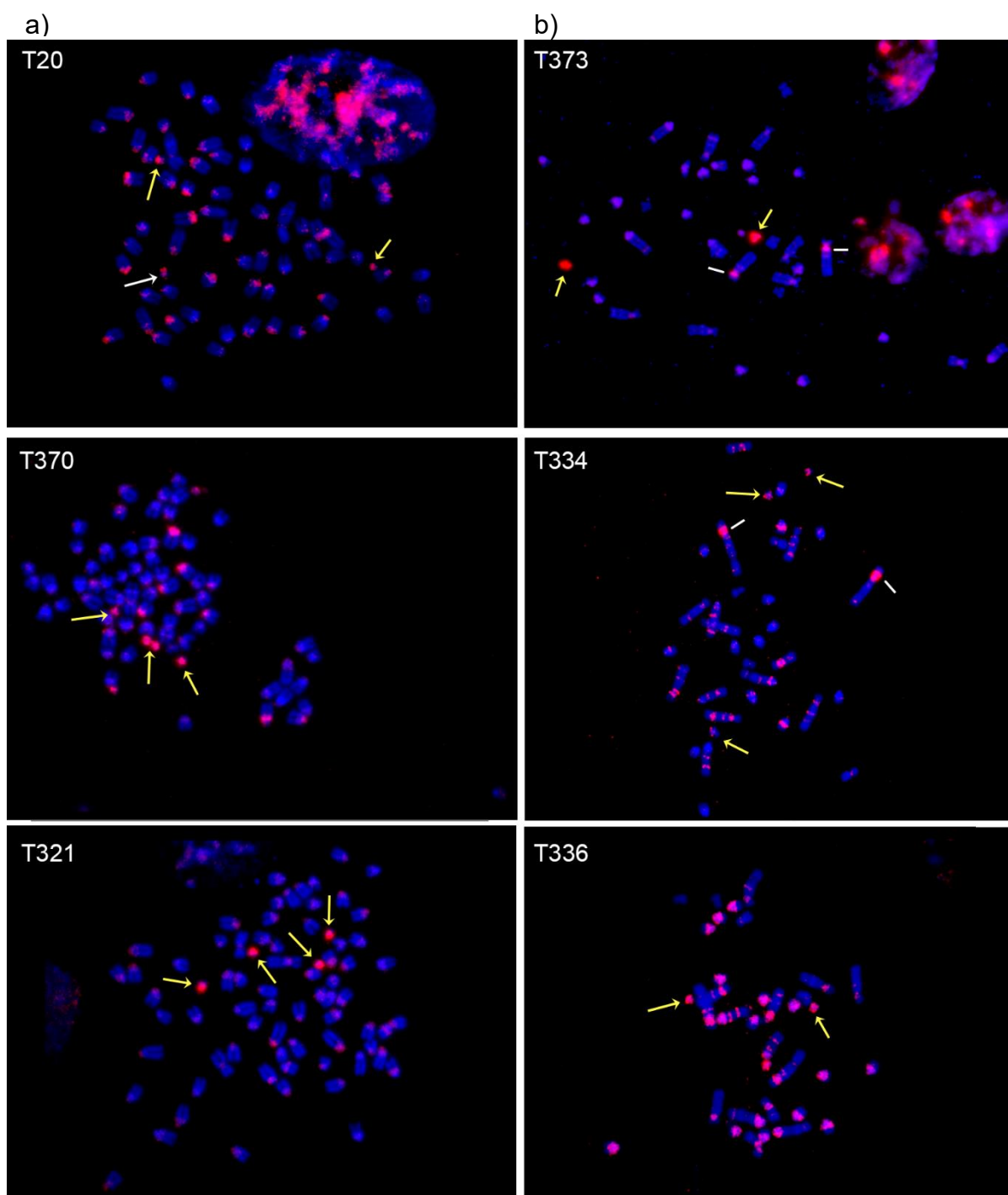
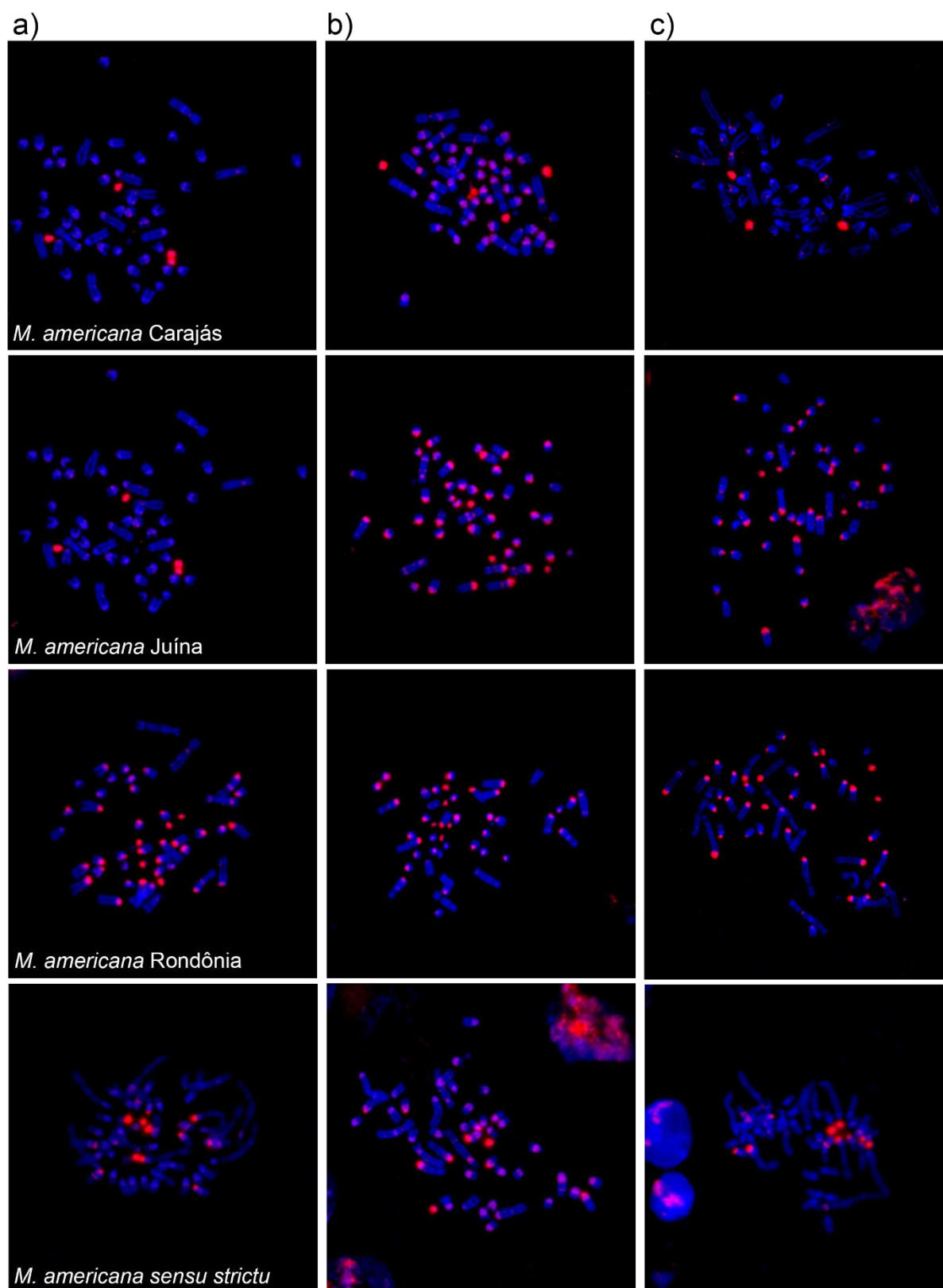


Figure 2. Hybridization pattern of the B probes created and tested in their respective animals. a) The first column represents animals of the species *P. nemorivagus* (T20, T321, T370); b) Second column represents animals of the species *M. jucunda* (T373, T334, T336). Yellow arrows indicate B chromosomes, and white arrows highlight the centromeric region of chromosome pair 1 in *M. jucunda*, strongly marked by the B probe of T373 and T334.

The B probes from *P. nemorivagus* T321, *M. jucunda* T373 and the B1 from *M. jucunda* T334 were chosen to be tested in other species (Figure 3).



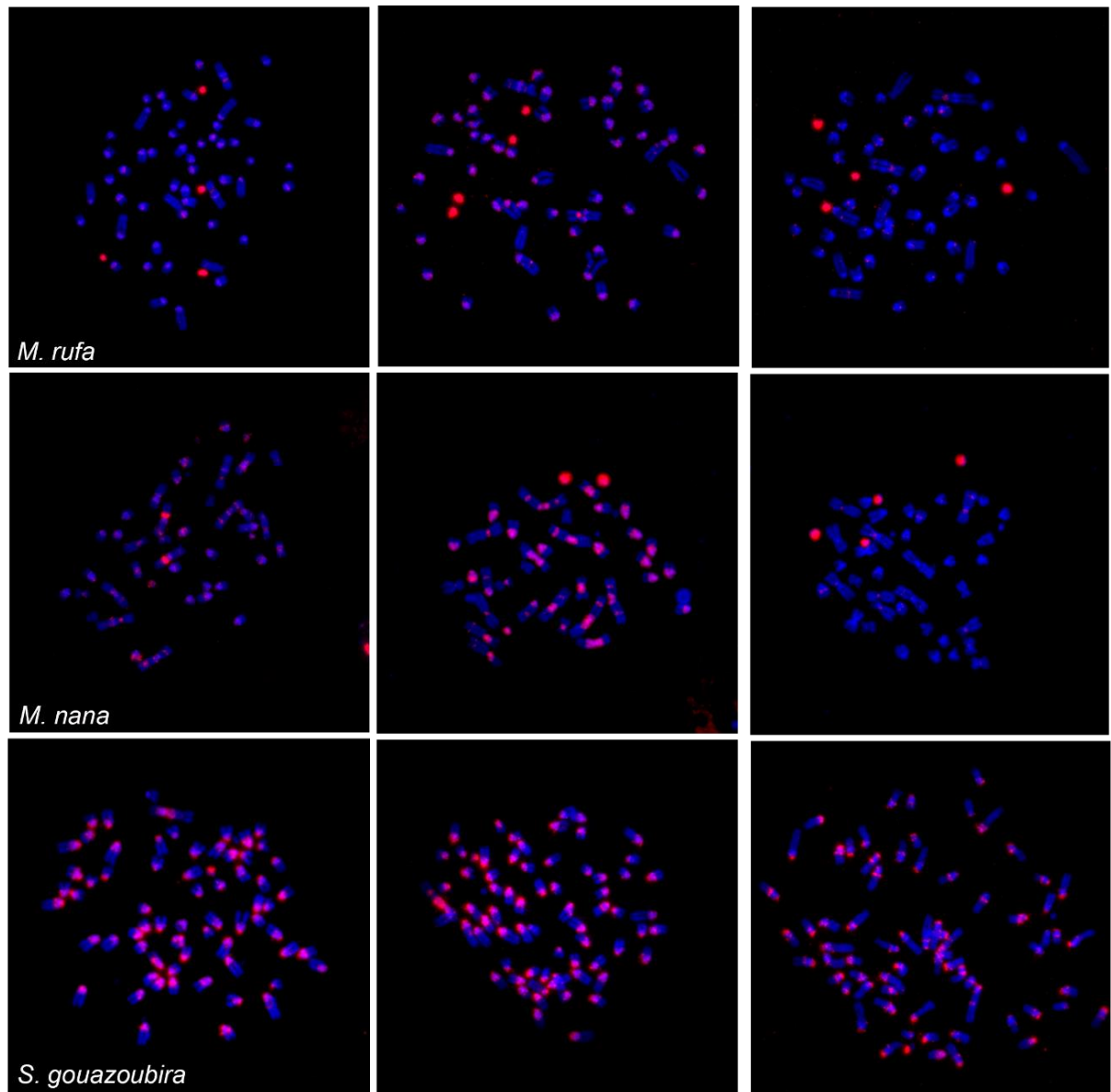


Figure 3. Probes tested in animals of different species. a) B probe from *P. nemorivagus* T321; b) B probe from *M. jucunda* T373; c) B1 probe from *M. jucunda* T334.

The probes showed some degree of variation among the different species, with strong signals observed in the B chromosomes and weaker signals detected in the centromeric, pericentromeric, and fusion regions of the autosomes, suggesting the presence of shared heterochromatic sequences on autosomes and B chromosomes. These findings were also demonstrated in the study of B chromosomes of the Siberian roe deer (Trifonov et al., 2013).

It was possible to observe, however, that the probe obtained from B1 exhibited more specific marking on the Bs of some species, such as *M. nana*, whereas T373 showed the most nonspecific signals. The varying intensity of signals on different species suggests a molecular heterogeneity among Bs, and that maybe the B1 could be, indeed, different from the other Bs. They may share repetitive and satellite regions, but perhaps may vary in the composition of genes or pseudogenes.

In a comparative analysis of DNA probes for B chromosomes using FISH in different populations of the Korean field mouse (*Apodemus peninsulae*), some populations exhibited low variability in DNA content, while others showed highly variable DNA composition (Rubtsov et al., 2015). The authors suggest that the high diversity of B chromosomes indicates different origins of these chromosomes in distinct populations of the same species.

The positive hybridization signals of the B probes by FISH in autosomal pericentromeric regions and fusion points provide evidence for the origin of B chromosomes from autosomes. Additionally, they suggest that B chromosomes may have originated from regions of genomic instability undergoing chromosomal rearrangements. Genes homologous to sequences identified in the B chromosomes of the Korean field mouse had previously been linked to evolutionary breakpoint regions in the porcine genome (Groenen et al., 2012). A similar pattern may also occur in the B chromosomes of other species (Becker et al., 2011), including, in this case, cervids.

The five individual B probes, each generated from a separately microdissected B chromosome from the T20 metaphase, were tested. Only one of these probes produced a signal, indicating that the remaining four did not contain sufficient material for amplification. The successfully amplified sample was then selected for cloning and sequencing.

4.2. B CHROMOSOMES SEQUENCING

4.2.1. Assembly

It was possible to obtain sequences from Bs of the individuals T334, T373, T20 and T321. Three distinct sample groups from animal T334 were sequenced separately,

B1, B- and Bs, as explained previously. For T20, two different groups were sequenced, one with all Bs and one with the individual B successfully microdissected and amplified. For individuals T373 and T321, only one group of sequences were obtained for each one, with all Bs microdissected.

Through Geneious assembler, a different number of contigs was obtained for each sample. However, not all sequences were assembled, indicating that some sequences might represent independent fragments or low-coverage regions. The program also demonstrates the number of nucleotides (pb), number of sequences, GC content, and the sequences length of the groups (Table 3).

Table 3. Information of the set of sequences obtained and assembled for each animal.

Sample	Species	Nucleotides	Sequences	% GC	Max Sequence Length	Min Sequence Length
T334 B1	<i>M. jucunda</i>	14449	45	42,8	679	146
T334 B-	<i>M. jucunda</i>	1851	13	51,2	508	50
T334 Bs	<i>M. jucunda</i>	5078	24	49,8	409	100
T373	<i>M. jucunda</i>	8363	28	39,6	612	139
T20 1B	<i>P. nemorivagus</i>	7599	23	51,1	753	148
T20 Bs	<i>P. nemorivagus</i>	10380	37	48,1	628	131
T321	<i>P. nemorivagus</i>	11586	39	44,5	656	49
Total		59306	209			
Mean		8472		46,72	606	109

A total of 59,306 bp were sequenced, with an average of 8,472 bp per individual. Comparing to the approximate size calculated for the Bs of *M. jucunda* (32.3 Mbp) the sequences obtained would represent only 0.026% of their B chromosomes. According to Makunin et al. (2016), the *S. gouazoubira* B chromosome is approximately 10 Mbp, a difference of 22Mpb. However, if the B chromosomes are composed mostly of repetitive sequences, our obtained sequences could represent a larger percentage of the DNA occurring on the B chromosome. Sanger sequencing is more limited in terms of data output compared to Next-Generation Sequencing (NGS), but it still provides valuable insights into the composition of B chromosomes in the studied animals.

4.2.2. RepeatMask

After assembly, the content of repetitive DNA was identified using RepeatMasker, and the program reported a different proportion of repeats and centromeric satellite DNA in each group, even between groups of the same individual. The most common repeat family identified was long interspersed nuclear elements (LINE). The sequences also presented copies of LTR retrotransposons from the ERVK family, indicating a recent repeat expansion probably due to retroviral infection (Table 4). The presence of LTR were also found in the Bs of gray brocket deer (Makunin et al., 2016).

Table 4. Analysis of the most common repetitive element and its percentage in each group of sequences.

Animal	Species	Most common element	Bases masked
T334 B1	<i>M. jucunda</i>	LINE	18,63%
T334 B-	<i>M. jucunda</i>	LTR	11,13%
T334 Bs	<i>M. jucunda</i>	LINE	2,50%
T373	<i>M. jucunda</i>	NA	0%
T20 Bs	<i>P. nemorivagus</i>	DNA elements	1,46%
T20 1B	<i>P. nemorivagus</i>	LINE	2,95%
T321	<i>P. nemorivagus</i>	LINE	18,49%

It is interesting to note that in the same animal (T334), the composition of the most common repetitive element differs between B1 and B-. Additionally, the samples representing all B chromosomes likely contain a higher abundance of B1 sequences compared to other B chromosomes.

4.2.3. BLAST

When compared to the NCBI database, the groups exhibited some homologous sequences to centromeric satellite DNA, mRNAs, and genic regions from different species of ruminants (Table 5). However, it is important to note that some sequences,

mostly for the individuals T373 and the group of sequences of 1B of T20, did not match to any sequences in the database, even changing filters and search parameters.

The results of sequence similarity between individuals of the study were infrequent and primarily observed in regions homologous to satellite sequences. This suggests that different regions of the B chromosomes were amplified in each animal.

Table 5. BLAST results of sequences that presented homology to the NCBI database. The first significant alignment is shown with information of the alignment.

Group	Sequence name	Significant alignment	Sequence ID on NCBI	Query cover	E value	Per. Ident
T334 B1	Contig_1	<i>Bos taurus</i> olfactory receptor family 13 subfamily P member 13 (OR13P13), transcript variant X17, mRNA	XM_059884646.1	100%	2e-46	80.77%
	Contig_2	<i>Odocoileus virginianus</i> uncharacterized lncRNA (LOC110144311), ncRNA	XR_011484945.1	31%	6e-47	81.34%
	Contig_7	<i>Odocoileus hemionus</i> centromeric satellite DNA	U55813.1	100%	5e-139	92.62%
	Contig_8	<i>Moschus berezovskii</i> required for meiotic nuclear division 5 homolog B (RMND5B), transcript variant X14, mRN	XM_055429185.1	99%	2e-54	79.77%
	Contig_9	<i>Bos taurus</i> BAC CH240-118C16 from chromosome X, complete sequence	AC280597.1	100%	3e-110	100.00%
	Contig_11	<i>Bos taurus</i> BAC CH240-423C21 Bovine BAC Library complete sequence	AC149694.4	30%	9e-16	70.40%
	Contig_12	<i>Bos taurus</i> uncharacterized lncRNA (LOC100847171), transcript variant X6, ncRNA	XR_009495092.1	75%	1e-47	76.21%
	Contig_16	<i>Odocoileus hemionus</i> centromeric satellite DNA	U55813.1	99%	2e-57	94.48%
	B1_B06	<i>Bos taurus</i> uncharacterized lncRNA	XR_009491608.1	80%	5e-22	78.26%
	B1_D05	<i>Bos taurus</i> isolate Dominette_000065F genomic sequence	KX592814.1	98%	2e-61	71.19%
	B1_D08	<i>Muntiacus reevesi</i> clone CH245-224M20, complete sequence	AC165182.3	100%	3e-70	73.72%
	B1_D11	<i>Odocoileus virginianus</i> uncharacterized lncRNA (LOC110132215), transcript variant X2, ncRNA	XR_011492128.1	87%	1e-49	72.06%
	B1_F03	<i>Bos taurus</i> BAC CH240-223I2 Bovine BAC Library complete sequence	AC150644.6	42%	1e-22	83.48%
	B1_F09	<i>Bubalus kerabau</i> RAD54 like 2 (RAD54L2), transcript variant X1, mRNA	XM_055557021.1	48%	1e-75	92.82%
	B1_G02	<i>Oryx dammah</i> transcription factor 4 (TCF4), transcript variant X24, mRNA	XM_040264439.1	100%	2e-120	91.14%
	B1_G03	<i>Bubalus kerabau</i> solute carrier family 38 member 6 (SLC38A6), transcript variant X3, mRNA	XM_055538252.1	95%	5e-66	78.07%

	B1_G10	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55814.1			
T334 Bs	Contig_2	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55814.1	100%	2e-174	93.15%
	Contig_3	Cervus nippon clone SM171 microsatellite sequence	HQ849776.1	84%	8e-62	84.21%
	Contig_5	Muntiacus muntjak vaginalis clone BAC SatM5 centromeric sequence	EU433566.1	99%	5e-36	81.76%
	Contig_6	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55813.1	100%	1e-142	94.77%
	Contig_7	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55813.1	100%	1e-124	91.36%
	Contig_8	Cervus nippon clone SM171 microsatellite sequence	HQ849776.1	96%	2e-75	82.31%
	Contig_9	Odocoileus virginianus FA complementation group B (FANCB), transcript variant X1, mRNA	XM_070462614.1	64%	2e-43	86.62%
	Bs_13	Odocoileus virginianus clone 2 satellite I sequence	MT186000.1	98%	2e-61	89.62%
	Bs_21	Bos taurus isolate Dominette_000065F genomic sequence	KX592814.1	100%	8e-47	84.80%
	Bs_23	Bubalus bubalis uncharacterized LOC123330247 (LOC123330247), ncRNA	XR_006546000.1	61%	5e-30	88.79%
	Bs_24	Muntiacus reevesi clone 1 satellite I sequence	MT185983.1	100%	5e-49	87.65%
	Bs_27	Muntiacus reevesi uncharacterized protein (LOC136155197), mRNA	XM_065917060.1	42%	5e-15	98.00%
	Bs_33	Odocoileus virginianus clone 4 satellite I sequence	MT186002.1	99%	3e-58	91.36%
	Bs_35	Odocoileus virginianus clone 4 satellite I sequence	MT186002.1	100%	8e-52	91.22%
	Bs_38	Ovis aries CD200 molecule (CD200), transcript variant X1, mRNA	XM_060404300.1	59%	1e-21	100.00%
	Bs_3	Muntiacus muntjak vaginalis clone BAC SatM5 centromeric sequence	EU433566.1	100%	2e-61	91.76%
	Bs_45	Muntiacus muntjak vaginalis clone BAC SatM5 centromeric sequence	EU433566.1	100%	3e-87	83.77%
	Bs_47	Muntiacus muntjak vaginalis clone BAC SatM5 centromeric sequence	EU433566.1	98%	5e-57	83.81%
	Bs_6	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	MT186002.1	100%	1e-42	88.41%
	Bs_8	Muntiacus muntjak vaginalis clone BAC SatM5 centromeric sequence	EU433566.1	100%	2e-40	85.71%
	Bs_9	Odocoileus virginianus clone 4 satellite I sequence	MT186002.1	100%	4e-104	92.08%
T334 B-	Contig_2	Bos javanicus uncharacterized LOC133256474 (LOC133256474), ncRNA	XR_009739229.1	29%	1e-21	89.16%
	B-_C01	Mazama americana isolate Roraima clone 4 satellite I sequence	MW273616.1	86%	4e-18	98.18%

	B-_F02	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55813.1	99%	4e-56	95.65%
	B-_B12_H	Mazama americana isolate Roraima clone 4 satellite I sequence	MW273616.1	100%	9e-44	94.07%
	B-_G12_M	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55813.1	100%	7e-95	86.71%
T373	Contig 6	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55813.1	99%	7e-59	97.10%
T321	Contig 2	Dama dama post-GPI attachment to proteins GalNAc transferase 4 (PGAP4), transcript variant X2, mRNA	XM_061163528.1	91%	1e-49	72.91%
	Contig 4	Dama dama olfactory receptor 4S2 (LOC133065644), mRNA	XM_061156345.1	100%	4e-131	89.77%
	Contig 6	Ovis aries shroom family member 3 (SHROOM3), transcript variant X7, mRNA	XM_060417302.1	35%	1e-17	78.69%
	Contig 7	Ovis aries TOP6B like initiator of meiotic double strand breaks (TOP6BL), transcript variant X7, mRNA	XM_060404112.1	48%	1e-23	77.30%
	Contig 8	Dama dama peroxisomal succinyl-coenzyme A thioesterase-like (LOC133066044), mRNA	XM_061156709.1	24%	9e-05	77.94%
	Contig 9	Bos indicus G patch domain-containing protein 4 (LOC109553171), transcript variant X3, mRNA	XM_070784709.1	54%	2e-37	84.72%
	N1_A02	Odocoileus virginianus glutathione peroxidase 5 (GPX5), transcript variant X1, mRNA	XM_020890408.2	91%	2e-86	71.78%
	N1_A03	Ovis aries P2Y receptor family member 8 (LOC101114246), transcript variant X4, mRNA	XM_060408562.1	98%	8e-47	79.90%
	N1_A07	Bos taurus clone RP42-459A17, complete sequence	AC092193.4	16%	8e-04	91.43%
	N1_A10	Bos grunniens protein phosphatase 2 regulatory subunit beta gene, intron	AY453178.1	35%	5e-14	78.64%
	N1_B05	Bos taurus Y Chr BAC CH240-97C1 (Children's Hospital Oakland Research Institute Bovine BAC Library (male)) complete sequence	AC231869.4	99%	7e-78	76.57%
	N1_C01	Capra hircus pancreatic and duodenal homeobox 1 (PDX1) gene, partial sequence; and distal regulatory region genomic sequence	PQ066237.1	45%	2e-31	90.29%
	N1_D08	Dama dama proteasome activator subunit 3 interacting protein 1 (PSME3IP1), transcript variant X5, mRNA	XM_061138574.1	19%	2e-35	94.06%
T20 1B	Contig 4	Muntiacus vaginalis clone CH244-55D23, complete sequence	AC149434.3	100%	4e-39	76.92%
T20 Bs	Contig 2	Odocoileus hemionus centromeric satellite DNA	U55813.1	99%	8e-58	96.38%

Contig 5	Cervus elaphus uncharacterized LOC122699792 (LOC122699792), transcript variant X1, ncRNA	XR_006342673.1	99%	3e-78	93.40%
N3_Bs_A10	Ovis canadensis uncharacterized lncRNA (LOC138441120), ncRNA	XR_011257249.1	98%	5e-110	90.46%
N3_Bs_B10	Muntiacus muntjak vaginalis clone BAC SatM5 centromeric sequence	EU433566.1	99%	2e-34	81.25%
N3_Bs_C05	Capreolus capreolus 18S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY623901.1	72%	6e-55	96.95%
N3_Bs_C08	Oryx dammah elongation factor Tu (LOC120859611), mRNA	XM_040235649.1	57%	6e-27	75.62%

According to the results of RepeatMasker and BLAST, it is possible to note a variable composition on Bs of *M. jucunda* and *P. nemorivagus*. Trifonov et al. (2013) and Makunin et al. (2016) also found very divergent composition between B chromosomes of the brown brocket deer and the Siberian roe deer. Considering that *Capreolus*, *Subulo*, *Passalites* and *Mazama* are phylogenetically separated into three different tribes of Cervidae, the absence of homologous segments suggests a recent and independent origin of Bs between them.

BLAST analysis also identified DNA fragments homologous to genes from various ruminant species. However, due to the small size of our fragments, we cannot confirm the presence of complete gene sequences. Trifonov et al. (2013) identified coding genes in the Siberian roe deer and discussed their potential expression and influence on cellular metabolism. Other studies have also provided evidence of coding genes in B chromosomes of different animal species (Graphodatsky et al., 2005; Yudkin et al., 2007).

The presence of satellite DNA identified through BLAST supports the FISH results, which show B probe signals in peri/centromeric and interstitial chromosome regions. A study by (Vozdova et al., 2021) on satellite DNA in neotropical deer confirms that these regions are rich in such elements. Additionally, the same study reported that in all animals carrying B chromosomes, including species from the genera *Mazama*, *Subulo*, and *Passalites*, the satI probe also marked B chromosomes. These findings support the concept of B chromosomes as complex mosaics, composed of autonomous blocks of segmental duplications and heterochromatin (Trifonov et al., 2010), but also

reinforces the theory of the presence of active genes and a potential for becoming important genomic players (Pokorná; Reifová, 2021).

5 CONCLUSIONS

The significantly higher prevalence of B chromosomes in Neotropical deer compared to all other cervid species makes them prime targets for molecular studies and investigations into their composition. Despite this, the brown brocket deer (*Subulo gouazoubira*) is the only Neotropical deer whose B chromosomes have been molecularly studied (Makunin et al., 2016). The present study, therefore, represents the first investigation of the sequence composition of B chromosomes in the genera *Passalites* and *Mazama*, both important representatives of Neotropical deer.

However, the information obtained through Sanger sequencing was limited and represents only a small fraction of the entire B chromosome. Nevertheless, alternative bioinformatics methodologies, not explored in this study, could be applied to maximize the extraction of relevant data from our results. Several questions remain unanswered, highlighting the need for new and diverse approaches to further investigate the complexity of B chromosomes of Neotropical deer species.

6 REFERENCES

- Abril VV, Carnelossi EAG, González S, Duarte JMB (2010) Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research** 128:177–187
- Abril VV, Duarte JMB (2008) Chromosome Polymorphism in the Brazilian Dwarf Brocket Deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology** 31:53–57
- Ahmad S, Martins C (2019) The Modern View of B Chromosomes Under the Impact of High Scale Omics Analyses. **Cells** 8:156
- Banaei-Moghaddam AM, Martis MM, Macas J, Gundlach H, Himmelbach A, Altschmied L, Mayer KFX, Houben A (2015) Genes on B Chromosomes: Old Questions Revisited with New Tools. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms** 1849:64–70
- Barrio J, Gutiérrez EE, D'Elía G (2024) The First Living Cervid Species Described in the 21st Century and Revalidation of *Pudella* (Artiodactyla). **Journal of Mammalogy** gyae012
- Becker SED, Thomas R, Trifonov VA, Wayne RK, Graphodatsky AS, Breen M (2011) Anchoring the Dog to Its Relatives Reveals New Evolutionary Breakpoints across 11 Species of the Canidae and Provides New Clues for the Role of B Chromosomes. **Chromosome Research** 19:685–708
- Bernegossi AM, Cartes JL, Cernohorska H, Kubickova S, Vozdova M, Caparroz R, González S, Duarte JMB (2022a) Resurrection of the Genus *Subulo* Smith, 1827 for the Gray Brocket Deer, with Designation of a Neotype. **Journal of Mammalogy** 104:619–633.
- Bernegossi AM, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Galindo DJ, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2022b) Cytogenetic Mapping of Cattle BAC Probes for the Hypothetical Ancestral Karyotype of the Family Cervidae. **Cytogenetic and Genome Research** 162:140–147
- Camacho JPM, Sharbel TF, Beukeboom LW (2000) B-Chromosome Evolution. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences* 355:163–178
- Cernohorska H, Kubickova S, Musilova P, Vozdova M, Vodicka R, Rubes J (2023) Supernumerary Marker Chromosome Identified in Asian Elephant (*Elephas maximus*). **Animals** 13:701
- D'Ambrosio U, Alonso-Lifante MP, Barros K, Kovařík A, Mas de Xaxars G, Garcia S (2017) B-chrom: A Database on B-chromosomes of Plants, Animals and Fungi. **New Phytologist** 216:635–642
- Duarte JMB, González S, Maldonado JE (2008) The Surprising Evolutionary History of South American Deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49:17–22

Duarte JMB, Jorge W (2003) Morphologic and Cytogenetic Description of the Small Red Brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalian Biology** 67:403–410

Foresti ÉASF, Silva DMZA, Ruiz-Ruano FJ, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Oliveira C, Camacho JPM (2020) Satellite DNA content of B chromosomes in the characid fish *Characidium gomesi* supports their origin from sex chromosomes. **Chromosome Research** 295:195–207

Galindo DJ, Martins GS, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Bernegossi AM, Kadlcikova D, Rubes J, Duarte JMB (2021) Chromosomal Polymorphism and Speciation: The Case of the Genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). **Genes** 12:165

Graphodatsky AS, Kukekova AV, Yudkin DV, Trifonov VA, Vorobieva NV, Beklemisheva VR, Perelman PL, Graphodatskaya DA, Trut LN, Yang F, Ferguson-Smith MA, Acland GM, Aguirre GD (2005) The Proto-Oncogene C-KIT Maps to Canid B-Chromosomes. **Chromosome Research** 13:113–122

Groenen MAM, Archibald AL, Uenishi H, Tuggle CK, et al. (2012) Analyses of Pig Genomes Provide Insight into Porcine Demography and Evolution. **Nature** 491:393–398

Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rößner GE (2016) Systematic Relationships of Five Newly Sequenced Cervid Species. **PeerJ** 4:e2307

Johnson Pokorná M, Reifová R (2021) Evolution of B Chromosomes: From Dispensable Parasitic Chromosomes to Essential Genomic Players. **Frontiers in Genetics** 12:727570

Jones RN (1995) B Chromosomes in Plants. **The New Phytologist** 131:411–434

Klemme S, Banaei-Moghaddam AM, Macas J, Wicker T, Novák P, Houben A (2013) High-copy Sequences Reveal Distinct Evolution of the Rye B Chromosome. **New Phytologist** 199:550–558

Kubickova S, Cernohorska H, Musilova P, Rubes J (2002) The Use of Laser Microdissection for the Preparation of Chromosome-Specific Painting Probes in Farm Animals. **Chromosome Research** 10:571–577

Makunin AI, Dementyeva PV, Graphodatsky AS, Volobouev VT, Kukekova AV, Trifonov VA (2014) Genes on B Chromosomes of Vertebrates. **Molecular Cytogenetics** 7:99

Makunin AI, Kichigin IG, Larkin DM, O'Brien PCM, Ferguson-Smith MA, Yang F, Proskuryakova AA, Vorobieva NV, Chernyaeva EN, O'Brien SJ, Graphodatsky AS, Trifonov VA (2016) Contrasting Origin of B Chromosomes in Two Cervids (Siberian Roe Deer and Grey Brocket Deer) Unravelling by Chromosome-Specific DNA Sequencing. **BMC Genomics** 17:618

Morales-Donoso JA, Vacari GQ, Bernegossi AM, Sandoval EDP, Peres PHF, Galindo DJ, de Thoisy B, Vozdova M, Kubickova S, Barbanti Duarte JM (2023) Revalidation of *Passalites* Gloger, 1841 for the Amazon Brown Brocket Deer *P. nemorivagus* (Cuvier, 1817) (Mammalia, Artiodactyla, Cervidae). **ZooKeys** 1167:241–264

Neitzel H (1987) Chromosome Evolution of Cervidae: Karyotypic and Molecular Aspects. In: **Cytogenetics of Animals**, 1987

- Pauciullo A, Kubickova S, Cernohorska H, Petrova K, Di Berardino D, Ramunno L, Rubes J (2006) Isolation and Physical Localization of New Chromosome-Specific Centromeric Repeats in Farm Animals. **Veterinární Medicína** 51:224–231
- Rubtsov NB, Kartavtseva IV, Roslik GV, Karamysheva TV, Pavlenko MV, Iwasa MA, Koh HS (2015) Features of the B Chromosome in Korean Field Mouse *Apodemus peninsulae* (Thomas, 1906) from Transbaikalia and the Far East Identified by the FISH Method. **Russian Journal of Genetics** 51:278–288
- Rubtsov N, Borisov Y (2018) Sequence Composition and Evolution of Mammalian B Chromosomes. **Genes** 9:490
- Sandoval EDP, Jędrzejewski W, Molinari J, Vozdova M, Cernohorska H, Kubickova S, Bernegossi AM, Caparroz R, Duarte JMB (2024) Description of *Bisbalus*, a New Genus for the Gray Brocket, *Mazama cita* Osgood, 1912 (Mammalia, Cervidae), as a Step to Solve the Neotropical Deer Puzzle. **Taxonomy** 4:10–26
- Sandoval EDP, Rola LD, Morales-Donoso JA, Gallina S, Reyna-Hurtado R, Duarte JMB (2022) Integrative Analysis of *Mazama temama* (Artiodactyla: Cervidae) and Designation of a Neotype for the Species. **Journal of Mammalogy** 103:447–458
- Sarria-Perea JA (2004) **Comparação entre alguns citótipos da espécie *Mazama americana*: Quão grande é a diferença entre eles?** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, Brazil
- Silva DMZA, Pansonato-Alves JC, Utsunomia R, Araya-Jaime C, Ruiz-Ruano FJ, Daniel SN, Hashimoto DT, Oliveira C, Camacho JPM, Porto-Foresti F, Foresti F (2014) Delimiting the Origin of a B Chromosome by FISH Mapping, Chromosome Painting and DNA Sequence Analysis in *Astyanax paranae* (Teleostei, Characiformes). **PLoS ONE** 9:e94896
- Sokolov VE, Prikhod'ko VI (1998) [Taxonomy of the musk deer (Artiodactyla, Mammalia)]. **Izvestiia Akademii nauk. Seriya biologicheskaya** 1:37–46
- Tomazella IM (2016) **Análise de polimorfismo cromossômico em *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae): Implicações para a evolução cariotípica em cervidae.** Dissertação de mestrado, Universidade Estadual Paulista – UNESP, Jaboticabal, Brazil
- Trifonov VA, Dementyeva PV, Beklemisheva VR, Yudkin DV, Vorobieva NV, Graphodatsky AS (2010) Supernumerary chromosomes, segmental duplications, and evolution. **Russian Journal of Genetics** 46:1094–1096
- Verma R, Babu A (1995) Human Chromosomes: Principles & Techniques. 2nd ed. McGraw-Hill, New York.
- Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Fröhlich J, Vodicka R, Rubes J (2019) Comparative Study of the Bush Dog (*Speothos venaticus*) Karyotype and Analysis of Satellite DNA Sequences and Their Chromosome Distribution in Six Species of Canidae. **Cytogenetic and Genome Research** 159:88–96

Vozdova M, Kubickova S, Martinkova N, Galindo DJ, Bernegossi AM, Cernohorska H, Kadlcikova D, Musilová P, Duarte JM, Rubes J (2021) Satellite DNA in Neotropical Deer Species. **Genes** 12:123

Vujošević M, Rajčić M, Blagojević J (2018) B Chromosomes in Populations of Mammals Revisited. **Genes** 9:487

Weber M, Gonzalez S (2003) Latin American Deer Diversity and Conservation: A Review of Status and Distribution. **Écoscience** 10:443–454

Wilson EB (1907) The Supernumerary Chromosomes of Hemiptera. **Science** 26:870–871

Yudkin DV, Trifonov VA, Kukekova AV, Vorobieva NV, Rubtsova NV, Yang F, Acland GM, Ferguson-Smith MA, Graphodatsky AS (2007) Mapping of KIT Adjacent Sequences on Canid Autosomes and B Chromosomes. **Cytogenetic and Genome Research** 116, 100–103