

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E**  
**MOLECULAR DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama***  
**(MAMMALIA: CERVIDAE) DO PERU**

José Eduard Hernández Guevara  
Zootecnista

**2025**

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

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E  
MOLECULAR DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama*  
(MAMMALIA: CERVIDAE) DO PERU**

**Discente:** José Eduard Hernández Guevara

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

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

**2025**

G939c Guevara, José Eduard Hernández  
Caracterização morfológica, citogenética e molecular das espécies do gênero mazama (Mammalia: Cervidae) do Peru / José Eduard Hernández Guevara. -- Jaboticabal, 2025  
95 p. : tabs., fotos

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal  
Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Morfologia (Animais). 2. Citogenética Animal. 3. Filogenia. 4. Genética animal. 5. Taxonomia (Zoologia). I. Título.

## **IMPACTO POTENCIAL DESTA PESQUISA**

O conhecimento das espécies do gênero *Mazama* que ocorrem nos distintos países da região neotropical é importante para desenvolver estratégias de conservação e proteção delas, especialmente em países da região andina onde não tem sido feitos estudos genéticos do gênero *Mazama*. Neste estudo foi realizada a primeira análise de morfologia, posição filogenética e citogenética de topotipos das duas espécies do gênero *Mazama* descritas no Peru: *Mazama tschudii* (Wagner, 1855) e *Mazama whitelyi* (Gray, 1873) além de três indivíduos mantidos em cativeiro. Os resultados aportaram dados para esclarecer a validade das espécies previamente descritas além da importância do correto manejo genético e reprodutivo em cativeiro do gênero.

## **POTENTIAL IMPACT OF THIS RESEARCH**

The knowledge of the species of the genus *Mazama* occurring in the countries of the neotropical region is important to develop conservation and protection strategies specially in countries of the Andean region where genetic studies of the genus *Mazama* have not yet been conducted. In this study was performed the first morphologic, phylogenetic and cytogenetic description of topotypes of the two *Mazama* species described no Peru: *Mazama tschudii* (Wagner, 1855) and *Mazama whitelyi* (Gray, 1873) as well as three captive specimens. The results provided data to clarify the validity of the previously described species and highlighted the importance of proper genetic and reproductive management of the genus in captivity.



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal



### CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DAS ESPÉCIES DO GÊNERO MAZAMA (MAMMALIA: CERVIDAE) DO PERU

**AUTOR: JOSÉ EDUARD HERNÁNDEZ GUEVARA**

**ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE**

Aprovado como parte das exigências para obtenção do Título de Doutor em Genética e Melhoramento Animal, pela Comissão Examinadora:

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

Documento assinado digitalmente  
**JOSE MAURICIO BARBANTI DUARTE**  
Data: 24/09/2023 09:50:32-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. ANA CAROLINA D OLIVEIRA PAVAN (Participação Virtual)  
IB USP / São Paulo/SP

Documento assinado digitalmente  
**ANA CAROLINA D OLIVEIRA PAVAN**  
Data: 25/09/2023 13:40:10-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Profa. Dra. SUZANA GONZALEZ (Participação Virtual)  
Departamento Biodiversidad y Genética / Insituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable -  
Montevidéu/UR

Pós-Doutoranda SAURA RODRIGUES DA SILVA (Participação Virtual)  
Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária / FCAV UNESP Jaboticabal

Documento assinado digitalmente  
**SAURA RODRIGUES DA SILVA**  
Data: 02/10/2023 00:00:30-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Prof. Dr. RENATO CAPARROZ (Participação Virtual)  
Departamento de Genética e Morfologia / Universidade de Brasília (IB/UnB) - Brasília/DF

Documento assinado digitalmente  
**RENATO CAPARROZ**  
Data: 03/10/2023 16:29:17-0300  
Verifique em <https://validar.it.gov.br>

Jaboticabal, 21 de setembro de 2023

## **DADOS CURRICULARES DO AUTOR**

**José Eduard Hernández Guevara** – Possui graduação em ciências pecuárias pela Universidad Nacional Agraria de la Selva -Tingo María, Peru. Obteve o grau de mestre no Programa de pós-graduação em Ciências Animais e Veterinárias da Universidad de Chile. Desenvolveu seus estudos de doutorado no Programa de pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – Campus de Jaboticabal – São Paulo.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo del Perú - PRONABEC, pela bolsa concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro - Processo nº2017/07014-8.

Ao Professor Dr. José Mauricio Barbanti Duarte pela oportunidade, apoio e sugestões no desenvolvimento desta pesquisa.

A todas as pessoas que tornaram possível a realização deste trabalho.

## SUMÁRIO

	Página
<b>RESUMO</b> .....	<b>vi</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>vii</b>
<b>CAPÍTULO 1 – Considerações gerais</b> .....	<b>1</b>
1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	2
2.1 Taxonomia do gênero <i>Mazama</i> .....	2
2.2 Espécies descritas no Peru .....	4
2.2.1 <i>Cervus tschudii</i> Wagner, 1855 .....	4
2.2.2 <i>Cervus whitelyi</i> Gray, 1873 .....	5
2.3 Espécies descritas em outros países com ocorrência no Peru .....	5
2.3.1 <i>Mazama americana</i> (Erxleben 1777) .....	5
2.3.2 <i>Subulo gouazoubira</i> (Fischer, 1814) e <i>Mazama nemorivaga</i> (Cuvier, 1817) .....	6
2.3.3 <i>Mazama chunyi</i> (Herskovitz, 1959) .....	6
2.3.4 <i>Mazama rufina</i> (Pucheran, 1851) .....	7
3. Referências bibliográficas .....	8
<b>CAPÍTULO 2 – Caracterização morfológica, citogenética e molecular de <i>Mazama tschudii</i> (Wagner, 1855)</b> .....	<b>14</b>
1. INTRODUÇÃO .....	14
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	15
2.1 Aspectos legais e éticos .....	16
2.2 Área de estudo e coleta de amostras .....	14
2.3 Caracterização morfológica .....	17
2.4 Caracterização citogenética .....	18
2.5 Caracterização molecular .....	19

2.5.1 Extração de DNA e sequenciamento do mitogenoma -----	19
2.5.2 Análise filogenética -----	20
3. RESULTADOS -----	21
3.1 Caracterização morfológica de <i>M. tschudii</i> -----	21
3.2 Descrição citogenética -----	30
3.3 Análise filogenética -----	31
4. DISCUSSÃO -----	32
4.1 Caracterização morfológica -----	32
4.2 Caracterização citogenética -----	33
4.3 Caracterização filogenética -----	34
5. CONCLUSÃO -----	35
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	35
<b>CAPÍTULO 3 - Caracterização morfológica, citogenética e molecular de <i>Mazama whitelyi</i> (Gray, 1873) -----</b>	<b>39</b>
1. INTRODUÇÃO -----	39
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	41
2.1 Aspectos legais e éticos -----	41
2.2 Área de estudo e coleta de amostras -----	41
2.3 Caracterização morfológica -----	42
2.4 Caracterização citogenética -----	44
2.5 Caracterização molecular -----	45
2.5.1 Extração de DNA e sequenciamento do mitogenoma -----	45
2.5.2 Análise filogenética -----	46
3. RESULTADOS -----	48
3.1 Caracterização morfológica do topótipo de <i>M. whitelyi</i> -----	48
3.2 Descrição citogenética -----	57
3.3 Análise filogenética -----	59

4. DISCUSSÃO -----	61
4.1 Caracterização morfológica -----	61
4.2 Caracterização citogenética -----	61
4.3 Análise filogenética -----	63
5. CONCLUSÃO -----	63
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	64
<b>CAPÍTULO 4 – Caracterização morfológica, citogenética e molecular de <i>Mazama</i> em cativeiro no Peru -----</b>	<b>68</b>
1. INTRODUÇÃO -----	68
2. MATERIAL E MÉTODOS -----	69
2.1 Aspectos legais e éticos -----	69
2.2 Área de estudo e coleta de amostras -----	70
2.3 Caracterização morfológica -----	71
2.4 Caracterização Citogenética -----	72
2.5 Extração de DNA e sequenciamento do mitogenoma -----	73
2. 6 Análise filogenética -----	74
3. RESULTADOS -----	76
3. 1 Descrição morfológica externa -----	76
3.2 Descrição citogenética -----	82
3.3 Análise filogenética -----	85
4. DISCUSSÃO -----	87
4.1 Caracterização morfológica -----	87
4.2 Caracterização citogenética -----	87
4.3 Caracterização filogenética -----	88
5. CONCLUSÃO -----	89
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	89
<b>CAPÍTULO 5 – Considerações finais -----</b>	<b>94</b>



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Câmpus de Jaboticabal



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

Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias  
Via de Acesso Prof. Paulo Donato Castellane, s/n CEP 14884-900 - Jaboticabal/ SP - Brasil  
tel 16 3299 7100 [www.fcaav.unesp.br](http://www.fcaav.unesp.br)

Pica AI

## CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DAS ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama* (MAMMALIA: CERVIDAE) DO PERU

**RESUMO** – O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 corresponde a um extenso grupo de cervídeos de tamanho médio a pequeno e chifres simples nos machos. Se distribuem na América tropical e subtropical. No Peru foram descritas as espécies *Cervus tschudii* Wagner, 1855 e *Cervus whitelyi* Gray, 1873, ambas reclassificadas posteriormente como *Mazama tschudii* (Wagner, 1855) e *Mazama whitelyi* (Gray, 1873). Com o propósito de esclarecer a complexa taxonomia que apresenta o gênero *Mazama* na atualidade, a presente pesquisa propôs a coleta de um topótipo para cada uma das espécies descritas no Peru e sua caracterização morfológica, citogenética e molecular. Após a coleta, foram tomadas amostras de tecido para estudos moleculares e citogenéticos, além da pele e o esqueleto completo (crânio e pós-crânio) para estudos morfológicos. Além dos animais coletados em cada localidade tipo, foram realizadas coletas de amostras de três indivíduos acessíveis em cativeiro. O topótipo de *C. tschudii* apresentou características exclusivas em comparação com outras espécies do gênero *Mazama*. As características observadas sustentam a hipótese de que *C. tschudii* descrito na Cordilheira ocidental do Peru se trate de uma espécie válida dentro do gênero. As características citogenéticas, morfológicas e moleculares de um topótipo de *C. whitelyi*, foram importantes para determinar a similaridade com os espécimes *Mazama americana* do noroeste do Brasil. O táxon não teve um ancestral comum exclusivo com espécimes de *M. americana* da localidade tipo da Guiana Francesa, portanto, os resultados mostram que *C. whitelyi* deva ser considerada como espécie separada de *M. americana*. O estudo genético de indivíduos amostrados em cativeiro com origem na natureza no Peru mostrou a relação filogenética com os citótipos de *M. americana* do noroeste brasileiro e revelou cariótipos diferenciados de outros *M. americana*.

**Palavras-chave:** taxonomia, filogenia mitocondrial, veados

**MORPHOLOGICAL, CYTOGENETIC AND MOLECULAR  
CHARACTERIZATION OF SPECIES OF THE GENUS *Mazama* (MAMMALIA:  
CERVIDAE) FROM PERU**

**ABSTRACT** – The genus *Mazama* corresponds to an extensive group of brocket deer of medium to small size, with simple antlers in males. The distribution covers tropical and subtropical America. In Peru were described *Mazama tschudii* (Wagner, 1855) and *Cervus whitelyi* (Gray, 1873). Due to the great taxonomic uncertainties that currently surround the genus *Mazama*, this project proposed the collection of a topotype for each of the species described in Peru and its subsequent morphological, cytogenetic and molecular characterization. After collection, tissue samples were taken for molecular and cytogenetic studies, and also, both the complete skin and skeleton (skull and post-cranium) were analyzed for morphological studies. In addition to the animals collected in each type locality, samples of captive individuals in zoos and breeding sites were assessed. The topotype of *Mazama tschudii* (Wagner, 1855) presented unique characteristics compared to other species of the genus *Mazama*. The observed characteristics support the hypothesis that *Mazama tschudii* described in the western Cordillera of Peru is a valid species within the genus. The cytogenetic, morphological and molecular characteristics of a topotype of *Mazama whitelyi* (Gray, 1873) were important to determine the similarity with *Mazama americana* specimens from northwestern Brazil. The taxon did not have an exclusive common ancestor with *Mazama americana* specimens from the type locality in French Guiana, therefore, the results show that *Mazama whitelyi* should be considered as a separate species from *Mazama americana*. The genetic study of captive red brocket deer individuals with known origin in the wild of Peru showed a phylogenetic relationship with *Mazama americana* cytotypes from northwestern Brazil and revealed differentiated karyotypes from other *Mazama americana*.

**Keywords:** taxonomy, mitochondrial phylogeny, deer

## CAPÍTULO 1. Considerações gerais

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 (Artiodátila: Cervidae), corresponde a um grupo de cervídeos neotropicais com caracteres morfológicos principais como o tamanho corporal de médio a pequeno porte e chifres curtos e não ramificados nos machos (Rossi, 2000). As espécies agrupadas dentro do gênero possuem hábito solitário e uma ampla distribuição, que se estende do Estado de Veracruz no México até o norte da Argentina (Czernay, 1987).

Grande parte das revisões taxonômicas no gênero foram feitas com base em caracteres morfológicos (Gray, 1873; Lydekker, 1898; Neveu-Lemaire e Grandidier, 1911; Cabrera, 1961, Czernay, 1987, Rossi, 2000). Porém, o gênero apresenta baixos níveis de diferenciação morfológica (Rossi, 2000), com alta diversidade cariotípica (Duarte e Jorge, 1996; Abril et al., 2010) além de ser polifilético (Duarte et al., 2008, Heckeberg et al., 2016, Gutiérrez et al. 2017).

Pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de caracterizar taxonomicamente as espécies dentro do gênero *Mazama*. Entretanto, ainda é necessário conhecer a identidade de vários táxons nominais. Muitos nomes designados foram considerados como sinônimos de outras espécies devido aos aspectos da morfologia externa, porém muitos processos que contribuem para a diferenciação das espécies ocorrem ao nível cromossômico, só podendo ser evidenciados por estudos citogenéticos (Guerra, 2004). Outra ferramenta importante, são os estudos filogenéticos a partir de genes mitocondrias ou o mitogenoma, que ajudam na recuperação das relações de ancestralidade entre as espécies e em conjunto com a citogenética, podem ser utilizadas como abordagens integrativas para conhecer as diferenças entre grupos morfológicamente semelhantes (Bernegossi et al., 2022).

A problemática enunciada em relação à taxonomia do gênero *Mazama* descrita anteriormente, leva à preocupação em relação a identidade taxonômica das espécies descritas no Peru, razão pela qual a presente pesquisa busca estudar a taxonomia do gênero *Mazama*, considerando que não existem referências citogenéticas ou

moleculares para as espécies mencionadas neste país. Com isso, o presente estudo tem o objetivo de complementar a descrição taxonômica, por meio da caracterização morfológica, citogenética e molecular das espécies do gênero *Mazama* descritas no Peru, contribuindo assim no esclarecimento da complexidade taxonômica que apresenta este grupo de cervídeos neotropicais na atualidade.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Taxonomia do gênero *Mazama*

O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817, agrupa as espécies de cervídeos neotropicais caracterizadas pela presença de chifre simples e não ramificados nos machos, membros posteriores maiores que os anteriores, pelagem avermelhada, cinza ou castanha, e cujas espécies se distribuem desde o sudeste mexicano até o norte da Argentina (Eisenberg, 1989).

A complexa taxonomia do gênero tem sido discutida pela grande similaridade morfológica das espécies que o compõem, que não é associada às grandes diferenças cariotípicas apresentadas entre elas (Duarte e González, 2010). Além disso, relações de ancestralidade por DNA mitocondrial evidenciou a polifilia do gênero, onde as espécies tradicionalmente consideradas dentro do gênero se distribuíam em duas subtribos, Blastocerina e Odocoileina (Gutiérrez et al., 2017).

Estudos citogenéticos feitos em veado-mateiro *Mazama americana* (Erxleben, 1777) no Brasil, geraram controvérsias sobre sua correta definição taxonômica, já que revelaram variações cromossômicas que sugeriram sua divisão em várias espécies. Para entender melhor estas variações, Duarte e Jorge (1996) analisaram os cariótipos de *M. americana* de várias localidades do Brasil, encontrando extenso polimorfismo, com número diploide ( $2n$ ) variando de 42 a 53 cromossomos e número fundamental de braços cromossômicos (NF) variando de 48 a 57. Essa variação cromossômica apresentou coerência geográfica, ou seja, alguns cariótipos eram característicos de algumas regiões e foram separados em citótipos, sendo os citótipos Rondônia ( $2n = 42/43$ ; NF = 46) e Juína ( $2n = 44/45$ ; NF = 48) característicos do oeste da Amazônia; e os citótipos Paraná ( $2n = 52/53$ ; NF = 56), Carajás ( $2n = 50/51$ ; NF = 54), Santarém

( $2n = 50/51$ ;  $NF = 56$ ) e Jari ( $2n = 48/49$ ;  $NF = 56$ ) de ocorrência no leste da Amazônia e Mata Atlântica (Abril et al. 2010). Esses resultados geraram grandes dúvidas sobre a validade de *M. americana* como espécie única, devido a sua extensa variação cariotípica apesar da pequena variação morfológica (Duarte e Jorge 1996; Rossi, 2000; Abril et al. 2010). Assim também, foi possível, a partir de análises citogenéticas, a distinção de *Mazama jucunda* Thomas 1913 ( $2n = 32 - 34$ ) e *Mazama temama* Kerr 1792 ( $2n=50$ ) até aquele momento consideradas como *M. americana* (Duarte e Jorge, 2003) (Jorge e Benirschke 1977, Groves e Grubb, 1987).

Estudos têm se desenvolvido com o propósito de esclarecer a taxonomia do gênero através de abordagens integrativas. A análise recente do neótipo de *M. americana* coletado na Guiana Francesa, localidade tipo da espécie, descreveu características morfológicas similares às outras formas de veado-mateiro, entretanto, o número diplóide ( $2n = 45$ ) revelou diferenças cromossômicas significativas com os citótipos descritos para a espécie no Brasil (Cifuentes-Rincon et al. 2020). Importante ressaltar que tais divergências cromossômicas descritas para o táxon podem servir como barreira reprodutiva pela subfertilidade ou infertilidade dos híbridos (Cursino et al., 2014; Salviano et al. 2017). Ademais, a análise de cruzamentos em cativeiro de espécimes de diferentes citótipos demonstrou que a presença de apenas uma fusão em tandem em heterozigose causa erros meióticos consideráveis nos híbridos (Galindo et al. 2021)

Outro estudo permitiu a revalidação da espécie *M. rufa* (antigo citótipo Paraná) e proposição de um neótipo coletado entre a fronteira sul do Brasil, no estado de Paraná e Paraguai. A análise cariotípica neste estudo revelou que no mínimo 15 rearranjos cromossômicos divergem entre os cariótipos de *M. rufa* e o neótipo de *M. americana* (Peres et al., 2021).

Assim também, outras pesquisas permitiram a validação e designação de um neótipo para *M. temama* (Sandoval et al., 2022), a revalidação do gênero *Subulo* Smith, 1827, para o veado catingueiro antigamente considerado dentro do gênero *Mazama*, hoje *Subulo gouazoubira* (Fischer, 1814) (Bernegossi et al., 2022), e do gênero *Passalites* Gloger, 1814, para o antigo *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817) hoje nomeado *Passalites nemorivagus* (Cuvier, 1817) (Morales-Donoso et al., 2023),

assim como a validação de *Odocoileus pandora* (Merriam, 1901), descrito inicialmente como *Mazama pandora* Merriam, 1901 (Sandoval et al., 2023).

Nesse contexto, há a necessidade de pesquisa sobre os outros táxons nominais designados para exemplares coletados na América Latina no século XIX e XX. Para as descrições do gênero *Mazama* coletados no Peru, as caracterizações foram baseadas apenas na morfologia corporal externa e craniana. Portanto, uma pesquisa integrativa que agrupe dados genéticos, morfológicos e cariotípicos a essas descrições é necessária para esclarecer a taxonomia do gênero *Mazama* neste país.

## 2.2 Espécies descritas no Peru

### 2.2.1 *Cervus tschudii* Wagner, 1855

De acordo com Wagner (1855), *C. tschudii* é encontrada na região costeira do Peru, onde são frequentes; os espécimes encontram-se por todas as regiões da parte ocidental da Cordilheira litorânea, aproximadamente até 4870 m.s.n.m, atravessam as montanhas, e se espalham na área central até a parte oriental da cordilheira do interior; no entanto, desaparecem repentinamente e não são mais encontrados nas regiões do leste no Peru. Em comparação com a espécie brasileira *Subulo goauzoubira* Smith, 1827 (Bernegossi et al., 2023) *C. tschudii* apresenta tamanho um pouco maior, coloração discretamente mais escura, pelos com desenho contornado e mais claros apenas na ponta do fio e região ventral e interna dos membros mais clara. Posteriormente, Lydekker (1898) associou a descrição do exemplar com *Cervus whitelyi*, Gray 1873, classificando este último como sinônimo júnior de *Mazama tschudii* (Wagner, 1855). Além disso, relata que a pelagem no dorso é mais escura do que no *Passalites nemorivagus* Cuvier, 1817 (Morales-Donoso et al., 2023) e as partes inferiores e interna dos membros são brancas puras em vez de branco-amareladas. Entretanto Allen (1915), sinonimiza a *P. nemorivagus* com *C. tschudii* e discute que *C. tschudii* difere bastante sua coloração de *S. goauzoubira*, sendo também de tamanho maior. Nesse sentido o autor propõe a provável ocorrência de várias formas deste tipo no Peru, e que nesse caso, caberá em uma nova revisão taxonômica determinar a localidade-tipo.

### **2.2.2 *Cervus whitelyi*, Gray 1873**

Espécime descrita por Gray (1873) a partir do crânio de um exemplar jovem com origem em Cosñipata, Peru, que se encontrava armazenado no Museu britânico. As características da descrição relatam estruturas no crânio que o autor considerou diferentes em relação às outras espécies de cervídeos sul-americanos existentes na coleção, como a cavidade cerebral muito maior, presença de caninos rudimentares, ossos nasais proeminentes no meio da extremidade caudal, ossos intermaxilares muito delgados na frente e a região intermaxilar posterior larga dorsalmente (Gray, 1873). Entre outros caracteres, o autor também relata a presença de um sulco alongado sobre cada órbita, a profundidade moderadamente côncava e arredondada para a glândula lacrimal e duas perfurações para a passagem de vasos através da órbita, logo atrás do poço lacrimal, a caixa craniana é oblonga, estreitada acima, na borda superior das órbitas, com a borda inferior das órbitas sendo muito expandida, sendo a parte mais larga do crânio (Gray, 1873). Lydekker (1898) associou ao crânio juvenil de *C. whitelyi* com *M. tschudii*, entretanto, provavelmente tal consideração foi feita por motivos geográficos, como indicado por Allen (1915). Posteriormente *C. whitelyi* foi classificada como subespécie de *M. americana*, nomeando *M. americana whitelyi* (Cabrera, 1960).

## **2.3 Espécies descritas em outros países com ocorrência no Peru.**

### **2.3.1 *Mazama americana* (Erxleben,1777)**

Espécie descrita na Guiana Francesa, com ocorrência referida em diversas localidades do Peru em regiões que correspondem ao noroeste, região central e a parte da Amazonia deste país (Bodmer e Pezo, 2001; Aquino et al., 2007; Sanchez e Vasquez, 2007; Tobler et al., 2009; Mayor et al., 2011; Aquino et al., 2014; Gonzales e Llerena, 2014; Hurtado, 2015; Vela et al., 2017; Shane e Shane, 2018; Rivera, 2019; Madrid, 2020; Scullion et al., 2021, Chung, 2022). Mayor et al. (2011) caracterizaram histologicamente e anatomicamente órgãos reprodutivos de 89 fêmeas, concluindo que a espécie se reproduz durante o ano inteiro na região nordeste da Amazônia

peruana. Também, estudos confirmaram a espécie na comunidade indígena Nueva Esperanza como hospedeiro intermediário de parasitas como *Taenia omissa* (Gomez-Puerta et al., 2021), na região de Loreto como hospedeiro de *Setaria bidentata* (Gomez-Puerta et al., 2017) e também presente em cativeiro no Zoológico de Huachipa como hospedeiro de *Taenia hydatigena* (Gomez-Puerta et al., 2015).

A atividade da caça de *M. americana* tem sido avaliada em função da sua sustentabilidade no nordeste peruano, onde é estimado que 5000 indivíduos de veados vermelhos e cinzas são caçados anualmente. O estudo tem evidenciado que a espécie *M. americana* é abundante nessa região e que é uma importante fonte de alimento em comunidades indígenas (Bodmer e Pezo, 2001).

### **2.3.2 *Subulo gouazoubira* (Fischer, 1814) e *Passalites nemorivagus* (Cuvier, 1817)**

A ocorrência veados de coloração cinza têm sido relatada no Peru. Diversos relatos mencionam a presença de *S. gouazoubira* e *P. nemorivagus* (Bodmer e Pezo, 2001; Hurtado-Gonzales e Bodmer, 2004, Tobler et al., 2009; Rosi et al., 2010; Aquino et al., 2012, Vela et al., 2017; Pacheco et al., 2021) na região Amazônica do Peru, não havendo um estudo genético que confirme a identidade taxonômica dos mesmos. De qualquer forma, a população de veado cinza tem sido discutida como vulnerável na bacia Amazônica e menos abundante nessa região pela atividade da caça de subsistência de muitas comunidades rurais e indígenas (Hurtado-González e Bodmer, 2006).

### **2.3.3 *Mazama chunyi* (Herskovitz, 1959)**

A espécie foi descrita a partir de um indivíduo com origem ao norte da Bolívia e quatro espécimes do Peru (Herskovitz 1959). Estudos têm relatado a presença da espécie ao sul dos Andes peruanos nas regiões de Cusco, Puno e Madre de Dios, na Reserva Manu, Cordillera de Vilcabamba e no santuário de Machu Picchu (Emmons et al. 2001; Pacheco et al. 1993). A espécie é considerada como vulnerável pela IUCN, e a informação sobre a biologia e ecologia dessa espécie é escassa (Rumiz e

Pardo, 2010). Todas as descrições de *M. chunyi* basearam-se em características morfológicas dos indivíduos coletados por Hershkovitz (1959,1982) e complementadas com base em locais isolados de espécimes de museus e raros avistamentos na natureza (Rumiz e Pardo, 2010). Entre os caracteres morfológicos de *Mazama chunyi* se encontram a coloração geral do corpo sendo canela ou marrom madeira, ausência de pelos antevertidos na nuca, cascos negros, não contrastando com a pele do pé. Presença de um tufo arredondado de pelos escuros, longos e antevertidos na região tarsal de ambos os membros (Hershkovitz, 1959, Rojas, 2021).

#### **2.3.4 *Mazama rufina* (Pucheran, 1851)**

A espécie foi descrita no Equador, na Cordilheira Pichincha, com uma distribuição desde o norte dos Andes, no estado Mérida da Venezuela, cordilheiras oriental e sul da Colômbia, Equador; e o ponto mais sul sendo a floresta de Huamantanga, no departamento de Cajamarca Perú 5° 42' S, 78° 56' W (Barrio, 2010). No Peru, a espécie se encontra a uma altitude de 1790 até 3250 m.s.n.m, sempre dentro de floresta úmida, coexistindo com o *Pudu mephistohhiles* (de Winton, 1896) nas montanhas do leste andino no Peru (Barrio, 2010; Tirira, 2007). Apesar de ambas serem espécies de pequeno porte, autores têm relatado diferença de tamanho e partição de nicho na forma de diferenciação na altitude entre ambas (Tirira, 2007).

*M. rufina* foi incluída na lista de mamíferos peruanos (Pacheco et al., 1995), baseado em imagens de indivíduos de cativeiros identificados como *M. rufina*. Dois indivíduos fotografados foram posteriormente associados com a espécie *M. americana* por não possuírem os caracteres diagnósticos de *M. rufina* (Barrio, 2010). Em *M. rufina* a coloração geral do corpo é avermelhada, muito semelhante a *M. americana* sendo a cabeça, pescoço e os quatro membros enegrecidos (Lizcano et al., 2010). A confirmação da espécie no Peru foi feita por Barrio (2010), a partir de indivíduos descritos em Cajamarca. O autor também considera que os indivíduos previamente identificados como *M. rufina* em cativeiro na verdade se tratavam da subespécie *Mazama americana zamora* (Allen, 1915), presente no este dos Andes, norte do Peru e Equador (Amanzo et al., 2003), e da subespécie *Mazama americana*

*guala* (Allen, 1915), do oeste dos Andes e sul do Equador e norte do Peru (Pacheco, 2002).

### 3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril VV, Carnelossi EAG, Gonzalez S, Duarte JMB (2010) Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research** 128:177-187.

Allen JA (1915) Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 34:521-553.

Amanzo J, Acosta R, Aguilar C, Eckhardt K, Baldeón S, Pequeño T (2003) Evaluación biológica rápida del Santuario Nacional Tabaconas – Namballe y zonas aledañas. World Wildlife Fund – Perú, 212p.

Aquino R, Terrones C, Navarro R, Terrones W (2007). Assessing impact of hunting mammals in Alto Itaya river basin, Peruvian Amazon. **Revista Peruana de Biología** 14:181-186.

Aquino R, Tuesta C, Rengifo, E (2012) Diversity of mammals and its preferences for the habitats types in the upper Itaya river basin, Peruvian Amazon. **Revista Peruana de Biología** 19:35-42.

Aquino R, García G, Charpentier E (2014) Ungulates abundance and habitats use between lower Urubamba and Tambo rivers, Peruvian Amazon. **Ciencia Amazónica** 4:13-21.

Barrio, J (2010) First records and conservation status of *Mazama rufina* (Cervidae, Artiodactyla) from Peru. **Mastozoología Neotropical** 17:117-122.

Bernegossi AM, Borges C, Sandoval EDP, Cernohorska H, Svatava K, Vozdova, M, Caparroz R, González S, Duarte, JMB. 2022. Resurrection of the genus *Subulo* Smith, 1827 for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy**. 104:1-15.

Bodmer RE, Pezo L (2001) Rural development and sustainable wildlife use in Peru. **Conservation Biology** 15:1163-1170.

Cabrera A (1960) Catálogo de los mamíferos de America der Sur. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales “Bernardino Rivadavia”. **Zoología** 4:309-732.

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 brocket deer species. **Zookeys** 958:143-164.

Chung LBT (2022) **Diagnóstico del Consumo de Carne de Monte en la Comunidad Nativa de Remanso, Cuenca Baja del Putumayo, Loreto, Perú**. 92 f. Dissertação (Engenheiro em Ecologia de Florestas Tropicais) – Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Iquitos.

Cursino M, Salviano M, Abril V, Zanetti E, Duarte JM (2014) The Role of Chromosome Variation in the Speciation of the Red Brocket Deer Complex: The Study of Reproductive Isolation in Females. **BMC Ecology and Evolution** 14:40.

Cuvier GF (1817) Dictionnaire des Sciences Naturelles. Zoologie. Mammiferes. Paris, F. G. Levrault. 428p.

Czernay S (1987) Die Spiesshirsche und Pudus: die Gattungen *Mazama* und *Pudu*. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt. 84p.

Duarte JMB, Gonzales S (2010) Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer. 1ª Edição, Jaboticabal, FUNEP. 394p.

Duarte JMB, Jorge W (1996) Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia** 45:281-287.

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, González S, Maldonado JE (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49:17-22.

Eisenberg JF (1989) Mammals of the Neotropics, Vol. 1, The Northern Neotropics: Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana. University of Chicago Press, 550p.

Emmons LH, Luna LW, Romo MR (2001) Mammals of the Northern Vilcabamba Mountain Range, Peru. In: Alonso, LE, Alonso, A, Schulenberg, TS, Dallmeier, F (Eds.) **Biological and social assessments of the Cordillera de Vilcabamba**, Washington: Conservation International, p. 105-109.

Erxleben JCP (1777) Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates com synonymia et history animalium, Classis 1. Mammalia. Imprensus Weygandianis. Lipsiae. p. 1-636.

Fischer G (1814) Zoognosia Tabulis Synopticis Illustrata. Typis Nicolai Sergeidis Vsevolozky. Moscow. 587p.

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.

Gloger CWL (1841) Gemeinnütziges hand-und Hilfsbuch der Naturgeschichte. Für gebildete Leser aller Stände, besonders für die reifere Jugend und ihre Lehrer. U. Schulz und Co., Breslau [Wrocław], Poland, 160p.

Gomez-Puerta LA, Pacheco J, Gonzales-Viera O, Lopez-Urbina MT, Gonzalez, AE (2015) The taruca (*Hippocamelus antisensis*) and the red brocket deer (*Mazama americana*) as intermediate hosts of *Taenia hydatigena* in Peru, morphological and molecular evidence. **Veterinary Parasitology** 212:465-468.

Gomez-Puerta LA, Mayor P (2017) Congenital Filariasis caused by *Setaria bidentata* (Nematoda: Filarioidea) in the red brocket deer (*Mazama americana*). **Journal of Parasitology** 103:123-126.

Gomez-Puerta LA, Mayor P (2021) The red brocket deer (*Mazama americana*) as a new intermediate host of *Taenia omissa* (Taeniidae). **Parasitology International** 85: 102439.

Gonzales GFN, Llerena GR (2014) Mammal Hunting in the Special Use Zone and Buffer Tingo Maria National Park, Huánuco, Peru. **Revista Peruana de Biología** 21:283-286.

Gray, JE (1873) On the Deer of the West Coast of South America, With the Description of a New Species from Peru (*Cervus whitelyi*). **The Annals and magazine of natural history** 12:161-164.

Groves CP, Grubb P (1987) Relationships of living deer. In.: Wemmer, C.M. **Biology and management of the cervidae**. Smithsonian Institution Press, Washington, p. 21-59.

GUERRA M (2004) FISH – Conceitos e Aplicações na Citogenética. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 176p.

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.

Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rössner GE (2016) Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **Peerj** 4:e2307.

Hershkovitz P (1959) A new species of South American brocket, genus *Mazama* (Cervidae). **Proceedings of the Biological Society Washington** 72: 45-5.

Herskovitz P (1982) Neotropical deer (Cervidae). Part 1. Pudu, genus *Pudu* Gray. *Fieldiana Zoology, New Series* 11:1-86.

Hurtado-Gonzales JL, Bodmer RE (2004) Assessing the sustainability of brocket deer hunting in the Tamshiyacu-Tahuayo Communal Reserve, northeastern Peru. **Biological Conservation** 116:1-7.

Hurtado-Gonzales JL, Bodmer RE (2006) Reproductive biology of female Amazonian brocket deer in northeastern Peru. **European Journal of Wildlife Research** 52:171-177.

Hurtado MCM (2015) **Riqueza y abundancia de macromamíferos terrestres en la margen nor-oriental del parque nacional cerros de amotape**. 67 f. Dissertação (Biología) – Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima.

Jorge W, Benirschke K (1977) Centromeric heterochromatine and G-banding of the red brocket deer, *Mazama americana temama* (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-robertsonian translocation. **Cytologia** 42:11-21.

Kerr R (1792) The animal kingdom or zoological System. Class I. Mammalia. Edinburgh. 303p.

Lizcano DJ, Álvarez SJ, Delgado CA (2010) Dwarf red brocket *Mazama rufina* (Purcheran 1951) In.: DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep, IUCN, p. 177-180.

Lydekker R (1898) The deer of all lands. Rowland Ward, London. 325 p.

Madrid GMA (2020) **Evaluación del nivel de conservación de aves y mamíferos legalmente protegidos en las Áreas Naturales Protegidas de la Región Tumbes – 2015**. 116 f. Dissertação (Engenheiro Florestal e Ambiental) – Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes.

Mayor P, Bodmer RE, López-Béjar M, López-Plana C (2011) Reproductive biology of the wild red brocket deer (*Mazama americana*) female in the Peruvian Amazon. **Animal Reproduction Science** 128:123-128.

Merriam C.H. 1901. Seven new mammals from Mexico, including a new genus of rodents. *Proceedings of the Washington Academy of Sciences* 3:559-563.

Morales-Donoso JA, Vacari G, Bernegossi AM, Sandoval EDP, Peres PHF, Galindo DJ, Thoisy B, Vozdova M, Kubickova S, Duarte JMB (2023) Revalidation of *Passalites* Gloger, 1841 for the Amazon brown brocket deer *P. nemorivagus* (Cuvier, 1817) (Mammalia, Artiodactyla, Cervidae). **ZooKeys** 1167:241-264.

Neveu-Lemaire M, Grandidier G (1911) Notes sur les mammifères des hauts plateaux de l'Amérique du Sud. Imprimerie Nationale - Librairie H. Le Soudier. 125p.

Pachecho V (2002) Mamíferos del Perú. In.: Ceballos G, Simonetti J (Eds.). **Diversidad y Conservación de los Mamíferos Neotropicales**. México, D.F: CONABIO-UNAM, p.503 - 549.

Pacheco VBD, Patterson JL, Patton LH, Emmons S, Solari, Ascorra FC (1993) List of mammal species known to occur in Manu Biosphere Reserve, Peru. Publicaciones del Museo de Historia Natural, UNMSM, 44:1-12.

Pacheco V, de Macedo H, Vivar E, Ascorra C, Arana C, Solari S (1995) Lista Anotada de los Mamíferos Peruanos. Conservation International, Occasional Papers on Conservation Biology 2:1-35.

Pacheco V, Diaz S, Graham-Angeles L, Flores-Quispe M, Calizaya-Mamani G, Ruelas D, Sánchez-Vendizú P (2021) Lista actualizada de la diversidad de los mamíferos del Perú y una propuesta para su actualización. **Revista Peruana de Biología** 28: e21019.

Peres PHF, Luduvério DJ, Bernegossi AM, Galindo DJ, Nascimento GB, Oliveira ML, Sandoval EDP, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Duarte JMB (2021) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (Artiodactyla: Cervidae) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). **Frontiers in Genetics** 12:1-18.

Rafinesque GS (1817) Descriptions of seven new genera of North American quadrupeds. American Monthly Magazine 1:363-364.

Rivera PJR (2019) **Patrones De Actividad De Mamíferos Mayores, Parque Nacional Cerros De Amotape, Sector Rica Playa – Tumbes**.105 f. Dissertação (Biologia) – Universidad Nacional de Piura, Piura.

Rojas LJF (2021) **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama sarae* e *Mazama chunyi* (Cetartiodactyla, Cervidae) a partir de topótipos atuais**.146 f Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) - Unesp, Jaboticabal.

Rossi RV (2000) **Taxonomia de *Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil* (Artiodactyla, Cervidae)**. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo. São Paulo, Brasil.

Rossi RV, Bodmer R, Duarte JMB, Trovati RG (2010) Amazonian Brown Brocket Deer. *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817). In: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**, Jaboticabal, Brazil. FUNEP/IUCN, Jaboticabal, p. 202-210.

Rumiz DI, Pardo E (2010) Peruvian dwarf brocket deer *Mazama chunyi* (Herskovitz 1959). In B. Duarte e S. González (Eds.) **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Funep, IUCN, p. 185-189.

Sánchez A, Vásquez P (2007) Hunting pressure in the mushuckllacta de chipaota native community, buffer zone of the cordillera azul national park. **Ecología Aplicada**, 6:131-138.

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.

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.

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: 1279-1287.

Scullion JJ, Fahrenholz J, Huaytalla V, Rengifo EM, Lang E (2021) Mammal conservation in Amazonia's protected areas: A case study of Peru's Ichigkat Muja - Cordillera del Cóndor National Park. **Global Ecology and Conservation** 26:e01451.

Shanee S, Shanee N (2018) Diversity of large mammals in the Marañón–Huallaga landscape, Peru: with notes on rare species. **Zoology and Ecology**. 28:313-328.

Smith HC (1827) The seventh order of the Mammalia. The Ruminantia. In: Griffith E, Smith CH, Pidgeon E (Eds.) The animal kingdom arranged in conformity with its organization. Vol. 5. Geo B. Whitaker, London. 298-376.

Tirira D (2007) Mamíferos del Ecuador: Guía de campo. Ediciones Murciélago Blanco. Publicación especial sobre los mamíferos del Ecuador 6. Quito. 576p.

Tobler MW, Carrillo-Percastegui SE, Powell G (2009) Habitat use, activity patterns and use of mineral licks by five species of ungulate in south-eastern Peru. **Journal of Tropical Ecology** 25:261-270.

Vela AJW, Rivas M, Fernández V, Clavo PM (2017) Wild Mammals and birds used by inhabitants of the Abujao river basin (Ucayali, Peru). **Revista Peruana de Biología** 24: 263–272.

Wagner A (1855) Die Saugthiere in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen von Dr. Johann Christian Daniel von Schreber. Supplementband. L. D. Weigel, Leipzig. 783p.

## CAPÍTULO 2 – Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama tschudii* (Wagner, 1855)

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 agrupa um grupo de veados de pequeno e médio porte que possuem chifres simples e não ramificados distribuídos do nordeste do México ao centro da Argentina (Eisenberg, 1987; Allen, 1915). A descrição das espécies de *Mazama* foi baseada em características morfológicas externas (Allen, 1915; Miranda-Ribeiro, 1919) que geraram 42 táxons nominais ao longo de sua distribuição (Duarte e González, 2010). Atualmente são reconhecidas como espécies válidas: *Mazama americana* (Erxleben, 1777), *Mazama rufa* (Illiger, 1815), *Mazama nana* (Hensel, 1872), *Mazama jucunda* Thomas, 1913, *Mazama temama* (Kerr, 1792) e *Mazama rufina* (Pucheran, 1851).

Historicamente, foi sugerida uma separação das espécies de *Mazama* em dois grupos com base em alguns caracteres cranianos e caracteres de pelagem e coloração (Allen, 1915): os *Mazama* vermelhos (*M. nana*, *M. jucunda*, *M. americana*, *M. temama*, *Mazama bricenii* Thomas, 1908 e *M. rufina*) e os cinzas (*Mazama pandora* (Merriam, 1901), *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), *Mazama gouazoubira* Fischer, 1814, e *Mazama chunyi* (Hershkovitz, 1959)). Já tem sido discutido que a maioria dos caracteres morfológicos deste grupo são associados a uma convergência morfológica produto da adaptação ao habitat, num processo evolutivo que levou à seleção de menores tamanhos corporais e menor desenvolvimento dos chifres (Eisenberg, 1987). Assim, há uma grande semelhança morfológica encontrada no gênero (Groves e Grubb, 1987) com variações fenotípicas inter e intrapopulacionais associadas à sua distribuição geográfica (Rossi, 2000). Devido a essa semelhança, a morfologia não é um bom critério taxonômico no grupo (Groves e Grubb, 1987; Merino e Rossi, 2010), portanto, ferramentas como a citogenética e genética molecular podem auxiliar na resolução taxonômica do gênero (Duarte e González, 2010; Heckeberg et al., 2016; Bernegossi et al., 2022).

Para este grupo de cervídeos, o estudo de cromossomos pode ser uma importante ferramenta para taxonomia, uma vez que a variação cariotípica

intraespecífica tem um limite imposto pela estabilidade meiótica na produção de gametas (Cursino et al., 2014; Galindo et al., 2021). Dependendo da diferença numérica e estrutural entre os cromossomos de dois indivíduos, seu descendente será infértil, e seguindo o conceito biológico de espécie, se o descendente produzido for infértil, os genitores devem ser considerados como espécies distintas, pois haveria uma barreira reprodutiva eficiente entre eles (Coyne e Orr, 1998; Abril et al., 2010; Cursino et al., 2014)

Wagner (1855) descreveu um espécime com maior ocorrência na cordilheira ocidental do Peru, nomeando-o de *Cervus tschudii*. O autor destacou a coloração avermelhada castanha escurecida dorsalmente no exemplar, mais escura que os indivíduos da espécie *Subulo gouazoubira* (Fischer, 1814) (Bernegossi et al., 2023). Devido às semelhanças com o morfotipo de *Mazama*, a descrição de Wagner foi realocada para esse gênero. Entretanto, as dúvidas sobre a taxonomia da espécie têm sido evidenciadas a partir da consideração de Lydekker (1898) e Cabrera (1960) em associar *Mazama tschudii* (Wagner, 1855) com a espécie *Mazama whitelyi* devido a ambas se tratarem de descrições com origem no Peru. Depois dos trabalhos de Wagner (1855), Lydekker (1898) e Cabrera (1960) não há relato publicado sobre morfologia, nomenclatura ou estudo genético que confirme a identidade taxonômica de *M. tschudii*. Por isso, é relevante acessar um topótipo de vida livre, para estudar de forma integrativa suas características genéticas e morfológicas.

Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi caracterizar a morfologia (biometria corporal, padrões de coloração, craniometria, caracterização pós-crânio), citogenética (cariótipo convencional, biometria cromossômica, banda C, coloração Ag-RON) e genética molecular (mitogenoma) de um topótipo atual de *M. tschudii*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

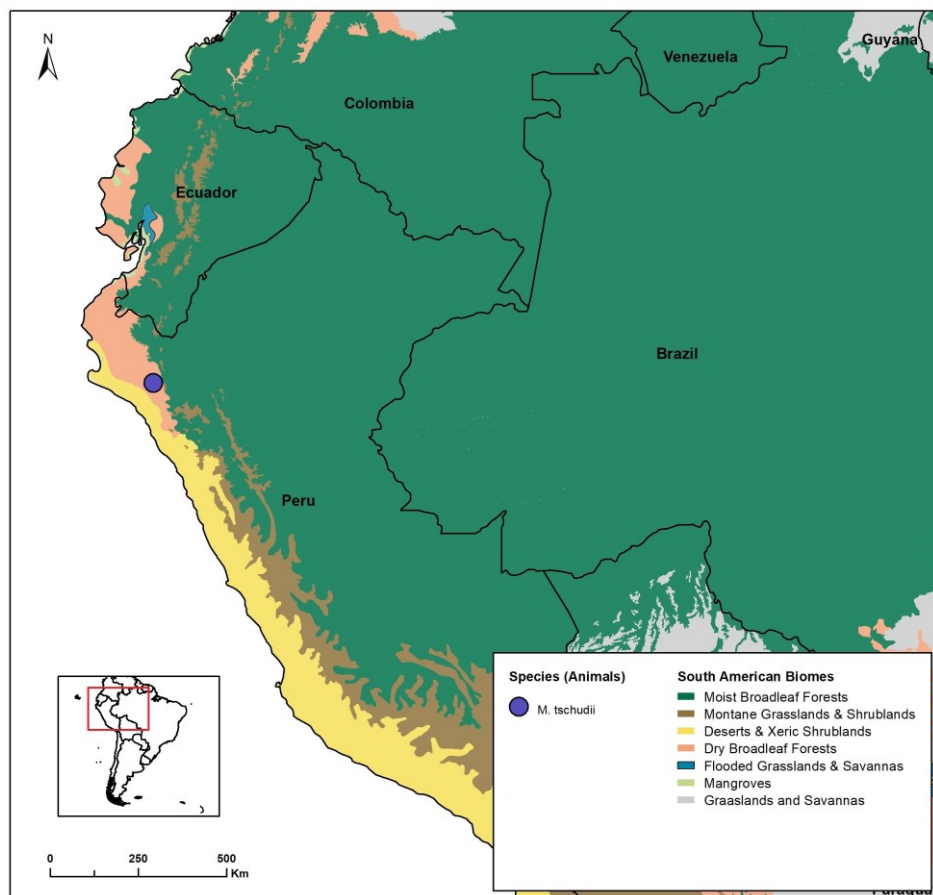
### **2.1 Aspectos legais e éticos**

Todos os procedimentos adotados neste estudo estão de acordo com normas internacionais vigentes: autorização de coleta concedida pelo Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) – Peru, Resolução da Direção Geral N°

D000289-2020-MINAGRI-SERFOR-DGSPFS; autorização de exportação de amostras N° 003704-SERFOR; e certificado de aprovação pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal-SP.

## 2.2 Área de estudo e coleta de amostras

Uma vez obtida a autorização para a coleta de amostras, foi organizada uma expedição científica na cordilheira ocidental na parte norte do Peru e coletado um indivíduo macho na localidade La Ramada, Distrito Salas, Provincia Lambayeque, Peru. Data de coleta 22/01/2020. Coordenadas Zona 17, UTM E 663682; UTM N 9319276. Altitude 1510 m.s.n.m (Figura 1). O indivíduo foi designado com o número T431 do Núcleo de Pesquisa e Conservação e Cervídeos (NUPECCE) e catalogado no Museo de História Natural de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco com código N° MHNC008-My.



**Figura 1.** Local de coleta do topótipo de *M. tschudii*

### 2.3 Caracterização morfológica

Logo após o abate, foi realizada a medição corporal externa do espécime para obter informação sobre o peso (kg), comprimento do chifre esquerdo e direito (cm), diâmetro à base dos chifres direito e esquerdo (cm), comprimento de cabeça (cm), largura de cabeça (cm), tamanho da orelha (cm), distância entre olhos (cm), distância entre chifres (cm), largura da mandíbula à base (cm), comprimento do metacarpo (cm), comprimento do metatarso (cm), altura (cm), comprimento do corpo (cm), comprimento da cauda (cm), perímetro de pescoço (cm), perímetro torácico (cm) e perímetro abdominal (cm). Estas medidas foram tomadas com balança, fita métrica e paquímetro.

Também, o indivíduo foi posicionado em um pano de campo azul contendo escalas métricas e foto documentado nas posições, lateral, dorsal e ventral, bem como detalhes da cabeça. A pele, na sua íntegra, foi retirada e separada dos restos musculares, gordura e fâscias, sendo então mergulhada em solução curtume para dessecação do material. Após secagem por três dias, a mesma foi acondicionada para estudos morfológicos. Foram examinados nas peles e nas fotos os seguintes aspectos de Coloração geral da pelagem, campos cromogénéticos da cabeça (faixas orbitais superior e inferior, mancha superciliar anterior, regiões auriculares antero-basal e pósterio-basal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular), e campos cromogénéticos do corpo (região da cabeça e pescoço, linha mediana dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal posterior do corpo, região ventral do corpo, ventre da cauda e região distal dos membros, padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo). Também foram examinadas as ocorrências de faixas de pelos antevértidos e ocorrência de tufo arredondado de pelos na região tarsal.

O esqueleto completo (crânio e pós-crânio) foi limpo no local de abate do animal e o material acondicionado em caixas plásticas sob temperatura ambiente. Foram tomadas medidas padrão do crânio conforme o proposto por Von den Driesch (1976).

Foram organizadas duas matrizes de dados, uma contendo dados de 14 medidas corporais e outra com 36 medidas cranianas, estas matrizes incluíam dados do topótipo de *M. tschudii* e indivíduos adultos das espécies *M. americana*, *M. jucunda*,

*M. temama*, *M. nana*, *P. nemorivagus* e *S. gouazoubira* pertencentes ao banco de dados do NUPECCE. Em cada matriz foram considerados indivíduos de ambos os sexos pela ausência de dimorfismo sexual (Rossi, 2000). Com o conjunto de dados de cada uma das matrizes foi feito a análise de agrupamento usando a distância euclidiana e o método de encadeamento médio (Sokal e Michener, 1958) e análises de componentes principais. As duas análises foram desenvolvidas usando o programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2020)

## **2.4 Caracterização Citogenética**

Logo após a coleta do exemplar, um fragmento de 5 cm x 2 cm de pele na região inguinal do topótipo foi coletado, subdividido em 10 partes, os quais foram depositados em meio de congelamento (Duarte et al., 2021). Posteriormente, as amostras foram refrigeradas a 4°C por 3 horas e colocadas no vapor de nitrogênio líquido por 30 minutos, sendo em seguida mergulhadas no nitrogênio líquido (-196°C), onde permaneceram estocadas.

As amostras de pele foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para os frascos com meio de cultivo enriquecido com soro fetal bovino e levados a estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Alcançada a confluência celular, o material passou por tratamento com colchicina, solução hipotônica e foi fixado em solução Carnoy (Verma e Babu, 1995).

A classificação cromossômica foi realizada utilizando 10 metáfases do topótipo coletado. Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão de braços como metacêntricos, submetacêntricos ou acrocêntricos (Levan et al., 1964). O comprimento relativo (CR) foi utilizado para a divisão dos pares cromossômicos em grupo A (grandes cromossomos de dois braços, CR≥6%), grupo C (pequenos cromossomos de dois braços, CR<6%), grupo D (grandes cromossomos de um braço, CR≥5%), grupo E (pequenos cromossomos de um braço, CR<5%) e grupo B (cromossomos B, CR<1,5%) (Cifuentes-Rincón, 2020). Da mesma forma, foi realizado o bandeamento C (Sumner, 1972) para visualizar as regiões de heterocromatina constitutiva e a coloração de Ag-RON (Howell; Black, 1980) para visualizar as regiões organizadoras de nucléolo.

## 2.5 Caracterização molecular

### 2.5.1 Extração de DNA e sequenciamento do mitogenoma

Após captura do exemplar, foram coletados fragmentos de fígado e músculo, amostras que foram utilizadas para a extração do DNA. A extração de DNA genômico a partir das amostras de tecido foi realizada utilizando-se o “kit” comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valência, CA, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O ADN extraído foi quantificado por fluorômetro Qubit®, tendo concentração inicial de aproximadamente 200 ng/ul, e teve sua integridade avaliada por um gel de agarose 1%.

O sequenciamento foi feito nas instalações da NGS Soluções Genômicas (<https://ngsgenomica.com.br>). Primeiro, as amostras de DNA foram fragmentadas por sonicação em um aparelho Covaris até um tamanho médio aproximado de 550 pares de bases (pb). Em seguida, as bibliotecas genômicas foram preparadas usando o kit TruSeq® Nano DNA e foram indexadas utilizando o kit IDT para Illumina - TruSeq DNA UD Indexes v2, seguindo as instruções dos fabricantes. As bibliotecas foram quantificadas por meio de qPCR e agrupadas em proporção equimolar com outras amostras para serem sequenciadas. O pool de amostras foi sequenciado em uma flowcell P2 (2x100bp) do equipamento Illumina Nextseq 2000 (Illumina, San Diego, Califórnia).

O sequenciamento da amostra do topotipo de *M. tschudii* gerou um total de 17.541.260 leituras, o mapeamento foi feito tendo como referência a sequência de *M. temama* (número de acesso do GenBank OP712669) usando o programa Geneious Prime 2023.1.1 e seguindo os parâmetros padrão de “sensibilidade média-baixa” do programa que, resumidamente, considera até 5 interações, uma qualidade de leitura mínima de 30, uma sobreposição mínima de 25pb em leituras para montagem de contigs com uma identidade de sobreposição mínima de 80% e um máximo de 10% de lacuna por leitura. O mapeamento gerou um mitogenoma de cobertura média 757,70, sendo que a sequência consenso foi gerada com uma cobertura mínima de 10 para cada sítio.

### 2.5.2 Análise filogenética

Para a análise filogenética do topótipo de *M. tschudii*, foi gerada uma matriz contendo o mitogenoma de *M. tschudii* e sequências de mitogenomas de diferentes espécies do gênero *Mazama* do banco de dados do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) e obtidas sequências de mitogenomas de diferentes espécies existentes no banco de dados online GenBank (Tabela 1). *Alces alces* foi utilizado como grupo externo.

**Tabela 1.** Sequências de mitogenoma de cervídeos neotropicais utilizadas no estudo filogenético.

Espécie	Código de acesso Genbank ou ID	Origem (Pais-Localidade)
<i>Mazama tschudii</i> - Topótipo	T431	Peru - La Ramada
<i>Mazama temama</i>	JN632673	Colômbia
<i>Mazama temama</i> - Neótipo	MZ350864	Mexico
<i>Mazama temama</i>	MZ362858	Mexico
<i>Mazama temama</i>	OP712670	Mexico
<i>Mazama temama</i>	OP712669	Mexico
<i>Mazama americana</i>	JN632657	Peru
<i>Mazama nana</i>	MZ350863	Brasil
<i>Mazama jucunda</i>	MZ350859	Brasil
<i>Mazama americana</i>	JN632656	Guiana Francesa
<i>Mazama americana</i> – Neótipo	Mz350857	Guiana Francesa
<i>Mazama rufa</i> – Neótipo	OQ198444	Brasil
<i>Odocoileus pandora</i>	OQ731409	Mexico
<i>Odocoileus pandora</i>	OQ731408	Mexico
<i>Odocoileus virginianus</i>	KM612273	Texas
<i>Odocoileus virginianus</i>	KM612271	Veracruz, México??
<i>Mazama rufina</i>	JN63266	Colômbia
<i>Subulo goauzoubira</i>	MZ350866	Brasil
<i>Subulo goauzoubira</i> -Neotipo	MZ350858	Paraguai
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	JN632681	Bolívia
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	MZ350860	Brasil
<i>Passalites nemorivagus</i>	JN632659	Peru
<i>Passalites nemorivagus</i>	MZ350867	Brasil
<i>Blastocerus dichotomus</i>	JN632603	Bolívia
<i>Alces alces</i>	MF784602	Polônia

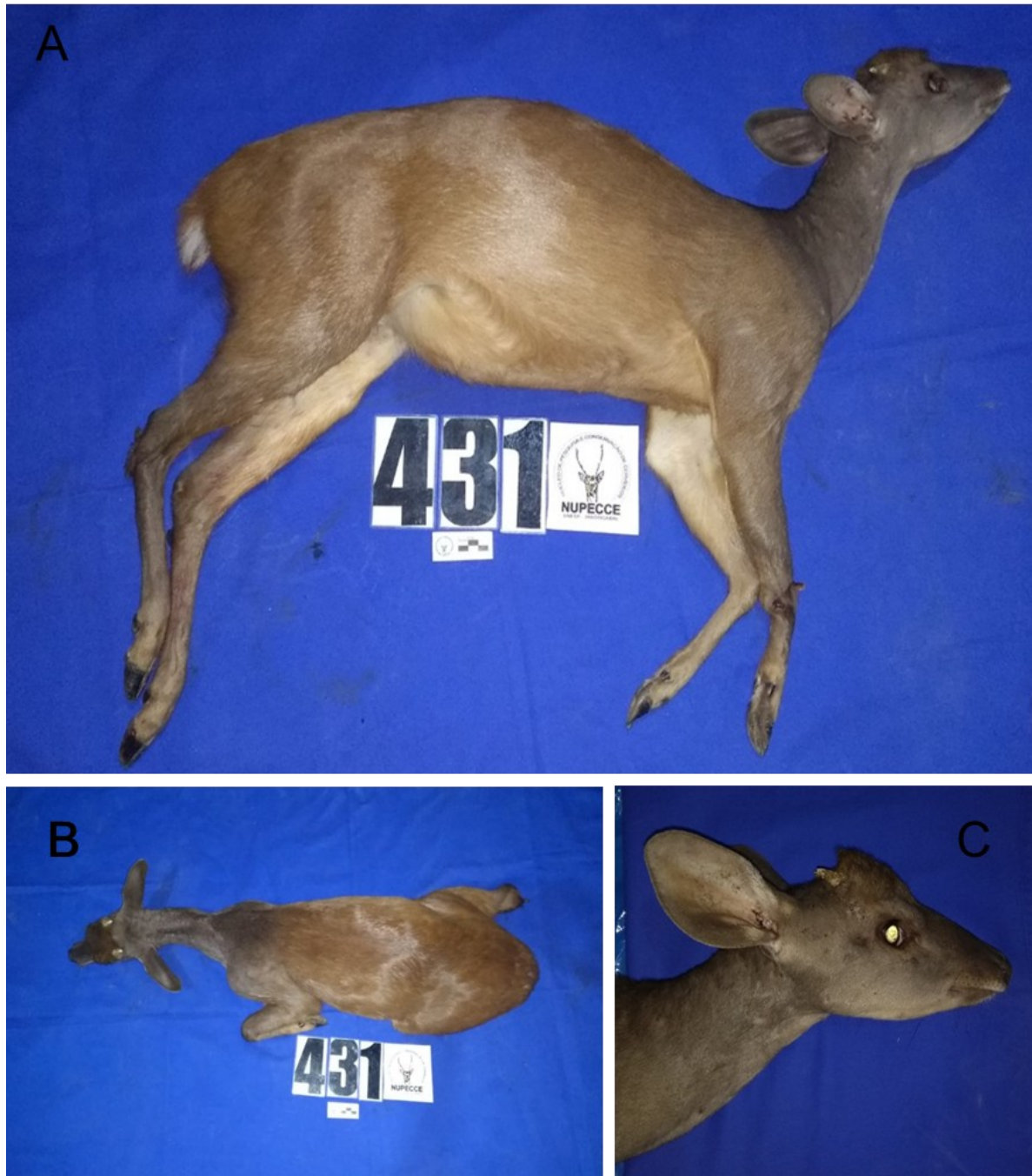
A matriz de sequências foi alinhada mediante a ferramenta MAFFT 7 (Kato et al., 2019) e anotada pelo programa Geneious Prime 2023.1.1. Posteriormente foi determinado o esquema de partição mais adequado e os melhores modelos de evolução molecular para o conjunto de dados levando em consideração os genes mitocondriais e sua divisão em códons, e as regiões não codantes (tRNA, rRNA). Para isso foi utilizado o programa PartitionFinder2 on XSEDE aplicando o método de busca “greedy” e a seleção de modelos por BIC (Bayesian Information Criterion) (Lanfear et al., 2016). A análise filogenética foi feita por meio de Inferência Bayesiana (IB), realizada no programa MrBayes on XSEDE 3.2.1 (Huelsenback J., Ronquist F. 2001), disponível como webservice na plataforma CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010), com 25.000.000 de gerações até obter uma variância < 0.01. Para estimar a distribuição da probabilidade posterior foi utilizado a Metropolis-Coupled MCMC (Markov Chain Monte Carlo) com nchains=4, nrns=2 e burninfrac=0,25. A árvore obtida foi editada com auxílio do programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

### **3. RESULTADOS**

#### **3.1 Caracterização morfológica do topótipo de *M. tschudii***

Coloração geral acastanhada. Linha dorso-medial do corpo de coloração marrom escura. Região ventral do corpo amarelado claro, esbranquiçado na região inguinal. Pelos compridos na região ventral do tórax. Ausência de pelo na região inguinal. Região dorsal da cauda com a mesma coloração que o resto da área dorsal do corpo, região ventral da cauda com pelos compridos e brancos. Pescoço de coloração cinza escura, contrastando com o resto do corpo. Membro posterior lateral acastanhada com pelos avermelhados na área lombar, ventro-dorsal cinza claro e ventro-distal escuro, na região do metatarso. Ausência de tufo tarsal e metatarsal. Membro anterior lateralmente de coloração acastanhada, distalmente cinza escuro. Membro anterior ventralmente amarelado, dorsalmente esbranquiçado e distalmente amarelado. Região externa da orelha cinza escura similar ao pescoço, e internamente castanha escuro. Base da orelha branca. Ausência de pelos na região basal da orelha. Região orbital de coloração cinza escuro sobre uma banda amarelada. Abertura

lacrimal de coloração amarelada. Região mentoniana castanho escuro, clareando ventralmente até a região do pescoço na linha média ventral. Mancha nasal branca. Presença de tufo frontal (Figura 2).



**Figura 2.** Topótipo macho de *M. tschudii*, coletado na Provincia Lambayeque, Peru. (A) vista lateral do corpo. (B) vista dorsal do corpo. (C) vista lateral da cabeça.

O topótipo apresentou chifres curtos, simples e sulcados longitudinalmente. O crânio apresentou bula auditiva de tamanho moderado e dois forames orbitais com fossa preorbital de formato oval (Figura 3).



**Figura 3.** Crânio do topótipo de *M. tschudii* A) vista ventral, (B) vista dorsal, (C) vista lateral esquerdo, (D) vista lateral direito.

A tabela 2 e 3 mostram, respectivamente, as medidas corporais e cranianas obtidas do topótipo de *M. tschudii*.

**Tabela 2.** Medidas de biometria corporal externa do topótipo macho de *M. tschudii*

<b>Caráter (cm)</b>	<b>T431</b>	<b>Caráter (cm)</b>	<b>T431</b>
Comprimento de cabeça	22,5	Comprimento de corpo	74,7
Largura de cabeça	7,5	Abdômen	57,8
Comprimento de orelha	9,6	Comprimento do testículo direito	5,3
Distância entre olhos	4,4	Comprimento do testículo esquerdo	5,2
Mandíbula	6,3	Diâmetro de testículo direito	2,1
Perímetro do pescoço	24,2	Diâmetro de testículo esquerdo	2,2
Tórax	50,2	Metatarso	19,1
Altura	51	Comprimento de cauda	7,5
Metacarpo	11	Massa (Kg)	13,6

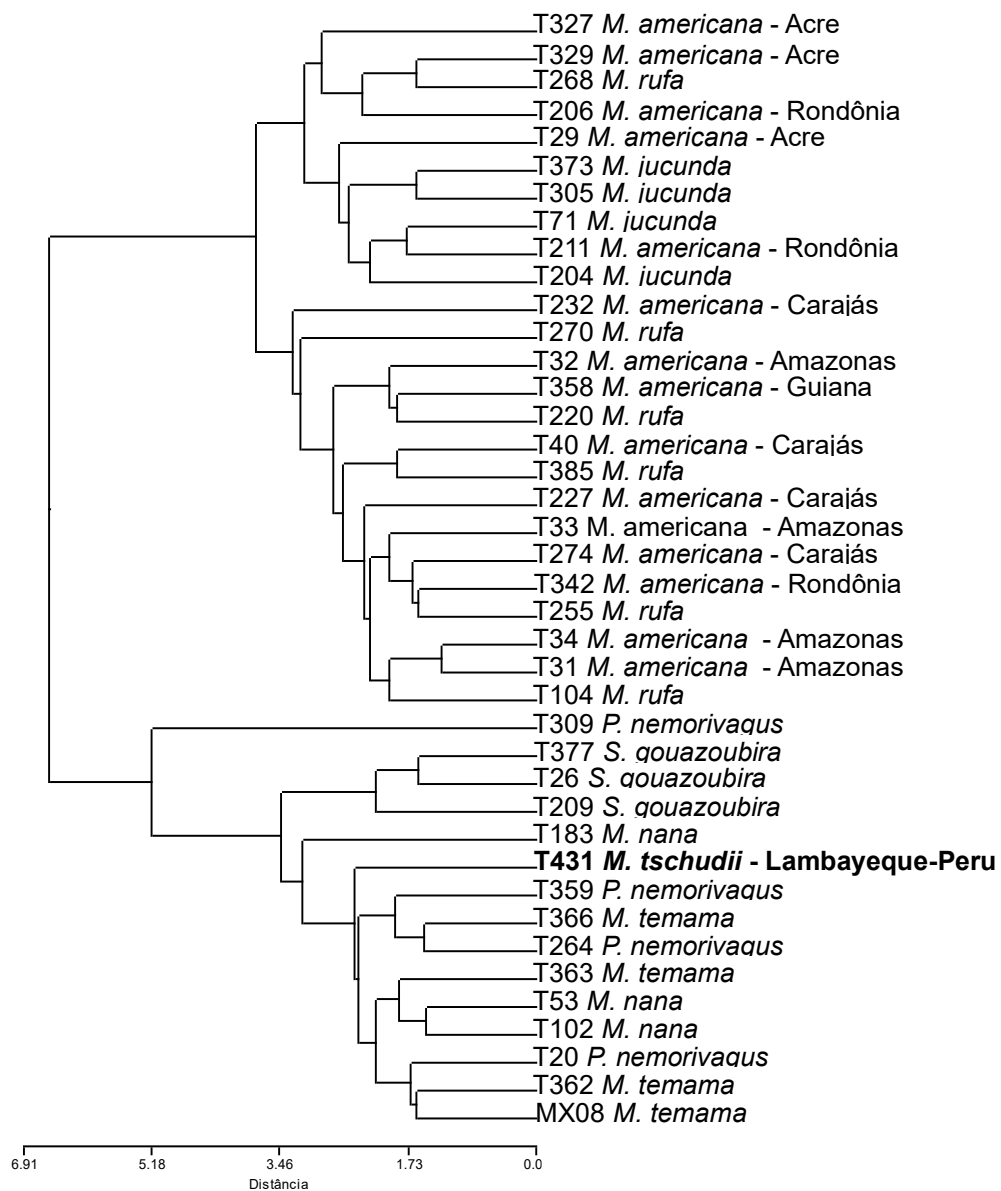
**Tabela 3.** Medidas tomadas do crânio do topótipo macho de *M. tschudii*

<b>Caráter (mm)</b>	<b>T431</b>	<b>Caráter (mm)</b>	<b>T431</b>	<b>Caráter (mm)</b>	<b>T431</b>
<b>CT</b>	174,7	<b>ACR</b>	120,6	<b>MLPP</b>	58,9
<b>CCB</b>	168,28	<b>MCN</b>	45,8	<b>MLFM</b>	16,15
<b>CB</b>	154,9	<b>CCFL</b>	86,1	<b>LFM</b>	56,03
<b>CCC</b>	104,2	<b>CPO</b>	79,04	<b>MLEO</b>	73,15
<b>PP</b>	50,7	<b>CLP</b>	40,2	<b>LMEO</b>	39,5
<b>EBC</b>	35,02	<b>DCD</b>	55,87	<b>LZ</b>	72,6
<b>EBF</b>	74,5	<b>CLM</b>	29,73	<b>MLEN</b>	15,1
<b>CVC</b>	74,7	<b>CLP</b>	26,7	<b>MLPM</b>	22,7
<b>CFM</b>	109,8	<b>MCIO</b>	30,41	<b>MLP</b>	50,91
<b>LN</b>	96,1	<b>MAIO</b>	29,06	<b>BCNS</b>	43,22
<b>LR</b>	138,05	<b>MLM</b>	71,19		
<b>LP</b>	164,4	<b>MLCO</b>	35,41		

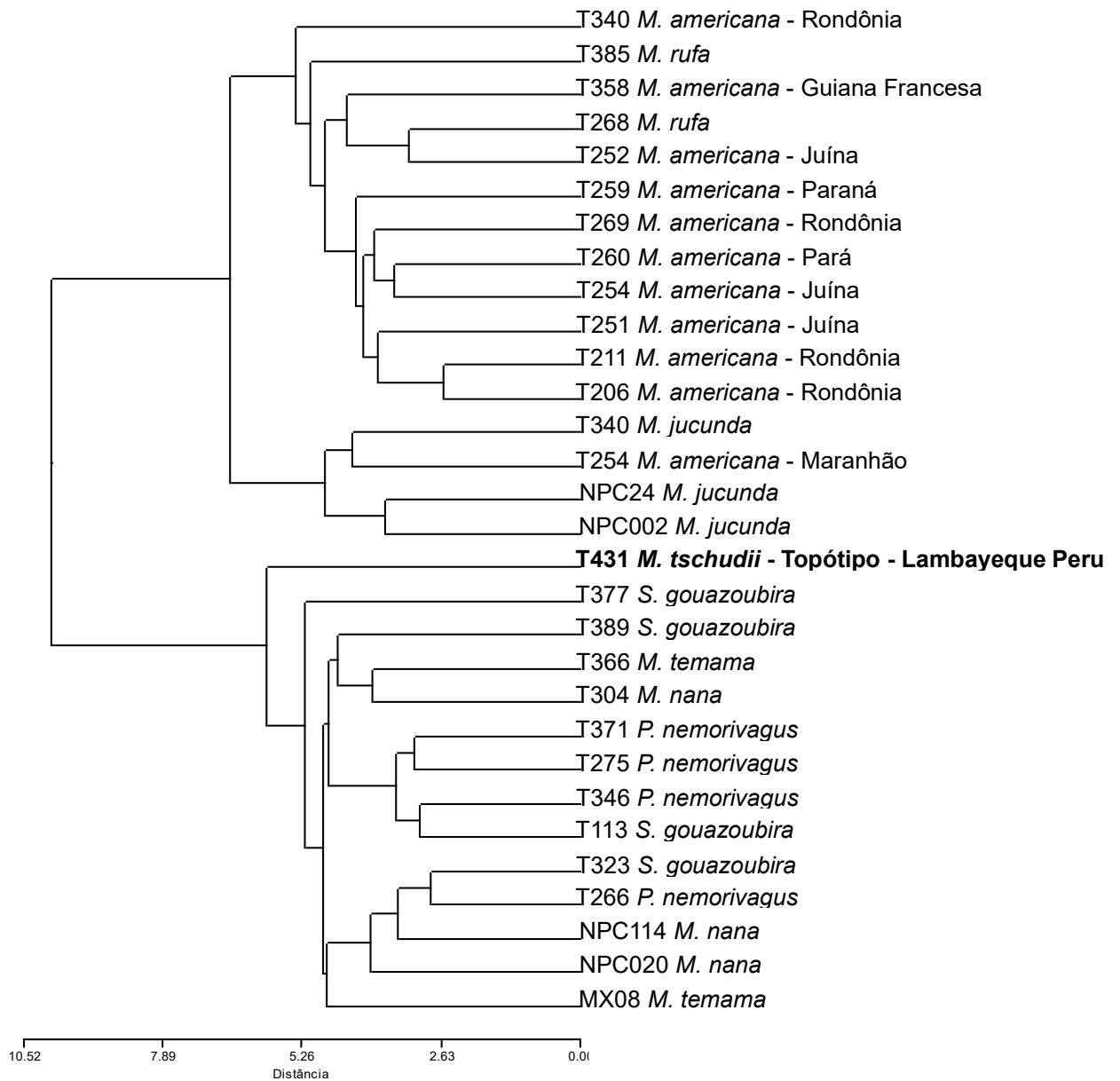
CT= Comprimento total; CCB = Comprimento côndilo-basal; CB = comprimento basal; CCC= comprimento curto do crânio; PP = pré-molar – prosthion; EBC = eixo base-cranial; EBF= eixo base-facial; CVC= comprimento vicero-craniano; CFM = comprimento frontal mediano; LN= lambda – nasal; LR = lambda – região mais distal do osso nasal; LP= lambda – prosthion; ACR= acrocânio; MCN= maior comprimento dos nasais; CCFL= comprimento curto facial – lateral; CPO= comprimento palatal-oral; CLP= comprimento lateral do pré-maxilar; DCD= distância corrida de dentes; CLM= comprimento da linha do molar; CLP= comprimento da linha pré-molar; MCIO= maior comprimento interno da órbita; MAIO= maior altura interna da órbita; MLM= maior largura do mastóide; MLCO= maior largura dos côndilos occipitais; MLPP= maior largura das bases do processo para-occipital; MLFM= maior largura do forâmen magno; LFM= menor largura frontal; MLEO= maior largura entre as órbitas; LMEO= menor largura entre as órbitas; LZ= largura do zigomático; MLEN= maior largura entre os nasais; MLPM= maior largura entre o pré-maxilar; MLP= maior largura do palatal; BCNS= basion – ponto mais alto da crista nugal superior.

A análise de agrupamento feito com o conjunto das medidas corporais, evidenciou a formação de dois grandes grupos (Figura 4), um formado pelas espécies *M. americana*, das diferentes localidades, a espécie *M. rufa* e a espécie *M. jucunda*. O outro grupo está formado pelas espécies de pequeno porte como *S. gouazoubira*,

*P. nemorivagus*, *M. temama*, *M. nana*, e dentro deste grupo o indivíduo coletado de *M. tschudii*, formando um subgrupo com as espécies *P. nemorivagus*, *M. temama*, *M. nana*. Um resultado similar foi obtido na análise de craniometria (Figura 5), no qual os indivíduos das espécies *M. americana*, *M. rufa* e *M. jucunda*, foram recuperados em um grupo separado das espécies de pequeno porte *M. nana*, *M. temama*, *S. gouazoubira* e *P. nemorivagus*. Nesse último grupo, e de forma independente foi recuperado o topótipo de *M. tschudii*.

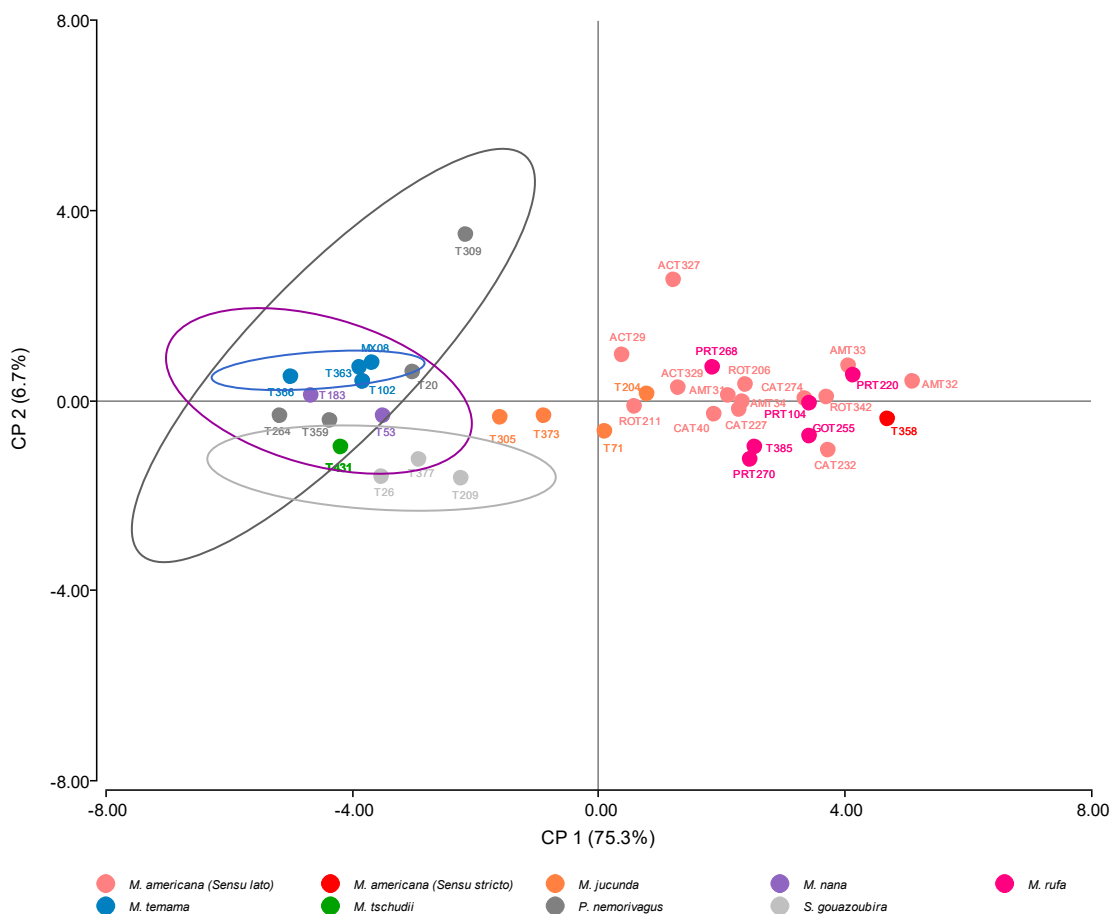


**Figura 4.** Dendrograma gerado com as de medidas de biometria corporal do topótipo de *M. tschudii* e outras espécies de cervídeos neotropicais.



**Figura 5.** Dendrograma gerado com as de medidas cranianas do topótipo de *M. tschudii* e outras espécies de cervídeos neotropicais.

Na análise de componentes principais (PCA) feito com as medidas de biometria corporal, os componentes PC1 e PC2 explicam 82,0% da variância total, sendo 75,3% e 6,7% respectivamente (Figura 6). As correlações de cada variável com os componentes principais utilizados são apresentadas na Tabela 4, os valores mostram correlação positiva entre a PC1 com todas as variáveis, variando entre 0,55 com a variável distância entre olhos e 0,98 com a variável peso. Na PC2 a maior correlação positiva ocorreu com a variável distância entre olhos (0.68) e a maior correlação negativa com a variável comprimento da orelha (-0.57).



**Figura 6.** Biplot da PCA baseado em dados de biometria corporal do topótipo de *M. tschudii* e outras espécies de cervídeos neotropicais

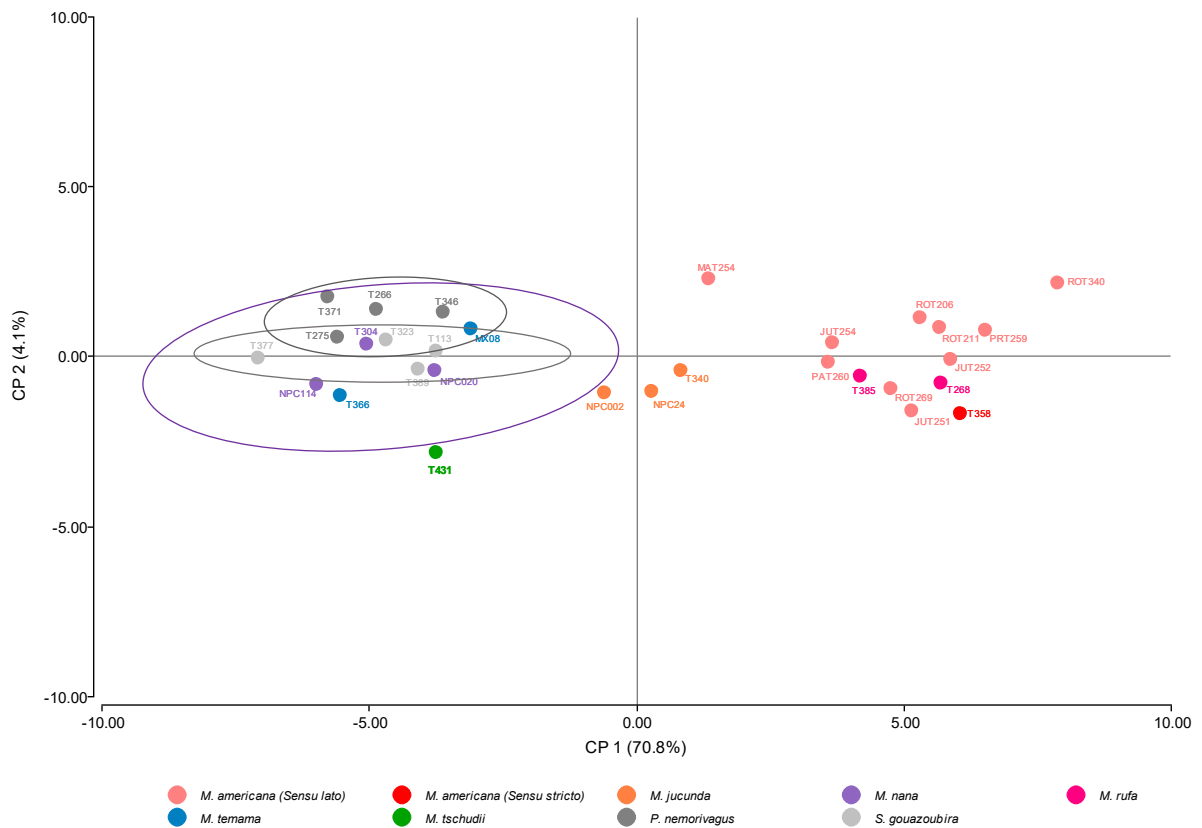
Ao projetar as coordenadas dos indivíduos no plano das componentes, a PC1 mostra marcada diferença entre as espécies de maior porte (*M. americana*, *M. rufa*) e as espécies de menor porte (*P. nemorivagus*, *S. gouazoubira*, *M. temama*, *M. nana*),

enquanto *M. jucunda* se posicionou nestes dois grupos. O topótipo de *M. tschudii* posicionou-se entre as sobreposições das espécies de menor porte *P. nemorivagus*, *S. gouazoubira* e *M. nana*.

**Tabela 4.** Coeficientes de correlação das variáveis de biometria corporal com as componentes PC1 e PC2

Variáveis	PC1	PC2
Comprimento de Cabeça	0.92	0.11
Largura de Cabeça	0.94	0.11
Comprimento de Orelha	0.64	-0.57
Distância entre olhos	0.55	0.68
Mandíbula	0.86	0.05
Metacarpo	0.87	-0.14
Altura	0.95	-0.12
Comprimento de Corpo	0.93	-0.04
Comprimento de Cauda	0.81	0.17
Metatarso	0.92	-0.19
Perímetro de Pescoço	0.84	-0.09
Tórax	0.89	0.07
Abdômem	0.94	0.07
Peso	0.98	-0.03

A PCA feita com as medidas cranianas é apresentada na figura 7, a PC1 e PC2 representam 70,8% e 4,1% da variância total dos dados respectivamente. As correlações de cada variável com os componentes principais utilizados são apresentadas na Tabela 5. Os valores mostram correlação positiva entre a PC1 com todas as variáveis, variando entre 0,35 com a variável maior largura do forâmen magno (MLFM) e 0,97 com a variável comprimento total (CT). Na PC2 a maior correlação positiva ocorreu com as variáveis lambda – nasal (LN) e maior comprimento dos nasais (MCN), com valor de 0,17 e a maior correlação negativa com a variável maior largura entre os nasais (MLEN), com valor de -0.43.



**Figura 7.** Biplot da PCA baseado em medidas cranianas do topótipo de *M. tschudii* e outras espécies de cervídeos neotropicais.

A projeção das coordenadas dos indivíduos no plano dos componentes mostra a separação de *M. americana (sensu stricto)*, *M. americana (sensu lato)* e *M. rufa* das espécies *P. nemorivagus*, *S. gouazoubira*, *M. temama*, *M. nana* e *M. tschudii*. Houve sobreposição na distribuição de coordenadas das espécies *P. nemorivagus*, *S. gouazoubira*, *M. temama* e *M. nana*. *M. tschudii* diferencia-se claramente do conjunto de espécies analisadas, posicionando-se distante de *P. nemorivagus*, *S. gouazoubira*, *M. temama* principalmente, sem sobreposição e no extremo mais inferior da PC2.

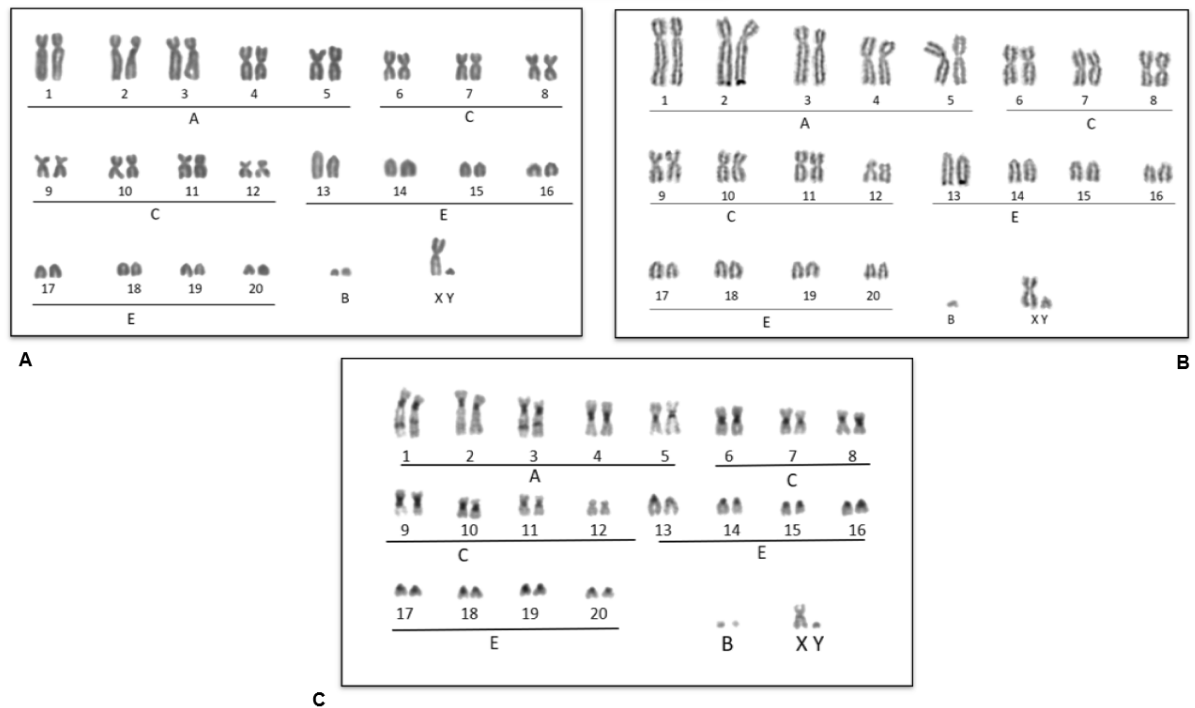
**Tabela 5.** Coeficientes de correlação das variáveis de biometria craniana com as componentes PC1 e PC2

Variáveis	PC1	PC2	Variáveis	PC1	PC2	Variáveis	PC1	PC2	Variáveis	PC1	PC2
CT	0.98	0.07	LN	0.84	-0.03	CLM	0.83	-0.28	MLEO	0.84	-0.21
CCB	0.95	0.05	LR	0.93	0.01	CLP1	0.76	-0.35	LMEO	0.81	0.28
CB	0.96	0.1	LP	0.96	0.12	MCIO	0.79	0.31	LZ	0.95	-0.05
CCC	0.92	0.05	ACR	0.97	0.11	MAIO	0.7	0.35	MLEN	0.59	0.43
PP	0.91	0.17	MCN	0.88	0.0036	MLM	0.56	0.01	MLPM	0.76	-0.09
EBC	0.63	-0.34	CCFL	0.95	-0.0021	MLCO	0.85	-0.17	MLP	0.7	-0.33
EBF	0.87	0.26	CPO	0.87	0.06	MLPP	0.85	-0.21	BCNS	0.89	0.14
CVC	0.95	0.07	CLP	0.91	0.02	MLFM	0.37	-0.2			
CFM	0.92	0.02	DCD	0.84	-0.3	LFM	0.78	-0.28			

### 3.2 Descrição citogenética

A análise citogenética do topótipo de *M. tschudii* teve um número diploide ( $2n$ ) de 42 e um número fundamental (NF) de 68. Foram observados 12 pares de cromossomos autossomos de dois braços e 8 pares de autossomos acrocêntricos. A medição do cromossomo por comprimento relativo classificou os pares 1 a 5 como pertencentes ao Grupo A (grandes cromossomos de dois braços), os pares 6 a 12 ao Grupo C (pequenos cromossomos de dois braços) e os pares 13 a 20 ao Grupo E (pequenos cromossomos de um braço).

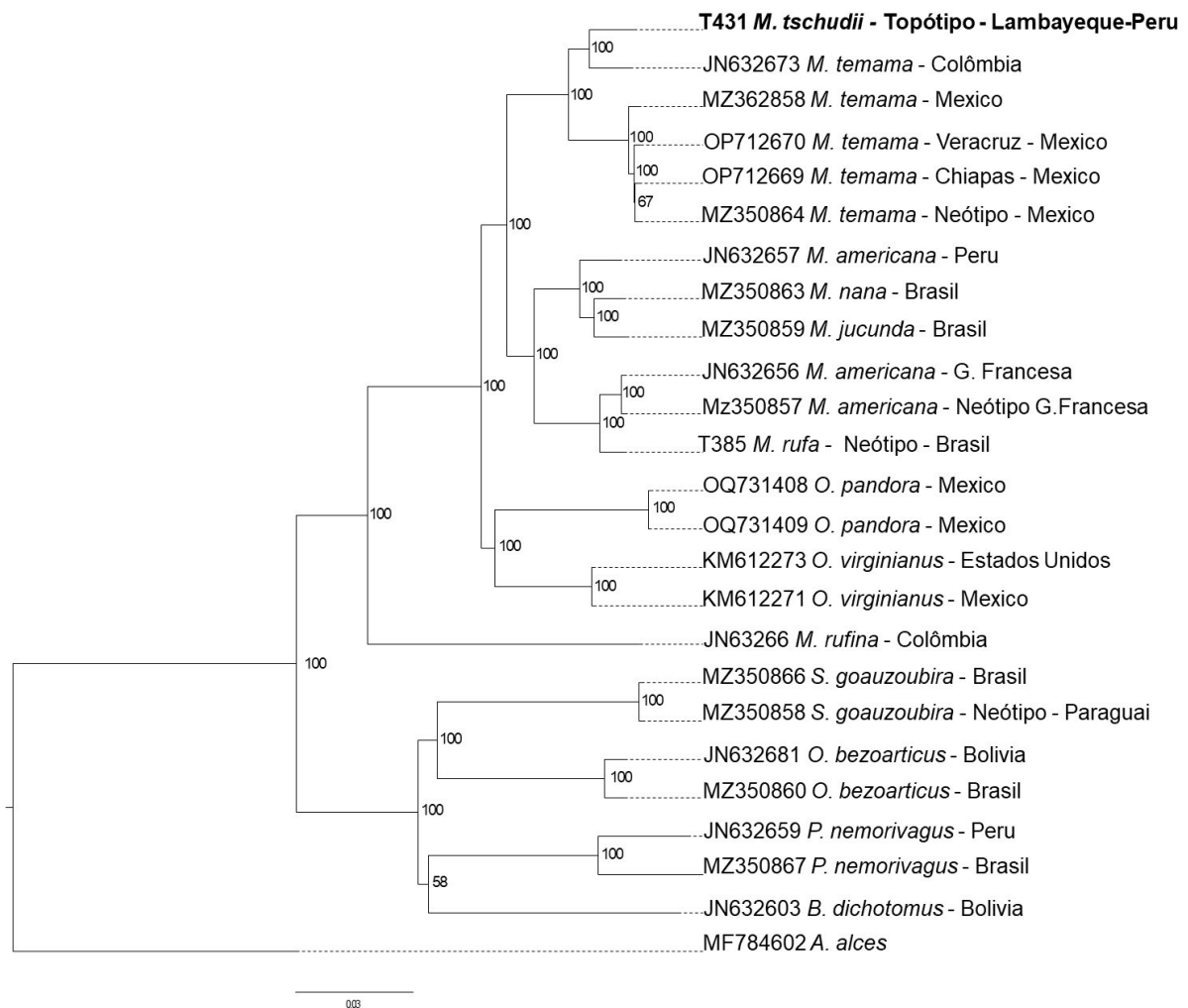
A morfologia do cromossomo X foi submetacêntrica e a do Y acrocêntrica, sendo o menor do lote. Foram observados de 1 a 2 cromossomos B (Figura 8). Nas metáfases analisadas sob a coloração de Ag-RON foram observadas as marcações de regiões nucleolares nos telômeros do braço longo (q) de ambos os cromossomos do par 2 e nos telômeros do braço q dos cromossomos do par 13 (Figura 8B). O bandamento C permitiu observar as regiões de heterocromatina constitutiva associadas ao centrômero de todos os cromossomos autossomos (Figura 8C), exceto no menor cromossomo de dois braços, posicionado como par 12. Também, foi possível observar marcações de heterocromatina intersticial associada aos braços q dos grandes cromossomos submetacêntricos, correspondentes aos pares 1 a 3, mas levemente no par 2 (Figura 8C).



**Figura 8.** Cariótipo do topótipo macho de *M. tschudii* ( $2n = 42 + 1-2 B$ ,  $NF = 68$ ). A) Coloração convencional de Giemsa; B) Coloração de Ag-RON; C) Bandamento C.

### 3.3 Análise filogenética

A análise filogenética do mitogenoma completo recuperou o topótipo de *M. tschudii* na sub-tribo odocoileina dentro do clado da espécie *M. temama* com 100% de probabilidade posterior. O topótipo do Peru foi observado como táxon irmão ao indivíduo *M. temama* de origem colombiana, separado dos *M. temama* do México. A espécie *M. americana* foi recuperada como parafilética em que os indivíduos da Guiana Francesa foram recuperados em um clado irmão à espécie *M. rufa* (100% de probabilidade) e em outro clado, o indivíduo *M. americana* do Peru como irmão ao clado de *M. jucunda* e *M. nana* (100% de probabilidade). Também, a análise recuperou as espécies do gênero *Odocoileus* como grupo irmão ao gênero *Mazama* com alta probabilidade posterior.



**Figura 9.** Análise de Inferência Bayesiana do mitogenoma completo de Cervídeos Neotropicais. Valores acima do nó = probabilidade posterior. Em negrito = topótipo de *M. tschudii* coletado em Lambayeque, Peru.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização morfológica

A descrição do *M. tschudii* foi caracterizada pelas particularidades de coloração discretamente mais escura e maior tamanho em comparação com as espécies *S. goauzoubira* e *P. nemorivagus*. No topótipo coletado, a coloração acastanhada da pele, linha dorso-medial do corpo de coloração marrom escura e áreas mais enegrecidas na região do pescoço e cabeça confirmam as descrições feitas por Wagner (1855) e Lydekker (1898).

Em relação ao tamanho, o posicionamento das coordenadas do topótipo de *M. tschudii* nas análises de PCA, permite afirmar que *M. tschudii* trata-se de um pequeno cervídeo (Figura 6 e 7). Os dendrogramas foram congruentes (Figura 4 e 5), mostrando o topótipo de *M. tschudii* alocado junto com as espécies *S. gouazoubira*, *P. nemorivagus*, *M. temama* e *M. nana*. Porém, no agrupamento obtido com as medidas corporais o topótipo formou um subgrupo que excluiu os indivíduos de *S. gouazoubira* usados neste estudo; aparecendo ligeiramente distante no subgrupo formado junto as espécies *P. nemorivagus*, *M. temama* e *M. nana*. Por sua vez, o agrupamento com as medidas cranianas mostra o topótipo de forma independente, sem formar nenhum subgrupo com as espécies referidas, demonstrando mais uma vez a diferenciação de *M. tschudii*, conforme o referido por Allen (1915).

## 4.2 Caracterização citogenética

A citogenética tem se mostrado uma ferramenta muito importante para auxiliar na discussão da taxonomia das espécies do gênero *Mazama* (Abril et al., 2010; Cifuentes-Rincón et al., 2020). Devido a isso, a análise citogenética de espécimes *Mazama* coletados em diversas localidades, se torna fundamental para a maior compreensão sobre a diversidade cariotípica do gênero e a resolução das espécies válidas dentro do mesmo (González e Duarte, 2020). O cariótipo do topótipo de *M. tschudii* apresentou  $2n = 42$  e  $NF = 68$ , uma descrição diferenciada aos demais cervídeos neotropicais, principalmente aos citados para *M. americana*, que apesar de ter um número diploide próximo, as diferenças de número fundamental evidenciam diversos processos associados a rearranjos cromossômicos (Abril et al., 2010; Cifuentes-Rincón et al., 2020; Peres et al., 2021). Isso se fundamenta nos 12 pares de cromossomos de dois braços encontrados no cariótipo de *M. tschudii* em comparação com 1 ou 2 pares de cromossomos de dois braços nos indivíduos *M. americana* (Abril et al., 2010; Cifuentes-Rincón et al., 2020). Também, *M. tschudii* possui um sistema sexual simples em comparação com o sistema sexual múltiplo da espécie *M. americana* (Abril et al., 2010; Cifuentes-Rincón et al., 2020).

Em comparação com as espécies de pequeno porte dentro do gênero, as diferenças de  $2n$  são marcadas quando comparadas com *M. jucunda* ( $2n = 32-34$ ) e *M. nana* ( $2n = 36-39$ ) (Duarte e Jorge, 2003; Abril e Duarte, 2008). A maior similaridade na descrição cariotípica de *M. tschudii* é observada quando comparada ao neótipo da espécie *M. temama* cujo  $2n = 44$  e  $NF = 70$  (Sandoval et al., 2022), entretanto, é provável que exista no mínimo uma fusão em tandem diferenciando esses cariótipos. O bandamento C realizado foi chave como evidência de marcações intersticiais nos braços q de um par de cromossomos adicionais aos observados no cariótipo do neótipo de *M. temama* (Sandoval et al., 2022), característica que pode ser um sinal diferencial de diferentes rearranjos na sua constituição cariotípica.

### 4.3 Caracterização filogenética

A análise filogenética de inferência Bayesiana evidenciou que o topótipo de *M. tschudii* não se posiciona em nenhum dos cladogramas que representam as espécies *S. gouazoubira* ou *P. nemorivagus*, mas se posicionou na subtribo Odocoileina. Adicionalmente, também não foi associado a nenhum clado com espécimes de *M. americana*, nem os da localidade tipo nem com o indivíduo de *M. americana* do Peru. Isso confirma que a descrição de Wagner (1855) não corresponde às espécies em que o nome foi sinonimizado ao longo da história taxonômica (Lydekker, 1898, Allen, 1915)

Entretanto, a análise revelou que o topótipo de *M. tschudii* foi recuperado no clado da espécie *M. temama*, descrita para México e América central (Kerr, 1792; Sandoval et al., 2022). Especificamente, o mitogenoma de *M. tschudii* foi recuperado como irmão ao espécime identificado como *M. temama* com origem na Colômbia, divergindo dos demais *M. temama* de origem Mexicana. Essa sequência de *M. temama* colombiana foi discutido por Gutiérrez et al., (2017) através de filogenia do gene mitocondrial Cyt-b, devido à grande divergência com os *M. temama* do México, sugerindo que se trate de uma possível espécie não descrita. Para isso, o autor sugere a revisão do táxon através do estudo integrativo a partir de exemplares coletados na Colômbia e Venezuela (Gutiérrez et al., 2017).

Devido a estreita relação entre o topótipo de *M. tschudii* e o espécime de *Mazama* colombiano utilizado na análise filogenética deste trabalho, possivelmente ambos indivíduos sejam a mesma espécie *M. tschudii* Wagner, 1855, a qual deve ser reconhecida como válida dentro do gênero *Mazama* como grupo irmão a *M. temama*.

## 5. CONCLUSÃO

Os dados obtidos sustentam a hipótese de que o cervídeo com maior ocorrência na Cordilheira Ocidental do Peru descrito por Wagner 1855 se trate de uma espécie válida dentro do gênero. Entretanto, ainda é necessário complementar as informações com resultados de técnicas como a citogenética molecular para uma melhor compreensão das diferenças entre os cariótipos de *M. tschudii* e *M. temama*.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril VV, Duarte JMB (2008) Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology** 31:53-57.

Abril VV, Carnelossi EAG, Gonzalez S, Duarte JMB (2010) Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research** 128:177-187.

Allen JA (1915) Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 34:521-553.

Bernegossi AM, Borges C, Sandoval EDP, Cernohorska H, Svatava K, Vozdova, M, Caparroz R, González S, Duarte JMB (2022) Resurrection of the genus *Subulo* Smith, 1827 for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy** 104:619-633.

Cabrera A (1960) Catálogo de los mamíferos de América del Sur. Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales "Bernardino Rivadavia". **Zoologia** 4:309-732.

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 brocket deer species. **ZooKeys** 958:143-164.

Coyne JA, Orr AH (1998) The evolutionary genetics of speciation. *Philosophical Transactions of the Royal Society* 353:287-305.

Cursino M, Salviano M, Abril V, Zanetti ED, Duarte JM (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.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2020) InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Duarte JMB, Gonzales S (2010) Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer. 1ª Edição, Jaboticabal, FUNEP. 394p.

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, Boer JA, Sandoval EDP, Bernegossi AM, Tomazella IM (2021) Skin Freezing Technique for Living Cell Bank. *GenProtocols*. Available from <https://genprotocols.genengnews.com/protocols/skin-freezing-technique-for-living-cell-bank/1041>.

Eisenberg JF (1987) The evolutionary history of the Cervidae with special reference to the South American radiation. In.: Wemmer C (Ed.). **Biology and Management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 60-64.

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.

González S, Duarte JMB (2020) Speciation, evolutionary history and conservation trends of Neotropical deer. **Mastozoologia Neotropical** 27:37-47.

Groves CP, Grubb P (1987) Relationships of living deer. In: Wemmer CM (Ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Smithsonian Institution Press, Washington, p. 21-59.

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.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica** 4:9.

Heckeberg NS, Erpenbeck D, Wörheide G, Rössner GE (2016) Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **PeerJ** 4:e2307.

Huelsenbeck J, Ronquist F (2001). MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics** 17:754-755.

Howell, WM, Black DAY (1980) Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Cellular and Molecular Life Sciences** 36:1014-1015.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada K (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics** 20:1160-1166.

Kerr R (1792) The animal kingdom or zoological System. Class I. Mammalia. Edinburgh. 303p.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas** 52:201-219.

Lydekker R (1898) The deer of all lands. Rowland Ward, London. 325p.

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/IUCN, p. 2-11.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)** 1-8.

Miranda-Ribeiro A (1919) Os veados do Brasil Segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista** 11:209-308.

Peres PHF, Luduvério DJ, Bernegossi AM, Galindo DJ, Nascimento GB, Oliveira ML, Sandoval EDP, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Duarte JMB (2021) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (Artiodactyla: Cervidae) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). **Frontiers in Genetics** 12:1-18.

Rafinesque GS (1817) Descriptions of seven new genera of North American quadrupeds. *American Monthly Magazine* 1:363-364.

Rambaut A (2012) FigTree version 1.4.0. Computer program and documentation. University of Oxford. United Kingdom. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rossi RV (2000) **Taxonomia de *Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)***. Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil.

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.

Sokal RR, Michener CD (1958) *A Statistical Methods for Evaluating Systematic Relationships*. University of Kansas Science Bulletin, 38:1409-1438.

Sumner ATA (1972) A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306.

Verma RS, Babu A (1995) *Human chromosomes: principles and techniques*. 2nd ed. McGraw-Hill, Inc., New York, 419p.

Von Den Driesch A (1976) *A Guide to the Measurement of Animal Bones from Archaeological Sites*. Peabody Museum Bulletin 1, Harvard University, Peabody Museum of Archaeology and Ethnology, 136p.

Wagner A (1855) *Die Saugthiere in Abbildungen nach der Natur mit Beschreibungen von Dr. Johann Christian Daniel von Schreber*. Supplementband. L. D. Weigel, Leipzig. 783p.

## CAPÍTULO 3 – Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama whitelyi* (Gray, 1873)

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mazama* Rafinesque (1817) agrupa os cervídeos neotropicais por características morfológicas em comum, como são, chifres simples nos machos, membros posteriores maiores que os anteriores, coloração vermelha ou cinzenta do pelame (Eisenberg, 1989). Recentemente, com a revalidação dos gêneros *Subulo* (Bernegossi et al., 2023) e *Passalites* (Morales-Donoso et al., 2023) o gênero *Mazama* ficou restrito aos animais de pelagem avermelhada como o principal traço morfológico. A espécie mais antiga do grupo foi *Mazama americana* (Erxleben, 1777) descrito a partir de indivíduos da Guiana Francesa, e por corresponder a descrição binomial mais antiga do grupo, outros táxons que posteriormente foram descritos com uma coloração e tamanho semelhante, foram sinonimizados ou classificados como subespécies de *M. americana* (Hershkovitz, 1959).

A homoplasia dos caracteres morfológicos das espécies de *Mazama* tem sido amplamente discutida (Duarte et al., 2008, Abril et al., 2010 e Peres et al., 2021), demonstrado consistentemente a grande similaridade morfológica dos *Mazama*, que não acompanha a variação cariotípica das espécies. Exemplo disso, temos a descrição da antigamente nomeada *M. bororo* Duarte, 1996, hoje reconhecida como *M. jucunda* Thomas, 1913 (Mantellato et al., 2022), a partir da caracterização citogenética de exemplares coletados no sudeste brasileiro cujas divergências cariotípicas permitiram validar a espécie que para esse momento era considerada subespécie de *M. americana* (Duarte e Jorge, 1996).

Por outro lado, vários citótipos da espécie *M. americana* foram descritos no Brasil, baseados nas suas diferenças cariotípicas; essas diferenças, foram fusões em tandem ou cêntricas, inversões e variação do sistema sexual (Abril et al., 2010).

Outro exemplo é o que ocorre com *M. temama* (Kerr, 1792), onde o estudo citogenético de exemplares em cativeiro evidenciou processos de fusões em tandem e cêntricas relacionados com as diferenças cromossômicas para *M. americana*, de

quem também era considerada subespécie (Jorge e Bernishke, 1977). A coleta recente de um neótipo da espécie, na localidade tipo em Veracruz, confirmou a validade da espécie (Sandoval et al., 2022).

Devido a importância da primeira espécie descrita *M. americana* (Erxleben, 1777) foi realizado um estudo a partir de um topótipo coletado na Guiana Francesa, com posterior designação deste espécime como neótipo da espécie. A análise citogenética do neótipo evidenciou que este cariótipo ainda não havia sido encontrado em nenhum citótipo descrito previamente, discutindo a possibilidade de que a espécie não ocorra na maior parte do Brasil (Cifuentes-Rincón et al., 2020). Esse resultado levantou o questionamento sobre a real identidade dos citótipos de *M. americana* descritos no Brasil, e das demais subespécies ou sinonímias descritas em outros países no século passado.

No Peru, foi descrita *Cervus whitelyi*, uma das primeiras descrições de veado vermelho, feita por Gray (1873) a partir do crânio de um exemplar jovem com origem em Cosñipata, Cusco, Peru. Ele possuía características exclusivas, como ossos nasais proeminentes, sulco alongado sobre cada órbita, a profundidade moderadamente côncava e arredondada para a glândula lacrimal. Autores subsequentes reconheceram o táxon como sinônimo júnior de *Mazama tschudii* (Wagner 1855) (Lydekker, 1898; Neveu-Lemaire e Grandidier 1911) ou classificaram ao nível de subespécie de *M. americana* (Hershkovitz, 1959). Entretanto, a ausência de dados citogenéticos e de genética molecular geram lacunas sobre o conhecimento taxonômico e impedem esclarecer a sua classificação.

A genética molecular tem um papel fundamental em revelar a posição de um táxon em relação a outras espécies (Ravaoarima et al., 2004). Estudos filogenéticos feitos a partir de genes mitocondriais evidenciaram a polifilia do gênero e parafilia do grupo vermelho, no qual a espécie *M. americana* é recuperada como parafilética ou polifilética, dependendo a quais indivíduos são considerados na análise (Peres et al., 2021; Gutiérrez et al., 2017). O único estudo que possui sequências de *M. americana* do Peru descreve o mitogenoma completo do indivíduo posicionado no mesmo clado do indivíduo de *M. americana* da Guiana Francesa; no entanto, o autor sugere que ainda são necessárias investigações moleculares e morfológicas para fornecer conclusões definitivas (Hassanin et al., 2012).

Portanto, o objetivo do presente estudo é caracterizar a morfologia (biometria corporal, padrões de coloração, craniometria, caracterização pós-crânio), citogenética (cariótipo convencional, biometria cromossômica, banda C, coloração Ag- RON) e genética molecular (mitogenoma) de um topótipo atual de *M. whitelyi*.

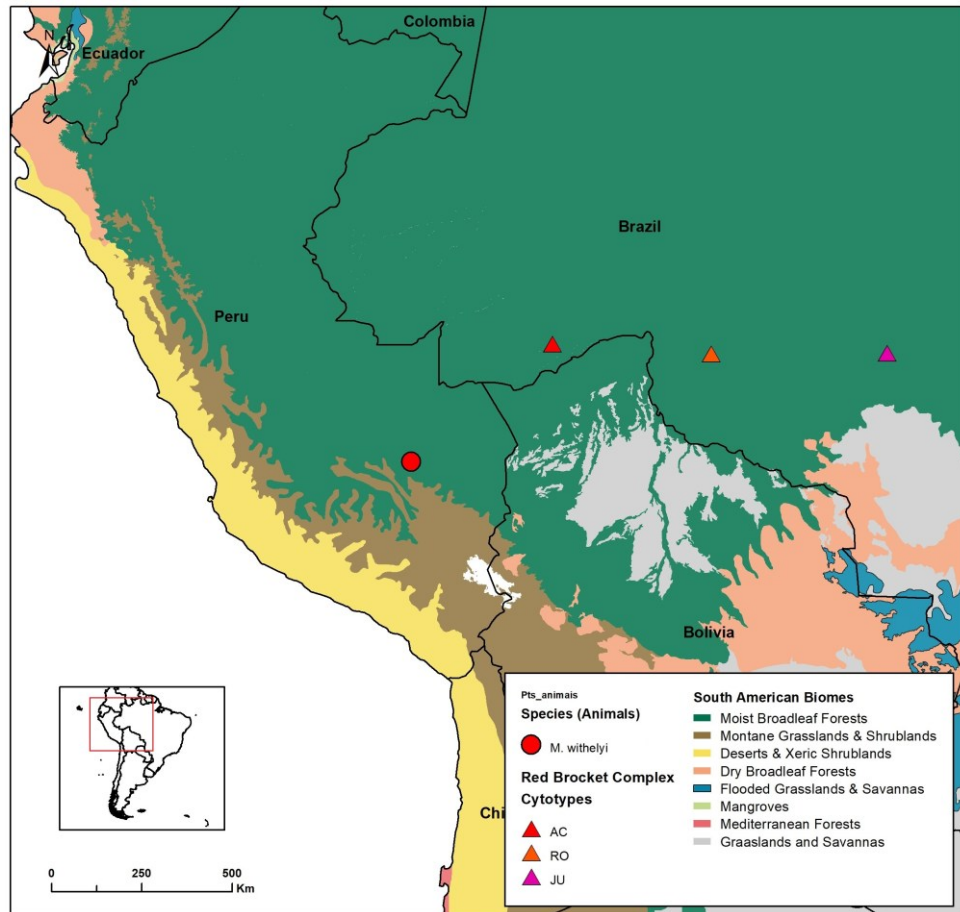
## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Aspectos legais e éticos**

Todos os procedimentos adotados neste estudo estão de acordo com normas internacionais vigentes. Autorização de coleta concedida pelo Servicio Nacional Forestal y de Fauna Silvestre (SERFOR) - Peru, Resolução da Direção Geral N° 499-2018-MINAGRI-SERFOR-DGSPFS, autorização de exportação de amostras N° 003704-SERFOR, certificado de aprovação pela comissão de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal-SP.

### **2.2 Área de estudo e coleta de amostras**

Uma vez obtida a licença para a coleta e obtenção de amostras foi organizada uma expedição científica ao Departamento de Cusco no Peru e coletado um indivíduo adulto na Provincia de Paucartambo, Distrito Cozñipata, na localidade de rio Carbon, no dia 14/04/2019. Coordenadas Zona 19, UTM E 247704, UTM N 8579762, Altitude 511 m.s.n.m (Figura 1). O indivíduo macho adulto, foi coletado com ajuda de caçadores locais que foram contratados para tal fim. O indivíduo foi designado com o número T414 do Núcleo de Pesquisa e Conservação e Cervídeos (NUPECCE) e catalogado no Museo de Historia Natural de la Universidad Nacional San Antonio Abad del Cuzco, com código N° MHNC007-My.



**Figura 1.** Local de coleta do topotipo de *M. whitelyi* e de outros citótipos de *M. americana* originários do Brasil.

### 2.3 Caracterização morfológica

Logo após o abate, foi realizada a medição corporal externa do espécime para obter informação sobre o peso (kg), comprimento do chifre esquerdo e direito (cm), diâmetro à base dos chifres direito e esquerdo (cm), comprimento de cabeça (cm), largura de cabeça (cm), tamanho da orelha (cm), distância entre olhos (cm), distância entre chifres (cm), largura da mandíbula à base (cm), comprimento do metacarpo (cm), comprimento do metatarso (cm), altura (cm), comprimento do corpo (cm), comprimento da cauda (cm), perímetro de pescoço (cm), perímetro torácico (cm) e

perímetro abdominal (cm). Estas medidas foram tomadas com balança, fita métrica e paquímetro.

Também, o indivíduo foi posicionado em um pano de campo azul contendo escalas métricas, e foto documentado nas posições, lateral, dorsal e ventral, bem como detalhes da cabeça. A pele, na sua íntegra, foi retirada e separada dos restos musculares, gordura e fâscias, sendo então mergulhada em solução curtume para dessecação do material. Após secagem por três dias, a mesma foi acondicionada para estudos morfológicos. Foram examinados nas peles e nas fotos os seguintes aspectos de coloração geral da pelagem, campos cromogénéticos da cabeça (faixas orbitais superior e inferior, mancha superciliar anterior, regiões auriculares antero-basal e pósterio-basal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular), e campos cromogénéticos do corpo (região da cabeça e pescoço, linha mediana dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal posterior do corpo, região ventral do corpo, ventre da cauda e região distal dos membros, padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo). Também foram examinadas as ocorrências de faixas de pelos antevértidos e ocorrência de tufo arredondado de pelos na região tarsal.

O esqueleto completo (crânio e pós-crânio) foi limpo no local de abate do animal e o material acondicionado em caixas plásticas sob temperatura ambiente. Foram tomadas medidas padrão do crânio conforme o proposto por Von den Driesch (1976).

Foram organizadas duas matrizes de dados, uma contendo dados de 14 medidas corporais e outra com 36 medidas cranianas, estas matrizes incluíam dados do topótipo de *M. whitelyi* e indivíduos adultos das espécies *M. americana*, *M. jucunda*, *M. temama*, *M. nana*, *P. nemorivagus* e *S. gouazoubira* pertencentes ao banco de dados do NUPECCE. Em cada matriz foram considerados indivíduos de ambos os sexos pela ausência de dimorfismo sexual (Rossi, 2000). Com o conjunto de dados de cada uma das matrizes foi feita a análise de agrupamento usando a distância euclidiana e o método de encadeamento médio (Sokal e Michener, 1958) e análises de componentes principais. As duas análises foram desenvolvidas usando o programa INFOSAT (Di Rienzo et al., 2020).

## 2.4 Caracterização Citogenética

Logo após a coleta do exemplar, um fragmento de 5cm x 2cm de pele da região inguinal do topótipo foi coletado e subdividido em 10 partes. Cada fragmento foi depositado em meio de cultivo próprio (Duarte et al. 2021). Posteriormente os fragmentos foram refrigerados a (4°C) por 3 horas e vapor de nitrogênio líquido por 30 minutos, sendo em seguida mergulhado no nitrogênio líquido (-196°C), onde permaneceram estocados. As amostras de pele foram descongeladas em banho-maria a 37°C e transferidas para os frascos com meio de cultivo enriquecido com soro fetal bovino e levados a estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Alcançada a confluência celular, o material passou por tratamento com colchicina, solução hipotônica e foi fixado em solução Carnoy (Verma e Babu, 1995).

A classificação cromossômica foi realizada utilizando 10 metáfases do topótipo coletado. Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão de braços como metacêntricos, submetacêntricos ou acrocêntricos (Levan et al., 1964). O comprimento relativo (CR) foi utilizado para a divisão dos pares cromossômicos em grupo A (grandes cromossomos de dois braços, CR≥6%), grupo C (pequenos cromossomos de dois braços, CR<6%), grupo D (grandes cromossomos de um braço, CR≥5%), grupo E (pequenos cromossomos de um braço, CR<5%) e grupo B (cromossomos B, CR<1,5%) (Cifuentes-Rincón, 2020). Da mesma forma, foi realizado o bandamento C (Sumner, 1972) para visualizar as regiões de heterocromatina constitutiva e a coloração de Ag-RON (Howell e Black, 1980) para visualizar as regiões organizadoras de nucléolo.

A técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) foi realizada em metáfases do topótipo *M. whitelyi* a fim de se identificar os cromossomos sexuais. Os clones de cromossomos artificiais de bactéria (BAC) derivados do cromossomo X da espécie *Bos taurus* foram selecionados da biblioteca bovina CHORI-240 com base nos dados do NCBI ARS-UCD1.2 genome assembly data e obtidos de BACPAC Genomics, Emeryville, CA, EUA. Foram usadas as sondas 40H2, posição no cromossomo bovino (MB): 74.95-75.12 e 159O1, posição no cromossomo bovino (MB): 23.04-23.22. Para extração de DNA, usamos um protocolo adaptado do método incluído no Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification Systems. O DNA BAC foi marcado com biotina

16-dUTP ou digoxigenina-11-dUTP (Roche, Mannheim, Alemanha) usando BioPrime® Array CGH Genomic Labeling (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA). A FISH foi realizada conforme descrito em Vozdova et al., (2019). Foi utilizado um microscópio de fluorescência Zeiss Axio Image Z2 (Carl Zeiss Microimaging GmbH, Jena, Alemanha), equipado com filtros de fluorescência apropriados para a visualização dos resultados de FISH.

## **2. 5 Caracterização molecular**

### **2. 5. 1 Extração de DNA e sequenciamento do mitogenoma**

Após captura do exemplar, foram coletados fragmentos de fígado e músculo, amostras que foram utilizadas para a extração do DNA. A extração de DNA genômico a partir das amostras de tecido foi realizada utilizando-se o “kit” comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valência, CA, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O ADN extraído foi quantificado por fluorômetro Qubit®, tendo concentração inicial de aproximadamente 200 ng/ul, e teve sua integridade avaliada por um gel de agarose 1%.

O sequenciamento foi feito nas instalações da NGS Soluções Genômicas (<https://ngsgenomica.com.br>). Primeiro, as amostras de DNA foram fragmentadas por sonicação em um aparelho Covaris até um tamanho médio aproximado de 550 pares de bases (pb). Em seguida, as bibliotecas genômicas foram preparadas usando o kit TruSeq® Nano DNA e foram indexadas utilizando o kit IDT para Illumina - TruSeq DNA UD Indexes v2, seguindo as instruções dos fabricantes. As bibliotecas foram quantificadas por meio de qPCR e agrupadas em proporção equimolar com outras amostras para serem sequenciadas. O pool de amostras foi sequenciado em uma flowcell P2 (2x100bp) do equipamento Illumina Nextseq 2000 (Illumina, San Diego, Califórnia).

O sequenciamento da amostra do topotipo de *M. whitelyi* gerou um total de 8.464.240 leituras, o mapeamento foi feito tendo como referência a sequência de *Mazama americana* (número de acesso do GenBank MZ350856) usando o programa

Geneious Prime 2023.1.1 e seguindo os parâmetros padrão de “sensibilidade média-baixa” do programa que, resumidamente, considera até 5 iterações, uma qualidade de leitura mínima de 30, uma sobreposição mínima de 25pb em leituras para montagem de contigs com uma identidade de sobreposição mínima de 80% e um máximo de 10% de lacuna por leitura. O mapemaneio gerou um mitogenoma de cobertura média 391.80, sendo que a sequência consenso foi gerada com uma cobertura mínima de 10 para cada sítio.

### 2.5.2 Análise filogenética

Para a análise filogenética do topótipo de *M. whitelyi*, foi gerada uma matriz contendo o mitogenoma de *M. whitelyi* e sequências de mitogenomas de diferentes espécies do gênero *Mazama* do banco de dados do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) e obtidas sequências de mitogenomas de diferentes espécies existentes no banco de dados online GenBank (Tabela 1). *Rangifer tarandus* foi utilizado como grupo externo.

A matriz de sequências foi alinhada mediante a ferramenta MAFFT 7 (Kato et al., 2019) e anotada pelo programa Geneious Prime 2023.1.1. Posteriormente foi determinado o esquema de partição mais adequado e os melhores modelos de evolução molecular para o conjunto de dados levando em consideração os genes mitocondriais e sua divisão em códons, e as regiões não codantes (tRNA, rRNA). Para isso foi utilizado o programa PartitionFinder2 on XSEDE aplicando o método de busca “greedy” e a seleção de modelos por BIC (Bayesian Information Criterion) (Lanfear et al., 2016). A análise filogenética foi feita por meio de Inferência Bayesiana (IB), realizada no programa MrBayes on XSEDE 3.2.1 (Huelsenback J., Ronquist F. 2001), disponível como webservice na plataforma CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010), com 25.000.000 de gerações até obter uma variância < 0.01. Para estimar a distribuição da probabilidade posterior foi utilizado a Metropolis-Coupled MCMC (Markov Chain Monte Carlo) com nchains=4, nrns=2 e burnfrac=0,25. A árvore obtida foi editada com auxílio do programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

**Tabela 1.** Sequências de mitogenoma de cervídeos neotropicais utilizadas no estudo filogenético.

<b>Espécie</b>	<b>Código de acesso Genbank ou ID</b>	<b>Origem (Pais-Localidade)</b>
<i>Mazama whitelyi</i>	T414	Peru - Cozñipata
<i>Mazama americana</i>	T328	Brasil - Acre
<i>Mazama americana</i>	JN632657	Peru
<i>Mazama americana</i>	MZ350856	Brasil - Juína
<i>Mazama americana</i>	T251	Brasil - Juína
<i>Mazama americana</i>	T342	Brasil - Rondônia
<i>Mazama americana</i>	T327	Brasil - Acre
<i>Mazama americana</i>	T211	Brasil - Rondônia
<i>Mazama nana</i>	MZ350863	Brasil
<i>Mazama nana</i>	T185	Brasil
<i>Mazama jucunda</i>	MZ350859	Brasil
<i>Mazama jucunda</i>	T373	Brasil
<i>Mazama americana</i>	JN632656	Guiana Francesa
<i>Mazama americana</i> - Neótipo	MZ350857	Guiana Francesa
<i>Mazama americana</i>	T424	Brasil - Roraima
<i>Mazama rufa</i> - Neótipo	T385	Brasil
<i>Mazama rufa</i>	T255	Brasil
<i>Mazama americana</i>	T311	Brasil - Carajás
<i>Mazama americana</i>	T274	Brasil - Carajás
<i>Odocoileus virginianus</i>	KM612273	Texas
<i>Odocoileus virginianus</i>	KM612271	Veracruz
<i>Subulo goauzoubira</i>	KJ772514	Brasil
<i>Subulo goauzoubira</i>	MZ350858	Brasil
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	JN632681	Bolívia
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	MZ350860	Brasil
<i>Blastoceros dichotomus</i>	JN632603	Bolívia
<i>Passalites nemorivagus</i>	JN632659	Peru
<i>Passalites nemorivagus</i>	MZ350861	Brasil
<i>Rangifer tarandus</i>	NC007703	Não publicado

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterização morfológica do topótipo de *M. whitelyi*

Coloração geral castanho avermelhada. Linha dorsal castanho escuro. Região inguinal esbranquiçada. Cauda similar a coloração do corpo na região dorsal, branca ventralmente. Pescoço castanho escuro dorsalmente, lateralmente segue coloração do corpo. Presença tufo tarsal marrom escuro. Pelos mais escuros ao redor da articulação tarsal lateralmente, contrastando entre região dorsal e distal do membro posterior lateral. Membro posterior de coloração avermelhada clara homogênea ventralmente. Membro anterior de coloração avermelhada lateralmente e branco ventralmente. Região externa da orelha de coloração pardo escuro, levemente cinzenta. Região interna da orelha branca. Base da orelha de coloração avermelhada claro, esbranquiçada e ausente de pelo. Mandíbula e região mentoniana de coloração esbranquiçada. Lateral da cabeça e pescoço de coloração amarelada. Mancha superciliar ausente. Base da orbita de coloração cinza escura. Presença de tufo frontal. Coloração dorsal frontal da cabeça marrom escuro (Figura 2). Presença de chifres simples, curtos e inclinados distalmente. No crânio, o formato da órbita é arredondado, com sulco alongado sobre a mesma, glândula lacrimal com profundidade moderada e côncava e com a borda inferior das órbitas sendo muito expandido, constituindo a parte mais larga do crânio (Figura 3).



**Figura 2.** Topótipo macho de *M. whitelyi*, coletado em Cosñipata, Peru. (A) vista lateral do corpo. (B) vista ventral do corpo. (C) vista dorsal do corpo. (D) vista lateral da cabeça.



**Figura 3.** Crânio do topótipo macho de *M. whitelyi*. A) vista dorsal; B) vista ventral; C) vista lateral direita; D) vista lateral esquerda.

A tabela 2 mostra as medidas de biometria corporal e a tabela 3 as medidas cranianas obtidas do topótipo de *M. whitelyi*.

**Tabela 2.** Medidas de biometria corporal externa do topótipo macho de *M. whitelyi*, ID= T414.

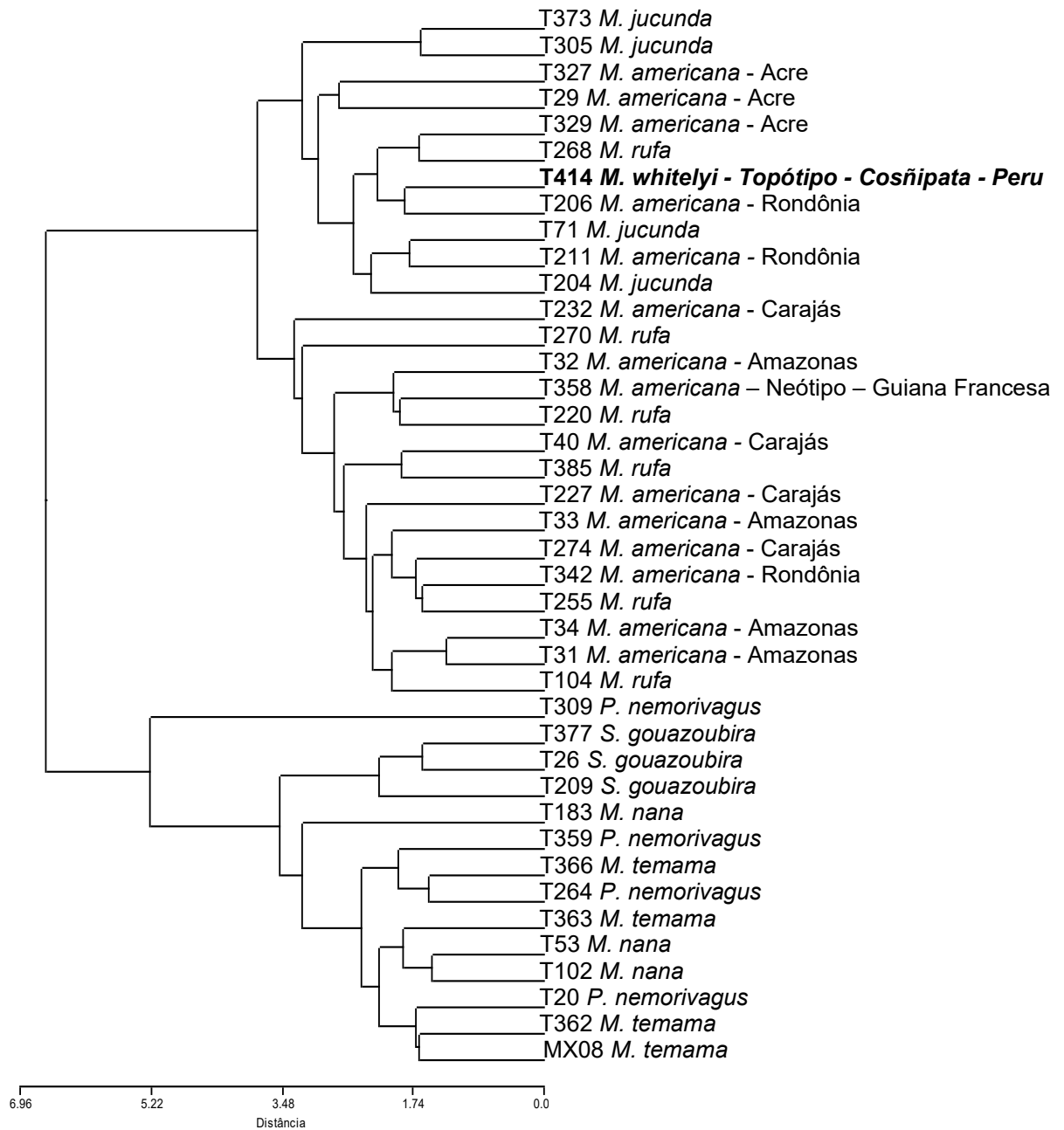
<b>Caráter (cm)</b>	<b>T414</b>	<b>Caráter (cm)</b>	<b>T414</b>
Comprimento de cabeça	26	Comprimento de corpo	92
Largura de cabeça	9	Abdômen	77
Comprimento de orelha	9,4	Comprimento do testículo direito	5,2
Distância entre olhos	5,9	Comprimento do testículo esquerdo	5,4
Mandíbula	7,7	Diâmetro de testículo direito	2,2
Perímetro do pescoço	33	Diâmetro de testículo esquerdo	2,3
Tórax	71	Metatarso	23,5
Altura	59	Comprimento de cauda	9,8
Metacarpo	13,2	Massa (kg)	33,4

**Tabela 3.** Medidas tomadas do crânio do topótipo macho de *M. whitelyi* ID= T414.

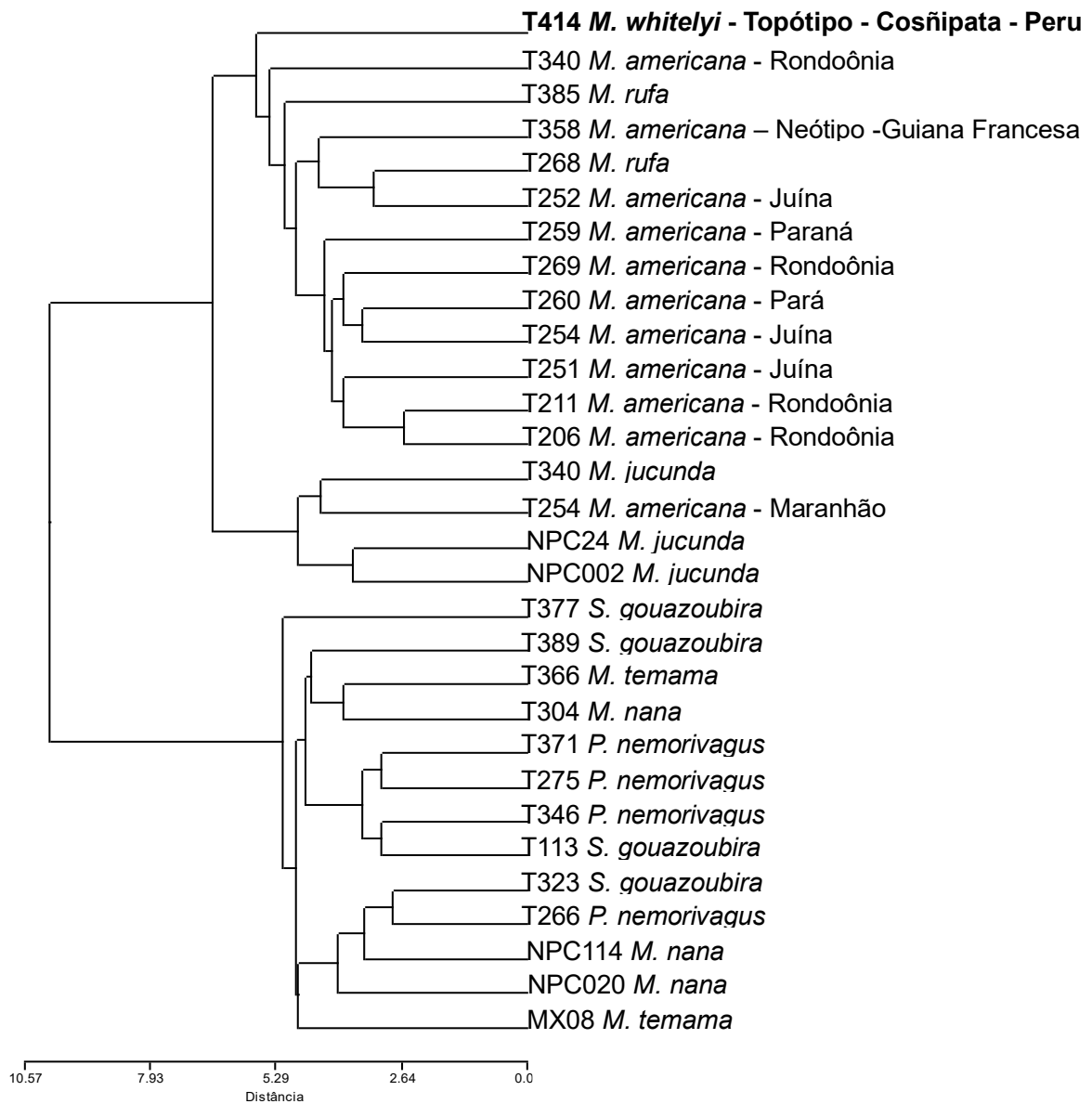
<b>Caráter (mm)</b>	<b>T414</b>	<b>Caráter (mm)</b>	<b>T414</b>	<b>Caráter (mm)</b>	<b>T414</b>
<b>CT</b>	199,65	<b>ACR</b>	120,6	<b>MLPP</b>	58,9
<b>CCB</b>	194,4	<b>MCN</b>	45,8	<b>MLFM</b>	16,15
<b>CB</b>	178,22	<b>CCFL</b>	86,1	<b>LFM</b>	56,03
<b>CCC</b>	113,46	<b>CPO</b>	79,04	<b>MLEO</b>	73,15
<b>PP</b>	64,76	<b>CLP</b>	40,2	<b>LMEO</b>	39,5
<b>EBC</b>	35,11	<b>DCD</b>	55,87	<b>LZ</b>	72,6
<b>EBF</b>	144,93	<b>CLM</b>	29,73	<b>MLEN</b>	15,1
<b>CVC</b>	95,117	<b>CLP</b>	26,7	<b>MLPM</b>	22,7
<b>CFM</b>	116,11	<b>MCIO</b>	30,41	<b>MLP</b>	50,91
<b>LN</b>	107,26	<b>MAIO</b>	29,06	<b>BCNS</b>	43,22
<b>LR</b>	161,09	<b>MLM</b>	71,19		
<b>LP</b>	193,23	<b>MLCO</b>	35,41		

CT= Comprimento total; CCB = Comprimento côndilo-basal; CB = comprimento basal; CCC= comprimento curto do crânio; PP = pré-molar – prosthion; EBC = eixo base-cranial; EBF= eixo base-facial; CVC= comprimento vicero-craniano; CFM = comprimento frontal mediano; LN= lambda – nasal; LR = lambda – região mais distal do osso nasal; LP= lambda – prosthion; ACR= acrocânio; MCN= maior comprimento dos nasais; CCFL= comprimento curto facial – lateral; CPO= comprimento palatal-oral; CLP= comprimento lateral do pré-maxilar; DCD= distância corrida de dentes; CLM= comprimento da linha do molar; CLP= comprimento da linha pré-molar; MCIO= maior comprimento interno da órbita; MAIO= maior altura interna da órbita; MLM= maior largura do mastóide; MLCO= maior largura dos côndilos occipitais; MLPP= maior largura das bases do processo para-occipital; MLFM= maior largura do forâmen magno; LFM= menor largura frontal; MLEO= maior largura entre as órbitas; LMEO= menor largura entre as órbitas; LZ= largura do zigomático; MLEN= maior largura entre os nasais; MLPM= maior largura entre o pré-maxilar; MLP= maior largura do palatal; BCNS= basion – ponto mais alto da crista nugal superior.

O resultado da análise de agrupamento para medidas cranianas e biométricas foram congruentes. Ambas as topologias agruparam o topótipo de *M. whitelyi* dentro do grupo de *M. rufa*, *M. americana* da Guiana Francesa e de diversas localidades no Brasil e *M. jucunda*. A análise biométrica, recuperou o topótipo em um subgrupo junto a dois espécimes do citótipo de Rondônia, um do citótipo Acre, um indivíduo de *M. rufa* e dois de *M. jucunda* (Figura 4). A craniometria posicionou o topótipo de forma independente sem formar nenhum subgrupo e próximo de um indivíduo do citótipo Rondônia (Figura 5). As outras espécies de veado vermelho (*M. nana* e *M. temama*) foram agrupadas como pequenos *Mazama*, separado das espécies de médio e grande porte como são *M. jucunda*, *M. americana* e *M. rufa*.



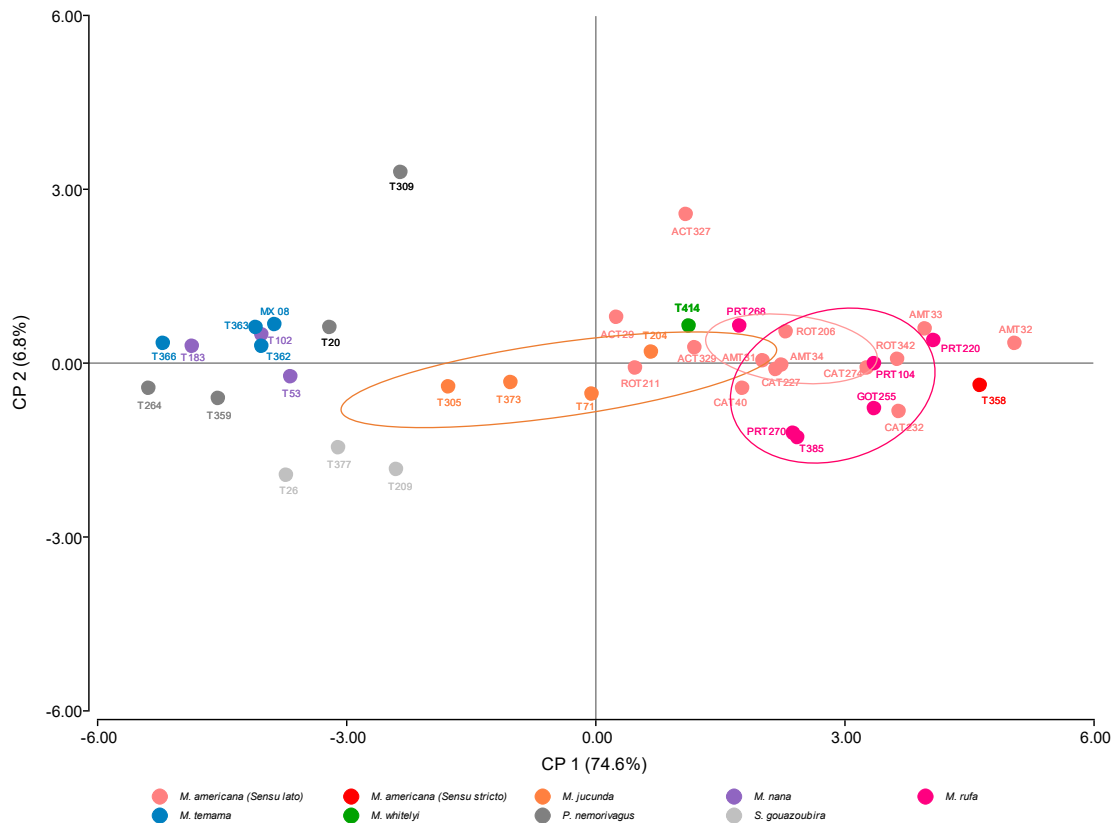
**Figura 4.** Dendrograma gerado com as medidas de biometria corporal do topótipo de *M. whitelyi* e outras espécies de cervídeos neotropicais.



**Figura 5.** Dendrograma gerado com as medidas do crânio do topótipo de *M. whitelyi* e outras espécies de cervídeos neotropicais.

Na análise de componentes principais (PCA) feito com as medidas de biometria corporal, os componentes PC1 e PC2 explicam 81,4% da variância total, sendo 74,6% e 6,8% respectivamente (Figura 6). As correlações de cada variável com as componentes principais utilizadas são apresentadas na Tabela 4 e os valores mostram correlação positiva entre a PC1 com todas as variáveis, variando entre 0,53 com a variável distância entre olhos e 0,98 com a variável peso. Na PC2 a maior

correlação positiva ocorreu com a variável distância entre olhos (0.66) e a maior correlação negativa com a variável comprimento da orelha (-0.57).



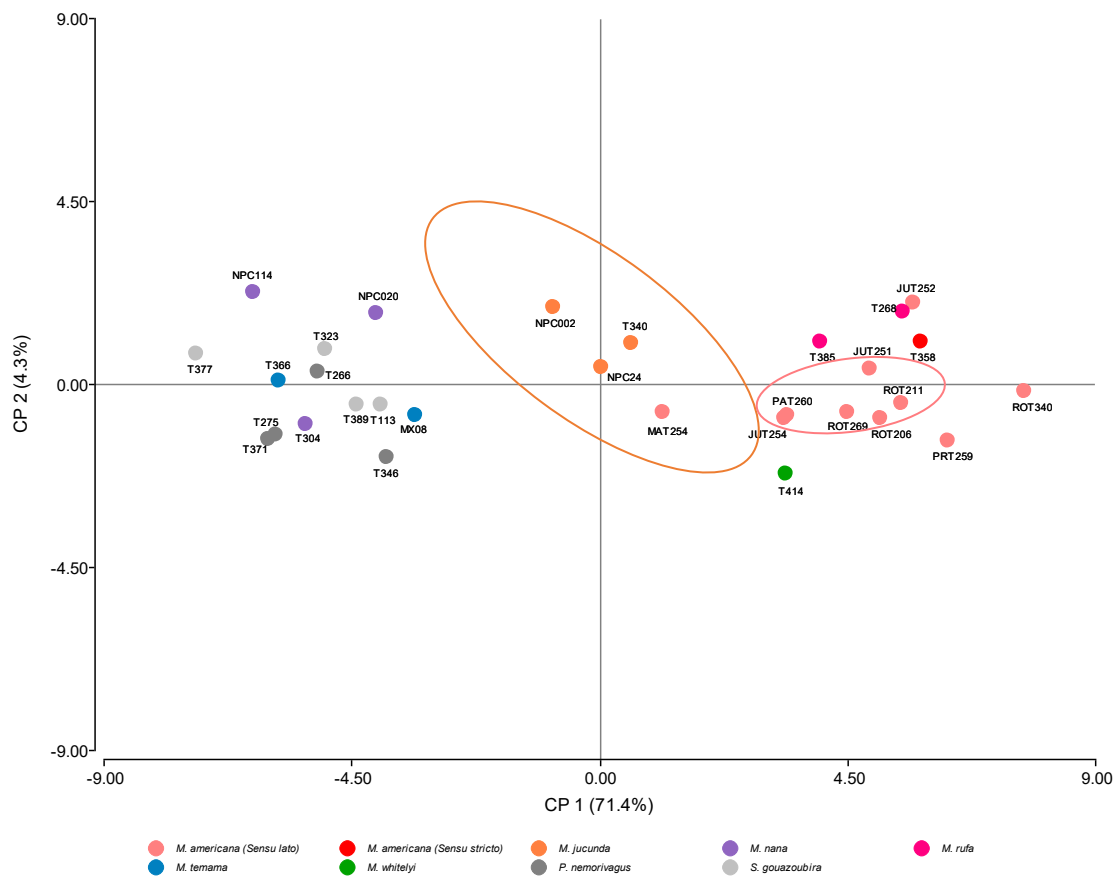
**Figura 6.** Biplot da PCA baseados em dados de biometria corporal do topótipo de *M. whitelyi* e outras espécies de cervídeos neotropicais

Ao projetar as coordenadas dos indivíduos no plano dos componentes, a PC1 separa claramente as espécies de maior porte (*M. americana*, *M. rufa*) e as espécies de menor porte (*P. nemorivagus*, *S. gouazoubira*, *M. temama*, *M. nana*), enquanto *M. jucunda* distribuiu-se nos dois grupos. O topótipo de *M. whitelyi* posicionou-se perto das sobreposições das espécies *M. jucunda* e *M. americana* (sensu lato) e distante de *M. americana* (sensu stricto).

**Tabela 4.** Coeficientes de correlação das variáveis de biometria corporal com os componentes PC1 e PC2

Variables	PC1	PC2
Comprimento de Cabeça	0.92	0.17
Largura de Cabeça	0.93	0.13
Comprimento de Orelha	0.65	-0.57
Distância entre olhos	0.53	0.66
Mandíbula	0.86	0.08
Metacarpo	0.86	-0.22
Altura	0.95	-0.12
Comprimento de Corpo	0.93	-0.02
Comprimento de Cauda	0.79	0.09
Metatarso	0.91	-0.22
Perímetro de Pescoço	0.83	-0.03
Torax	0.88	0.1
Abdomem	0.94	0.07
Peso	0.98	-0.02

A PCA feita com as medidas cranianas é apresentada na figura 7, a PC1 e PC2 representaram 71,4% e 4,3% da variância total dos dados respectivamente. As correlações de cada variável com os componentes principais utilizados são apresentadas na Tabela 5. Os valores mostram correlação positiva entre a PC1 com todas as variáveis, variando entre 0,35 com a variável maior largura do forâmen magno (MLFM) e 0,97 com a variável comprimento total (CT). Na PC2 a maior correlação positiva ocorreu com a variável maior largura do forâmen magno (MLFM) e a maior correlação negativa com a variável maior largura entre os nasais (MLEN) com valor de -0.43.



**Figura 7.** Biplot da PCA baseado em medidas cranianas do topótipo de *M. whitelyi* e outras espécies de cervídeos neotropicais

A projeção das coordenadas dos indivíduos no plano dos componentes mostra a separação de *M. americana (sensu stricto)*, *M. americana (sensu lato)* e *M. rufa* das espécies *P. nemorivagus*, *S. gouazoubira*, *M. temana* e *M. nana*. *M. whitelyi*, posicionou-se perto da dispersão de coordenadas dos espécimes de *M. americana (sensu lato)* e distante de *M. rufa* e *M. americana (sensu stricto)*, sem sobreposição e no extremo mais inferior da CP2.

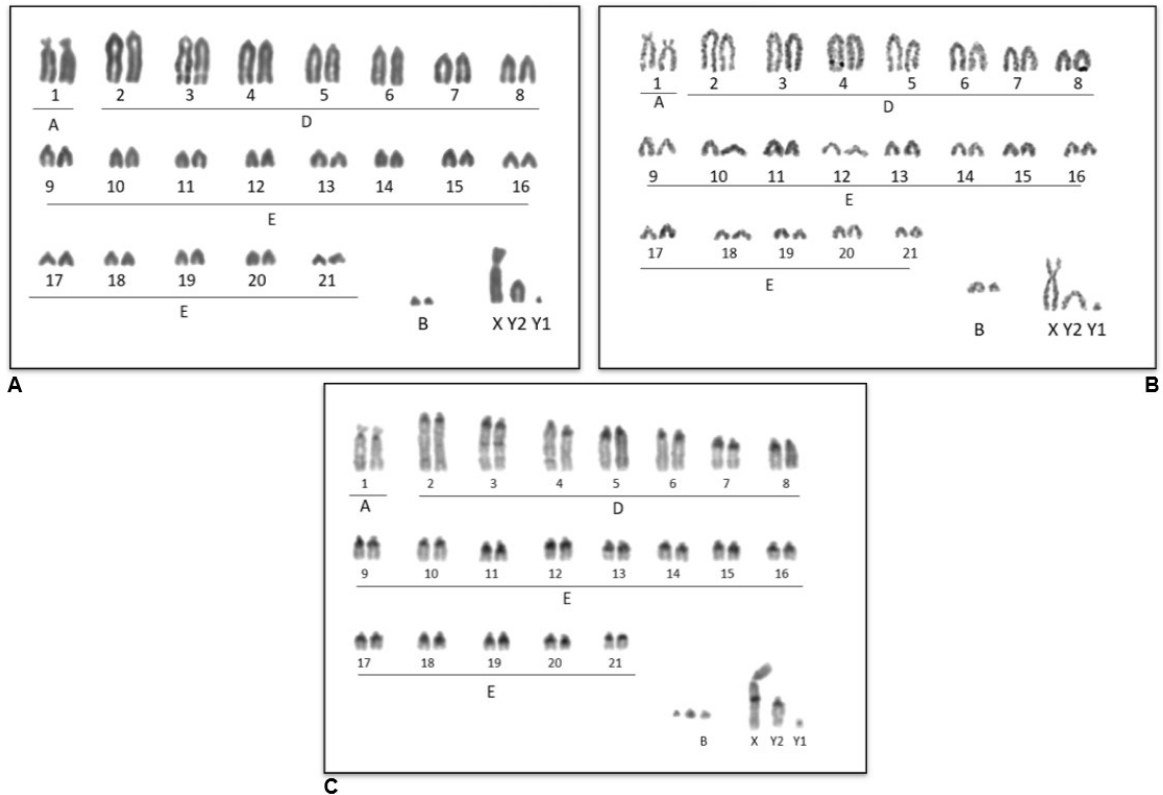
**Tabela 5.** Coeficientes de correlação das variáveis de biometria craniana com os componentes CP1 e CP2

Variables	CP 1	CP 2	Variables	CP 1	CP 2	Variables	CP 1	CP 2	Variables	CP 1	CP 2
CT	0.97	0.02	LN	0.84	0.17	CLM	0.81	0.13	MLEO	0.83	-0.11
CCB	0.95	-0.02	LR	0.93	0.1	CLP1	0.77	0.09	LMEO	0.83	-0.16
CB	0.96	-0.08	LP	0.95	0.05	MCIO	0.79	-0.38	LZ	0.94	0.1
CCC	0.91	0.06	ACR	0.97	0.04	MAIO	0.69	-0.42	MLEN	0.6	-0.43
PP	0.91	0.04	MCN	0.88	0.17	MLM	0.61	-0.33	MLPM	0.76	0.09
EBC	0.69	-0.06	CCFL	0.95	0.15	MLCO	0.86	0.07	MLP	0.7	0.13
EBF	0.95	0.1	CPO	0.86	0.12	MLPP	0.84	-0.19	BCNS	0.87	0.01
CVC	0.95	0.02	CLP	0.91	-0.05	MLFM	0.35	0.73			
CFM	0.92	-0.02	DCD	0.84	0.05	LFM	0.79	-0.16			

### 3.2 Descrição citogenética

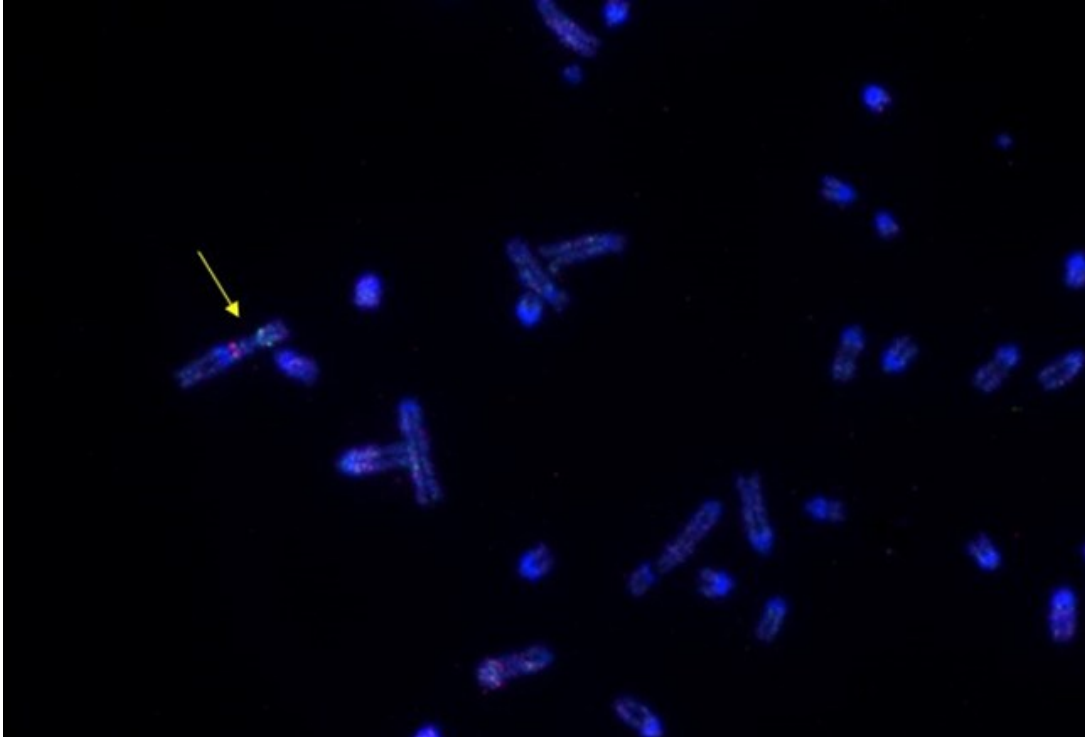
O topótipo apresentou  $2n = 45$  e  $NF = 48$ . O primeiro par de autossomos é submetacêntrico. Todos os outros pares de autossomos foram acrocêntricos. A biometria cromossômica permitiu classificar os cromossomos de acordo com o seu comprimento relativo de braços (CR), sendo que o par cromossômico 1 foi alocado no grupo A, os pares 2 a 8 no grupo D e 9 a 21 no grupo E (Figura 8).

A análise de coloração de Ag-RON evidenciou que as marcações de regiões nucleolares ativas estão associadas à região intersticial distal de ambos os cromossomos do par 4, e a região telomérica de um cromossomo do par 8 (Figura 8B). O bandamento C revelou as regiões de heterocromatina constitutiva associada ao centrômero de todos os cromossomos autossomos. Também, evidenciou uma forte marcação intersticial no braço q do cromossomo X, três bandas intersticiais discretas no cromossomo 2, duas bandas intersticiais discretas no par 3, uma banda intersticial discreta no par 4 (Figura 8C).



**Figura 8.** Cariótipo de um topótipo macho de *M. whitelyi* ( $2n = 45 + 2-3 B$ ,  $NF = 48$ ) (A) sob coloração convencional de Giemsa, (B) sob coloração Ag-RON e (C) bandamento C.

A FISH utilizando clones BAC do cromossomo X de bovino no cariótipo do topótipo macho de *M. whitelyi* evidenciou que a morfologia do cromossomo X é um grande submetacêntrico, no qual as sondas CH240-40H2 (Figura 5, em verde) e CH240-159O1 (Figura 5, em rosa) hibridizaram no braço p e q do cromossomo X, respectivamente. Especificamente, a sonda BAC CH240-159O1 foi evidenciada na região proximal do braço q do cromossomo X, próximo à banda de heterocromatina intersticial evidenciada no bandamento C. Não foi observada nenhuma marcação de sonda de cromossomo X na região distal a essa banda intersticial, portanto, suponha-se que esteja relacionado a uma fusão X-autossômica. Isso confirma que o sistema sexual desse espécime seja múltiplo no qual o cromossomo X se apresentou como um grande cromossomo submetacêntrico, Y<sub>1</sub> como um pequeno metacêntrico e Y<sub>2</sub> correspondendo ao par do autossomo fusionado com X.



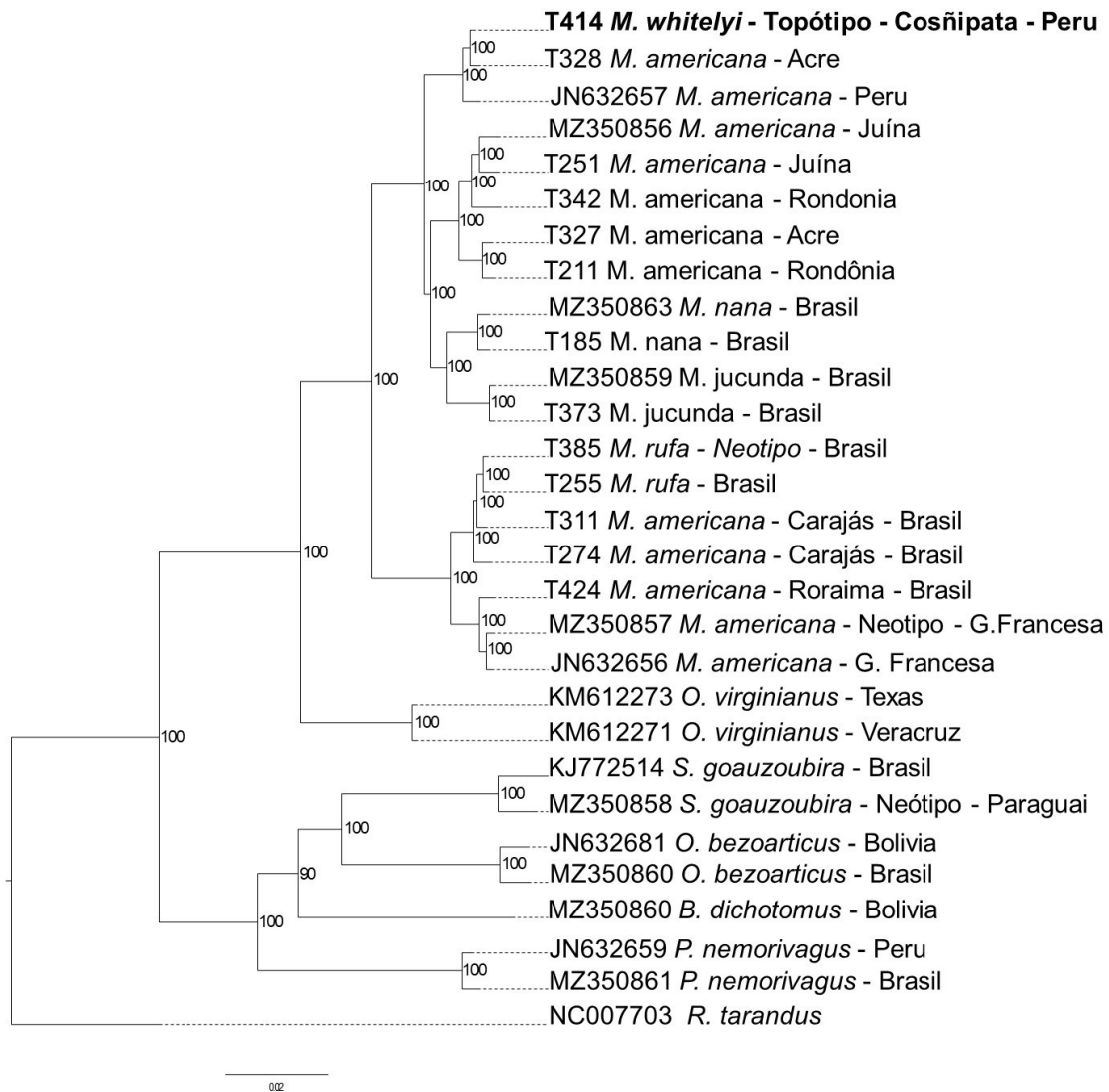
**Figura 9.** Hibridização *in situ* fluorescente mostrando o padrão de marcação das sondas de clones BAC CH240-40H2 (verde) e CH240-159O1 (rosa), derivadas do genoma bovino, no cromossomo X do topótipo macho de *M. whitelyi*. A seta amarela indica o cromossomo X. A contra coloração foi realizada com DAPI (azul) e a marcação com digoxigenina (rosa) e biotina (verde). Aumento de 1000x em microscópio de fluorescência.

### 3.3 Análise filogenética

O resultado da análise filogenética por Inferência Bayesiana recuperou o topótipo de *M. whitelyi* dentro da subtribo Odocoileina, no clado composto por o indivíduo de *M. americana* do Peru e indivíduos de localidades do Brasil correspondente aos citótipos do oeste da Amazônia (Acre, Juína e Rondônia), além das espécies *M. jucunda* e *M. nana*. Também, a espécie *M. americana* se apresentou polifilético dado que indivíduos da localidade tipo na Guiana Francesa foram recuperados em um clado diferente, com a espécie *M. rufa* e *M. americana* citótipo Carajás como grupo irmão (100 % probabilidade). O gênero *Odocoileus* foi recuperado como monofilético e grupo irmão de todos os citados anteriormente.

Na outra subtribo, Blastocerina, foram recuperadas as espécies monofiléticas *S. gouazoubira* (100% probabilidade), *B. dichotomus* (100% probabilidade), *O.*

*bezoarticus* (100% probabilidade) e *P. nemorivagus* (100% probabilidade), conforme observado na Figura 10.



**Figura 10.** Árvore de Inferência Bayesiana de cervídeos neotropicais a partir do mitogenoma completo. Valores dos nós são as probabilidades posteriores. Grupo externo: *Alces alces*. Em negrito = topótipo de *M. whitelyi*.

## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização morfológica

Os caracteres diagnósticos da descrição de *M. whitelyi* foram evidenciados no topótipo recente coletado neste estudo. A posição das coordenadas nas análises de PCA com as medidas de biometria externa e craniana evidenciaram o posicionamento do topótipo como de porte médio ou grande, tendo como referência as amostras incluídas neste estudo. O formato da órbita arredondado, com sulco alongado sobre a mesma, glândula lacrimal com profundidade moderada e côncava e com a borda inferior das órbitas sendo muito expandida, confirmando o citado por Gray (1873). Por sua vez, os resultados das análises de agrupamento feito com as medidas cranianas, mostram ao topótipo de *M. whitelyi* independente sem formar nenhum subgrupo com os demais indivíduos (Figura 5), reforçando a descrição de diferenciação feita pelo autor.

O agrupamento do topótipo de *M. whitelyi* com os *M. americana* das diferentes localidades e também com indivíduos *M. rufa*, separado dos pequenos cervídeos neotropicais, sustenta que *M. whitelyi* não tem similaridade morfométrica com *M. tschudii*, contrariando sua sinonimização conforme proposto por Lydekker (1898) e Neveu-Lemaire e Grandidier (1911), posto que o topótipo de *M. tschudii* agrupou-se com as espécies de pequeno porte (*P. nemorivagus*, *S. goauzoubira*, *M. nana* e *M. temama*), conforme o mostrado no capítulo anterior neste trabalho.

### 4.2 Caracterização citogenética

A descrição cariotípica do topótipo do presente estudo revelou um  $2n=45$  e  $NF=48$ . Semelhante aos resultados da morfologia, o cariótipo desse indivíduo difere consideravelmente do cariótipo do indivíduo coletado de *M. tschudii*, que apresentou  $2n=42$  e um  $NF=68$ , evidências que permitem refutar a sinonimização proposta por Lydekker (1898) e Neveu-Lemaire e Grandidier (1911).

Por outro lado, o cariótipo de *M. whitelyi* foi similar ao descrito para os citótipos do oeste da Amazônia do Brasil, como em Juína ( $2n = 44/45$ ;  $NF = 48$ ), Rondônia ( $2n = 42/43$  e  $NF = 46$ ) e indivíduos do Acre ( $2n = 46/47$  e  $NF = 48$ ) (Abril et al., 2010). Importante ressaltar que a análise citogenética de *M. americana* sensu lato do Brasil mostrou uma variação intra-específica que derivou em seis citótipos, associados com números diploides diferentes de acordo ao padrão geográfico (Abril et al., 2010). Entre esses, indivíduos do citótipo Paraná foram reconhecidos como pertencentes a espécie *M. rufa*, apresentando o maior número diploide ( $2n = 52/53$  e  $NF = 56$ ), diferente dos citótipos de Juína e Rondônia cujos números diploides e fundamentais são menores devido ao acúmulo de rearranjos cromossômicos (Abril et al., 2010; Cifuentes-Rincón et al., 2020).

Adicionalmente, o cariótipo de *M. whitelyi* também difere do cariótipo do neótipo de *M. americana* (*sensu stricto*) (Cifuentes-Rincon et al., 2020). Apesar do número diploide ser o mesmo que o descrito para o neótipo de Guiana Francesa ( $2n = 45$ ), o  $NF$  bem diferente revela inúmeros rearranjos cromossômicos associados ao processo de evolução cromossômica para cada espécie. As diferenças cariotípicas podem representar uma barreira reprodutiva entre populações, uma vez que estudos em animais híbridos, gerados pelo cruzamento entre diferentes citótipos em cativeiro, evidenciaram diferentes graus de subfertilidade e infertilidade, a depender do acúmulo de rearranjos cromossômicos que os diferenciam (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021). Principalmente o processo de fusão em tandem tem sido citado como relevante em diminuir significativamente a viabilidade do híbrido entre citótipos diferentes (Galindo et al., 2021).

Os resultados do cariótipo e de bandamentos cromossômicos em *M. americana* (*sensu stricto*) (Cifuentes-Rincon et al. 2020), *M. rufa* (Peres et al. 2021) e nos citótipos Carajás, Santarém e Jari (Abril et al. 2010), diferencia *M. whitelyi* desses cariótipos e o aproxima dos citótipos de Juína, Rondônia e Acre (Abril et al. 2010).

### 4.3 Análise filogenética

A análise mitogenômica de inferência bayesiana recuperou o topótipo de *M. whitelyi* num subclado com um indivíduo do citótipo de Acre e outro indivíduo do Peru (número de acesso do GenBank JN632657). Essa amostra utilizada no estudo feito por Hassanin et al., (2012), foi recuperada junto ao indivíduo de *M. americana* da Guiana Francesa. Esse resultado mostrou-se distinto ao obtido no presente estudo, posto que os indivíduos de *M. americana* da Guiana Francesa foram recuperados em um clado diferente ao de *M. whitelyi*, demonstrando também a parafilia do gênero.

A condição não monofilética de *M. americana* tem sido relatada por diversos autores (Duarte et al. 2008; Hassanin et al., 2012; Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg et al., 2020; Bernegossi et al., 2022). O presente estudo evidenciou a espécie como parafilética, na qual os exemplares *M. americana* do oeste Amazônico foram recuperados como grupo irmão das espécies *M. jucunda* e *M. nana*, em um clado diferente ao dos exemplares *M. americana* da localidade tipo (Guiana Francesa).

As divergências entre o topótipo de *M. whitelyi* e o neótipo de *M. americana* e de *M. rufa* evidenciam que esses não são a mesma espécie. Além disso, a íntima relação do topótipo com os indivíduos do oeste da Amazônia do Brasil, relacionados aos citótipos Acre, Juína e Rondônia, revela que esses citótipos podem corresponder a *M. whitelyi*, sustentando pela monofilia na análise filogenética de Inferência bayesiana (100 % probabilidade) e similaridade do número diploide e número fundamental.

## 5. CONCLUSÃO

*Mazama whitelyi* apresenta características diferenciadas que permitem sua proposição como espécie válida dentro do gênero. Ainda, que os citótipos de *M. americana* do oeste da Amazônia são grupo irmão de *M. whitelyi* e possivelmente pertencem a essa espécie.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril VV, Carnellosi EAG, Gonzalez S, Duarte JMB (2010) Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research** 128:177-187.

Bernegossi AM, Borges C, Sandoval EDP, Cernohorska H, Svatava K, Vozdova, M, Caparroz R, González S, Duarte JMB (2022) Resurrection of the genus *Subulo* Smith, 1827 for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy** 104:619-633.

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 brocket deer species. **ZooKeys** 958:143-164.

Cursino M, Salviano M, Abril V, Zanetti ED, Duarte JM (2014) The Role of Chromosome Variation in the Speciation of the Red Brocket Deer Complex: The Study of Reproductive Isolation in Females. **BMC Ecology and Evolution** 14:40.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2020) InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Duarte JMB, Gonzales S (2010) Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer. 1ª Edição, Jaboticabal, FUNEP, 394p.

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 (1996) Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus *Mazama*) from Brazil. **Archivos de Zootecnia** 45:281-287.

Duarte JMB, Boer JA, Sandoval EDP, Bernegossi AM, Tomazella IM (2021) Skin Freezing Technique for Living Cell Bank. GenProtocols. Available from <https://genprotocols.genengnews.com/protocols/skin-freezing-technique-for-living-cell-bank/1041>.

Eisenberg JF (1989) Mammals of the Neotropics, Vol. 1, The Northern Neotropics: Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana. University of Chicago Press, Chicago. 550p.

Erxleben JCP (1777) *Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates com synonymia et history animalium*, Classis 1. Mammalia. Imprensus Weygandianis. 752p.

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.

Gray JE (1873) On the Deer of the West Coast of South America, With the Description of a New Species from Peru (*Cervus whitelyi*). **The Annals and magazine of natural history** 12:161-164.

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.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica** 4:9.

Hassanin A, Delsuc F et al. (2012) 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 (2020) The systematics of the Cervidae: A total evidence approach. **PeerJ** 8:e8114.

Hershkovitz P (1959) A new species of South American brocket, genus *Mazama* (Cervidae). **Proceedings of the Biological Society Washington** 72:45-54.

Howell W, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer. **Experientia** 36:1014-1015.

Huelsenbeck J, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics** 17:754-755

Illiger JKW (1815) Uebelblich der Säugethiere nach ihrer Vertheilung über die Welttheile. Abhandlungen der Königlichen Akademie der Wissenschaften zu Berlim 39–159.

Jorge W, Benirschke K (1977) Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer, *Mazama americana* temama (Cervoidea, Artiodactyla) with a probable non-Robertsonian translocation. **Cytologia** 42:711-721.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada K (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics** 20:1160-1166.

Kerr R (1792) The animal kingdom or zoological System. Class I. Mammalia. Edinburgh. 303p.

Levan A, Fredga K, Sandberg A (1964) Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas** 52:201-219

Lydekker R (1898) The deer of all lands. Rowland Ward, London. 325 p.

Mantellato, AMB, Gonzalez S, Duarte JMB (2022) Cytochrome b sequence of the *Mazama americana jucunda* Thomas, 1913 holotype reveals *Mazama bororo* Duarte, 1996 as its junior synonym. **Genetics and Molecular Biology** 45:e20210093.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)** 1-8.

Neveu-Lemaire M, Grandidier G (1911) Notes sur les mammifères des hauts plateaux de L'amérique du Sud. Paris. 170p.

Peres PHF, Luduvério DJ, Bernegossi AM, Galindo DJ, Nascimento GB, Oliveira ML, Sandoval EDP, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Duarte JMB (2021) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (Artiodactyla: Cervidae) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). **Frontiers in Genetics** 12:1-18.

Rafinesque GS (1817) Descriptions of seven new genera of North American quadrupeds. American Monthly Magazine 1:363-364.

Ravaoarimanana IB, Tiedemann R, Montagnon D, Rumpler Y (2004) Molecular and cytogenetic evidence for cryptic speciation within a rare endemic Malagasy lemur, the Northern Sportive Lemur (*Lepilemur septentrionalis*). **Molecular phylogenetics and evolution** 31:440-448.

Rambaut A (2012) FigTree version 1.4.0. Computer program and documentation. University of Oxford. United Kingdom. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rossi RV (2000) Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae). Dissertação (Mestrado), Universidade de São Paulo. São Paulo, São Paulo, Brasil.

Salviano MB, Cursino MS, Zanetti EDSS, 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.

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.

Sokal RR, Michener CD (1958) A Statistical Methods for Evaluating Systematic Relationships. University of Kansas Science Bulletin, 38:1409-1438.

Sumner AT (1972) A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306.

Thomas O (1913) The smaller south American cervidae. The Annals and magazine of natural history. 591p.

Verma RS, Babu A (1995) Human chromosomes: principles and techniques. 2nd ed. McGraw-Hill, Inc., New York, 419p.

Von Den Driesch A (1976) A Guide to the Measurement of Animal Bones from Archaeological Sites. Peabody Museum Bulletin 1, Harvard University, Peabody Museum of Archaeology and Ethnology, 136p.

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.

## CAPÍTULO 4 – Caracterização morfológica, citogenética e molecular de alguns exemplares de *Mazama* em cativeiro no Peru

### 1. INTRODUÇÃO

O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817, é o grupo taxonômico formado por cervídeos de pequeno a médio porte e chifres simples, que se distribuem ao longo da América tropical e subtropical desde o nordeste mexicano até a região central da Argentina, ocupando uma ampla variedade de habitats (Eisenberg, 1989; Allen, 1915).

As características morfológicas deste grupo são produtos da adaptação ao habitat, em um processo evolutivo que levou a seleção de corpos de menor tamanho e com menor desenvolvimento da galhada (Eisenberg, 1989). Entretanto, a complexidade deste grupo está nessa convergência morfológica associada a alta diversidade cariotípica e linhagens distintas dentro do gênero (Duarte et al., 2008). Assim, têm sido identificados cariótipos muito diferentes entre as espécies estudadas, que vão desde  $2n = 32$  até  $2n = 70$ , sendo frequentes os polimorfismos cromossômicos intraespecíficos (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990; Duarte e Jorge, 2003; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010). Outra característica do gênero é a polifilia descrita pela filogenia mitocondrial, na qual a espécie tipo do gênero, *Mazama rufa* (Illiger, 1811) (Peres et al., 2021), junto a *Mazama americana* (Erxleben, 1777), *Mazama temama* (Kerr, 1792), *Mazama rufina* (Pucheran, 1851), *Mazama nana* (Hensel, 1872) e *Mazama jucunda* Thomas, 1913, se aloca em um clado que diverge de outras espécies neotropicais, como a antigamente nomeada *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814), hoje reconhecida dentro do revalidado gênero *Subulo* e *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817) dentro do gênero *Passalites* (Gutiérrez et al., 2017; Heckeberg et al., 2020; Bernegossi et al., 2022; Morales-Donoso et al., 2023).

Devido à complexidade taxonômica apresentada no grupo, vários estudos têm sido conduzidos com o intuito de esclarecê-la. Entre estes, a caracterização de um topótipo recente de *M. americana* revelou uma morfologia similar aos exemplares da espécie que ocorrem no Brasil, entretanto, o número diplóide ( $2n = 45$ ) revelou diferenças cromossômicas significativas entre estes (Cifuentes-Rincon et al., 2020). Outro estudo analisou as características de exemplares reconhecidos como *M.*

*americana* da região do Paraná no Brasil (sudeste do país) mostrando diferenças cariotípicas de mais de 15 rearranjos cromossômicos existente entre o cariótipo do neótipo de *M. americana* e os indivíduos do citótipo Paraná (Peres et al., 2021). Isso, sustentado pela filogenia mitocondrial, justificou a revalidação da espécie *M. rufa*, e proposição de um neótipo coletado entre a fronteira sul do Brasil, no estado do Paraná e no Paraguai (Peres et al., 2021).

Da mesma forma que ocorreu com *M. rufa*, várias outras formas de veado vermelho têm sido associadas a espécie *M. americana*, portanto, é importante dar continuidade ao estudo de revisão e caracterização taxonômica de morfotipos similares a espécie com ocorrência em outras regiões da América Latina. Exemplo disso, temos as descrições realizadas na região amazônica e outras regiões do Peru, cujos autores consideraram que se tratasse da espécie *M. americana* (Bodmer e Pezo, 2001; Aquino et al., 2007; Sanchez e Vasquez, 2007; Tobler et al., 2009; Mayor et al., 2011; Aquino et al., 2014; Gonzales e Llerena, 2014; Hurtado, 2015; Vela et al., 2017; Shane e Shane, 2018; Rivera, 2019; Madrid, 2020; Scullion et al., 2021, Chung, 2022). Também, exemplares cativos nos diversos zoológicos e criadouros do Peru são nomeados comumente como *M. americana* devido as similaridades morfológicas com essa espécie. Assim o objetivo do estudo foi caracterizar citogenética, morfológica e molecularmente alguns indivíduos do gênero *Mazama* que se encontram atualmente em cativeiro no Peru, com origem conhecida, com vistas a colaborar para a resolução das incertezas taxonômicas desses animais e auxiliar no conhecimento da diversidade dos Cervídeos do Peru.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Aspectos legais e éticos.**

Todos os procedimentos adotados neste estudo estão de acordo com normas internacionais vigentes. Autorização de coleta concedida pelas instituições para a obtenção de amostras de sangue, pele e pelo, certificado de aprovação pela comissão

de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Agrárias e veterinárias, UNESP – Câmpus de Jaboticabal-SP.

## 2.2 Área de estudo e coleta de amostras.

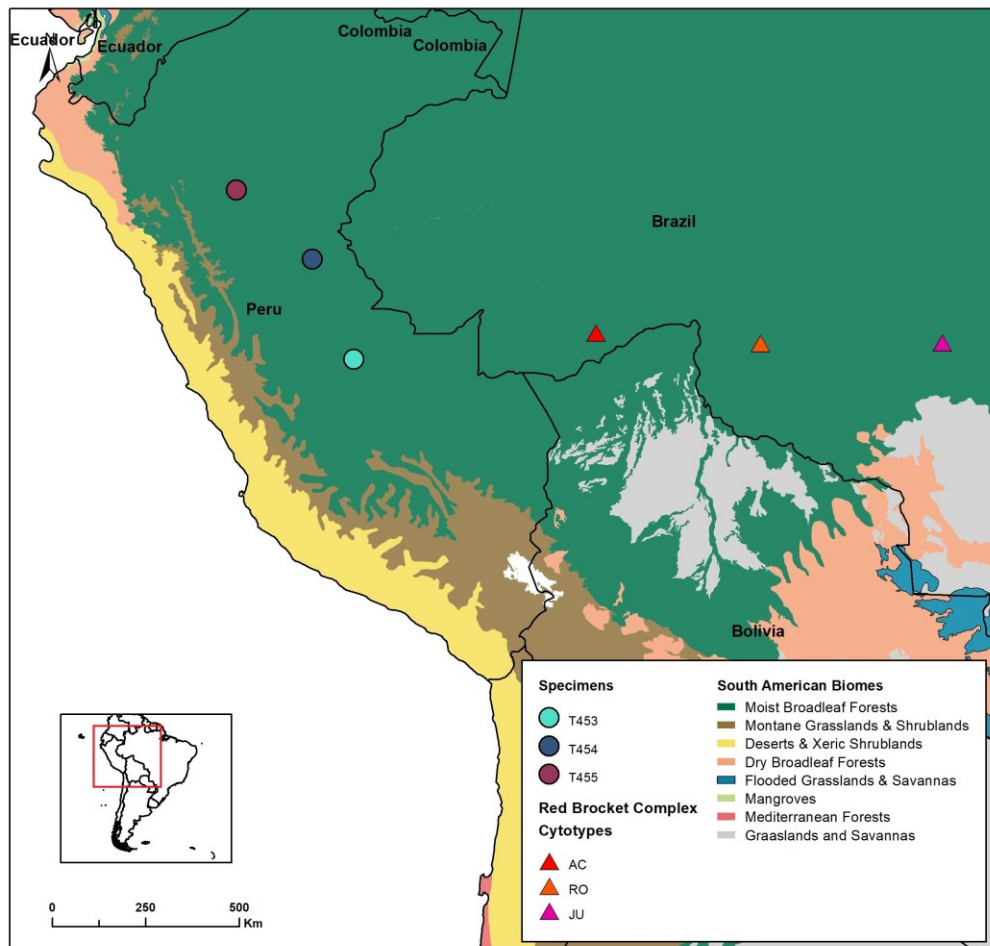
Foi feito um levantamento dos zoológicos e criadouros no Peru que possuíam indivíduos do gênero *Mazama* em cativeiro. Uma vez obtida a licença para a coleta e obtenção de amostras, foi solicitada a cada instituição uma autorização para coletar amostras de sangue, pele, pelo, seguida por documentação fotográfica de cada exemplar mantido em cativeiro. As instituições que autorizaram a coleta foram Zoológico La Jungla (Ucayali), Parque Natural Pucallpa (Ucayali) e Centro Urku (San Martin), e as visitas foram realizadas em abril de 2022, onde foram amostrados três indivíduos adultos cuja localidade de origem era conhecida (um de cada instituição) (Tabela 1). Os espécimes foram designados com os números T453, T454 e T555 do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE). A referência de origem é apresentada na figura 1.

**Tabela 1.** Indivíduos do gênero *Mazama* em cativeiro no Peru, amostrados no presente estudo.

<b>Espécie</b>	<b>N° Tese</b>	<b>Data de coleta</b>	<b>Sexo</b>	<b>Instituição Proprietária</b>	<b>Localidade de origem</b>
<i>Mazama americana</i>	<b>T453</b>	18/04/2022	F	Zoológico La Jungla	Alto Ucayali
<i>Mazama americana</i>	<b>T454</b>	20/04/2022	M	Parque Natural Pucallpa	Pucallpa
<i>Mazama americana</i>	<b>T455</b>	22/04/2022	F	Centro Urku	Cuyumbuque

Os indivíduos foram contidos quimicamente por meio do disparo de dardos anestésicos com o auxílio de pistola pneumática. O protocolo anestésico foi a associação de Cloridrato de Cetamina 10mg/kg e Cloridrato de Xilazina 1,5mg/kg, via

intramuscular. O procedimento foi executado pelo Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte.



**Figura 1.** Lugar de procedência dos espécimes T453, T454 e T455 amostrados em cativeiro.

### 2.3 Caracterização morfológica

Uma vez anestesiados os animais, foi realizada a medição corporal obtendo informações sobre o peso (kg), comprimento do chifre esquerdo e direito (cm), diâmetro à base dos chifres direito e esquerdo (cm), comprimento de cabeça (cm), largura de cabeça (cm), tamanho da orelha (cm), distância entre olhos (cm), distância entre chifres (cm), largura da mandíbula à base (cm), comprimento do metacarpo (cm), comprimento do metatarso (cm), altura (cm), comprimento do corpo (cm),

comprimento da cauda (cm), perímetro de pescoço (cm), perímetro torácico (cm) e perímetro abdominal (cm). Estas medidas foram tomadas com balança, fita métrica e paquímetro.

Também, os animais foram posicionados em um pano de campo azul contendo escalas métricas, sendo foto-documentados nas posições, lateral, dorsal e ventral, bem como detalhes da cabeça.

Foram examinados nas peles e nas fotos os seguintes aspectos: coloração geral da pelagem, campos cromogénéticos da cabeça (faixas orbitais superior e inferior, mancha superciliar anterior, regiões auriculares antero-basal e pósterio-basal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular), campos cromogénéticos do corpo (região da cabeça e pescoço, linha mediana dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal posterior do corpo, região ventral do corpo, ventre da cauda e região distal dos membros, padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo), ocorrência de faixas de pelos antevertidos e ocorrência de tufo arredondado de pelos na região tarsal.

Os dados das medidas corporais foram organizados numa matriz incluindo dados de indivíduos adultos das espécies *M. americana*, *M. jucunda*, *M. temama*, *M. nana*, *P. nemorivagus* e *S. gouazoubira* pertencentes ao banco de dados do NUPECCE. Foram considerados indivíduos de ambos os sexos pela ausência de dimorfismo sexual (Rossi, 2000). Com o conjunto de dados da matriz foi feita a análise de agrupamento usando a distância euclidiana e o método de encadeamento médio (Sokal e Michener, 1958) e análises de componentes principais. As duas análises foram desenvolvidas usando o programa INFOSTAT (Di Rienzo et al., 2020)

## **2. 4 Caracterização Citogenética**

Foi realizada uma biópsia de fragmento de pele da região inguinal dos indivíduos, de aproximadamente 1cm<sup>2</sup>, usando pinça e tesouras finas estéreis e com desinfecção e tricotomia previa da área com sabão bactericida e álcool 70%. A amostra foi conservada em meio de transporte (meio McCoy com 20% de solução de antibiótico), subdividida em 5 partes que foram depositadas em meio de congelamento

(Duarte et al. 2021). Posteriormente, os fragmentos foram refrigerados a 4°C por 3 horas e deixados no vapor de nitrogênio líquido por 30 minutos, sendo em seguida mergulhados no nitrogênio líquido (-196°C), onde permaneceram estocados.

As amostras de pele foram descongeladas em banho-maria a 37°C, transferidas para frascos com meio de cultivo enriquecido com soro fetal bovino e levados a estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>. Alcançada a confluência celular, o material passou por tratamento com colchicina, solução hipotônica e foi fixado em solução Carnoy (Verma e Babu, 1995).

A classificação cromossômica foi realizada utilizando 10 metáfases de cada indivíduo amostrado. Os cromossomos foram classificados de acordo com a razão de braços como metacêntricos, submetacêntricos ou acrocêntricos (Levan et al., 1964). O comprimento relativo (CR) foi utilizado para a divisão dos pares cromossômicos em grupo A (grandes cromossomos de dois braços, CR≥6%), grupo C (pequenos cromossomos de dois braços, CR<6%), grupo D (grandes cromossomos de um braço, CR≥5%), grupo E (pequenos cromossomos de um braço, CR<5%) e grupo B (cromossomos B, CR<1,5%) (Cifuentes-Rincón, 2020). Da mesma forma, foi realizado o bandeamento C (Sumner, 1972) para visualizar as regiões de heterocromatina constitutiva e a coloração de Ag-RON (Howell e Black, 1980) para visualizar as regiões organizadoras de nucléolo.

## **2. 5 Extração de DNA e sequenciamento do mitogenoma**

A extração de DNA genômico foi realizada utilizando-se o “kit” comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valência, CA, EUA) de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. O DNA extraído foi quantificado por fluorômetro Qubit®, tendo concentração inicial de aproximadamente 200 ng/ul, e teve sua integridade avaliada por um gel de agarose 1%.

O sequenciamento foi feito nas instalações da NGS Soluções Genômicas (<https://ngsgenomica.com.br>). Primeiro, as amostras de DNA foram fragmentadas por sonicação em um aparelho Covaris até um tamanho médio aproximado de 550 pares de bases (pb). Em seguida, as bibliotecas genômicas foram preparadas usando o kit

TruSeq® Nano DNA e foram indexadas utilizando o kit IDT para Illumina - TruSeq DNA UD Indexes v2, seguindo as instruções dos fabricantes. As bibliotecas foram quantificadas por meio de qPCR e agrupadas em proporção equimolar com outras amostras para serem sequenciadas. O pool de amostras foi sequenciado em uma flowcell P2 (2x100bp) do equipamento Illumina Nextseq 2000 (Illumina, San Diego, Califórnia).

O sequenciamento da amostra do exemplar T453 gerou um total de 17.031.100 leituras o T454 17.151.812 leituras e o T455 um total de 18.483.680 leituras, o mapeamento foi feito tendo como referência a sequência de *Mazama americana* (número de acesso do GenBank MZ350856) usando o programa Geneious Prime 2023.1.1 e seguindo os parâmetros padrão de “sensibilidade média-baixa” do programa que, resumidamente, considera até 5 interações, uma qualidade de leitura mínima de 30, uma sobreposição mínima de 25pb em leituras para montagem de contigs com uma identidade de sobreposição mínima de 80% e um máximo de 10% de lacuna por leitura. O mapeamento gerou um mitogenoma de cobertura média de 7,5x para o exemplar T453; 50,8x para o exemplar T454 e 57,8x para o indivíduo T455. A sequência consenso foi gerada com uma cobertura mínima de 3, 10 e 10 para cada sítio para os exemplares T453, T454 e T455 respectivamente.

## 2.6 Análise filogenética

Para a análise filogenética dos espécimes de cativeiro, foi gerada uma matriz contendo o mitogenoma dos três espécimes (T453, T454 e T455) e sequências de mitogenomas de diferentes espécies do gênero *Mazama* do banco de dados do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) e obtidas sequências de mitogenomas de diferentes espécies existentes no banco de dados online GenBank (Tabela 1). *Rangifer tarandus* foi utilizado como grupo externo.

A matriz de sequências foi alinhada mediante a ferramenta MAFFT 7 (Kato et al., 2019) e anotada pelo programa Geneious Prime 2023.1.1. Posteriormente foi determinado o esquema de partição mais adequado e os melhores modelos de evolução molecular para o conjunto de dados levando em consideração os genes

mitocondriais e sua divisão em códons, e as regiões não codantes (tRNA, rRNA). Para isso foi utilizado o programa PartitionFinder2 on XSEDE aplicando o método de busca “greedy” e a seleção de modelos por BIC (Bayesian Information Criterion) (Lanfear et al., 2016). A análise filogenética foi feita por meio de Inferência Bayesiana (IB), realizada no programa MrBayes on XSEDE 3.2.1 (Huelsenback J., Ronquist F. 2001), disponível como webservice na plataforma CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010), com 25.000.000 de gerações até obter uma variância < 0.01. Para estimar a distribuição da probabilidade posterior foi utilizado a Metropolis-Coupled MCMC (Markov Chain Monte Carlo) com nchains=4, nrns=2 e burnfrac=0,25. A árvore obtida foi editada com auxílio do programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

**Tabela 2.** Sequências de mitogenoma de cervídeos neotropicais utilizadas no estudo filogenético.

<b>Espécie</b>	<b>Código de acesso Genbank ou ID</b>	<b>Origem (Pais-Localidade)</b>
<i>Mazama whitelyi</i> - topótipo	T414	Peru - Cozñipata
<i>Mazama americana</i>	T328	Brasil - Acre
<i>Mazama americana</i>	JN632657	Peru
<i>Mazama americana</i>	MZ350856	Brasil - Juína
<i>Mazama americana</i>	T251	Brasil - Juína
<i>Mazama americana</i>	T342	Brasil - Rondonia
<i>Mazama americana</i>	T327	Brasil - Acre
<i>Mazama americana</i>	T455	Peru - Cuñumbuque
<i>Mazama americana</i>	T211	Brasil - Rondônia
<i>Mazama americana</i>	T454	Peru - Pucallpa Norte
<i>Mazama americana</i>	T453	Peru - Alto Ucayali
<i>Mazama nana</i>	MZ350863	Brasil
<i>Mazama nana</i>	T185	Brasil
<i>Mazama jucunda</i>	MZ350859	Brasil
<i>Mazama jucunda</i>	T373	Brasil
<i>Mazama americana</i>	JN632656	Guiana Francesa
<i>Mazama americana-Neótipo</i>	MZ350857	Guiana Francesa
<i>Mazama americana</i>	T424	Brasil - Roraima
<i>Mazama rufa -Neótipo</i>	T385	Brasil
<i>Mazama rufa</i>	T255	Brasil
<i>Mazama americana</i>	T311	Brasil - Carajás
<i>Mazama americana</i>	T274	Brasil - Carajás
<i>Odocoileus virginianus</i>	KM612273	Texas

<i>Odocoileus virginianus</i>	KM612271	Veracruz
<i>Subulo goauzoubira</i>	KJ772514	Brasil
<i>Subulo goauzoubira- Neótipo</i>	MZ350858	Paraguai
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	JN632681	Bolivia
<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	MZ350860	Brasil
<i>Blastoceros dichotomus</i>	JN632603	Bolivia
<i>Passalites nemorivagus</i>	JN632659	Peru
<i>Passalites nemorivagus</i>	MZ350861	Brasil
<i>Rangifer tarandus</i>	NC007703	Não publicado

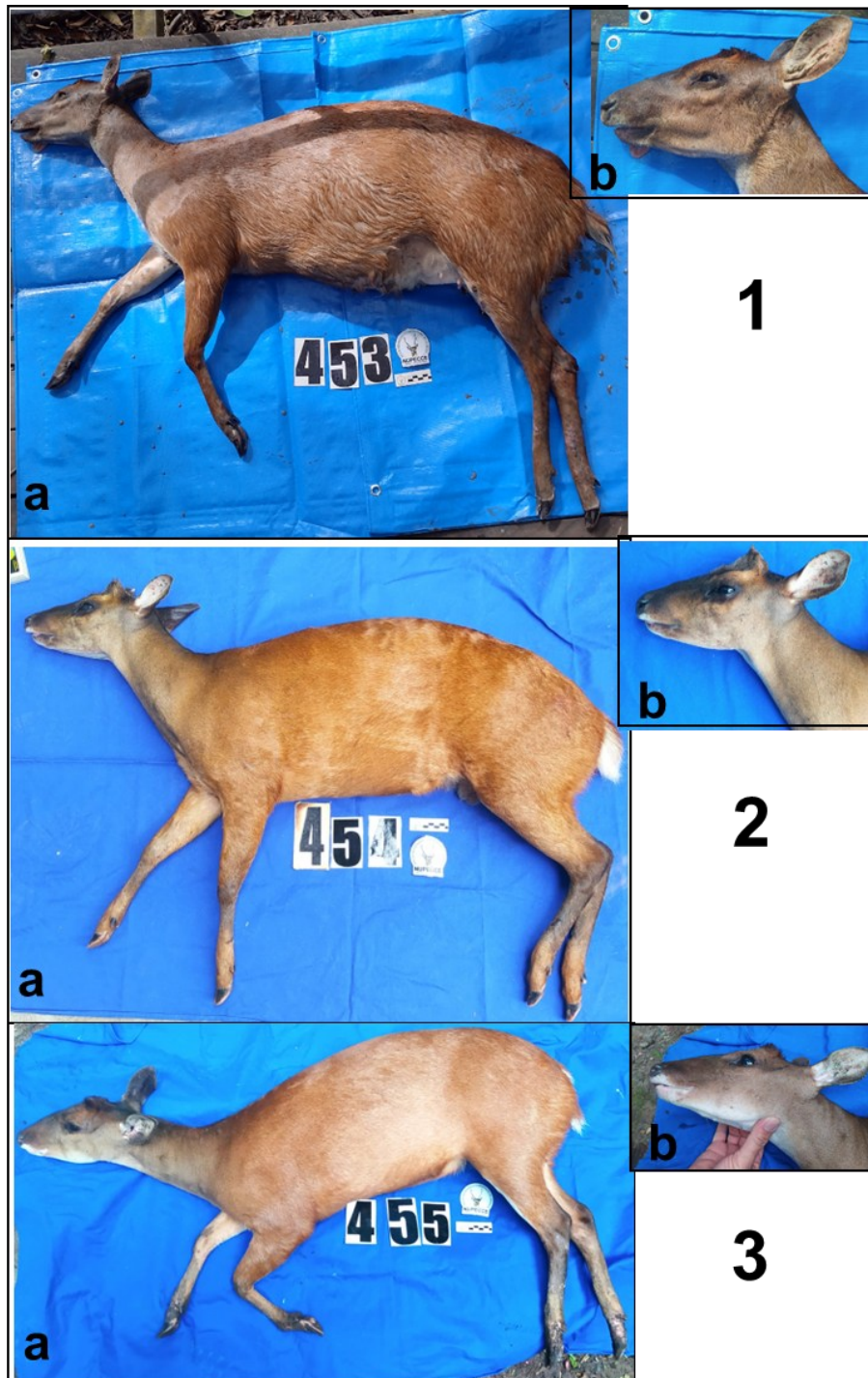
### 3. RESULTADOS

#### 3. 1 Descrição morfológica externa

T453, *M. americana*, indivíduo fêmea de coloração geral do corpo castanha avermelhada. Linha dorsal medial castanha escura. Região ventral esbranquiçada. Pescoço e cabeça castanha uniforme, dorsalmente escurecida e ventralmente esbranquiçada. Orelhas pontiagudas, externamente da coloração do corpo, internamente acastanhada, ausente de pelos, base branca. Mancha frontal até a região superior da órbita amarelada. Inferior da orbita castanha escura sobre o castanho avermelhado das bochechas. Região frontal da cabeça até a mufla enegrecida. Região mentoniana acastanhada. Pelos curtos e finos na região do pescoço e cabeça. Pelos mais compridos na região lateral do corpo, anca e cauda (Figura 2-1).

T454, *M. americana*, indivíduo macho de coloração geral do corpo vermelho brilhante. Região inguinal esbranquiçada. Metatarsos lateralmente de coloração cinza. Cabeça cinzenta com presença de mancha mentoniana esbranquiçada. Orelhas pontiagudas, externamente de coloração castanha cinza, internamente esbranquiçadas e ausentes de pelo. Região frontal com presença de tufo de pelos alaranjados. Região orbital castanha, olhos sobre uma banda marrom e mancha laranja projetada lateralmente na cabeça. Pelos finos e curtos em toda a superfície do corpo (Figura 2-2).

T455, *M. americana*, indivíduo fêmea de coloração geral do corpo vermelho brilhante. Região inguinal esbranquiçada. Metatarsos lateralmente de coloração cinza. Cabeça e pescoço de coloração cinza dorso-lateralmente e esbranquiçada ventralmente. Presença de mancha mentoniana esbranquiçada. Orelhas pontiagudas, externamente de coloração castanha cinza, internamente esbranquiçadas e ausentes de pelo. Região frontal com presença de tufo de pelos castanhos. Região orbital castanha. Pelos finos e curtos em toda a superfície do corpo (Figura 2-3).



**Figura 2.** Indivíduos amostrados do gênero *Mazama* em cativeiro no Peru. (1) *M. americana* T453, fêmea; a) foto lateral do corpo b) foto close da cabeça. (2) *M. americana* T454, macho; a) foto lateral do corpo b) foto close da cabeça. (3) *M. americana* T455, fêmea; a) foto lateral do corpo b) foto close da cabeça

**Tabela 3.** Medidas de biometria corporal externa dos indivíduos do gênero *Mazama* amostrados em cativeiro no Peru.

<b>CARÁTER (cm)</b>	<b>453</b>	<b>454</b>	<b>455</b>	<b>CARÁTER (cm)</b>	<b>453</b>	<b>454</b>	<b>455</b>
Comprimento de cabeça	25	24,2	23	Abdômen	89,5	75	72
Largura de cabeça	9,35	10	9,85	Comprimento do testículo direito		4,85	
Comprimento de orelha	9	9,8	9,4	Comprimento do testículo esquerdo		4,7	
Distância entre olhos	5,7	5,6	9,05	Diâmetro de testículo direito		2,3	
Mandíbula	8,6	8,3	7,95	Diâmetro de testículo esquerdo		2,1	
Perímetro do pescoço	32,5	33,5	29,5	Metatarso	23	23	21,7
Torax	74	68,5	66	Comprimento de cauda	16	11	11
Altura	64	64	60,5	Massa (em Kg)	43,5	32,5	30,1
Metacarpo	14,5	14	13,7				
Comprimento de corpo	98,5	91,5	84				

A análise de agrupamento recuperou todos os indivíduos cativos amostrados no Peru dentro de um grande grupo formado por indivíduos das espécies *M. americana* (com origem na Guiana Francesa e nas diferentes localidades do Brasil), *M. rufa* e *M. jucunda*, separados do grupo dos indivíduos de *Mazama* de pequeno porte, como *M. temama*, *M. nana* e os indivíduos *S. gouazoubira* e *P. nemorivagus*. Em um subgrupo, foram recuperados os indivíduos de Pucallpa e Alto Ucayali, correspondentes ao macho T454 e a fêmea T453, respectivamente, junto aos indivíduos *M. rufa* e *M. americana*. Em outro subgrupo, foi posicionado o indivíduo T455, junto com o citótipo Rondônia, citótipo Acre e todos os indivíduos de *M. jucunda* analisados no estudo.

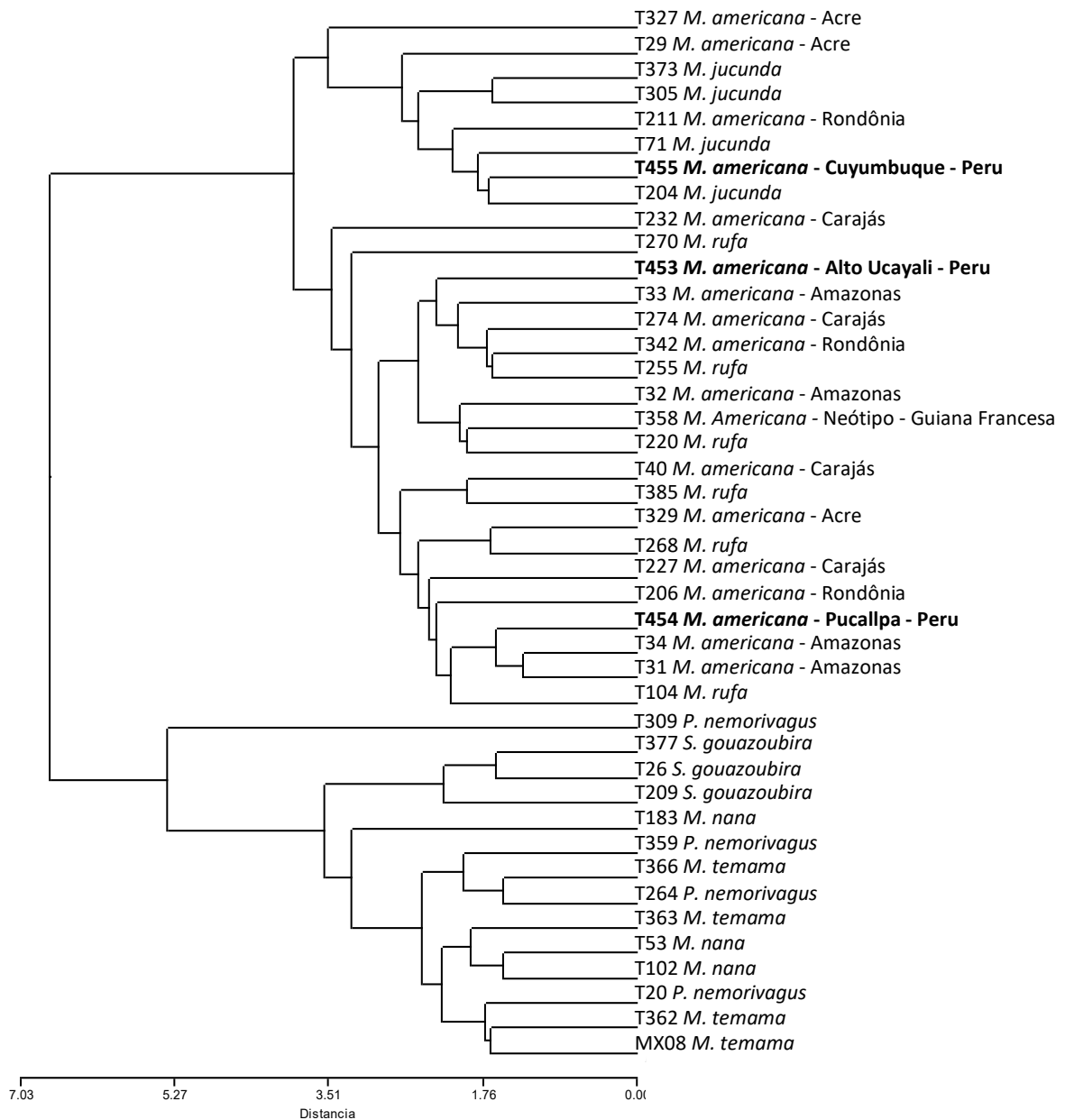


Figura 3. Dendrograma gerado com medidas de biometria corporal de espécimes do gênero *Mazama* em cativeiro no Peru e outras espécies de cervídeos neotropicais.

Na análise de componentes principais (PCA) feito com as medidas de biometria corporal as componentes PC1 e PC2 explicam o 81,2% da variância total, sendo 74,4% e 6,8% respectivamente (Figura 4). As correlações de cada variável com as componentes principais utilizados se apresentam na Tabela 4, os valores mostram

correlação positiva entre a PC1 com todas as variáveis, variando entre 0,53 com a variável distância entre olhos e 0,98 com a variável peso. Na PC2 a maior correlação positiva apresentasse com a variável distância entre olhos (0.67) e a maior correlação negativa com a variável comprimento da orelha (-0.57).



**Figura 4.** Biplot da PCA baseados em dados de biometria corporal de espécimes do gênero *Mazama* presentes no cativeiro no Peru e outras espécies de cervídeos neotropicais

A projeção das coordenadas dos indivíduos no plano dos componentes mostra que na PC1 existe clara diferenciação entre as espécies de maior porte (*M. americana*, *M. rufa*) e as espécies de menor porte (*P. nemorivagus*, *S. guaozoubira*, *M. temama*, *M. nana*), com *M. jucunda* distribuindo-se entre estes dois grupos. Os indivíduos T453, T454 e T455 posicionaram-se entre as espécies de maior porte, distantes de *M. americana (sensu stricto)*. O indivíduo T453 mostrou-se mais próximo de *M. rufa*, enquanto que o T454 se posicionou dentro da dispersão no plano de *M. jucunda*

juntamente com *M. rufa* e *M. americana (sensu lato)*, enquanto o T455 se posicionou dentro da dispersão no plano de *M. jucunda*.

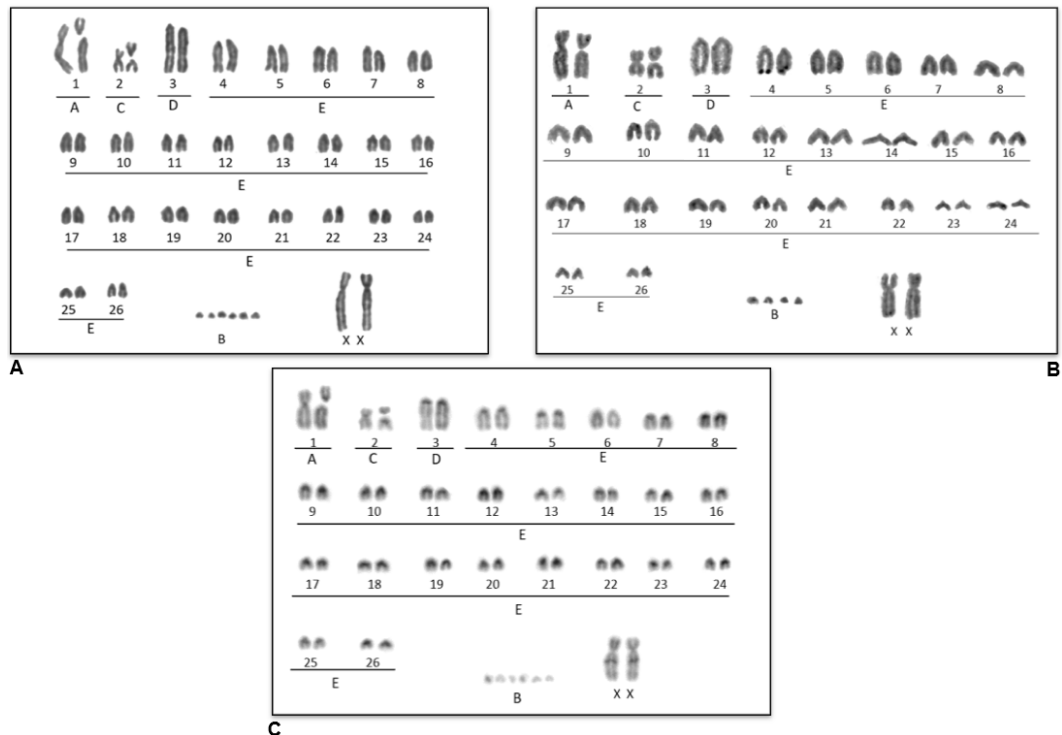
**Tabela 4.** Coeficientes de correlação das variáveis de biometria corporal com as componentes PC1 e PC2

Variables	PC1	PC2
Comprimento de Cabeça	0.93	0.14
Largura de Cabeça	0.92	0.09
Comprimento de Orelha	0.63	-0.57
Distância entre olhos	0.53	0.67
Mandíbula	0.86	0.06
Metacarpo	0.87	-0.18
Altura	0.95	-0.11
Comprimento de Corpo	0.93	-0.01
Comprimento de Cauda	0.79	0.18
Metatarso	0.91	-0.21
Perímetro de Pescoço	0.84	-0.08
Torax	0.89	0.07
Abdomem	0.94	0.09
Peso	0.98	-0.01

### 3.2 Descrição citogenética

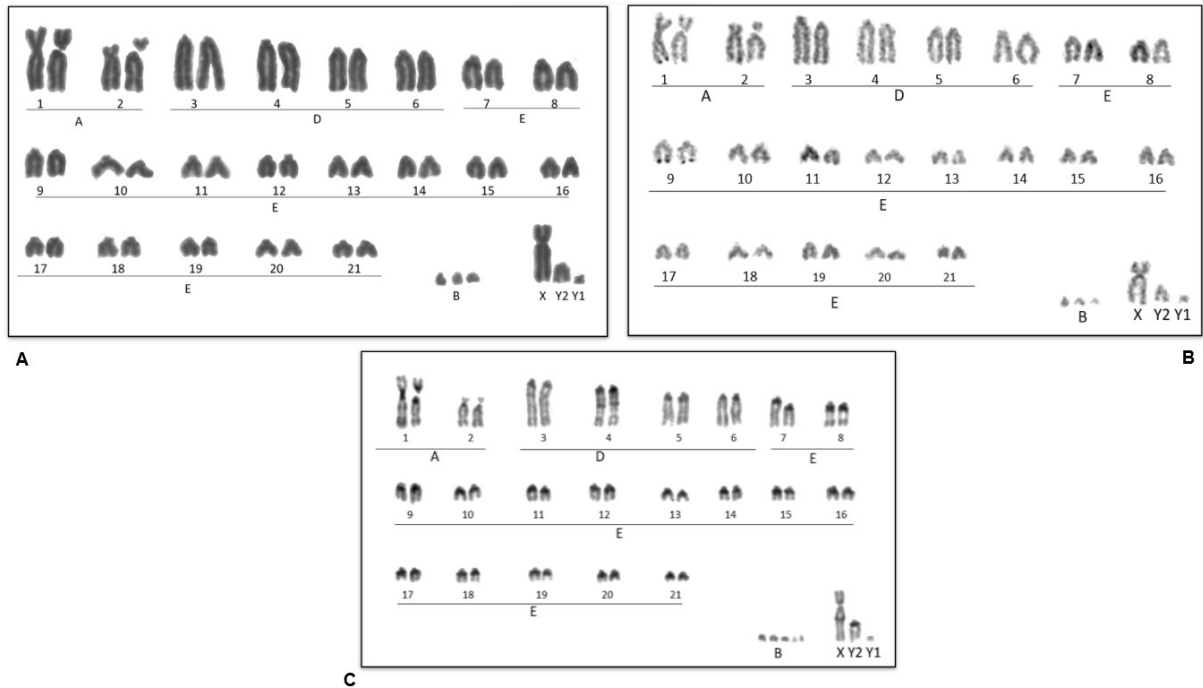
A análise citogenética dos exemplares do gênero *Mazama* amostrados em cativeiro permitiu observar importantes diferenças entre seus cariótipos. O indivíduo T453 apresentou  $2n = 56$ ,  $NF = 60$  e presença de 4 a 6 cromossomos B. O indivíduo foi heterozigoto para duas fusões cêntricas, associadas aos pares cromossômicos 1 e 2. Foram observados 2 pares de cromossomos autossomos de dois braços submetacêntricos e 24 pares de autossomos acrocêntricos. A biometria cromossômica permitiu classificar o par cromossômico 1 no grupo A, o par 2 no grupo C, par 3 no grupo D e no grupo E os pares 4 a 26. Os cromossomos sexuais foram dois cromossomos de morfologia submetacêntrica, sendo os maiores do lote (Figura 5A). A coloração de Ag-RON evidenciou marcações de regiões de atividade nucleolar nos telômeros dos dois cromossomos do par 4 (Figura 5B). O bandamento C mostrou as regiões de heterocromatina constitutiva associadas aos centrômeros de todos os

cromossomos autossomos. Nos cromossomos sexuais, as regiões de heterocromatina foram observadas nas regiões intersticiais dos braços q de ambos cromossomos X (Figura 5C).



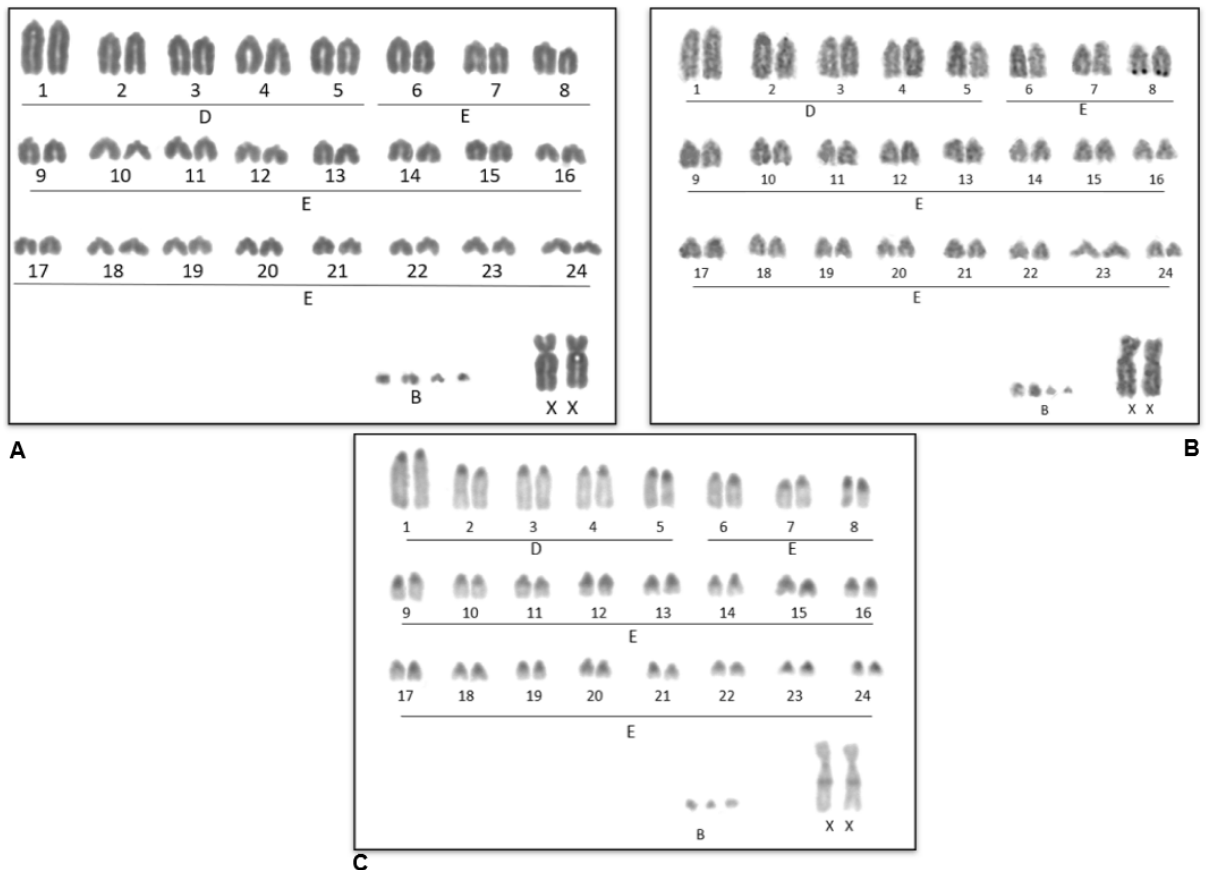
**Figura 5.** Cariótipo do exemplar *M. americana* T453 ( $2n = 56 + 4-6 Bs$ ,  $NF = 60$ ,  $XX$ ), A) Coloração convencional de Giemsa; B) Coloração de Ag-RON e C) Bandamento C.

O indivíduo T454, por sua vez, apresentou  $2n = 47$ ,  $NF = 51$  e presença de 3 a 5 cromossomos B. O indivíduo foi heterozigoto para duas fusões cêntricas, associadas aos pares cromossômicos 1 e 2. A biometria cromossômica permitiu classificar o par cromossômico 1 e 2 no grupo A, os pares 3 a 6 no grupo D e 7 a 21 no grupo E. Foi possível observar um sistema sexual múltiplo caracterizado por um grande cromossomo X submetacêntrico, um  $Y_2$  acrocêntrico e um  $Y_1$  pequeno metacêntrico (Figura 6A). A coloração de Ag-RON evidenciou marcações de regiões de atividade nucleolar nos telômeros dos cromossomos do par 1 e 9 (Figura 6B). O bandamento C mostrou as regiões de heterocromatina constitutiva associadas aos centrômeros de todos os cromossomos autossomos. Também, foi possível observar marcações intersticiais nos braços q do cromossomo do par 1, e nos cromossomos dos pares 3, 4 e 5 (Figura 6C).



**Figura 6.** Cariótipo do exemplar *M. americana* T454 ( $2n=47+3-5Bs$ ,  $NF=51$ ,  $XY_2Y_1$ ), A) Coloração convencional de Giemsa; B) Coloração de Ag-RON e C) Bandamento C.

Finalmente, o indivíduo T455, apresentou  $2n = 50$ ,  $NF= 52$  e presença de 3 a 4 cromossomos B. A biometria cromossômica permitiu classificar os pares cromossômicos 1 a 5 no grupo D e no grupo E os pares 6 a 24. Os cromossomos sexuais (X) foram grandes e de morfologia submetacêntrica (Figura 7A). A coloração de Ag-RON evidenciou marcações de regiões de atividade nucleolar nos telômeros dos dois cromossomos do par 8 (Figura 7B). O bandamento C evidenciou regiões de heterocromatina constitutiva associado aos centrômeros de todos os cromossomos autossomos (Figura 7C). Nos cromossomos sexuais, as marcações de heterocromatina foram observadas nas regiões intersticiais dos braços q de ambos os cromossomos X (Figura 7C).



**Figura 7.** Cariótipo do exemplar *M. americana* T455 ( $2n= 50 + 3-4 Bs$ ,  $NF= 52$ ,  $XX$ ), A) Coloração convencional de Giemsa B) Coloração de Ag-RON; C) Bandamento C.

### 3.3 Análise filogenética

A Inferência Bayesiana do mitogenoma completo (Figura 8) recuperou todos os indivíduos do gênero *Mazama* amostrados no estudo junto com os indivíduos da espécie *M. americana* (*sensu lato*) com origem no oeste da Amazônia do Brasil e correspondendo aos citótipos Acre, Juína e Rondônia. O espécime T455 da localidade de Cuyumbuque e o T454 da localidade de Pucallpa foram recuperados internamente a esse clado. Entretanto, o espécime T453 da localidade Alto Ucayali foi recuperado como uma linhagem basal em relação a todo o clado. Outros indivíduos do Peru, acessados através do banco de dados do Nupece e do Genbank, assim como um indivíduo proveniente do Acre, Brasil, foram recuperados como clados irmãos. As espécies *M. nana* e *M. jucunda* apareceram como grupo irmão de *M. americana* de origem no Noroeste do Brasil e no Peru, com 100% de probabilidade posterior.



## 4. DISCUSSÃO

### 4.1 Caracterização morfológica

Os resultados da análise morfológica de indivíduos em cativeiro no Peru confirmaram que todos possuem características que os poderiam categorizar como *M. americana*, principalmente associado ao tamanho e coloração, não sendo possível diferenciar os diferentes indivíduos pelas características avaliadas. Essa similaridade morfológica das espécies do gênero *Mazama* tem sido descrita como consequência de uma convergência adaptativa (Duarte et al., 2008, Cifuentes-Rincón et al., 2020; Peres et al. 2021).

A análise de agrupamento apresenta todos os indivíduos do estudo em um grande grupo junto com as espécies *M. americana* (*sensu stricto*), *M. rufa* e *M. americana* (*sensu lato*) e *M. jucunda*, esta similaridade morfológica confirma as denominações como *M. americana* nos estudos feitos por Bodmer e Pezo (2001), Aquino et al., (2007), Mayor et al. (2011), Aquino et al., (2014), Gonzales e Llerena (2014), Vela et al., (2017) e Chung (2022) na região amazônica do Peru.

### 4.2 Caracterização citogenética

A análise citogenética mostrou diferenças cromossômicas importantes entre os cariótipos dos indivíduos de *M. americana* amostrados no Peru. A fêmea T453 com origem em Alto Ucayali no Peru, teve um número diploide de 56 e fundamental de 60, sendo o maior número diploide descrito para *M. americana* ( $2n = 45-50$ ) até o presente (Abril et al. 2010; Cifuentes-Rincón et al. 2020). Esse cariótipo também difere dos demais indivíduos estudados, cujos números diploides foram iguais a 47, para o macho T454 de Pucallpa, e a 50 para a fêmea T455 de Cuyumbuque. Também, a ocorrência de fusões cêntricas em heterozigose foram observadas nos cariótipos dos indivíduos T453 e T454, características que corroboram que a evolução cromossômica de *M. americana* (*sensu lato*) está baseada em fusões em tandem e cêntricas (Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010) e evidencia a drástica ocorrência de rearranjos no grupo.

O acúmulo desses rearranjos é descrito como fator importante para barreiras reprodutivas associados a subfertilidade dos híbridos (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017; Galindo et al., 2021). A análise citogenética clássica dos três indivíduos coletados não condiz com o cariótipo descrito para *M. americana (sensu stricto)* nem *M. rufa*, o que pode ser evidenciado pela morfologia, padrão de bandas C e Ag-RON, quando comparadas aos cromossomos dos neótipos descritos para essas espécies (Cifuentes-Rincón et al. 2020, Peres et al. 2021). Entretanto, a extensão das diferenças cromossômicas entre esses indivíduos e com os demais citótipos deverá ser confirmada através de técnicas avançadas de citogenética molecular, uma vez que os bandamentos clássicos podem ser imprecisos diante da complexa reorganização dos cariótipos dentro do grupo (Peres et al. 2021). Para isso, atualmente está sendo realizada a análise citogenética molecular através de clones artificiais de bactérias (BAC) para comparar toda a composição cromossômica dos indivíduos entre si e com as espécies de *M. americana*, *M. rufa* e outros cervídeos da América Latina. Vale ressaltar que a evidência de um indivíduo com origem conhecida na região do Alto Ucayali (Amazonia do Peru), com um cariótipo diferenciado e número diploide alto já alerta sobre a possibilidade de uma espécie jamais estudada citogeneticamente.

Os cromossomos B foram observados em todas as metáfases de todos os indivíduos acessados em cativeiro no Peru, isso corrobora o descrito por outros autores que observaram a presença desses cromossomos supernumerários nos cariótipos da espécie *M. americana* e outras espécies do gênero *Mazama* (Abril e Duarte, 2008; Abril et al. 2010; Peres et al. 2021).

### 4.3 Caracterização filogenética

Os indivíduos de cativeiro com origem no Peru se posicionaram separadamente a *M. americana (sensu stricto)*, *M. rufa* e indivíduos do citótipo Carajás no Brasil (da espécie *M. americana*), o que revela que não correspondem filogeneticamente com nenhuma destas espécies. Os indivíduos do estudo foram recuperados junto com os veados-mateiros dos citótipos do noroeste amazônico do Brasil. O clado se dividiu em

três subclados, um composto pela linhagem do táxon T453 com origem no Alto Ucayali no Peru, outro por indivíduos com origem no Peru acessados no Genbank e banco de dados do NUPECCE (citado como topótipo de *Mazama whitelyi*), e outro onde se recuperou os indivíduos T454 de Pucallpa no Peru e T455 de Cuyumbuque Peru, junto com os indivíduos dos citótipos Juína, Rondônia e Acre. Esta distribuição em vários clados e comum nas espécies de *M. americana* (sensu lato) conforme o discutido por Gutiérrez et al. (2017) e Peres et al. (2021).

Apesar da amostragem aqui ser limitada, os resultados sugerem que os veados-mateiros do Peru são diferenciados entre si e mais relacionados com os citótipos do noroeste do Brasil previamente mencionados. Há necessidade de avaliar com uma amostragem maior e outras abordagens moleculares, ecológicas e citogenéticas para saber qual é a correspondência dos veados-mateiros encontrados no Peru com cada citótipo, devido a possibilidade de se tratar de mais de uma espécie válida que devem ser separadas de *M. americana* (Peres et al. 2021).

## 5. CONCLUSÃO

Os veados mateiros amostrados em cativeiro no Peru, referidos como *M. americana*, não correspondem a esta espécie nem as demais espécies válidas de *Mazama*. É necessário ainda complementar as informações para sua classificação taxonômica.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril VV, Carnelossi EAG, Gonzalez 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 R, Terrones C, Navarro R, Terrones W (2007) Assessing impact of hunting mammals in Alto Itaya river basin, Peruvian Amazon. **Revista Peruana de Biología** 14:181-186.

Aquino R, García G, Charpentier E (2014) Ungulates abundance and habitats use between lower Urubamba and Tambo rivers, Peruvian Amazon. **Ciencia amazónica**. 4:13-21.

Allen JA (1915) Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History** 34:521-553.

Bernegossi AM, Borges C, Sandoval EDP, Cernohorska H, Svatava K, Vozdova M, Caparroz R, González S, Duarte JMB (2022) Resurrection of the genus *Subulo* Smith, 1827 for the gray brocket deer, with designation of a neotype. **Journal of Mammalogy** 104:619-633.

Bodmer RE, Pezo L (2001) Rural development and sustainable wildlife use in Peru. **Conservation Biology** 15:1163-1170.

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 brocket deer species. **ZooKeys** 958:143-164.

Chung LBT (2022) **Diagnóstico del Consumo de Carne de Monte en la Comunidad Nativa de Remanso, Cuenca Baja del Putumayo, Loreto, Perú**. 92 f. Dissertação (Engenheiro em Ecologia de Florestas Tropicais) – Universidad Nacional de la Amazonia Peruana, Iquitos.

Cursino M, Salviano M, Abril V, Zanetti ED, Duarte JM (2014) The Role of Chromosome Variation in the Speciation of the Red Brocket Deer Frontiers in Genetics. Revalidation of *Mazama rufa* Complex: The Study of Reproductive Isolation in Females. **BMC Evolutionary Biology** 14:40.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2020) InfoStat versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Duarte JMB, Boer JA, Sandoval EDP, Bernegossi AM, Tomazella IM (2021) Skin Freezing Technique for Living Cell Bank. GenProtocols. Available from <https://genprotocols.genengnews.com/protocols/skin-freezing-technique-for-living-cell-bank/1041>.

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, González S, Maldonado JE (2008) The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 49:17-22.

Duarte JMB, Ramalho MFD, Lima VFH, Jorge W (1999) A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. **Genetics and Molecular Biology** 22:399-400.

Eisenberg JF (1989) Mammals of the Neotropics, Vol. 1, The Northern Neotropics: Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana. University of Chicago Press, Chicago. 550p.

Fontana F, Rubini M (1990) Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems** 24:157-174.

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.

Gonzales GFN, Llerena GR (2014) Mammal Hunting in the Special Use Zone and Buffer Tingo Maria National Park, Huánuco, Peru. **Revista Peruana de Biología** 21(3):283-286.

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.

Hammer O, Harper DAT, Ryan PD (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia electronica** 4:9.

Hassanin A, Delsuc F et al. (2012) 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 (2020) The systematics of the Cervidae: A total evidence approach. **PeerJ** 8:e8114.

Howell W, Black DA (1980) Controlled silver-staining of nucleous organizer regions with a protective colloidal developer. **Experientia** 36:1014-1015.

Huelsenbeck J, Ronquist F (2001) MrBayes: Bayesian inference of phylogenetic trees. **Bioinformatics** 17:754-755.

Hurtado MCM (2015) **Riqueza y abundancia de macromamíferos terrestres en la margen nor-oriental del parque nacional cerros de amotape**. 67 f. Dissertação (Biología) – Universidad Nacional Mayor De San Marcos, Lima.

Katoh K, Rozewicki J, Yamada K (2019) MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in Bioinformatics** 20:1160-1166.

LANFEAR R, FRANSEN PB, WRIGHT AM, SENFELD T, CALCOTT, B (2016) PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular biology and evolution** 34:772-773.

Levan A, Fredga K, Sandberg AA (1964) Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas** 52: 201-219.

Madrid GMA (2020) **Evaluación del nivel de conservación de aves y mamíferos legalmente protegidos en las Áreas Naturales Protegidas de la Región Tumbes – 2015**. 116 f. Dissertação (Engenheiro Florestal e Ambiental) – Universidad Nacional de Tumbes, Tumbes.

Mayor P, Bodmer RE, López-Béjar M, López-Plana C (2011) Reproductive biology of the wild red brocket deer (*Mazama americana*) female in the Peruvian Amazon. **Animal Reproduction Science** 128:123-128.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**1–8.

Morales-Donoso JA, Vacari G, Bernegossi AM, Sandoval EDP, Peres PHF, Galindo DJ, Thoisy B, Vozdova M, Kubickova S, Duarte JMB (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.: Obe G, Basler A (Eds.) **Cytogenetics, Basic and applied aspects**. Springer. Berlin, p. 90-112.

Peres PHF, Luduvério DJ, Bernegossi AM, Galindo DJ, Nascimento GB, Oliveira ML, Sandoval EDP, Vozdova M, Kubickova S, Cernohorska H, Duarte JMB (2021) Revalidation of *Mazama rufa* (Illiger 1815) (Artiodactyla: Cervidae) as a Distinct Species out of the Complex *Mazama americana* (Erxleben 1777). **Frontiers in Genetics** 12:1-18.

Rafinesque GS (1817) Descriptions of seven new genera of North American quadrupeds. *American Monthly Magazine* 1:363–364.

Rambaut A (2012) FigTree version 1.4.0. Computer program and documentation. University of Oxford. United Kingdom. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

Rivera PJR (2019) **Patrones De Actividad De Mamíferos Mayores, Parque Nacional Cerros De Amotape, Sector Rica Playa – Tumbes**.105 f. Dissertação (Biología) – Universidad Nacional de Piura, Piura.

Salviano MB, Cursino MS, Zanetti EDSS, 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.

Sánchez A, Vásquez P (2007) Hunting pressure in the mushuckllacta de chipaota native community, buffer zone of the cordillera azul national park. **Ecología Aplicada** 6:131-138.

Scullion JJ, Fahrenholz J, Huaytalla V, Rengifo EM, Lang E (2021) Mammal conservation in Amazonia's protected areas: A case study of Peru's Ichigkat Muja - Cordillera del Cóndor National Park. **Global Ecology and Conservation** 26:e01451.

Shanee S, Shanee N (2018) Diversity of large mammals in the Marañón–Huallaga landscape, Peru: with notes on rare species. **Zoology and Ecology** 28:313-328.

Sokal RR, Michener CD (1958) A Statistical Methods for Evaluating Systematic Relationships. University of Kansas Science Bulletin, 38: 1409-1438.

Sumner ATA (1972) A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research** 75:304-306.

Tobler MW, Carrillo-Percastegui SE, Powell G (2009) Habitat use, activity patterns and use of mineral licks by five species of ungulate in south-eastern Peru. **Journal of Tropical Ecology** 25:261-270.

Vela AJW, Rivas M, Fernández V, Clavo PM (2017) Wild Mammals and birds used by inhabitants of the Abujao river basin (Ucayali, Peru). **Revista Peruana de Biología** 24:263-272.

Verma RS, Babu A (1995) Human chromosomes: principles and techniques. 2nd ed. McGraw-Hill, Inc., New York. 419p.

## CAPÍTULO 5 – Considerações finais

O conhecimento das características morfológicas citogenéticas e moleculares dos topotipos de *Mazama tschudii*, *Mazama whitelyi* e espécimes do gênero *Mazama* presentes em cativeiro no Peru, constitui um primer passo importante no processo de esclarecimento da taxonomia dos espécimes do gênero neste país, informações que que contribuirão no reconhecimento e revalorização da biodiversidade de fauna peruana.

A caracterização de *Mazama tschudii* permitiu ter o primer reporte de *Mazama* na parte noroeste da cordilheira ocidental do Peru, sendo necessário ainda complementar com estudos que permitam conhecer sua distribuição além de diferenciação de outras possíveis espécies que também possam ocorrer nesta parte do país devido a existência de trabalhos referenciando a presença de *Mazama americana* em regiões próximas do lugar de coleta do topótipo de *Mazama tschudii*.

As características citogenéticas e moleculares do topotipo de *Mazama whitelyi* contribuíram na compreensão de sua taxonomia e sua diferenciação com as espécies de similaridade morfológica validas até o presente, demonstrando o fundamental aporte dos estudos citogenéticos e de genética molecular na resolução taxonômica. A similaridade cromossômica entre o topótipo de *Mazama whitelyi* e os indivíduos do oeste Amazônico do Brasil revelam a necessidade de expandir o conhecimento relativo aos diferentes cariótipos desta região, uma vez que esses citótipos podem corresponder ao táxon descrito no Peru.

Os resultados obtidos nos espécimes em cativeiro ressaltam a importância destes centros na conservação de espécies assim como no fornecimento de material para estudos que contribuem no reconhecimento de espécies. O posicionamento filogenético de indivíduos veado-mateiros amostrados em cativeiro com origem na natureza, mostra que todos os indivíduos do estudo formam parte de um grande clado formado pelos citótipos de *Mazama americana* do noroeste Amazônico (*Mazama americana sensu lato*). Porém, os resultados citogenéticos revelaram cariótipos diferenciados quando comparados com os descritos para a espécie, mostrando o valor que essa análise possui para a taxonomia de veados neotropicais.

Pesquisas futuras devem ser realizadas para comparar os *Mazama* que ocorrem no Peru com espécimes de museu e topótipos de outras localidades no

Amazonas sul-americano buscando esclarecer a taxonomia do complexo *Mazama americana* e complementar a descrição desses possíveis táxons válidos que ocorrem no Peru.