

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 04/05/2026.

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 agradecer-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 enchem 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 mestranda 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 alegam 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. <i>A FAMÍLIA CERVIDAE</i>	3
2.2 <i>OS CERVÍDEOS NEOTROPICAIS – UMA ABORDAGEM GENÉTICA</i>	6
2.3 <i>A ESPÉCIE <i>Passalites nemorivagus</i> (CUVIER, 1817)</i>	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. <i>INDIVÍDUOS E AMOSTRAS</i>	31
3.2 <i>CITOGENÉTICA</i>	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 <i>GENÉTICA MOLECULAR</i>	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 <i>ANÁLISE CITOGENÉTICA</i>	43
4.2 <i>ANÁLISE MOLECULAR</i>	46
5 DISCUSSÃO	52
5.1 <i>CITOGENÉTICA</i>	52
5.2 <i>GENÉTICA MOLECULAR</i>	55
5.3 <i>REVISÃO DO STATUS TAXONÔMICO DE <i>P. nemorivagus</i></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. <i>MATERIAL</i>	72
3.2. <i>CHROMOSOME PREPARATION AND MICRODISSECTION OF Bs</i>	73

3.3. *PREPARATION OF FISH PROBES AND FISH ANALYSIS* 74

3.4. *CLONING AND SEQUENCING*..... 74

4 RESULTS AND DISCUSSION 75

4.1. *MICRODISSECTED BS AND FISH*..... 75

4.2. *B CHROMOSOMES SEQUENCING*..... 80

 4.2.1. *Assembly*.....80

 4.2.2. *RepeatMask*82

 4.2.3. *BLAST*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.



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 jucunda* 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 phylogographic 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.

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. **Veterinárni 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. Serii biologicheskaja** 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