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

FILOGENIA E DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama* RAFINESQUE, 1817 (CETARTIODACTYLA:CERVIDAE)

Pedro Henrique de Faria Peres

Biólogo

2020

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

FILOGENIA E DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama* RAFINESQUE, 1817 (CETARTIODACTYLA:CERVIDAE)

Discente: Me. Pedro Henrique de Faria Peres

Orientador: 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

2020

P437f

Peres, Pedro Henrique de Faria
Filogenia e delimitação molecular de espécies do gênero Mazama Rafinesque 1817 (Cetartiodactyla:Cervidae) / Pedro Henrique de Faria Peres. -- Jaboticabal, 2020
95 f. : tabs., fotos, mapas

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

1. Mastozoologia. 2. Genética Animal. 3. Biodiversidade Conservação. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: FILOGENIA E DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama* RAFINESQUE, 1817 (CETARTIODACTYLA:CERVIDAE)

AUTOR: PEDRO HENRIQUE DE FARIA PERES
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
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal

Profa. Dra. VANESSA VELTRINI ABRIL (VIDEOCONFERÊNCIA)
Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde (ICBS) - Campus Universitário do Araguaia CUA/UFMT / Pontal do Araguaia/MT

Prof. Dr. ALEXANDRE REIS PERCEQUILLO (VIDEOCONFERÊNCIA)
ESALQ - USP - Piracicaba/SP

Prof. Dr. PEDRO MANUEL GALETTI JUNIOR (VIDEOCONFERÊNCIA)
UFSCAR / São Carlos/SP

Prof. Dr. RENATO CAPARROZ (VIDEOCONFERÊNCIA)
Departamento de Genética e Morfologia-UnB / Brasília/DF

Jaboticabal, 24 de agosto de 2020

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Pedro Henrique de Faria Peres – graduado Bacharel em Ciências Biológicas em dezembro de 2010, pela Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita filho” (UNESP), câmpus de Jaboticabal. Integrante do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) desde 2007, durante a graduação foi bolsista de iniciação científica PIBIC/CNPq e FAPESP junto ao departamento de Zootecnia FCAV/UNESP. Ao longo da graduação exerceu o cargo de representante discente junto ao Conselho de Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária por dois anos e exerceu o cargo de vice presidente do Centro Acadêmico “Alfred Russel Wallace” do curso de Ciências Biológicas na gestão 2009-2010. Titulado no ano de 2015 como mestre em Ciências, área de concentração Ecologia Aplicada, pela Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” (ESALQ) e pelo Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA) da Universidade de São Paulo (USP), câmpus de Piracicaba. Ingressou no presente curso de doutorado em agosto de 2016 e, durante a execução deste trabalho, foi bolsista por 13 meses financiado pela CAPES e por 34 meses financiado pela FAPESP.

“... Alma livre,

Mente aberta,

Coração tranquilo...”

(Trecho da música “Coração Tranquilo” de Renato Teixeira)

À Ana Maria de Faria

Engenheira agrônoma, entomóloga, pesquisadora, mãe,

guerreira, exemplo, inspiração,

meu porto seguro.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, por sua parceria de muitos anos, ensinamentos de todos os tipos e pelo seu exemplo como profissional comprometido com valores éticos e científicos. Ao mestre, eterno respeito e profunda gratidão.

À FAPESP pelo financiamento e bolsa através do Processo n°2017/02200-8 e pelo financiamento através do Projeto Temático Processo n°2017/07014-8. À UNESP pelo apoio estrutural e pessoal. No mesmo sentido, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Aos amigos da vida e da pesquisa Dr. Márcio Leite de Oliveira e Dr. Francisco Grotta Neto, pela convivência produtiva e prazerosa, por toda crítica e toda cerveja, por toda cobrança e toda ideia mirabolante, pela amizade.

Aos amigos da graduação, Caleb C. Martins, pela ajuda na coleta de campo e contribuições na revisão dessa tese, e Marcelo H. Assunção, pela ajuda em duas coletas decisivas e pela viabilização da coleta no Pantanal do Mato Grosso do Sul. Obrigado pelas suas amizades.

Aos parceiros de coleta: Shamira, Rullian, Maria Helena, Isabel, Guilherme e Maxhilian, pela paciência infinita de estar comigo em trabalho de campo, muitas vezes em situações desagradáveis ou tensas, mas com muito companheirismo e motivação.

Ao técnico João Airton Boer, companheiro do laboratório, pela palavra amiga, sempre otimista e atenciosa.

Às minhas amigas de campo Nicks e Granada, pelo companheirismo e alegria contagiantes em todos os momentos.

À toda equipe do canil Caraíbas, em especial Heitor Pires e Leonardo Vieira Araújo, pela paciência e dedicação com nossa equipe e pelo trabalho extraordinário que realizam.

Aos professores Drª. Cyntia P. A. Prado e Dr. Vitor F. O. de Miranda, pela atenção despendida na avaliação desse trabalho, a qual rendeu valiosas contribuições e críticas que me orientaram na busca por aperfeiçoar essa tese.

Aos gestores e analistas ambientais ligados às Unidades de Conservação públicas visitadas, Paula Leão Ferreira (PN Sempre- Vivas), Paula Ericson Guilherme Tambellini (PE da Mata Atlântica), Marcelo Leandro Feitosa de Andrade (EE Serra das Araras), Caio César Neves Sousa (SEMA/PE do Araguaia), Nelson Antônio Gallo (EE de Caetetus), Renato Cezar de Miranda

(FLONA Silvânia), pela recepção atenciosa, valorização da pesquisa e pelo trabalho árduo, porém incrível, de cuidado e manutenção da nossa biodiversidade.

Ao SESC e em especial à gerente de Pesquisa e Meio Ambiente, Cristina Cuiabália, pela permissão, custeio e apoio logístico completo ao trabalho de campo realizado na RPPN SESC Pantanal.

À Cia. Eelétrica de São Paulo (CESP), em especial os gestores da RPPN Cisalpina, Fernando Brandão de Andrade e José Dimas Alessio, por permitirem e incentivarem o trabalho de pesquisa na sua propriedade, pela acolhida atenciosa e pela infraestrutura de alojamento e transporte que viabilizaram o trabalho.

À Fundação Fernando Lee, responsável pela Fazenda Rio Negro, em especial aos senhores Bernardo Bonini e Avenir Fernando Marques de Araújo, pela atenção e suporte total à nossa pesquisa. À pesquisadora e Profª. Drª Rita Maria de Moraes que intermediou o contato, viabilizando a coleta na região do Xingu.

Ao proprietário da Fazenda Xaraés, senhor João Ramos, e aos proprietários da Fazenda Riachuelo, senhores Marcelo Pauliello Junqueira e Luiz Antônio Junqueira Filho, pela permissão e ajuda logística que tornou possível a coleta na fazenda.

Aos meus amigos Vanessa V. Abril e Dilermando Lima, pela acolhida tão carinhosa em sua residência em Barra do Garças, momento especial que ficará para sempre marcado.

Ao pesquisador Dr. Leandro Silveira, pela acolhida em sua residência, em um momento de necessidade durante as coletas de campo no PN de Emas.

Ao médico Dr. Aldo de Albuquerque Cunha, por seu critério científico, atenção cuidadosa e avaliação clínica, que acertou desde o princípio meu diagnóstico de infecção por malária e me retirou de uma situação extremamente desagradável.

Aos funcionários e moradores dos locais onde realizei as coletas de campo, Sr. Sebastião (RPPN Cisalpina), Manoel Pedro e Gilson (PPA St. Maria-RPPN SESC), Carlos (EE Serra das Araras), Geraldo e Marcos (PN Sempre Vivas), pela acolhida, orientação e estórias incríveis. Em especial, agradeço pelas palavras e momentos tão valiosos compartilhados com os senhores Emiarde Geraldo da Cruz (“Mad”), Antônio Martins de Moura Marqes (“Mineiro”) e Vicente da Costa, senhores da terra, detentores de uma sabedoria maior.

Aos meus amigos, pelo suporte emocional nas horas difíceis e alegria nas horas de distração da pós-graduação: Guilherme, Adriano, Leandro, Felipe, Vitor, Marcelo, Beatriz, Marina, Alessandra, Sandra, Anita, Leandro, Paulo, Rosimar, Sérgio. Dedico para todos vocês meu eterno carinho e gratidão.

Aos demais colegas do NUPECCE, pelo companheirismo e convivência tão rica ao longo do doutorado: Douglas, Elias, Eluzai, Gabrielle, Vinícius, Natália, Manoela, Amanda, Isabela, Agda, Valdir, Iara, David, Cláudia, Luciana, Yuki, Marina, Júlia, dona Lúcia, Toninho e Renato.

Por fim e mais importante, agradeço profundamente à minha família: Ana Maria, Sérgio, Ana Carolina, Ana Luíza, Telma, Luiz Davi e Maria, pelo apoio incondicional e imprescindível ao longo de toda minha formação acadêmica, amor eterno.

SUMÁRIO

Página

RESUMO.....iii

ABSTRACT.....iv

INTRODUÇÃO.....01

2. REVISÃO DE LITERATURA 06

2.1. A Família Cervidae.....06

2.2. Cervídeos Neotropicais e o Gênero *Mazama* Rafinesque, 1817.....12

2.3. O complexo *M. americana* (Erxleben, 1777) e *M. rufa* (Illiger, 1811).....20

2.4. Uma palavra sobre a nomenclatura taxonômica do grupo.....25

3. MATERIAL E MÉTODOS.....26

3.1. Amostras de Referência.....26

3.2. Amostragem Fecal.....29

3.3. Coleta de Fezes em Campo.....31

3.4. Extração, Amplificação e Sequenciamento das Amostras de Referência.....33

3.5. Extração, Amplificação e Sequenciamento das Amostras Fecais.....34

3.6. Caracterização das Matrizes de DNA: alinhamento, polimorfismo, modelo evolutivo e saturação.....37

3.7. Análise Filogenética Baseada em Caracteres Moleculares.....38

3.8. Delimitação Molecular de Espécies da Subtribo Odocoileina.....39

4.RESULTADOS.....40

4.1. Coleta e Triagem de Amostras Fecais de Cervidae.....40

4.2. Amplificação, Sequenciamento e Caracterização das

Matrizes de Caracteres Moleculares.....42

4.3. Filogenia e Delimitação Molecular de Espécies

da Subtribo Odocoileina.....44

5.DISCUSSÃO.....52

5.1. Relações Filogenéticas do Complexo *Mazama americana*

(Erxleben, 1777).....52

5.2. Avanços da Amostragem Genética Não Invasiva.....55

5.3. Delimitação de Espécies no Gênero *Mazama* Rafinesque, 1817

e a validade de *M. rufa* (Illiger, 1811) 58

5.4. Implicações para a Ecologia e Conservação de *Mazama rufa*

(Illiger, 1811).....61

6. CONCLUSÕES.....63

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....64

APÊNDICES.....74

Apêndice A.....75

Apêndice B.....76

Apêndice C.....78

FILOGENIA E DELIMITAÇÃO MOLECULAR DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Mazama* RAFINESQUE, 1817 (CETARTIODACTYLA:CERVIDAE)

RESUMO – O veado-mateiro (*Mazama americana* Erxleben, 1777) representa um complexo de espécies crípticas cujo caráter polifilético e diferenças cromossômicas já foram demonstrados. Dependendo do grau de divergência, essas diferenças são uma barreira reprodutiva que levam ao isolamento e reforçam a necessidade de revisão taxonômica do grupo. Assim, foi proposta a revalidação da espécie *Mazama rufa* Illiger 1811 para Mata Atlântica. A resolução da incerteza taxonômica que ainda cerca o complexo é vital na avaliação e conservação do grupo, posto que várias lacunas amostrais e espécies em potencial carecem de avalição. Nesse sentido, o presente trabalho buscou avaliar as relações filogenéticas entre as variantes cromossômicas do complexo *M. americana* e delimitar potenciais novas espécies a partir de dados moleculares. Também foi testada a validade da espécie *M. rufa* e inferidos aspectos de sua distribuição e estado de conservação. Um conjunto de espécimes com informação cromossômica (citótipo) e outro, de amostras fecais coletadas na natureza, foram sequenciados para parte dos genes mitocondriais Cytb, D-loop e ND5. Foram realizadas análises filogenéticas por meio de inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança e aplicados métodos coalescentes de delimitação molecular de espécie (GMYC e PTP) para identificar unidades taxonômicas operacionais moleculares (MOTUs). A hipótese filogenética mostrou relação de monofilia recíproca entre todos os citótipos, com exceção do citótipo Carajás. As espécies *M. americana* (*sensu strictu*) e *M. rufa* foram consideradas como espécies irmãs e válidas. Já os citótipos Juína e Rondônia representam duas potenciais espécies distintas de *M. americana*. A espécie *M. rufa* é composta pelos citótipos Paraná e Carajás, apresenta ampla distribuição, do sul do Brasil até a faixa sul-sudeste da Amazônia, e potencialmente não deve ser classificada como ameaçada de extinção. Ficou demonstrado que até a menor diferença cromossômica (uma fusão em tandem) pode implicar em espécies distintas, dependendo do tempo de divergência.

Palavras-chave: Cervidae, Odocoileini, DNA fecal, *molecular operational taxonomic units*, taxonomia integrativa, biodiversidade.

MOLECULAR PHYLOGENY AND SPECIES DELIMITATION IN *Mazama* RAFINESQUE, 1817 (CETARTIODACTYLA:CERVIDAE)

ABSTRACT – The red brocket deer (*Mazama americana* Erxleben, 1777)) is considered cryptic species complex whose polyphyletic state and chromosomal differences have been already demonstrated. These chromossomal differences act as a reproductive barrier that can lead to isolation, depending on the level of divergence, thus, reinforce the need for taxonomic revision. In this sense a species revalidation has just been proposed for *Mazama rufa* Illiger 1811 in the Atlantic Forest. The resolution of the remaning taxonomic uncertainty is vital in this taxa assessment and conservation, once there is several sampling gaps and other potential species to be evaluated. Therefore, the present work sought to evaluate the phylogenetic relationships between the chromosomal variants and to delimit potential new species for the *M. americana* complex from molecular data. The validity of *M. rufa* was tested and aspects of its distribution and conservation status were also inferred. A set of specimens with chromosomal information (cytotype) and another set of fecal samples collected in nature were sequenced for part of the mitochondrial regions Cytb, D-loop and ND5. Bayesian inference and Maximum Likelihood phylogenetic analyzes were performed and coalescent methods of molecular species delimitation (GMYC and PTP) were applied to identify molecular operational taxonomic units (MOTUs). The phylogenetic hypothesis demonstrated a reciprocal monophiletic relationship between all cytotypes, with the exception of Carajás. The red brocket deers *M. americana* (*sensu strictu*) and *M. rufa* were recovered as sisters and valid species. On the other hand, Juína and Rondônia cytotypes should represent two distinct species from *M. americana*. The *M. rufa* species is composed of Paraná and Carajás cytotypes, has a wide distribution from the south of Brazil up to the south-southeast of the Amazon Forest, and potentially will not be categorized as threatened with extinction. The results demonstrated that even the minimal chromosomal difference (a tandem fusion) can imply different species, depending on other factors as the time since divergence.

Keywords: Cervidae, Odocoileini, fecal DNA, molecular operational taxonomic units, integrative taxonomy, biodiversity.

1. INTRODUÇÃO

A taxonomia é a base do processo de avaliação e planejamento de conservação da biodiversidade, pautada basicamente ao nível de espécie (Mace, 2004). Ferramentas como as listas de espécies ameaçadas de extinção da IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) e de regulamentação do comércio internacional de fauna da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) demonstram a dependência em relação à nomenclatura taxonômica. Dessa forma, a definição de espécies influencia diretamente questões de comunicação, manejo e implicações legais relacionadas à conservação (Zachos, 2018).

Negligenciar a existência de linhagens evolutivas distintas pode ocasionar problemas em programas de manejo em cativeiro, translocações que resultam em introgressões não naturais e depressão exogâmica, e casos de não adaptação à infecções parasitárias locais (Gippoliti et al., 2018). Porém, dependendo da abordagem utilizada, podemos ter arranjos taxonômicos com característica mais aglutinadora (*lumper*) ou divisora (*spliter)* em número de espécies. Ambas podem ser igualmente nocivas à conservação (Zachos, 2018). Dada essa problemática, a taxonomia de ungulados, em particular dos cervídeos, é cheia de lacunas, sendo essencial a promoção de trabalhos que aumentem a amostragem e a coleta de vouchers (Gutiérrez et al., 2017; Gippoliti et al., 2018; Zachos, 2018; Heckberg, 2020).

Na família Cervidae, o gênero neotropical *Mazama* Rafinesque 1817 é o mais diversificado, apresentando uma classificação controversa, e cuja revisão taxonômica deve abranger a descrição de novas espécies (Heckberg 2020; Rincón et al., 2020). O gênero é composto pelos veados florestais, animais de médio porte (10-65 kg), com chifres em forma de espeto, hábito solitário e evasivo (Weber e González, 2003; Merino e Rossi, 2010). A convergência morfológica das espécies classificadas como *Mazama* dificultou o entendimento evolutivo do grupo, cujo caráter polifilético já foi amplamente indicado (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012; Gutiérrez et al 2017; Heckberg, 2020). O gênero *Mazama* ficará restrito às espécies ligadas à

Mazama americana (Erxleben, 1777), que é a espécie tipo do gênero e dois novos gêneros devem ser propostos (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Heckberg, 2020).

No tocante a espécie *Mazama americana*, conhecida como veado-mateiro, observa-se que é uma das espécies de maior incerteza taxonômica do gênero, sendo considerada como um complexo de espécies crípticas (Duarte et al., 2008). Por esse motivo, ela não pôde ter seu estado de ameaça avaliado, sendo classificada como Dados Deficientes pela IUCN (Duarte e Vogliotti, 2016). Foi demonstrado que *M. americana* não se trata de um grupo monofilético e apresenta uma grande diversidade cariotípica (Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010; Gutiérrez et al., 2017; Heckberg, 2020). Duas espécies atuais do gênero (*Mazama bororo* Duarte, 1996 e *M. temama* (Kerr, 1972)) já foram separadas do complexo *M. americana* devido a diferenças cromossômicas extremas (Jorge e Benirschke, 1977; Duarte e Jorge, 2003). Além dessas, uma terceira espécie, *Mazama rufa* (Illiger, 1811), foi recentemente revalidada pelo mesmo motivo (Luduvério, 2018).

À vista disso, vale ressaltar que a taxonomia de *Mazama* é historicamente baseada em dados morfológicos e revisões discordantes (Allen, 1915; Cabrera, 1960; Czernay, 1987). A quantidade de espécies de *Mazama* “vermelhos” (que seriam do genêro *Mazama* propriamente) variou bastante conforme as principais revisões: 11 espécies (com oito subespécies) por Allen (1915); duas espécies (com seis subespécies) por Cabrera (1960); quatro espécies (com seis subespécies) por Czernay (1987); e, por fim, Merino e Rossi (2010) consideraram a validade de seis espécies. A contabilização em si não se alterou, mas *Mazama bricenii* Thomas, 1908 foi considerada sinônimo júnior de *Mazama rufina* (Bourcier e Pucheran, 1852) por Gutiérrez et al (2015) e *Mazama rufa* foi revalidada por Luduvério (2018). Apesar de figurar como espécie válida, *M. americana* sempre foi dividida em subespécies, variando de três a seis, dependendo do trabalho (Allen, 1915; Cabrera, 1960; Czernay, 1987).

As revisões baseadas em dados morfológicos, no entanto, apresentam limitações, pois esses caracteres são pouco informativos para recuperar as relações filogenéticas em Cervidae (Heckberg 2020) e não revelam a diversidade do gênero *Mazama* (Rossi, 2000; Duarte et al., 2008). Se, por um

lado há convergência morfológica-evolutiva entre linhagens distintas do gênero (Duarte et al., 2008; Cassini e Toledo, 2020), há, por outro, retenção de um padrão morfológico que não permite diferenciar as linhagens genéticas do complexo *M. americana* (Rincón et al., 2020).

Isto posto, a avaliação feita por Duarte e Jorge (1996), ao descrever variantes cromossômicas no Brasil, revelaram a diversidade críptica de *Mazama americana*. Dentre as variantes, foram identificadas duas linhagens distintas e descritos citótipos com estruturação geográfica (Abril et al., 2010). Uma das linhagens investigadas ocorre no oeste da Amazônia (estado de Rondônia e Mato Grosso) e apresenta baixo número cromossômico (2n=42-45). Ela é composta pelos citótipos chamados Rondônia (RO; 2n=42/43; NF=46) e Juína (JU; 2n=44/45; NF=48). Em contrapartida, a outra linhagem ocorre na região leste da Amazônia (estado do Pará e Maranhão) e na Mata Atlântica, tendo alto número cromossômico (2n= 49-53). Essa é composta pelos citótipos Paraná (PR; 2n=52/53; NF=56), Carajás (CA; 2n=50/51; NF=54), Santarém (SA; 2n=50/51; NF=56) e Jari (JA; 2n=48/49; NF=56) (Abril et al., 2010).

Estudos de reprodução em cativeiro mostraram infertilidade total, ou alto grau de subfertilidade, da progênie híbrida entre as linhagens de alto e baixo número diplóide devido às falhas na gametogênese de fêmeas e machos (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017). Também foi observada subfertilidade, em menor grau, entre os citótipos com menor divergência dentro das linhagens: RO x JU e PR x CA (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017). A divergência cromossômica extrema entre as linhagens (≥7 cromossomos) representaria uma barreira reprodutiva pós-zigótica que indicaria a presença de pelo menos duas espécies em *M. americana*. No entanto, é levantada a hipótese de que a subfertilidade observada nas linhagens de menor divergência (≥2 cromossomos) também resultaria em isolamento, podendo, assim, cada citótipo corresponder a uma espécie distinta (Abril et al., 2010; Cursino et al., 2014 Salviano et al 2017; Carranza et al 2018).

As informações citogenéticas apresentadas convergem com os dados de filogenia molecular, indicando que o complexo *Mazama americana* não é monofilético (Duarte et al., 2008; Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al. 2017; Heckberg, 2020; Rincón et al., 2020). As duas linhagens cromossômicas se

subdividem em clados distintos, em meio a outras espécies, sendo que a linhagem de alto número diploide é posicionada em um clado próprio e a de baixo número diploide é recuperada como grupo irmão de *Mazama nana* (Hensel, 1872) e *M. bororo* (Abril et al., 2010; Rincón et al., 2020). No entanto, a monofilia recíproca entre citótipos mais próximos (PR e CA/ JU e RO) não foi propriamente testada (Abril et al., 2010; Luduvério, 2018; Rincón et al., 2020).

O processo de revisão taxonômica de *Mazama americana* avançou com a coleta, caracterização e designação de um neótipo, uma vez que não existe holótipo da espécie (Rincón et al, 2020). O animal coletado na Guiana Francesa, localidade tipo, apresentou um cariótipo com 2n=45 e NF=50. Apesar do baixo número cromossômico, os rearranjos observados (duas fusões em tandem, duas fusões cêntricas e uma inversão periférica) teriam derivado esse cariótipo a partir de um cariótipo ancestral semelhante ao citótipo Paraná (2n=52/53; NF=56). Ademais, a análise de filogenia molecular também apontou para uma relação de grupo irmão entre os animais da Guiana Francesa e a linhagem de alto número diplóide (PR/CA). Assim, Rincón e colaboradores (2020) concluíram que a diferença cromossômica observada indicaria que nenhuma variante com ocorrência no Brasil corresponde à *M. amerciana* (*sensu strictu*), sendo necessária uma revisão de seu estado taxonômico.

Posto que a sinonímia de *M. americana* é extensa, Luduvério (2018) iniciou sua avaliação a partir do sinônimo *Cervus rufus* Illiger 1811, o primeiro disponível na linha cronológica. Essa espécie foi descrita originalmente por Azara (1802), que descreveu os dois veados que ocorriam no Paraguai: guazupita e guazubira. Coube a Illiger (1811) nomear os animais dentro da nomenclatura Linneana, deliberando *Cervus rufus* ao veado guazupita, o “veado vermelho”. Tal espécie foi originalmente descrita como representante do gênero *Cervus* Linnaeus, 1758, porém foi transferida posteriormente ao gênero *Mazama,* configurando o binômio *Mazama rufa* (Lydekker, 1898). A espécie era considerada um táxon válido até a revisão feita por Alllen (1915), depois foi considerada subespécie ou sinônimo de *M. americana* (Cabrera, 1960; Czernay, 1987; Rossi, 2000; Varela et al. 2010). Visto que o *M. rufa* nunca teve um holótipo designado, foi, então, mais uma vez coletado, caracterizado e indicado um neótipo para a espécie próximo à região de descrição original (Luduvério, 2018).

Foi proposta a revalidação da espécie, que apresentou o padrão cromossômico do citótipo Paraná (2n=52/NF 56) e teria a ocorrência na Mata Atlântica. A nova localidade tipo indicada foi o município de Foz do Iguaçú, Brasil, na região florestal do Parque Nacional do Iguaçú. O grupo de espécimes do citótipo Paraná foi recuperado como monofilético em relação a um grupo de animais da Guiana Francesa (Luduvério, 2018).

Importante apontar que os dois conjuntos representam os extremos norte e sul da distribuição de *M. americana* (*sensu lato*), não tendo sido incluída nenhuma população intermediária na análise e nenhum outro citótipo, o que poderia ter impacto nos resultados (Luduvério, 2018). Dado que não é bem resolvida a relação filogenética entre os citótipos PR e CA, nem se o grau de divergência cromossômica entre eles é suficiente para considera-los espécies distintas, se faz necessária maior investigação sobre *M. rufa.*

Visto que certo consenso foi alcançado sobre a definição de espécie como linhagens evolutivas independentes (De Queiroz, 2007), o limiar de corte em meio ao contínuo processo de divergência representa o atual desafio da taxonomia para definição de espécies (Fujita et al., 2012). Nessa busca, a compreensão do processo evolutivo do grupo estudado tem se mostrado essencial para a definição taxonômica, visto que informações como tempo de divergência, fatores de isolamento e aspectos ecológicos são importantes para compor a discussão (Padial et al., 2010). A proposta de taxonomia integrativa reside justamente na análise de diversos conjuntos de dados para reunir mais evidências que suportem as propostas taxonômicas (Padial et al., 2010; Fujita et al., 2012).

Recentemente, os métodos coalescentes de delimitação de espécie (e.g. GMYC, PTP, BPP) têm contribuído na identificação de linhagens evolutivas significativas e definições de espécies (Esselstyn et al., 2012; Larson et al., 2016; Machado et al., 2017). Tal abordagem traz um arcabouço estatístico que propõe um limiar, diminuindo a subjetividade inevitável envolvida no processo (Pons et al., 2006). A identificação de unidades moleculares que representem espécies em potencial, também chamadas de *molecular operational taxonomic units* (MOTUs) (Floyd et al., 2002), surge como um teste de hipótese perante outros conjuntos de dados, contribuindo em uma análise integrativa (Fujita et al., 2012).

Perante as várias lacunas apresentadas e a necessidade de investigar com maior profundidade os dados moleculares em *Mazama*, o presente trabalho se propôs a: (1) avançar na compreensão das relações filogenéticas entre as variantes genéticas que compõem *Mazama americana*, com foco na relação entre citótipos de menor divergência cromossômica; (2) delimitar potenciais espécies de *Mazama* a partir de dados moleculares, avaliando as hipóteses existentes em uma abordagem de taxonomia integrativa; (3) testar a validade taxonômica de *M. rufa* e inferir sua distribuição. Para avançar sobre esses objetivos foi analisado um conjunto maior de espécimes com informação cromossômica e regiões mais informativas do DNA mitocondrial. O uso de amostragem genética não invasiva, através da coleta de fezes na natureza, permitiu incluir nesse contexto populações de veado-mateiro da região central do Brasil (Pantanal e Cerrado) que nunca foram amostradas e analisadas anteriormente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. A Família Cervidae

A família Cervidae faz parte da ordem Cetartiodactyla e dentre as mais de 300 espécies da ordem, Cervidae é a segunda mais diversa, com 55 espécies e 18 gêneros, atrás apenas de Bovidae (Zurano et al., 2019). Os cervídeos apresentam uma grande amplitude morfológica, que pode variar de 6 à 600 kg, e ocorrem naturalmente por toda Europa, Ásia e América, em uma variedade de ambientes e altitudes (Merino e Rossi, 2010). Originalmente os cervídeos integravam a ordem Artiodactyla, no entanto, a parafilia dessa ordem foi demonstrada por estudos moleculares que evidenciaram a relação de grupo irmão entre a família Hippopotamidae e a ordem Cetacea (Graur e Higgs, 1994; Montgelard et al., 1997). A fusão das duas ordens em Cetardiodactyla já é amplamente aceita (Hassanin et al., 2012; Zurano et al., 2019).

Posto que os cervídeos são artiodáctilos ruminantes, é possível destacar algumas adaptações morfológicas que favoreceram a vida cursorial e a

herbivoria no grupo. Os artiodáctilos possuem os dígitos recobertos com cascos córneos e se apoiam na ponta do terceiro e quarto dígitos, sendo o primeiro ausente e o segundo e quinto reduzidos em Cervidae (Putman, 1988). Várias adaptações nos membros resultaram na adaptação para uma estrutura fortalecida e ágil, como ossos proximais (fêmur e úmero) curtos e robustos, ossos distais (tíbia, fíbula, rádio e ulna) alongados e ossos metapodiais alongados e modificados, formando um terceiro segmento dos membros (Putman, 1988). Por serem ruminantes, os cervídeos possuem estômago dividido em quatro câmaras (rúmem, retículo, omaso e abomaso), sendo as três primeiras com função fermentativa, somente possível pela relação de simbiose com microorganismos. Essa característica viabiliza a digestão da celulose, que compõe a parede celular dos vegetais, e representa uma vantagem adaptativa na obtenção de energia e nutrientes em relação aos demais herbívoros. (Putman, 1988).

Dentre as principais características diagnósticas da família Cervidae, pode-se citar os caracteres do crânio: dois forames lacrimais, uma fossa lacrimal, uma vacuidade pré-orbital, dentição braquiodonte e a presença de chifres nos machos (Figura 1) (Merino e Rossi, 2010; Heckberg, 2020).

A presença de chifres apenas nos machos apresenta duas exceções: *Rangifer tarandus* (Linnaeus, 1758), em que as fêmeas também possuem chifres, e *Hidropotes inermis* Swinhoe, 1870, em que ambos os sexos não possuem chifre, mas caninos alongados (Putman, 1988). Três morfotipos de chifres podem ser observados na família segundo Heckberg (2020): (1) chifres simples, em forma de espeto ou com uma bifurcação saindo do eixo principal, encontrados nos gêneros *Mazama* Rafinesque, 1817, *Pudu* Gray, 1852, *Hippocamelus* Leuckart, 1816, *Muntiacus* Rafinesque, 1815 e *Elaphodus* Milne-Edwards, 1871; (2) chifres com exatas três pontas, em que as bifurcações podem variar no ângulo e comprimento em relação ao eixo principal, observados nos gêneros *Ozotoceros* Ameghino, 1891, *Capreolus* Gray, 1821 e *Axis* Smith, 1828; e (3) chifres ramificados, com múltiplas pontas e bifurcações, podendo ser palmado, encontrados em diversos gêneros como *Blastocerus* Gray, 1850, *Cervus* Linnaeus, 1758, *Dama* Frisch, 1775, *Odocoileus* Rafinesque, 1832 e *Alces* Gray, 1821.

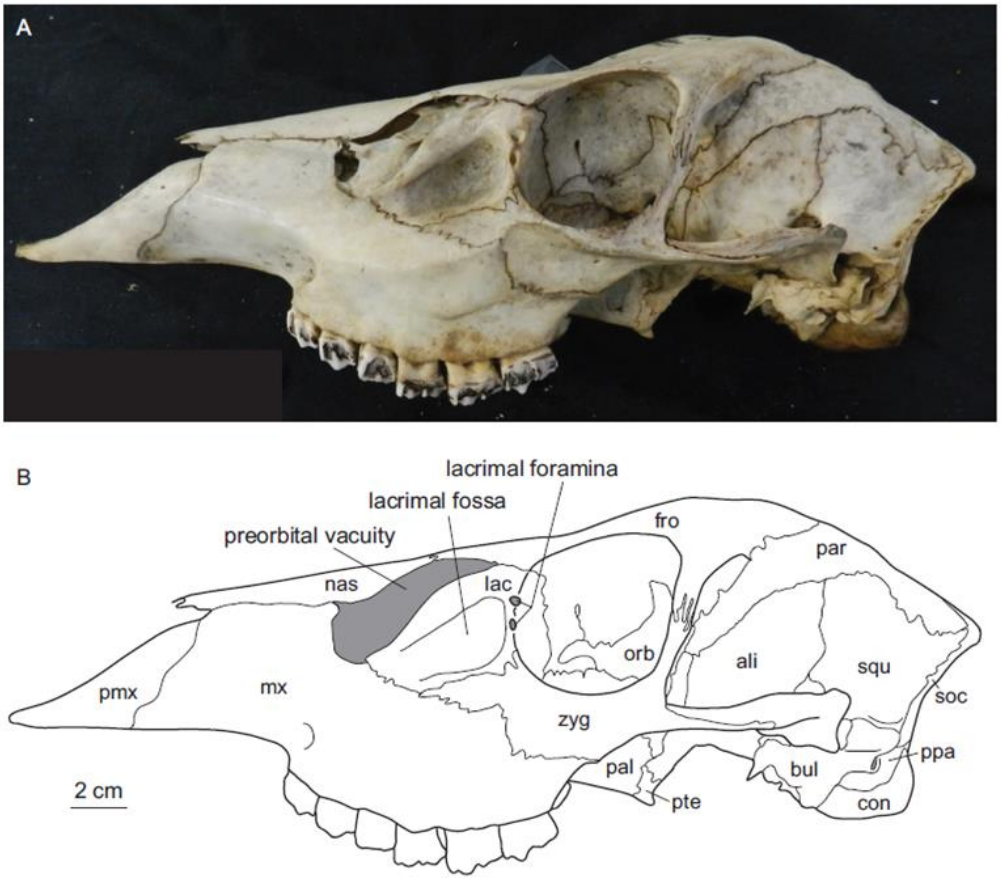


Figura 1. Principais caracteres diagnósticos no crânio de Cervidae (Cetartiodactyla), com a exceção dos chifres, que só ocorrem nos machos. Nessa figura de Heckberg (2020), observa-se a fotografia (A) e o desenho esquemático (B) de um crânio de uma fêmea de cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus* (Iliiger 1815)).

Os chifres dos cervídeos se originaram apenas uma vez na história evolutiva do grupo, sendo as formas ancestrais simples ou com pequena bifurcação saindo da base do chifre. Posteriormente, do final do Mioceno adiante, os chifres se tornaram maiores, mais complexos e com um espaço maior entre a base e a primeira bifurcação (Heckberg, 2020). Os chifres simples em *Mazama* e *Pudu* e sua ausência total em *Hidropotes inermis* são considerados uma condição derivada (Gilbert et al., 2006; Heckberg, 2020).

Estudos moleculares datam a origem de Cetardiodactyla para a transição do Cretácio para o Paleoceno, com estimativas para cerca de 67 mya (milhões de anos atrás) (Zurano et al., 2019). A diversificação dos artiodáctilos e a origem

da subordem Ruminantia ocorrem no Eoceno, favorecidas pela expansão e diversificação das áreas de campo aberto (Zurano et al., 2019; Heckberg, 2020).

A origem de Cervidae é datada para 13 mya (Zurano et al., 2019), sendo que a maior parte da diversificação das atuais subfamílias e tribos de Cervidae (e Bovidae também) ocorreu da metade para o fim do Mioceno (Hernandéz-Fernández e Vrba, 2005). Os principais fatores seriam a expansão das áreas de campo, a formação de corredores biogegráficos que permitiram sua expansão da Eurásia para outros continentes e a irradiação contemporânea de grandes carnívoros (Felidae, Canidae), seus principais predadores (Hassanin et al., 2012).

Na transição Mioceno-Plioceno, por volta de 5 mya, os cervídeos expandiram sua distribuição para a América do Norte e, a cerca de 2,5 mya, para a América do Sul. Essa expansão ocorreu a partir da formação do istmo do Panamá, na conexão do grande intercâmbio de fauna americana (Merino e Rossi, 2010). Tal como a dispersão e irradiação dos bovídeos na África, os cervídeos experimentaram intensa irradiação adaptativa com a colonização da América do Sul, sendo o sucesso de sua adaptação relacionado à ausência de outros ruminantes na região (Webb, 2000; González et al., 2010; Hassanin et al., 2012). Provavelmente, a diversificação da tribo Odocoileini se iniciou antes do intercâmbio americano, quando pelo menos duas linhagens já eram detectadas na América do Norte no Plioceno (Gilbert et al., 2006; Webb, 2000). Dados moleculares apontam que oito linhagens ancestrais das espécies neotropicais poderiam ter participado do intercâmbio, migrando para América do Sul (Duarte et al., 2008). Ademais, Escobedo-Morales et al (2016) levantam a hipótese de que uma segunda dispersão sentido norte, após a diversificação ao sul, estabeleceu a espécie *Mazama temama* (Kerr, 1972) na América Central e México.

A subdivisão da família Cervidae já foi controversa (Merino e Rossi, 2010), porém atualmente é consenso sua subdivisão em duas subfamílias, Capreolinae e Cervinae, que são suportadas tanto por evidências morfológicas, quanto genéticas (Gilbert et al., 2006; Heckberg et al., 2016; Zurano et al., 2019; Heckberg, 2020). Capreolinae é composta por espécies que possuem apenas a parte distal dos metacarpos laterais (2° e 5° dígitos), condição telemetacarpal,

enquanto Cervinae é composta por espécies que possuem apenas a parte proximal dos metacarpos laterais (condição plesiometacarpal) (Gilbert et al., 2006).

A subfamília Cervinae é composta pelas tribos Cervini e Muntiacini, enquanto a subfamília Capreolinae é subdividida nas tribos Alceini, Capreolini, Odocoileini e Rangiferini (Heckberg et al., 2016). O estado da arte das subdivisões da família foi resumido por Heckberg et al. (2016), cuja ilustração foi adaptada na Figura 2.

A relação filogenética entre as tribos de Cervinae é de monofilia recíproca, porém em Capreolinae é menos compreendida. Enquanto alguns estudos apontam uma politomia entre Capreolini, Alceini e a dupla irmã Odocoileini-Rangiferini (Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017), outros apontam a relação de grupo irmão entre Capreolini e Alceini, que por sua vez seriam grupo irmão de Odocoilenini e Rangiferini (Hassanin et al., 2012; Zurano et al., 2019; Heckberg, 2020). Apesar de muitos trabalhos na última década, a reconstituição filogenética na subfamília Capreolinae apresenta uma série de lacunas e alguns gêneros e espécies tem sua validade questionada (Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017; Zurano et al., 2019; Heckberg, 2020).

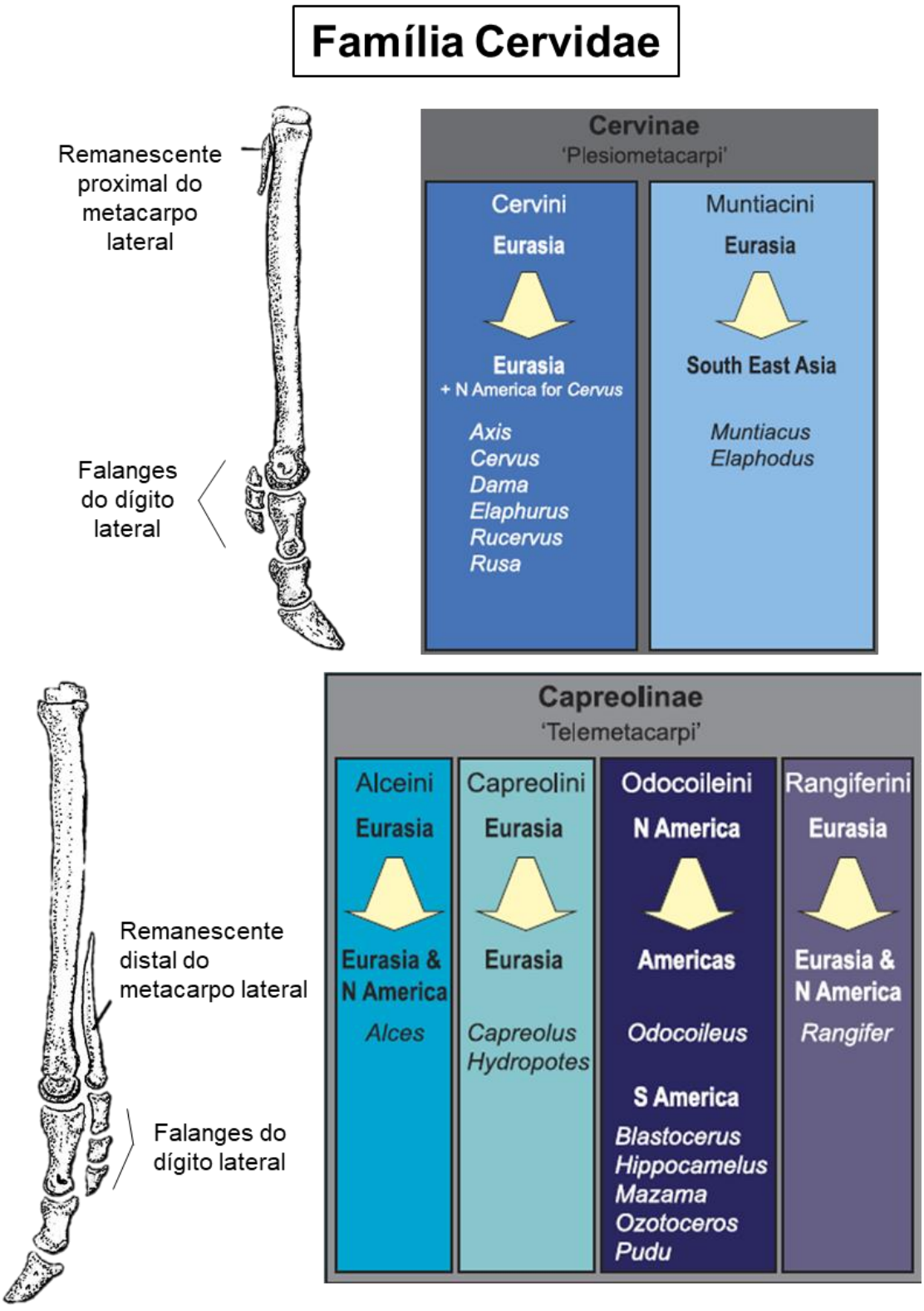


Figura 2. Organização atual de Cervidae (Cetartiodactyla) em duas subfamílias (Capreolinae e Cervinae) e seis tribos (Cervini, Muntiacini, Alceini, Capreolini, Odocoileini e Rangiferini) com suas origens, atuais distribuições e gêneros. Desenho da porção distal de parte do membro de um cervídeo demonstrando a diferença morfológica que caracteriza as duas subfamílias do táxon. Figura adaptada de Heckberg et al (2016).

2.2. Cervídeos Neotropicais e o Gênero *Mazama*

A região Neotropical é uma das oito grandes províncias biogeográficas do planeta, com distribuição desde a região meridional do México, passando por toda América Central e cobrindo toda a parte continental da América do Sul (Udvardy, 1975). Todos os cervídeos da região Neotropical são da tribo Odocoileini, sendo que sua expansão pelo continente sul-americano é a única presença de Cervidae no hemisfério sul (Heckberg et al., 2016). A região Neotropical representa o *hotspot* da diversidade da família, cuja diversidade é a maior entre os ungulados da região (Weber e González, 2003; González et al., 2010).

A divisão filogenética de Odocoileini reconhece dois clados bem suportados (Duarte et al., 2008; Heckber et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017). Tal subdivisão foi identificada por Duarte et al. (2008) como clados “vermelho” e “cinza”, remetendo à caracterização de *Mazama* em dois grupos proposta na edificante revisão taxonômica de Allen (1915). Já Heckberg et al. (2016) definiu essa subdivisão como duas subtribos, nomeando-as de Odocoileina (“clado vermelho”) e Blastocerina (“clado cinza”). Essa seria uma denominação mais adequada, menos propensa à confusão, posto que existem muitas exceções em relação à coloração da pelagem nas espécies envolvidas em cada grupo (Gutiérrez et al., 2017).

Considerando a classificação supra genérica de Heckberg et al. (2016) e a lista de gêneros e espécies de Merino e Rossi (2010), temos 18 espécies para a tribo Odocoilenini, sendo 17 ocupantes da região Neotropical. A única espécie da tribo que não ocorre na região neotropical é *Odocoileus hemionus* (Rafinesque, 1817). Atualizando essa classificação com a revalidação da espécie *Mazama rufa* (Illiger, 1811) (Luduvério, 2018) e a indicação de *Mazama bricenii* Thomas, 1908 como sinônimo júnior de *Mazama rufina* (Bourcier e Pucheran, 1852) por Gutiérrez et al. (2015), mantêm-se 17 espécies de Odocoileini para região, seguindo a organização abaixo:

Ordem Cetartiodacytla
Subordem Ruminantia
Família Cervidae
Subfamília Capreolinae
Tribo Odocoileini

Subtribo Odocoileina
Odocoileus hemionus (Rafinesque, 1817) – região Neoártica
Odocoileus virginianus (Zimmermann, 1780)
Mazama americana (Erxleben, 1777)
Mazama temama (Kerr, 1792)
Mazama rufa (Illiger 1811)
Mazama rufina (Bourcier e Pucheran, 1852)
Mazama nana (Hensel, 1872)
Mazama pandora Merriam, 1901
Mazama bororo Duarte, 1996

Subtribo Blastocerina
Ozotoceros bezoarticus (Linnaeus, 1758)
Blastocerus dichotomus (Illiger, 1815)
Hippocamelus bisulcus (Molina, 1784)
Hippocamelus antisensis (d'Orbigny, 1834)
Mazama gouazoubira (Fischer, 1814)
Mazama nemorivaga (Cuvier, 1817)
Mazama chunyi Hershkovitz, 1959
Pudu puda (Molina, 1782)

Pudu mephistopheles (De Winton, 1896) - posição incerta entre as subtribos (Heckber, 2020)

A literatura evidencia a condição não monofilética do gênero *Mazama*, assim como questiona a monofilia de *Odocoileus* e *Pudu,* o que deve resultar na descrição de novos gêneros para Odocoileini (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Zurano et al., 2019; Heckberg, 2020). À vista disso, o gênero *Mazama* representa o maior desafio à compreensão da diversidade em Odocoileini. A convergência morfológica-evolutiva do gênero (Figura 3) confundiu a organização taxonômica por muito tempo, visto que a diversidade genética do grupo revelou uma polifilia (Figura 4) (Duarte et al., 2008).

A revisão do grupo é iminente e dois novos gêneros devem ser propostos, um para *M. nemorivaga*, e o outro para a linhagem de *M. gouazoubira* e *M. chunyi* (Gilbert et al., 2006; Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012; Gutiérrez et al 2017). O gênero *Mazama* ficará restrito às espécies ligadas a *Mazama americana* (Erxleben, 1777), espécie tipo do gênero (Duarte et al., 2008;

Gutiérrez et al., 2017; Heckberg, 2020). Os possíveis nomes *Nanelaphus* Fitzinger, 1873 e *Passalites* Gloger, 1841 estariam disponíveis para os novos gêneros, porém uma avaliação mais cuidadosa seria necessária para confirmação de suas indicações (Gutiérrez et al., 2017).

Ademais, existem também questionamentos quanto à validade de algumas espécies (e.g. *Mazama bricenii* Thomas, 1908) e são identificados complexos de espécies crípticas para *Mazama americana* e *Mazama nemorivaga* (Duarte et al., 2008; Fiorillo et al., 2013; Gutiérrez et al., 2015; Gutiérrez et al., 2017; Rincón et al., 2020). A perspectiva é de que novas espécies serão descritas ou revalidas para a região Neotropical (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017; Rincón et al., 2020), processo que já se iniciou com a proposta de revalidação de *Mazama rufa* (Luduvério, 2018).

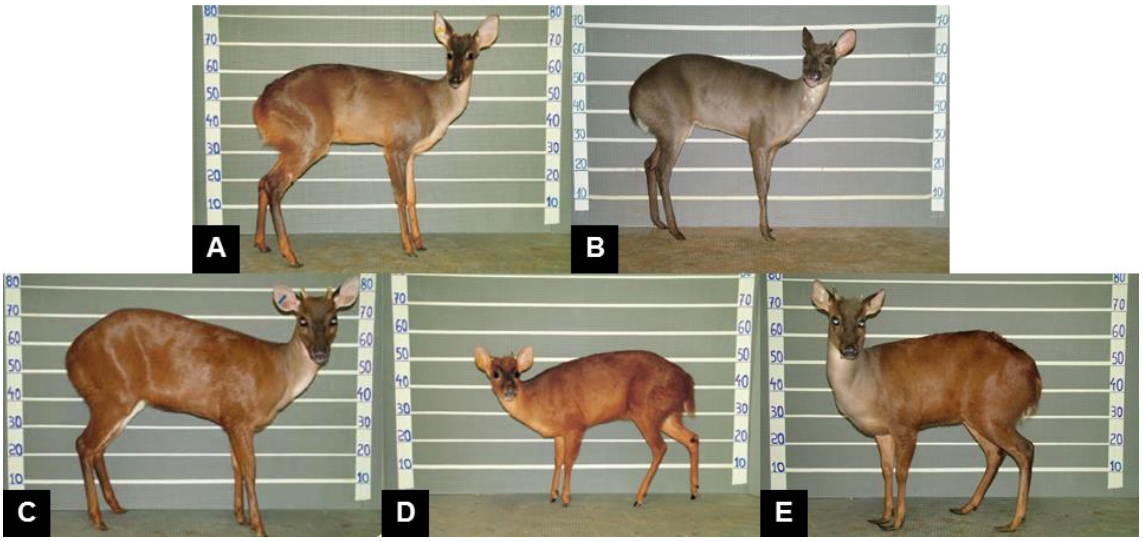


Figura 3. Espécimes adultos de cinco espécies do gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 que ocorrem no territorio brasileiro: (A) veado-catingueiro (*M. gouazoubira* (Fischer, 1814)), (B) veado-roxo (*M. nemorivaga* (Cuvier, 1817)), (C) veado-mateiro (complexo *M. americana* (Erxleben, 1777), (D) veado-da-mão-curta (*M. nana* (Hensel, 1872) e (E) veado-mateiro-bororó (*M. bororo* Duarte, 1996). A parede ao fundo marca a escala de altura marcada em centímetros, fotos de J.M.B. Duarte.

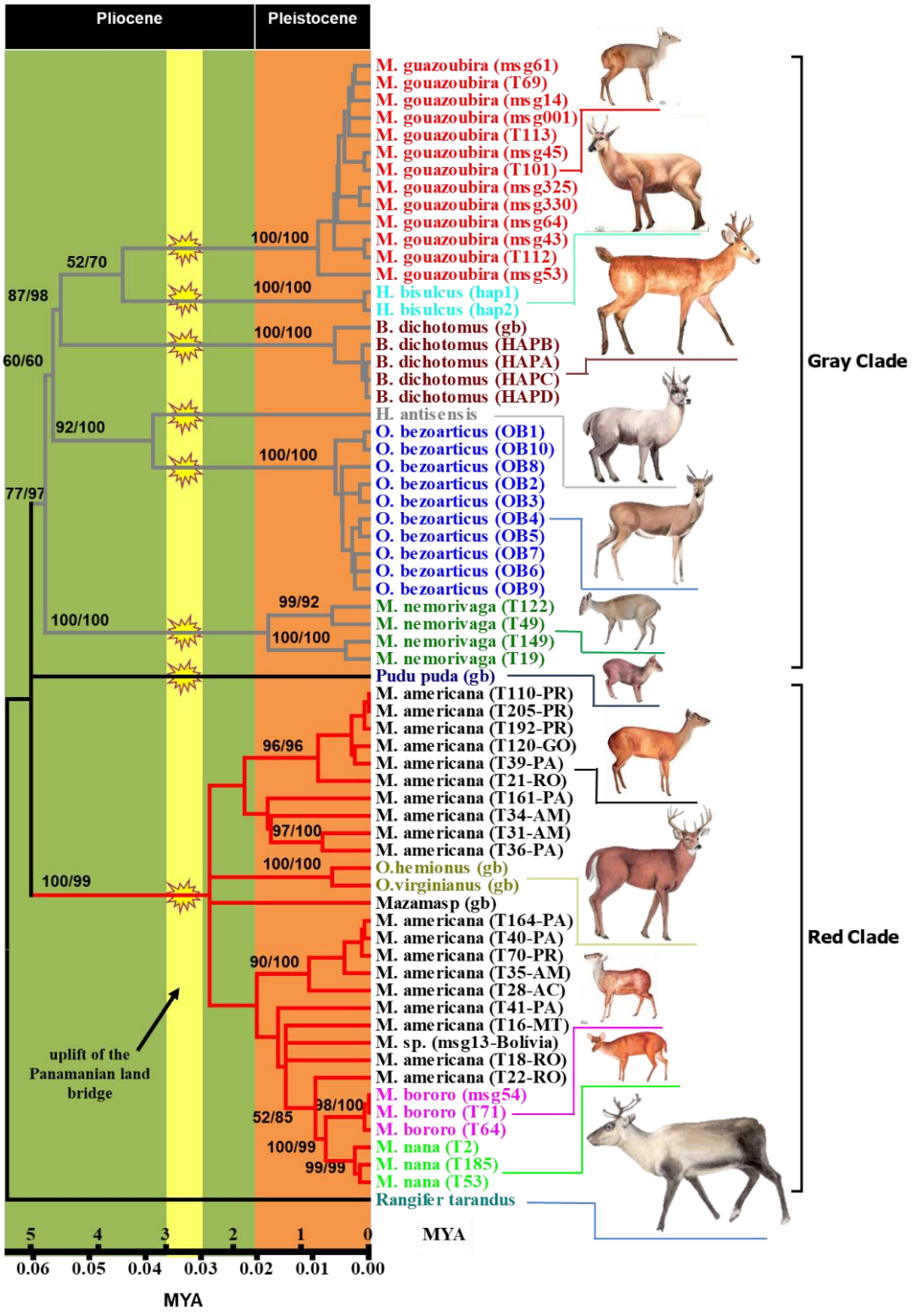


Figura 4. Relações filogenéticas de cervídeos neotropicais (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae) inferidas a partir de uma matriz de 934 pb do gene mitocondrial cytb. O suporte dos clados é apresentado através de valores de *bootstrap* e probabilidade posterior (>50%). Os clados vermelho e cinza são, respectivamente, homólogos às subtribos Odocoileina e Blastocerina *sensu* Heckberg et al. (2016). Figura publicada por Duarte et al. (2008).

A diversidade de *Mazama* não pode ser compreendida sem observar sua caracterização cromossômica. A evolução cromossômica em Cervidae é um caso especial dentre os mamíferos, visto a frequência de rearranjos cromossômicos e a diversidade e amplitude cariotípica da família (Fontana e Rubini, 1990; Abril et al., 2010). A hipótese aceita é a de que fusões cromossômicas (fusões cêntricas e em *tanden*) resultaram na diminuição do número diplóide ao longo da evolução, a partir de um cariótipo ancestral de 2n=70 (Fontana e Rubini, 1990). O perfil desse cariótipo ancestral seria de 68 cromossomos autossômicos acrocêntricos, um cromossomo X acrocêntrico grande e um cromossomo Y metacêntrico pequeno. A diversidade cromossômica na família varia conforme o grupo, posto que algumas espécies não apresentam variação alguma (e.g. *Ozotoceros bezoarticus,* 2n=68; *Blastocerus dichotomus,* 2n=66) e outras tem alta variabilidade, como os gêneros *Mazama* (2n=34-70; Figura 5) e *Muntiacus* (2n=6-46) (Fontana e Rubini, 1990; Abril et al., 2010). Ademais, algumas espécies (e. g. *Mazama americana* e *Mazama nemorivaga*) possuem sistema sexual múltiplo, em que são observados três cromossômos sexuais (X, Y1, Y2) nos machos (Abril et al. 2010; Fiorillo et al., 2013).

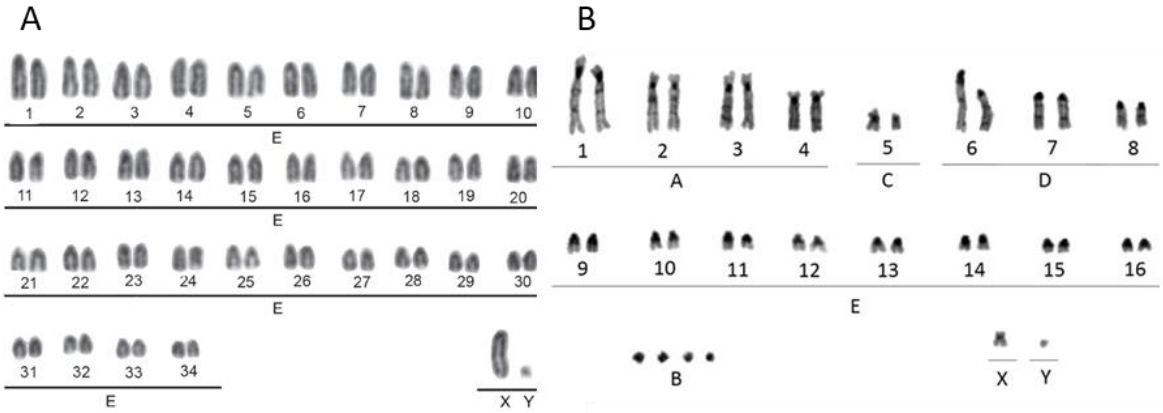


Figura 5. Variação cariotípica no gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 (Cervidae:Capreolinae:Odocoileini) exemplificada por: (A) um carótipo de *Mazama gouazoubira* (Fisher 1814) com padrão 2n=70/NF=70 (Fonte: Abril et al., 2010) e (B) um cariótipo de *Mazama bororo* Duarte 1996 com padrão 2n=34/NF=46 (Fonte: JMB Duarte).

Também são observadas variabilidades cromossômicas intra-específica, entre populações. Duas hipóteses são colocadas para explicar a origem e

manutenção do polimorfismo cromossômico populacional: rearranjos são gerados continuamente a partir de mutações neutras e se fixam perante a alta endogamia de uma população, que pode ter sido geograficamente isolada, ou, alternativamente, seriam resultados de hibridização entre diferentes táxons, formando uma população híbrida (Herzog e Harrignton, 1991). A hibridização entre táxons, no entanto, não parece ser o caso no gênero *Mazama*, posto que foi descartada na análise citogenética dos três veados vermelhos (*M. bororo*, *M. americana, M. nana*) por Duarte e Jorge (2003). São relatados polimorfismos cromossômicos intra-específicos para *M. nana* (2n=36-39 e FN=58) (Abril e Duarte, 2008) e para *Mazama nemorivaga* (2n=66-68/69 e NF=70) (Fiorillo et al., 2013). No entanto, o complexo *M. americana* é o que apresenta a maior amplitude do gênero (2n=42/43-52/53 e NF=46-56) (Abril et al., 2010).

Tal como os dados moleculares, a divergência cromossômica não encontra correspondência morfológica, cuja semelhança pode ser observada em uma comparação entre um espécime de *M. rufa* e outro do complexo *M. americana* (Figura 6):

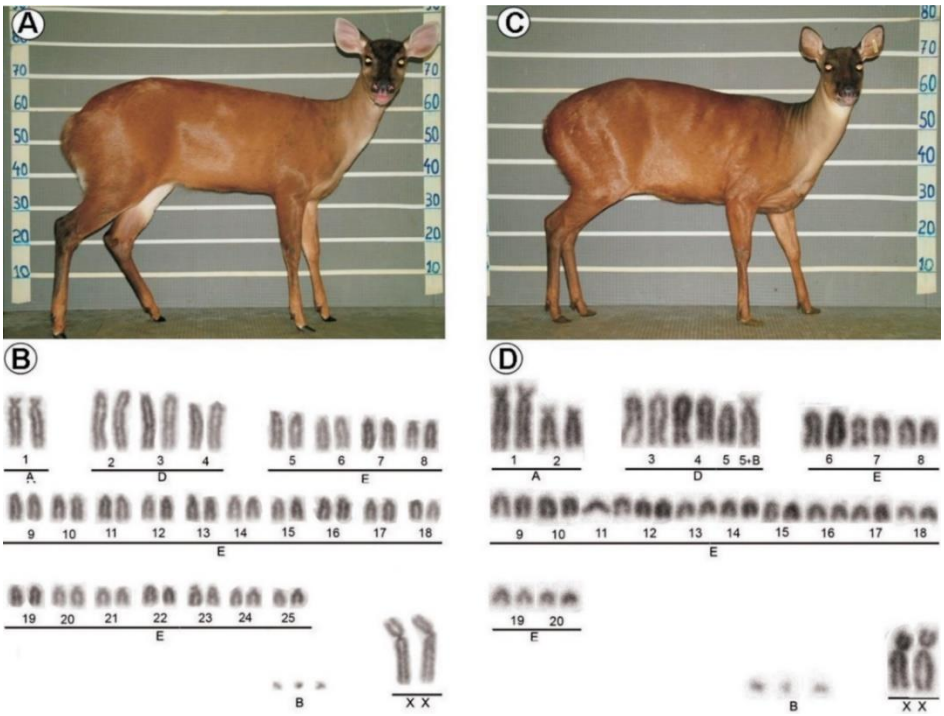


Figura 6. Duas fêmeas de veado-mateiro com seus respectivos cariotipos: (A) *Mazama rufa* (Illiger, 1811), proveniente da Mata Atlântica, com cariótipo (B) 2n=52/NF=56 e (C) espécime do complexo *Mazama americana (*Erxleben, 1777), proveniente do oeste amazônico, com cariótipo (D) 2n=42/NF=46. Figura publicada por Duarte et al. (2008), quando ambos ainda eram considerados complexo *M. americana.*

No estudo de Duarte e Jorge (2003), os autores chegam a indicar diferenças nas medidas corporais de um grupo restrito de espécimes de *Mazama* vermelhos. No entanto, estudos morfológicos do crânio, a partir de diferentes metodologias, falharam em reconstituir as relações filogenéticas e discriminar todas as espécies do gênero (Rossi, 2000; Merino et al., 2005; Duarte et al., 2008; Cassini e Toledo, 2020; Rincón et al., 2020; mas veja González et al., 2018). Essa constatação é compatível com as evidências de que as estruturas crânio-mandibulares estariam ligadas à dieta desses herbívoros (Cassini e Toledo, 2020) que no caso é igualmente sobreposta. A segregação de nicho entre as espécies de *Mazama* não ocorreria pela diferença nos hábitos alimentares mas pela segregação do espaço (Geist, 2000).

O conhecimento sobre a distribuição e segregação espacial das espécies de *Mazama* no Brasil tem avançado (Duarte et al., 2017; Oliveira et al., 2019; Oliveira et al., 2020). Por outro lado, a descoberta da espécie amazônica *M. nemorivaga* na Mata Atlântica do Espírito Santo demonstra como as informações ainda são incipientes (Oliveira et al., 2020). De forma geral, pode-se observar um padrão alopátrico de distribuição em duplas de espécies com aspectos morfológicos e ecológicos semelhantes, como em *M. amerinca* /*M. bororo* e *M. gouazoubira* /*M. nemorivaga* (Figura 7).

No entanto, é observado que a espécie *M. nana* tem distribuição simpátrica com suas congêneres *M. americana* e *M. bororo,* ocorrendo inclusive em sintopia com elas em algumas localidades (Duarte et al., 2017; Oliveira et al., 2019). Estudos apontam que a espécie segrega o espaço em uma escala ambiental fina em relação à *M. americana* (Vogliotti, 2008), como já previa Geist (2000). Enquanto *M. americana* ocorre em áreas florestais de dossel fechado e sub-bosque menos denso, *M. nana* ocorre em áreas de maior densidade vegetal e é mais plástico, posto que ocorre também em áreas alteradas e até florestas com alta densidade de bambu (Vogliotti, 2008; Oliveira et al., 2019).

Por outro lado, a ocorrência simpátrica de espécies “cinzas” e “vermelhas” é explicada pela partição do nicho no eixo temporal. Enquanto as espécies de Blastocerina (*M. nemorivaga e M. gouzoubira*) são diurnas, as espécies de Odocoileina (*M. bororo, M. nana, M. americana*) em sua maioria são noturnas (Oliveria et al., 2015).

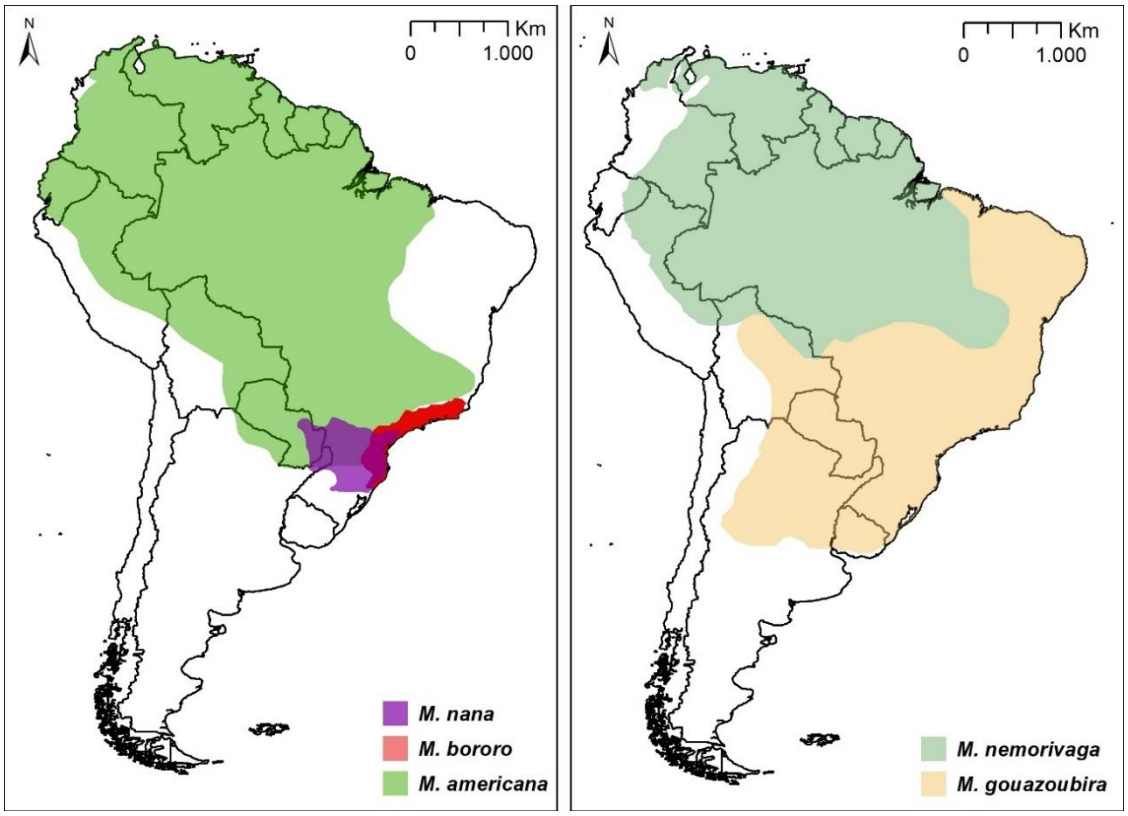


Figura 7. Distribuição geográfica considerada pela IUCN para as cinco espécies de *Mazama* Rafinesque, 1817 (Cervidae:Capreolinae:Odocoileini) que ocorrem no Brasil.

A convergência morfológica-evolutiva das três linhagens que compõem o gênero *Mazama* é relacionada à adaptação ao ambiente florestal (Duarte et al., 2008; Rincón et al. 2020). Tal padrão ficou conhecido como a síndrome de Duíker (ou "*slinker* -furtivo- *syndrome*"), que são pequenos bovídeos das florestas tropicais da África e também apresentam as mesmas características gerais (Geist, 2000). Os cervídeos do gênero *Muntiacus,* pequenos cervídeos das florestas do sudeste asiático, assim como o gênero sul-americano *Pudu*, também fazem parte desse grupo (Barrete, 1987).

Síndromes adaptativas são um conjunto de modificações intrinsicamente relacionadas, em que não é possível desassociar características morfológicas e fisiológicas de estratégias de defesa, alimentação, reprodução, organização social, uso do espaço e outros aspectos ecológicos (Geist, 2000). O grupo dos pequenos ruminantes florestais pode ser definido, em termos gerais, como de

tamanho corpóreo pequeno, com baixo dimorfismo sexual, hábito solitário, sedentário, territorialista, a maioria com atividade noturna, sistema poligínico e de dieta concentrada em itens de alto teor calórico e nutritivo (Barrete, 1987; Putman, 1988; Geist, 2000). Apesar da generalização, várias características particulares desviam as espécies dessa expectativa comum, posto que são altamente adaptadas aos seus ambientes específicos (Barrete, 1987).

A relação das espécies de *Mazama* com ambientes florestais está diretamente ligada à sua conservação. As duas espécies endêmicas da Mata Atlântica, *M. bororo* e *M. nana*, são classificadas como ameaçadas de extinção pela IUCN na categoria vulnerável (IUCN, 2020). A intensa exploração do bioma, que teve cerca de 88% de sua ocorrência natural devastada (Ribeiro et al., 2009), diminuiu a extensão de ocorrência e o contingente populacional das duas espécies (Duarte et al., 2015; Vogliotti et al., 2016). No total das dez espécies do gênero atualmente avaliadas pela IUCN, duas são classificadas como pouco preocupante, seis são classificadas como vulneráveis e duas são classificadas como dados deficientes (IUCN, 2020). Uma das espécies avaliadas como dados deficientes foi *M. americana*, dado a incerteza taxonômica que a envolve (Duarte e Vogliotti, 2016).

2.3. O complexo *M. americana* (Erxleben, 1777) e *M. rufa* (Illiger, 1811)

A espécie *Mazama americana* (Erxleben, 1777) é conhecida popularmente no Brasil como veado-mateiro, mas dependendo da região também é chamado de veado-canela-preta, veado-pardo ou veado-vermelho. A espécie é a maior do gênero, varia de 30-60 kg e de 58-80 cm de altura. A coloração do corpo é marrom-avermelhada, o pescoço e face são acinzentados e as regiões ventral, submandibular, partes internas das coxas e cauda são brancas, pode ter a parte distal dos membros preta (Varela., 2010) (Figura 8). A espécie tem importância cinegética para comunidades rurais e povos indígenas e compõe a dieta dos carnívoros de topo de cadeia do continente (Hurtado-Gonzáles e Bodmer, 2004; Weckel et al., 2006).

Figura 8. O veado-mateiro (complexo *Mazama americana* (Erxleben, 1777)) (Cervidae:Capreolinae:Odocoileini) em vida livre representado por uma fêmea registrada na região do Xingu-MT, à esquerda, e um macho flagrado por armadilha fotográfica no interior de São Paulo, à direita (foto gentilmente cedida por Paula Akkawi de Freitas).

O veado-mateiro hoje é considerado um complexo de espécies crípticas (Duarte et al., 2008; Rincón et al. 2020). Esse conceito pode ter diferentes conotações, mas a definição mais adequada seria a de um conjunto de duas ou mais espécies que são, ao menos superficialmente, de morfologia indistinguível e que erroneamente são classificadas sob apenas um nome (Bickford, et al 2006). Duas espécies do gênero (*M. temama* e *M. bororo*), que anteriormente compunham o táxon, já foram descritas em vista da variação cromossômica extrema em relação aos espécimes de *M. americana* (Jorge e Benirschke, 1977; Duarte e Jorge, 2003). A recente proposta de revalidação de *M. rufa* também é baseada na citogenética (Luduvério, 2018) e Rincón et al. (2020) indica que novas espécies ainda precisam ser descritas para o complexo *M. americana*

A localidade tipo de *Mazama americana* (Erxleben, 1777) é Caiena, na Guiana Francesa, onde ela foi descrita pela primeira vez como *Moschus americanus* Erxleben, 1777 (Thomas, 1913; Allen, 1915). Apesar de atualmente não ter nenhuma subespécie válida (Varela et al., 2010), *M. americana* sempre foi subdividida, variando de três a seis subespécies a depender do trabalho (Allen, 1915; Cabrera, 1960; Czernay, 1987). Após diversas descrições e algumas revisões, atualmente são listados 21 nomes em sua sinonímia (Varela et al., 2010).

A suspeita de que a *Mazama americana,* na verdade, poderia representar um conjunto de espécies se iniciou com a detecção do poliformismo cromossômico em suas populações (Duarte e Jorge, 1996). A descrição abrangente de Duarte (1998) demonstrou a variação nos números diploide (2n=42-53) e fundamental (NF=48-57) da espécie. Esse polimorfismo se apresentou diferente conforme a região de origem dos animais, sendo inferido que seria um polimorfismo entre populações cromossômicas, definidas como diferentes citótipos. Na ocasião foram descritos sete citótipos: Acre (2n=46/47), Rio Negro (2n=44), Manaus (2n=43-44), Carajás (2n=50/51), Rondônia (2n=42/43), Jari (2n=48/49) e Paraná (2n=52/53) (Duarte et al. 1998).

Posteriormente, Abril et al. (2010) avaliou a evolução cromossômica do grupo e definiu seis citótipos: Rondônia (RO) com 2n=42/43 e NF=46, Juína (JU) com 2n=44/45 e NF=48, Jarí (JA) com 2n=48/49 e NF=56, Santarém (SA) com 2n=50/51 e NF=56, Carajás (CA) 2n=50/51 e NF=54 e Paraná com 2n=52/53 e NF=56. Os ciótipos foram identificados como pertencentes a duas linhagens evolutivas diferentes, uma de alto (Paraná, Santarém, Jari, Carajás) e outra de baixo número diplóide (Juína e Rondônia (Figura 9).

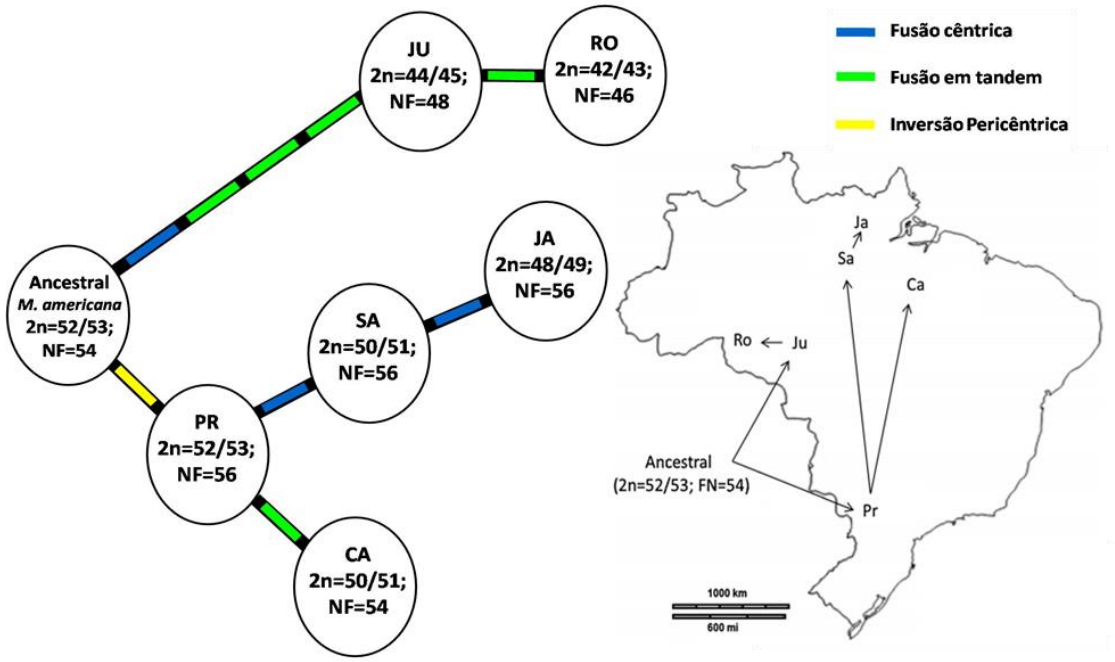


Figura 9.- Hipótese de evolução cromossômica com os principais citótipos do complexo *Mazama americana* (Cervidae:Capreolinae:Odocoileini) e suas localizações de referência no Brasil. Imagem modificada de Abril et al. (2010) e Cursino et al. (2014).

As duas linhagens cromossômicas também foram observadas como clados reciprocamente monofiléticos na topologia gerada a partir de sequências dos genes mitocondriais cytb e d-loop (Abril et al., 2010). No entanto, nessa análise não foram incluídas outras espécies que permitissem avaliar a condição filogenética da espécie. Apesar de observada a polifilia da espécie por Duarte et al (2008), apenas o polimorfismo do cytb não permitiu a separação das linhagens de forma coerente com a caracterização cromossômica e a origem geográfica. Topologia semelhante foi observada em outros estudos de filogenia molecular com o gene cytb, em que *M. americana* ficou dividida em dois clados, em meio a *Odocoileus,* e com um dos clados composto também pelas espécies *M. nana* e *M. bororo* (Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017; Heckberg, 2020). Em Gutiérrez et al. (2017), um animal da Guiana Francesa, localidade tipo, se posicionou no clado também composto pelas espécies *M. nana* e *M. bororo* (Clado 1; Figura 10).

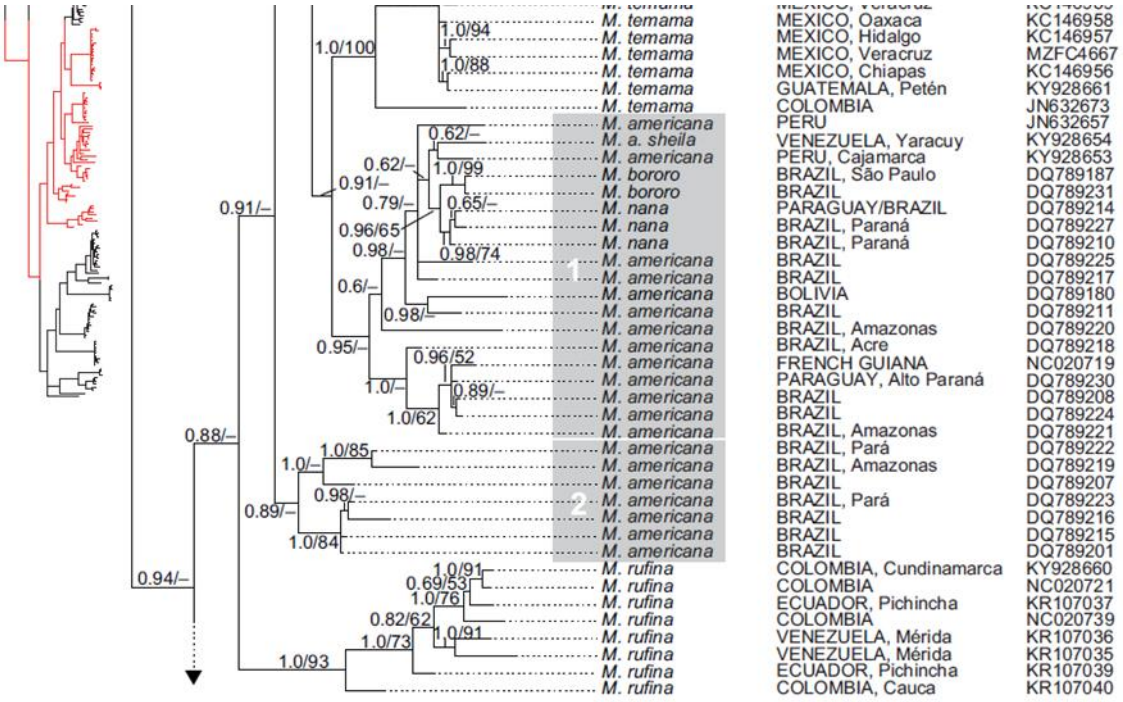


Figura 10. Parte da hipótese filogenética inferida com uma matriz do gene cytb para espécies de cervídeos do novo mundo, tribos Odocoileini e Rangiferini (Cervidae:Capreolinae). Destaque para a polifilia de *Mazama americana* (Erxleben, 1777) que ficou dividida em dois clados. Imagem publicada por Gutiérrez et al. (2017).

O isolamento reprodutivo entre as linhagens de *M. americana* foi testado experimentalmente em cativeiro. Foram realizados cruzamentos entre parentais de linhagens cromossômicas diferentes (alto 2n x baixo 2n) e também entre citótipos distintos dentro da mesma linhagem (PR x CA/ RO x JU) (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017). O estudo de aspectos reprodutivos mostrou infertilidade total ou alto grau de subfertilidade da progênie híbrida entre as linhagens evolutivas distintas e subfertilidade em menor grau nos híbridos entre citótipos próximos (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017). Em vista dos resultados, foi levantada a hipótese de que as duas linhagens evolutivas seriam espécies distintas, e que potencialmente cada citótipo poderia também representar uma espécie (Abril. et al., 2010; Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017).

A descrição de novas espécies a partir desse ponto dependia da designação de um neótipo, frente a inexistência de um holótipo, em que sua caracterização citogenética e molecular seriam cruciais. Para tanto, foi coletado um animal na Guiana Francesa e descrito o neótipo de *Mazama americana* (Rincón et al., 2020). Ele apresentou um cariótipo totalmente diferente dos citótipos observados até então, com 2n=45 e NF=50. Apesar do baixo número cromossômico, o cariótipo observado seria uma derivação do citótipo Paraná e, portanto, integrante da linhagem evolutiva de alto número diplóide. Essa derivação se daria a partir de cinco rearranjos: duas fusões em tandem, duas fusões cêntricas e uma inversão pericêntrica.

A análise filogenética de Rincón et al (2020) também permitiu posicionar o neótipo no clado da linhagem evolutiva de alto número diplóide. Os animais da Guiana Francesa foram recuperados como grupo irmão do clado composto pelos citótipos Paraná e Carajás. Já a linhagem evolutiva de baixo número cromossômico (RO e JU) foi recuperada como grupo irmão de *Mazama bororo* (Rincón et al., 2020). Frente a esses resultados, foi proposto que nenhuma variante cromossômica do Brasil seria de fato *Mazama americana* (Rincón. et al. 2020).

A revisão taxonômica do complexo *Mazama americana* se iniciou, então, com a avaliação do sinônimo mais antigo disponível em sua sinonímia, o nome *Cervus rufus* Illiger 1811, proveniente do Paraguai. Mais uma vez, a falta de um holótipo fez com que fosse necessário designar um neótipo para ancorar o nome

avaliado e compará-lo com o neótipo e os espécimes já caracterizados. A partir da coleta de um animal proveniente da região de fronteira do Brasil com Paraguai, foi realizada a caracterização de informações morfológicas, citogenéticas e moleculares (Luduvério, 2018). O animal apresentou o padrão cromossômico igual ao do citótipo Paraná (2n=52/NF 56) e um grupo de espécimes desse citótipo foi recuperado como monofilético em relação a um grupo da Guiana Francesa, incluído o neótipo. Assim, foi proposta a revalidação da espécie *Mazama rufa* (Illiger 1811).

2.4. Uma palavra sobre a nomenclatura taxonômica do grupo

Se faz importante fazer um resumo da nomenclatura taxonômica ligada às duas espécies. Segundo a revisão de Allen (1915), a primeira descrição inteligível dos pequenos cervídeos florestais sul-americanos vem de um manuscrito de Azara de 1801, mas a publicação completa de fato ocorreu em 1802 (Azara, 1802). Nela Azara descreve com grande detalhamento e acurácia as duas espécies de veados florestais do Paraguai: uma grande e vermelha, de hábitos noturnos (Gouazoupita) e outra menor, marrom e de hábito crepuscular e menos evasivo (Gouazoubira) (Allen, 1915). Os nomes e descrições informais de Azara se tornaram a base da nomenclatura da dupla e seus apontamentos basearam a descrição formal de Illiger (1815), que as nomeou *Cervus rufus* (espécie vermelha) e *Cervus simplicicornis* (espécie marrom).

Logo em sequência, Frederic Cuvier também designou o nome *Cervus rufus* Cuvier 1817, para um veado vermelho proveniente de Caiena, Guiana Francesa, sem menção à espécie de Illiger (Allen, 1915). Na ocasião é descrita também a espécie de veado marrom da Guiana, nomeada de *Cervus nemorivagus* Cuvier 1817. A utilização de *Cervus rufus* Cuvier 1817 se perpetua em vários trabalhos, mas Allen (1915) destaca que se trata de um sinônimo, a antecedência é de Illiger, e claramente o nome *Cervus rufus* não pode ser aplicado para a descrição do animal vermelho da Guiana (Allen, 1915). Por fim, a transferência da espécie do gênero *Cervus* Linnaeus 1758 para *Mazama* Rafinesque 1817 é realizada por Lydekker (1898), posto que o gênero *Mazama* já vinha sendo amplamente aceito, constituindo, assim, o binômio *Mazama rufa* (Illiger, 1815).

Importante citar que Illiger torna público seu trabalho na Academia de Ciências de Berlim em 1811 (Allen, 1915). A publicação de 1815 deixa claro que os trabalhos ali descritos foram apresentados entre 1804 e 1811. Esse fato é relevante pois Fisher (1814) também descreve formalmente os veados de Azara do Paraguai (*Cervus gouazoupita* e *Cervus gouazoubira*). No entanto, a apresentação anterior daria prioridade a Illiger em relação a Fisher, visto a mportância científica das comunicações orais e públicas na época. Posto essa problemática, Luduvério considerou o ano de 1811 na revalidação de *Mazama rufa* (Illiger, 1811).

Ademais, em relação ao veado vermelho da Guiana Francesa, coube à revisão de Thomas (1913) relacionar nome *Moschus americanus* Erxleben, 1777, o mais antigo nome que havia sido designado para um veado-mateiro, ao veado florestal vermelho de Caiena. Assim, o nome foi adaptado para *Mazama americana* (Erxleben, 1777) e ficou definida sua localidade tipo como Caiena, na Guiana Francesa (Thomas, 1913). Vale ressaltar, a título de correção histórica, que o resgate de *Moschus americanus* Erxleben, 1777 da literatura antiga foi realizada por Osgood (1912). No entanto, o autor atribuiu esse epípeto à espécie marrom da Guiana Francesa, originalmente *Cervus nemorivagus* Cuvier 1817. Thomas (1913) aponta que essa atribuição foi um claro erro e que o correto seria relacionar *Moschus americanus* Erxleben, 1777 à maior espécie de veado florestal da região, a espécie vermelha.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras de Referência

Foi selecionado um conjunto de amostras de referência composto por espécimes do gênero *Mazama* com verificação morfológica do animal e avaliação do padrão cromossômico. Todos esses espécimes fazem parte do banco de animais e amostras coletados pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (FCAV, UNESP). Os animais foram

acessados através de criadouros públicos e privados, a maioria com origem na natureza, e também animais coletados diretamente em vida livre. As matrizes biológicas para o DNA variaram entre amostras de tecido (pele, baço), pelo e anel leucocitário de sangue total coletado. Todos os espécimes contam com esse material armazenado em álcool absoluto (tecido morto) e nitrogênio líquido (tecido vivo) e alguns possuem ainda o voucher completo (crânio, pós crânio, pele e tecidos) depositado na coleção, destacadamente os espécimes tipo.

As localidades de origem dos animais só podem ser estimadas, posto que muitas amostras carecem de qualquer referência segura de sua origem na natureza. Foram selecionadas 21 amostras de espécimes do complexo *Mazama americana* (*sensu lato*), incluindo o neótipo sugerido para *M. americana* (*sensu strictu*) e para a recém revalidada *M. rufa*. O conjunto foi composto por representantes dos principais citótipos descritos para o complexo do veado-mateiro (Rondônia, Juína, Paraná e Carajás) e contém espécimes de *M. bororo*, *M. nana* e *M. temama* (Tabela 1; Figura 11). Os citótipos Jari e Santarém (Abril et al., 2010), e outros animais variantes, não foram incluídos dado o baixo número de representantes observados e ocorrência geográfica incerta.

Por fim, o conjunto final de amostras de referência contou ainda com dados obtidos no GenBank para formação da matriz de sequências. Assim, foi adicionada outra amostra de *Mazama americana* proveniente da Guiana Francesa (portanto sem informação cromossômica), duas sequências de *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) e quatro sequências de outras espécies da família Cervidae: *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus, 1758), *Rangifer tarandus* (Linnaeus, 1758)*, Alces alces* (Linnaeus, 1758), *Capreolus pygargus* Pallas, 1777; totalizando 35 animais (Tabela 1).

Tabela 1. Espécimes e sequências utilizados na matriz de referência para análise filogenética do gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 (Odocoileini:Capreolinae:Cervidae). 2n= número diploide, NF= número fundamental. A origem das sequencias é identificada pelos trabalhos de origem ou pelo número de acesso no GenBank.

Espécie	Voucher Nupecce	Citótipo	2n	NF	Matriz	Origem das Sequências		
						Cytb	D-loop	ND5
M. americana	T021	Rondônia	43	46	*ingroup*	DQ789216	GU305930	atual
M. americana	T206	Rondônia	43	46	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T248	Juína	44	48	*ingroup*	atual	GU305935	atual
M. americana	T251	Juína	45	48	*ingroup*	atual	GU305933	atual
M. americana	T253	Juína	43	48	*ingroup*	atual	GU305937	atual
M. americana	T104	Paraná	53	56	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T110	Paraná	53	56	*ingroup*	DQ789201	atual	atual
M. americana	T179	Paraná	53	56	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T205	Paraná	53	56	*ingroup*	DQ789215	atual	atual
M. americana	T255	Paraná	52	56	*ingroup*	atual	GU305927	atual
M. americana	T256	Paraná	52	56	*ingroup*	atual	GU305924	atual
M. americana	T257	Paraná	52	56	*ingroup*	atual	GU305925	atual
M. rufa	T385*	Paraná	52	56	*ingroup*	Luduvério, 2018	Luduvério, 2018	Luduvério, 2018
M. americana	T039	Carajás	50	54	*ingroup*	DQ789223	atual	atual
M. americana	T043	Carajás	49	54	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T167	Carajás	49	54	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T232	Carajás	49	54	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T274	Carajás	50	54	*ingroup*	atual	GU305928	atual
M. americana	T296	Carajás	50	54	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T311	Carajás	51	54	*ingroup*	atual	atual	atual
M. americana	T358*	G. Francesa	45	50	*ingroup*	Rincón et al, 2020	Rincón et al, 2020	Rincón et al, 2020
M. americana	.	.	.	.	*ingroup*	JN632656	JN632656	JN632656
M. nana	T002	.	40	62	*ingroup*	DQ789214	atual	atual
M. nana	T053	.	39	54	*ingroup*	DQ789227	atual	atual
M. nana	T185	.	38	60	*ingroup*	DQ789210	atual	atual
M. bororo	T064	.	32	46	*ingroup*	DQ789228	atual	atual
M. bororo	T071*	.	34	46	*ingroup*	DQ789231	atual	atual
M. temama	T363	.	46	70	*ingroup*	Sandoval, 2019	Sandoval, 2019	Sandoval, 2019
M. temama	T366*	.	44	70	*ingroup*	Sandoval, 2019	Sandoval, 2019	Sandoval, 2019
O. virginiaunus	.	.	.	.	*ingroup*	KM612278	KM612278	KM612278
O. virginiaunus	.	.	.	.	*ingroup*	HQ332445	HQ332445	HQ332445
O. bezoarticus	.	.	.	.	*outgroup*	JN632681	JN632681	JN632681
Rangifer tarandus	.	.	.	.	*outgroup*	KM506758	KM506758	KM506758
Alces alces	.	.	.	.	*outgroup*	JN632595	JN632595	JN632595
Capreolus pygargus	.	.	.	.	*outgroup*	NC025271	NC025271	NC025271

*Espécimes tipo com voucher de referência completo depositado em coleção.

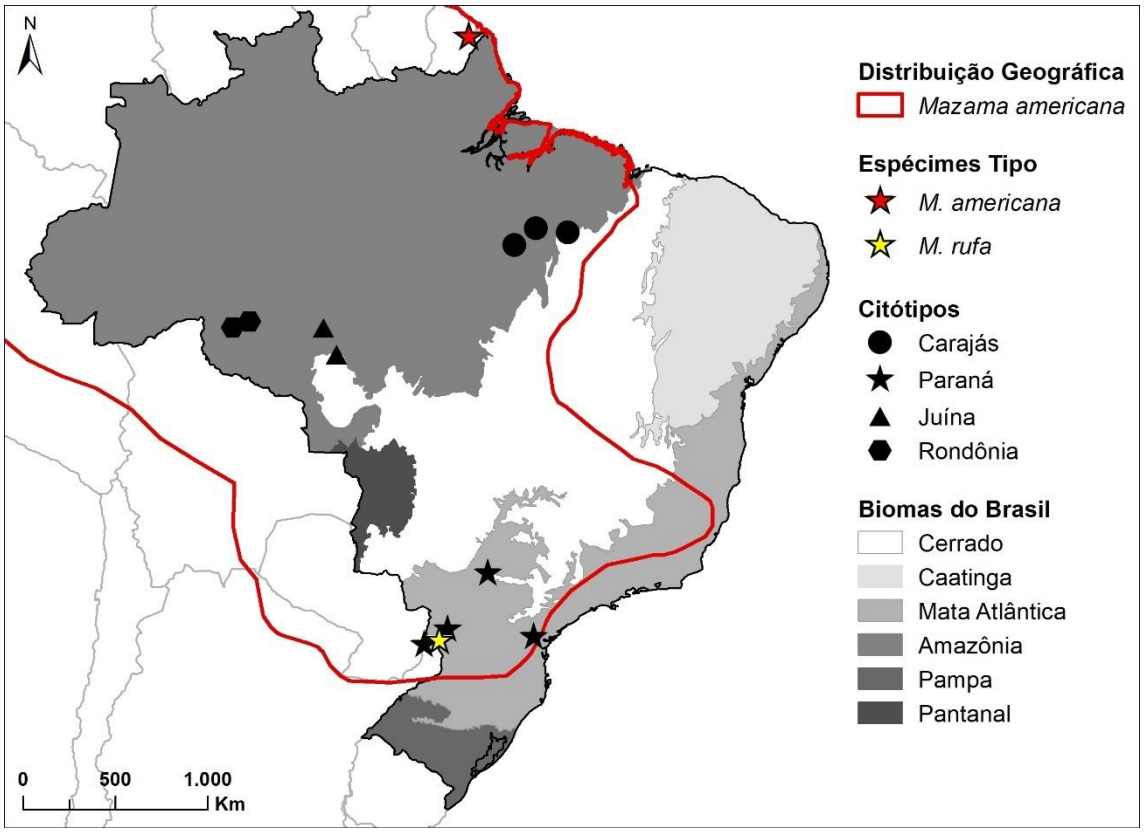


Figura 11. Regiões de origem consideradas para as amostras de referência que possuem indicação de origem geográfica. Estão representados os principais citótipos brasileiros do complexo *Mazama americana* (Erxleben, 1777), juntamente com o ponto de coleta dos neótipos da espécie na Guiana Francesa e de *Mazama rufa* (Illiger, 1811) no sul do Brasil. Mapa temático com os biomas brasileiros segundo classificação do IBGE e distribuição geográfica considerada pela IUCN.

3.2 Amostragem Fecal

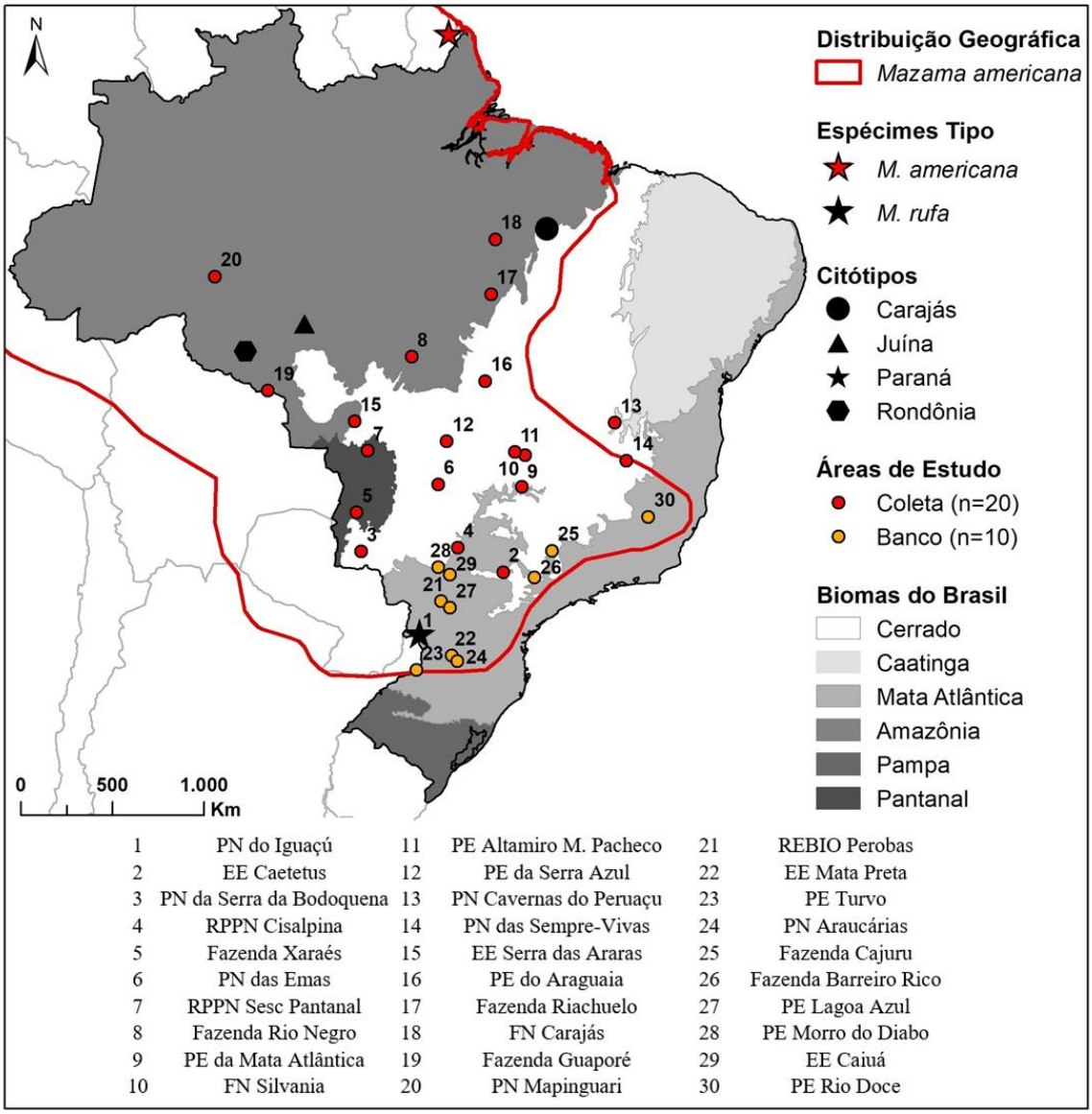
O trabalho de amostragem fecal foi concentrado nos domínios fitogeográficos do Cerrado e Pantanal. Tais regiões de estudo foram delimitadas perante a completa ausência de informação genética da espécie alvo em tais formações, preenchendo, dessa forma, o vazio amostral entre as regiões que já possuíram material avaliado. Excepcionalmente, localidades da Mata Atlântica e da Amazônia também foram incluídas. Em todas as áreas de coleta, a amostragem deu ênfase às formações florestais desses biomas (mata ciliar, mata de galeria, cerradão, floresta estacional), devido à relação intrínseca do veado-mateiro (*Mazama americana*) com tais formações.

Portanto, a coleta foi definida para um conjunto de 20 localidades com base na indicação de possível presença da espécie apontada por planos de

manejo, pela presença de habitat florestal ou por parceiros locais que compartilharam dados de levantamento de fauna. Em adição aos locais de coleta do presente projeto, foram utilizadas amostras fecais de coletas anteriores que compõem o banco do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal, Universidade Estadual Paulista (FCAV, UNESP). Esse material abrange principalmente a região da Mata Atlântica e dele foram selecionadas 10 áreas de estudo com amostras confirmadas de veado-mateiro (Tabela 2; Figura 12).

Tabela 2. Áreas de estudo onde foi realizada amostragem fecal (incluídas áreas que compõe o banco de dados do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos). Siglas: Id= identificação da área de estudo, PN=Parque Nacional, EE=Estação Ecológica, PE= Parque Estadual, FN= Floresta Nacional, REBIO= Reserva Biológica, PI= Unidade de Conservação de Proteção Integral, US= Unidade de Conservação de Uso Sustentável, RPPN=Reserva Particular do Patrimônio Natural, Particular= Propriedade Privada, UF=Unidade da Federação.

Id	Local	Coleta	Classificação da Área	Bioma	UF
1	PN do Iguaçú	atual	PI	Mata Atlântica	PR
2	EE Caetetus	atual	PI	Mata Atlântica	SP
3	PN da Serra da Bodoquena	atual	PI	Cerrado	MS
4	RPPN Cisalpina	atual	RPPN	Cerrado	MS
5	Fazenda Xaraés	atual	Particular	Pantanal	MS
6	PN das Emas	atual	PI	Cerrado	GO
7	RPPN Sesc Pantanal	atual	RPPN	Pantanal	MT
8	Fazenda Rio Negro	atual	Particular	Cer/Amazônia	MT
9	PE da Mata Atlântica	atual	PI	Cer/M. Atlântica	GO
10	FN Silvania	atual	US	Cerrado	GO
11	PE Altamiro M. Pacheco	atual	PI	Cerrado	GO
12	PE da Serra Azul	atual	PI	Cerrado	MT
13	PN Cavernas do Peruaçu	atual	PI	Cer/M. Atlântica	MG
14	PN das Sempre-Vivas	atual	PI	Cerrado	MG
15	EE Serra das Araras	atual	PI	Cerrado	MT
16	PE do Araguaia	atual	PI	Cerrado	GO
17	Fazenda Riachuelo	atual	Particular	Cer/Amazônia	PA
18	FN Carajás	atual	US	Amazônia	PA
19	Fazenda Guaporé	atual	Particular	Amazônia	RO
20	PN Mapinguari	atual	US	Amazônia	AM
21	REBIO Perobas	banco	PI	Mata Atlântica	PR
22	EE Mata Preta	banco	PI	Mata Atlântica	SC
23	PE Turvo	banco	PI	Mata Atlântica	RS
24	PN Araucárias	banco	PI	Mata Atlântica	SC
25	Fazenda Cajuru	banco	Particular	Mata Atlântica	SP
26	Fazenda Barreiro Rico	banco	Particular	Mata Atlântica	SP
27	PE Lagoa Azul	banco	PI	Mata Atlântica	PR
28	PE Morro do Diabo	banco	PI	Mata Atlântica	PR
29	EE Caiuá	banco	PI	Mata Atlântica	SP
30	PE Rio Doce	banco	PI	Mata Atlântica	MG



1	PN do Iguaçú	11	PE Altamiro M. Pacheco	21	REBIO Perobas
2	EE Caetetus	12	PE da Serra Azul	22	EE Mata Preta
3	PN da Serra da Bodoquena	13	PN Cavernas do Peruaçu	23	PE Turvo
4	RPPN Cisalpina	14	PN das Sempre-Vivas	24	PN Araucárias
5	Fazenda Xaraés	15	EE Serra das Araras	25	Fazenda Cajuru
6	PN das Emas	16	PE do Araguaia	26	Fazenda Barreiro Rico
7	RPPN Sesc Pantanal	17	Fazenda Riachuelo	27	PE Lagoa Azul
8	Fazenda Rio Negro	18	FN Carajás	28	PE Morro do Diabo
9	PE da Mata Atlântica	19	Fazenda Guaporé	29	EE Caiuá
10	FN Silvania	20	PN Mapinguari	30	PE Rio Doce

Figura 12. Áreas de estudo com coleta fecal realizada no presente projeto (em vermelho) e oriundas do banco de amostras fecais Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (em amarelo). Figuras em preto representam as localidades de referência para cada citótipo. As estrelas representam as localidades de coleta do neótipo da espécie *Mazama americana* (Erxleben, 1777) na Guiana Francesa (estrela vermelha) e de *Mazama rufa* (Illiger, 1811), no sul do Brasil (estrela preta).

3.3. Coleta de Fezes em Campo

O trabalho de coleta fecal procurou priorizar amostras espacialmente distantes e foram contabilizados 107 dias efetivos de trabalho de coleta em campo. Vale ressaltar que toda coleta dentro de Unidades de Conservação foi devidamente autorizada pelos órgãos de gestão competentes conforme

autorizações SISBIO n°59818; SMA-SP/COTEC n° 260108 – 005.112/2017; SECIMA-GO n°014/2019; SEMA-MT n°004/2018.

A coleta contou com o auxílio de cães de trabalho de faro treinados para o encontro de fezes de todas as espécies de cervídeos brasileiros (Figura 13A). Os trajetos em campo foram percorridos pelo pesquisador acompanhado de um cão, que trabalha solto e se movimenta em um raio máximo de 20 m ao redor do condutor (Figura 13B). No que diz respeito ao seu treinamento, o cão foi habituado à presença de outros animais, como medida de impedir a interação com a fauna nativa durante o trabalho em campo. Concomitante ao trabalho, foi mantido rígido controle sanitário sobre o animal para evitar a introdução de enfermidades nas áreas de estudo e preservar sua própria saúde. Tal controle foi feito entre cada expedição, quando o cão retornava para avaliação veterinária no Hospital Veterinário da FCAV, UNESP câmpus de Jaboticabal.

Figura 13. (A) Cão de trabalho de faro (cadela Nicks, sem raça definida) para encontro de fezes de cervídeos, equipada com coleira rastreadora e com seu brinquedo de recompensa. (B) Trabalho de busca de fezes em campo (cadela Granada, sem raça definida), na qual o cão trabalha solto em um raio ao redor do pesquisador. (C) Pilha fecal de veado do gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 (Odocoileini:Capreolinae: Cervidae) coletada no Pantanal Sul-Matogrossense.

As amostras fecais foram classificadas visualmente como “fresca” (com muco, cor original e ausência de fungo) ou “velha” (sem muco, escurecidas e/ou quebradiças, algumas com fungo). O local de coleta de cada amostra fecal (Figura 13C) teve sua coordenada geográfica anotada para posterior georreferenciamento. As amostras foram coletadas sem o contato com as mãos e armazenadas em tubos plásticos de centrífuga com tampa de rosca (Falcom 50 mL). Etanol absoluto foi adicionado aos tubos para a preservação do DNA contido nas fezes, mantendo sempre uma proporção mínima de 1 volume de fezes para 4 de álcool (aproximadamente 40 mL de etanol).

3.4 Extração, Amplificação e Sequenciamento das Amostras de Referência

A extração de DNA foi realizada pelo protocolo de fenol-clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989), para amostras de anel leucocitário do sangue, e através do kit de extração *Wizard® SV Genomic DNA Purification System* (Promega), para amostras de pelo e tecido.

Foram sequenciados parte dos genes mitocondriais Citocromo-b (Cytb; 995 pb), NADH desidrogenase subunidade 5 (ND5, 1180 pb) e parte da região controladora D-loop (453 pb) através de cinco fragmentos amplificados pelos iniciadores indicados na Tabela 3, sendo duas regiões do Cytb, duas do ND5 e uma do D-loop. As reações de PCR foram padronizadas para um volume final de 30ul (27ul de mix e 3ul de DNA aproximadamente com 50ng/ul), contendo 1x de tampão e 1 U de *Taq* DNA polimerase (ambos Platinum™, Thermo Fisher Scientific), 1,8 mM de $MgCl_2$, 3,6 mM de dNTP, 1 mg/ml de BSA, 0,5 pM de cada iniciador. As reações foram realizadas num termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler, sob as seguintes condições: um passo inicial de 94 ° C durante 2 min seguido de 36 ciclos de (1) 94 ° C durante 1 min, (2) 55 ° C durante 30 segundos, (3) 72 ° C durante 30 segundos e, ao final, uma extensão a 72 ° C durante 10 min.

A obtenção dos fragmentos de interesse foi confirmada por meio da visualização do produto da PCR por eletroforese em gel de agarose a 2%. Os fragmentos amplificados foram purificados através do kit *Wizard® SV Gel and*

PCR Clean-Up System (Promega) e enviados para sequenciamento. O DNA foi sequenciado nos dois sentidos em um sequenciador automático ABI 3730 XL através de serviço prestado pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da FCAV, UNESP. As sequências “foward” e “reverse” de cada amostra foram exportadas para o aplicativo BioEdit 7.2.6 (Hall, 1999), onde seus eletroferogramas foram revisados visualmente. Ao final, foi realizada a montagem de uma sequência consenso para cada amostra.

Tabela 3. Características dos oligonucleotídeos iniciadores utilizados para amplificação de DNA mitocondrial de amostras do gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 (Odocoileini:Capreolinae: Cervidae).

Gene	Tamanho Fragmento	Identificação	Iniciador (5'-3')	Fonte
Cytb	480pb	L14724 H15149	CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA	Irwin et al. (1991)
Cytb	660pb	FARH FARL	TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTTCA CCATGAGGACAAATATCATTCTGAT	Duarte et al. (2008)
D-loop	660pb	Thr- L15926 DL-H16340	CAATTCCCCGGTCTTGTAAACC CCTGAAGTAGGAACCAGATG	Vilà et al., (1999)
ND5	690pb	Leu 11775 ND5 12477	GGTGCAACTCCAAATAAAAG TTTTCCRGTTGCAGCTARTG	Caparroz et al. (2015)
ND5	690pb	ND5 12326 ND5 12988	TCTAGCAATAGCATGATTYC TGTTATTAGGAGGGCTCAGG	Caparroz et al. (2015)

3.5 Extração, Amplificação e Sequenciamento das Amostras Fecais

O DNA fecal das amostras coletadas foi extraído utilizando o kit de extração *QIAamp Fast DNA Stool MiniKit* (QIAGEN) segundo o protocolo descrito pelo fabricante. Os procedimentos laboratoriais contaram com o uso de controle branco sistematicamente em todas as etapas de extração e amplificação para detecção de contaminações cruzadas e o processamento ocorreu em laboratório exclusivo para amostras de DNA de baixa qualidade.

Primeiramente, as amostras de fezes foram triadas geneticamente para excluir das próximas etapas de caracterização outras espécies de cervídeos que ocorrem nas regiões de coleta, potencialmente em simpatria com o complexo *Mazama americana*. Essa etapa é necessária visto que não é seguro distinguir as espécies de cervídeos brasileiros através da morfologia/morfometria das fezes (Costa et al 2017). Nesse sentido, vale ressaltar que as áreas de estudo onde foram realizadas as coletas fecais possuem, também, a ocorrência do

veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira* (Fisher, 1814)), veado-roxo (*Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817)), veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*) e cervo-do-pantanal (*Blastocerus dichotomus* (Illiger, 1815)). A distinção genética das amostras do complexo *Mazama americana* em relação as demais espécies foi possível com a utilização de uma região do gene Cytb já atestada para o mesmo fim por González et al. (2009) e Souza et al. (2013). A análise realizada está exemplificada no Apêndice A.

Dada a condição de maior degradação do DNA obtido nas fezes do que em relação a outras matrizes biológicas (Beja-Pereira et al 2009), a amplificação desse DNA foi realizada apenas para pequenos fragmentos. Para isso, foram desenvolvidos iniciadores que amplificassem regiões internas aos cinco fragmentos amplificados para as amostras de referência. Destaca-se que os iniciadores do Cytb puderam ser aproveitados de trabalhos anteriores com DNA fecal, já que são conservados para as espécies de cervídeos brasileiros, sendo um par deles da própria região utilizada para triagem inicial das espécies (IDMAZ224-L e IDMAZ-H). Os demais foram desenvolvidos a partir da matriz de amostras de referência, selecionando aqueles que coincidissem com regiões conservadas e que amplificassem regiões polimórficas com no máximo 350 pb para aplicação no DNA fecal (Tabela 4).

As matrizes de cada fragmento das amostras de referência foram carregadas separadamente na plataforma PrimerQuest Tools para busca e seleção de sequências de iniciadores com base em critérios específicos. Para tanto, alguns parâmetros foram personalizados na plataforma visando atender as necessidades do trabalho. Foram definidos parâmetros para PCR em Geral (General PCR – Primers only), como temperatura de anelamento (*primer Tm*; mínima 50, ótima 55, máxima 60), composição de bases GC (*primer* GC) de 40 a 60 %, tamanho dos iniciadores (*primer size*) de 17 a 22 nucleotídeos e tamanho do *amplicon* de 100 a 350 bp, com valor ótimo de 250 pb. Depois de selecionado pares de iniciadores de interesse, eles foram testados para a presença de estruturas secundárias (formação de dímeros e *harpins*) no programa GeneRunner 6.5.1 e perante sua especificidade através da ferramenta Primer-BLAST do NCBI, comparando com as sequências de Cervidae no GenBank.

Tabela 4. Características dos oligonucleotídeos iniciadores para amplificação de DNA fecal no gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 (Odocoileini:Capreolinae: Cervidae).

Região	Tamanho Fragmento	Identificação	Iniciador (5'-3')	Fonte
Cytb	224 pb	IDMAZ224-L IDMAZ-H	CATCCGACACAATAACAGCA TCCTACGAATGCTGTGGCTA	González et al 2009
Cytb	305 pb	Cit305 F Cit305 R	CCATCAGACGCAGACAAA GCGTTGTTTAGATGTGTGAAG	Leandro, 2019*
D-loop	305 pb	D-loopb_Fec F D-loopb_Fec R	TTGCACTCAACAGCCATATT GACTGCATGGACTTGCTTAT	atual
ND5	249 pb	ND5a_Fec F ND5a_Fec R	TCTCAAACTGACACTGACTTAC TGCATCTGTTCGTCCATATC	atual
ND5	249 pb	ND5b_Fec F ND5b_Fec R	CCAACCCTACCTAGCATTTCTC TACGACGTATTGGCGGTTTC	atual

*Relatório Científico Final FAPESP processo 2017/26529-9.

A amplificação dos pequenos fragmentos a partir do DNA fecal foi realizada para amostras identificadas como pertencentes ao complexo *M. americana* e selecionadas perante sua distribuição. Todas as amostras selecionadas passaram por um crivo de independência espacial visando evitar a análise repetida de um mesmo indivíduo. Para tal fim, foi adotado a distância mínima de 1 km entre amostras, valor baseado no comprimento de área de vida disponível para o gênero (Maffei e Tabber, 2003; Vogliotti, 2003; Peres, 2015). Dessa forma fica assumida a premissa de que cada amostra fecal selecionada para amplificação corresponde a um indivíduo diferente.

A reação de PCR foi padronizada para um volume final de 30ul (25ul de mix e 5ul de DNA), contendo 1x de tampão e 1,5 U de *Taq* DNA polimerase (ambos Platinum™, Thermo Fisher Scientific); 2 mM de $MgCl_2$; 0,6 mM de dNTP; 1,3 mg/ml de BSA e 0,5 pM de cada iniciador. As reações foram realizadas num termociclador Bio-Rad C1000 Touch™ Thermal Cycler em um protocolo *touch down* que totalizou 45 ciclos sob as seguintes condições: um passo inicial de 94 ° C durante 2 min; seguido de 5 ciclos de 94°C-50 seg/ 58°C-50 seg/ 72°C-50 seg; 6 ciclos de 94°C-50 seg/ 57°C-45 seg/ 72°C-50 seg; 8 ciclos de 94°C-50 seg/ 56°C-40 seg/ 72°C-50 seg; 13 ciclos de 94°C-50 seg/ 55°C-30 seg/ 72°C-50 seg; 13 ciclos de 94°C-50 seg/ 54°C-30 seg/ 72°C-50 seg e por fim uma extensão a 72 ° C durante 10 min.

Após a amplificação, o material seguiu os mesmos procedimentos descritos no item anterior com a verificação em gel de agarose, purificação

através de kit, envio para sequenciamento nos dois sentidos pelo CREBIO/UNESP, revisão detalhada dos eletroferogramas e montagem de sequência consenso para cada amostra.

3.6. Caracterização das Matrizes de DNA: alinhamento, polimorfismo, modelo evolutivo e saturação

Primeiramente, as sequências consenso de cada fragmento e as sequências obtidas no GenBank foram alinhadas no servidor *on-line* Mafft (Katoh et al., 2017), com o alinhamento revisado e delimitado através do aplicativo Bioedit 7.2.6. O programa MEGA X (Kumar et al. 2018) foi utilizado para traduzir as sequências de DNA dos genes Cytb e ND5 em sequência de aminoácidos para busca por *stop codons* prematuros. Esse procedimento indicaria possíveis pseudogenes, e possibilitou o ajuste do alinhamento ao *frame* correto de códons, ideal para futuras análises de saturação e partição.

Logo, as cinco matrizes alinhadas foram concatenadas em uma matriz final de referência e outra final de DNA fecal através do aplicativo Mesquite 3.61 (Maddison e Maddison, 2019). A matriz de referência, proveniente de amostras de DNA de qualidade, totalizou 2625 pb. A matriz de DNA fecal, proveniente da amplificação do DNA das fezes, derivada dos pequenos fragmentos, totalizou 1104 pb. O trabalho de análise explorou ainda, secundariamente, outras quatro matrizes derivadas das amostras de referência para observar o polimorfismo e o sinal filogenético dos diferentes genes e da matriz de DNA fecal. Para tanto, foram utilizadas as três matrizes de cada um dos genes (Cytb, 993 pb; D-loop, 453 pb; ND5, 1179 pb) e um recorte da matriz de referência para os pequenos fragmentos que compõe o delineamento de DNA fecal (1104 pb).

O polimorfismo de cada matriz foi caracterizado através do aplicativo MEGA X, contabilizando os sítios variáveis (sítios com mutação em ao menos um animal) e os sítios parcimoniosamente informativos (PICs; sítios com mutações presentes em ao menos dois indivíduos). Foi considerado o melhor modelo para o conjunto de dados de cada matriz aquele com menor valor de AIC, dentre os 56 modelos evolutivos testados por meio do aplicativo jModelTest 2.1.4 (Darriba et al. 2012). Para avaliar a ocorrência de saturação em cada matriz, foi estimado o índice de saturação por substituição (Iss) pelo método de Xia et al (2003) e Xia e Lemey (2009). O sinal de saturação é considerado fraco

quando o Iss estimado é significativamente menor (p<0,05) que o de referência (Iss.c). Para a análise de saturação, também foi observado o gráfico de correlação entre transversões/transições em função da distância genética. Ambas análises foram realizadas através do programa DAMBE 7.2 (Xia, 2018). Para tanto, foram testadas as matrizes completas de referência e de DNA fecal, assim como os três genes individualmente para a matriz de referência. A saturação foi testada para os genes Cyt-b e ND5, em específico, perante a partição de suas matrizes de acordo com as posições do códon. Uma partição continha a posição 1 e 2 e a outra a posição 3, dada a maior taxa de substituição dessa.

3.7. Análise Filogenética Baseada em Caracteres Moleculares

As hipóteses filogenéticas foram inferidas para cada uma das matrizes citadas de forma independente, mas seguindo o mesmo protocolo. Dessa forma, as análises filogenéticas foram executadas com o critério de inferência bayesiana (IB) no pacote BEAST 1.10.4 para todas as matrizes. Adicionalmente, a análise filogenética foi realizada através do algoritmo de máxima verossimilhança (MV) denominado *Randomized Axelerated Maximum Likelihood* (RAxML) apenas para a matriz de referência completa. As análises tiveram como *ingroup* todos os animais da sub-tribo Odocoileina, o clado vermelho da tribo Odocoileini (no presente trabalho representada pelas espécies do gênero *Odocoileus* Rafinesque, 1832 e *Mazama* Rafinesque, 1817). O *outgroup* foi composto pelas quatro sequências de *Ozotoceros bezoarticus* (sub-tribo Blastocerina, o clado cinza da tribo Odocoileini), *Rangifer tarandus* (grupo mais externo dentro da tribo Odocoileini), *Alces alces* (tribo Alceini) e *Capreolus pygargus* (tribo Capreolini).

Na análise de IB, o modelo evolutivo selecionado e os parâmetros de corrida foram implementados por meio do aplicativo BEAUti do pacote BEAST para gerar o arquivo de entrada da análise, implementada através do servidor on-line CIPRES *Science Gateway* (Miller et al., 2010). A análise de MCMC (*Monte Carlo Markov Chains*) contou com 30 milhões de gerações para a matriz de referência e seus recortes e 50 milhões para a matriz de DNA fecal completa. A análise teve a amostragem a cada mil gerações, e foi realizada com três corridas distintas. Foram utilizados o modelo de relógio *lognormal uncorrelated*

relaxed clock, que não assume uma taxa de substituição constante, e o modelo de árvore de especiação através de *Yule process*, que assume uma taxa constante de especiação entre linhagens. Os dados das três corridas independentes foram combinados através do aplicativo Log Combiner do pacote BEAST 1.8. Os dados das árvores geradas foram sumarizadas na melhor árvore, sendo aplicado um *burn-in* de 30% e anotados os valores de suporte de probabilidade posterior (PP) através do aplicativo Tree Annotator do pacote BEAST 1.8. A convergência da análise foi verificada por intermédio do aplicativo Tracer v.1.7, e foi considerada satisfatória quando apresentou valores de ESS (*Estimated Sample Size*) maiores que 200. As árvores finais foram visualizadas e editadas pelo aplicativo FigTree 1.4. (http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/).

Por fim, a análise de máxima verossimilhança foi aplicada através da análise de RAxML (Stamatakis, 2014) apenas para a matriz de referência completa, sendo implementada através do servidor on-line CIPRES *Science Gateway* (Miller et al., 2010). Como parâmetros da análise foi utilizado o modelo evolutivo GTR, único modelo disponível para essa abordagem, e foram realizadas 1000 réplicas de *bootstrap* (BTS) para o cálculo de suporte dos nós, adotando os valores padrão para os demais parâmetros segundo Stamatakis (2014).

3.8 Delimitação Molecular de Espécies da subtribo Odocoileina

Foi utilizado o método coalescente *General Mixed Yule Coalescent* (GMYC) para identificação de *molecular operational taxonomic units* (MOTUs) através do pacote SPLITS (SPecies LImits by Threshold Statistics; Monaghan et al., 2009) no programa R (R Core Team, 2020). Tal abordagem avalia a taxa de cladogênese ao longo de uma árvore ultramétrica gerada por IB, identificando um limiar em que há uma mudança significativa dessa taxa. A mudança indica a transição do processo de cladogênese entre espécies para intra-espécie (Pons et al., 2006; Fujita et al, 2012). Para essa análise, é necessário obter uma hipótese filogenética com uma árvore ultramétrica e é recomendado apenas a inclusão do *ingroup* para a análise, visto que as sequências do *outgroup* podem ter forte influência no resultado e enviesá-lo. A hipótese do modelo GMYC foi testada com um e com múltiplos limiares. Na análise, a probabilidade do modelo GMYC é comparada perante a probabilidade de um modelo nulo, no qual apenas

uma unidade é identificada (ausência de unidades dentro do grupo analisado), retornando um valor de significância da análise comparativa (PONS et al., 2006). A hipótese de que os modelos eram diferentes foi aceita quando apresentaram $p<0,05$.

Ao final, para a matriz de referência completa, analisada também pelo critério de máxima verossimilhança, foi realizada a abordagem de delimitação molecular “Poisson Tree Process” (PTP). Essa análise pode ser aplicada para árvores não-ultramétricas, provenientes de análises de MV. Nessa abordagem, é avaliada a taxa de substituição, em que cada MOTU identificada é acompanhada de um valor probabilístico. A análise de PTP foi realizada utilizando seu servidor on-line (http://species.hits.org/).

4.RESULTADOS

4.1. Coleta e Triagem de Amostras Fecais de Cervidae

O trabalho de campo resultou na coleta de 241 amostras fecais de cervídeos. Dentre o conjunto, 16% foram amostras frescas e o restante apresentou amostras consideradas velhas, em diferentes graus de degradação e com presença de fungo. Não foi possível correlacionar o sucesso de amplificação à idade das amostras (resultado não apresentado).

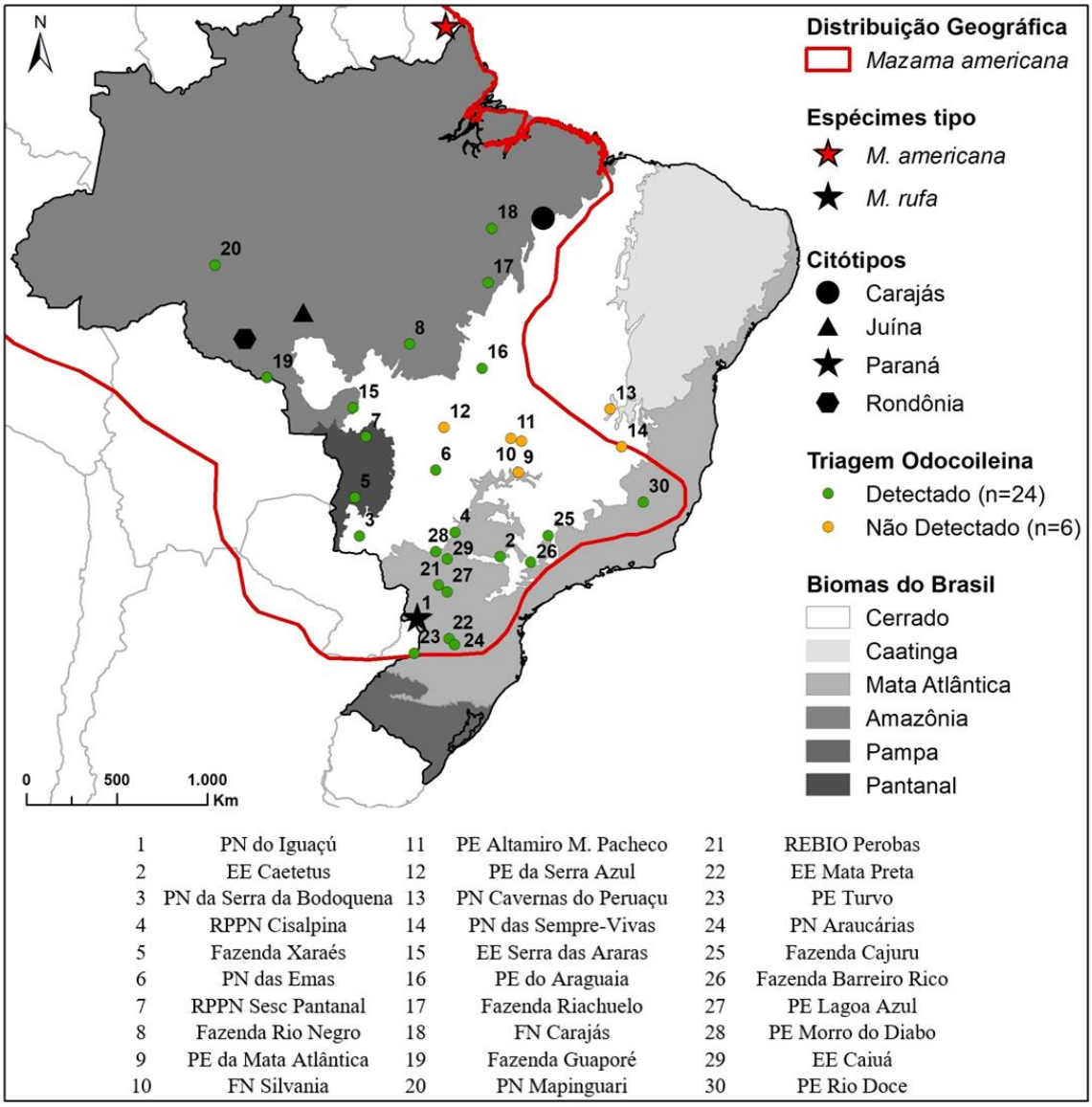
O processo de triagem de espécies não foi realizado para todas as amostras, porém permitiu a identificação com sucesso de 147 delas (Tabela 5). Dentre as identificações, destaca-se a detecção de *Mazama americana* (*sensu lato*) em 14 áreas de estudo das 20 coletadas. Do conjunto de amostras da espécie (n=101), 48 foram independentes espacialmente e consideradas como indivíduos distintos pela premissa espacial assumida. Seguindo o mesmo protocolo, 51 amostras de veado-mateiro espacialmente independentes foram triadas a partir do banco de fezes do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos para as 10 áreas de estudo previamente selecionadas.

Desse modo, um conjunto de 99 amostras de 24 áreas de estudo ficou disponível para a próxima etapa de sequenciamento e inferência filogenética (Figura 14). Tendo como critério a seleção de pelo menos duas amostras de

cada área de estudo, foram selecionadas 46 amostras para amplificação e sequenciamento dos cinco fragmentos propostos para as análises subsequentes. Áreas de estudo vizinhas (22-24; 21-27; 28-29) foram consideradas como a mesma localidade.

Tabela 5. Sumário do número de amostras de diferentes espécies de cervídeos (Cervidae) encontradas nas áreas de estudo prospectadas. M.am = complexo *Mazama americana* (Erxleben, 1777), M.go = *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814), M.ne = *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), O.be= *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus, 1758); PN= Parque Nacional; RPPN= Reserva Particular do Patrimônio Natural; PE= Parque Estadual; EE = Estação Ecológica; FN = Floresta Nacional.

Id	Local	Amostras Coletadas	Amostras Identificadas	*M. am*	*M. go*	*O. be*	*M. ne*
1	PN do Iguaçú	5	5	5	0	0	0
2	EE Caetetus	5	3	3	0	0	0
3	PN da Serra da Bodoquena	5	4	3	1	0	0
4	RPPN Cisalpina	11	3	3	0	0	0
5	Fazenda Xaraés	26	22	16	6	0	0
6	PN das Emas	11	10	6	1	3	0
7	Sesc Pantanal	41	36	36	0	0	0
8	Fazenda Rio Negro	10	4	2	0	0	2
9	PE da Mata Atlântica	5	3	0	3	0	0
10	FN Silvania	2	2	0	2	0	0
11	PE Altamiro M. Pacheco	1	1	0	1	0	0
12	PE da Serra Azul	11	4	0	4	0	0
13	PN Cavernas do Peruaçu	6	5	0	5	0	0
14	PN das Sempre-Vivas	13	10	0	10	0	0
15	EE Serra das Araras	19	17	14	3	0	0
16	PE do Araguaia	13	3	3	0	0	0
17	Fazenda Riachuelo	11	4	3	0	0	1
18	FN Carajás	26	5	4	0	0	1
19	Fazenda Rio Guaporé	13	4	2	0	0	2
20	PN Mapinguari	6	2	1	0	0	1
	TOTAL	**240**	**147**	**101**	**36**	**3**	**7**



1	PN do Iguaçú	11	PE Altamiro M. Pacheco	21	REBIO Perobas
2	EE Caetetus	12	PE da Serra Azul	22	EE Mata Preta
3	PN da Serra da Bodoquena	13	PN Cavernas do Peruaçu	23	PE Turvo
4	RPPN Cisalpina	14	PN das Sempre-Vivas	24	PN Araucárias
5	Fazenda Xaraés	15	EE Serra das Araras	25	Fazenda Cajuru
6	PN das Emas	16	PE do Araguaia	26	Fazenda Barreiro Rico
7	RPPN Sesc Pantanal	17	Fazenda Riachuelo	27	PE Lagoa Azul
8	Fazenda Rio Negro	18	FN Carajás	28	PE Morro do Diabo
9	PE da Mata Atlântica	19	Fazenda Guaporé	29	EE Caiuá
10	FN Silvania	20	PN Mapinguari	30	PE Rio Doce

Figura 14. Distribuição das áreas de estudo onde o veado-mateiro (complexo *Mazama americana*) (Odocoileini:Capreolinae:Cervidae) foi detectado (em verde) e localidades onde a espécie não foi detectada (em amarelo) perante as localidades de referência dos principais citótipos descrito para a espécie, as localidades tipo de *Mazama americana* (Erxleben, 1777) e *Mazama rufa* (Illiger, 1811) e os biomas brasileiros segundo dados do IBGE.

4.2. Amplificação, Sequenciamento e Caracterização das Matrizes de Caracteres Moleculares

Todas as amostras de referência selecionadas foram sequenciadas com sucesso, completando o conjunto de cinco fragmentos propostos. Assim, a matriz de referência final foi composta por 35 animais e 2625 pb, dentre eles 798 sítios variados e 567 sítios parcimoniosamente informativos (35% no Cyt-b, 24% no D-loop e 41% no ND5). A maior parte do polimorfismo se encontra na região

ND5, porém proporcionalmente ao tamanho, a região do D-loop é a mais polimórfica. O modelo evolutivo selecionado para a matriz foi o GTR+I+G. e a comparação desta matriz com suas quatro matrizes derivadas pode ser observada na Tabela 6. A comparação da matriz de referência completa (2625 pb) com seu recorte do delineamento de DNA fecal (1104 pb) mostrou que apesar de possuir 42% do tamanho, apresentou 46% dos sítios informativos e 52% dos PICs (Tabela 6).

As amostras fecais selecionadas apresentaram sucesso de amplificação de 94,8% para os pequenos fragmentos planejados. No entanto, foram admitidas apenas amostras com sequências de qualidade para todos os 5 fragmentos, reduzindo de 46 amostras para 34 amostras de fato utilizadas. Dessas 34 amostras que cumpriram com as condições de qualidade, foram excluídas as que possuíam mesmo haplótipo (sequência mitocondrial idêntica) e fossem da mesma localidade, resultando finalmente em 25 amostras fecais na matriz de DNA fecal. Essa matriz também foi composta por 27 sequências de referência que representaram haplótipos distintos. Por conseguinte, a matriz de DNA fecal final totalizou 52 espécimes, apresentando polimorfismo próximo das demais, tendo como modelo evolutivo selecionado o HKY+G (Tabela 6).

Tabela 6. Tamanho, polimorfismo e modelo evolutivo da matriz de sequências de referência, das quatro matrizes derivadas dela (comparadas em relação à ela) e da matriz de DNA fecal completa. PICs= "*parsimony informative characters*"; pb= pares de base.

	Matriz	Número de Espécimes	Tamanho	Sítios Variáveis	PICs	Modelo jModelTest
1	**Referência Final**	**35**	**2625**	**798**	**567**	**GTR+I+G**
2	Cytb	35	993 (38%)	279 (35%)	197 (35%)	GTR+I+G
3	D-loop	35	453 (17%)	188 (24%)	134 (23%)	GTR+I+G
4	ND5	35	1179 (45%)	331 (41%)	236 (42%)	GTR+I
5	DNA Fecal Referência	35	1104 (42%)	370 (46%)	294 (52%)	TrN+I+G
6	DNA Fecal Final	52	1104 pb	326	233	HKY+G

Ao final, todas as matrizes não apresentaram sinal de saturação (Apêndice B). Os gráficos de saturação mostraram uma proporção maior de transições em relação as transversões, como esperado em um nível baixo de saturação. No teste de Xia et al. (2003) e Xia e Lemey (2009) o índice de

saturação por substituição estimado foi significativamente menor que o de referência para todas as matrizes testadas, outro indicativo de pouca saturação.

4.3. Filogenia e Delimitação Molecular de Espécies da subtribo Odocoileina

As matrizes derivadas da matriz de referência completa permitiram observar o sinal filogenético de cada gene e do delineamento proposto para o DNA fecal. Essa abordagem evidenciou uma menor resolução do Cyt-b em relação à matriz completa, enquanto D-loop e ND5 mostraram sinal semelhante entre si e em relação ao conjunto total. Também foi possível observar que há diminuição de suporte dos clados de divergência mais recente ao analisar o delineamento do DNA fecal. Tais resultados podem ser vistos em detalhe no Apêndice C.

As inferências filogenéticas obtidas a partir da matriz de referência completa em ambas as abordagens de IB e MV indicaram topologias totalmente convergentes e com todos os clados do *ingroup* bem suportados (PP > 0,9 e BTS > 80; Figura 15). A maioria dos citótipos avaliados apresentou uma relação de monofilia recíproca em relação aos demais (com exceção de Carajás). A análise de delimitação molecular de espécies apresentou o modelo GMYC significativamente maior que o modelo nulo para o limiar único (p=0,04), enquanto para múltiplos limiares o modelo GMYC não foi significativamente maior (p=0,17). Dessa forma, o modelo de limiar único identificou oito MOTUs (“molecular operational taxonomic units”) (Figura 16), quase todas coincidentes com as espécies válidas na literatura e com a caracterização citogenética de *M. americana* (*sensu lato*).

A inferência filogenética e as MOTUs identificadas foram comparadas perante a taxonomia atual do grupo baseada em Merino e Rossi (2010) e a hipótese taxônomica proposta pela citogenética (Abril et al. 2010; Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017) (Figura 15). Observando a topologia da árvore, destaca-se a espécie *Odocoileus virginianus*. Sua posição mais externa no *ingroup* da análise, externa ao gênero *Mazama* (clado I), configura o ponto de divergência ao analisar apenas o gene Cytb.

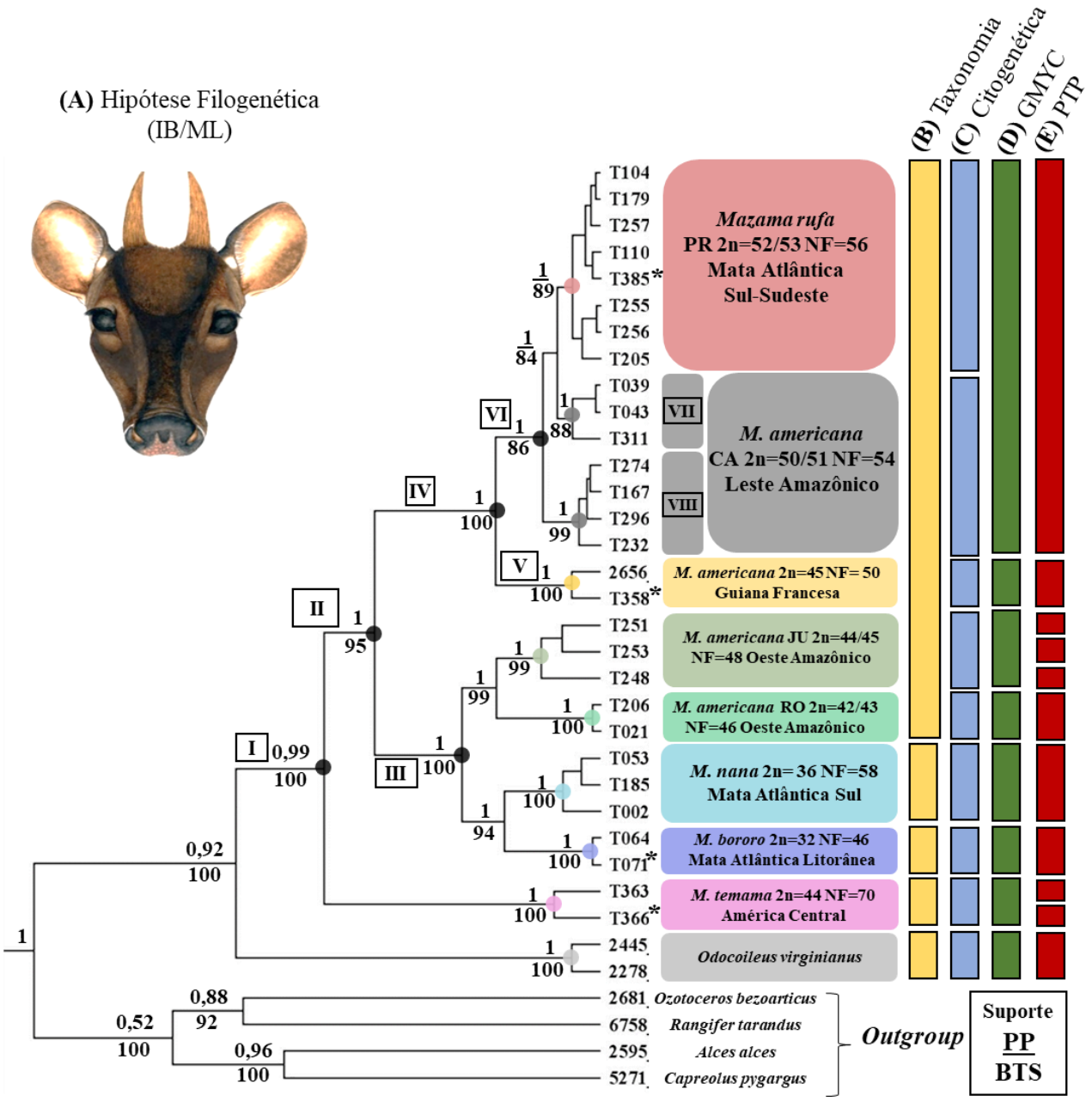


Figura 15. Sumarização dos resultados com a inferência filogenética e a delimitação de espécies baseadas em dados moleculares da sub-tribo Odocoileina (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae) em comparação com outros dados das amostras de referência. (A) Árvore ultramétrica representando a hipótese filogenética gerada por inferência bayesiana pelo aplicativo Beast e por máxima verossimilhança pelo algoritmo RAxML. Os valores de suporte dos clados estão representados pela probabilidade posterior acima (PP 0-1) e *bootstrap* abaixo (BTS 0-100) da linha. Os números de I à VII identificam clados em destaque no texto. (B) Taxonomia atual do grupo. (C) Hipótese taxonômica citogenética. (D) *Molecular Operational Taxonomic Units* obtidas pelo método de coalescência GMYC por limiar único (p=0,04) e (E) pelo método PTP, sendo cada MOTU representada por um bloco. Amostras identificadas com T### representam vouchers do Nupecce e amostras #### representam o final da identificação das sequências obtidas no GenBank, * indica espécimes tipo. Ilustração do veado gentilmente cedida por Natália Aranha de Azevedo.

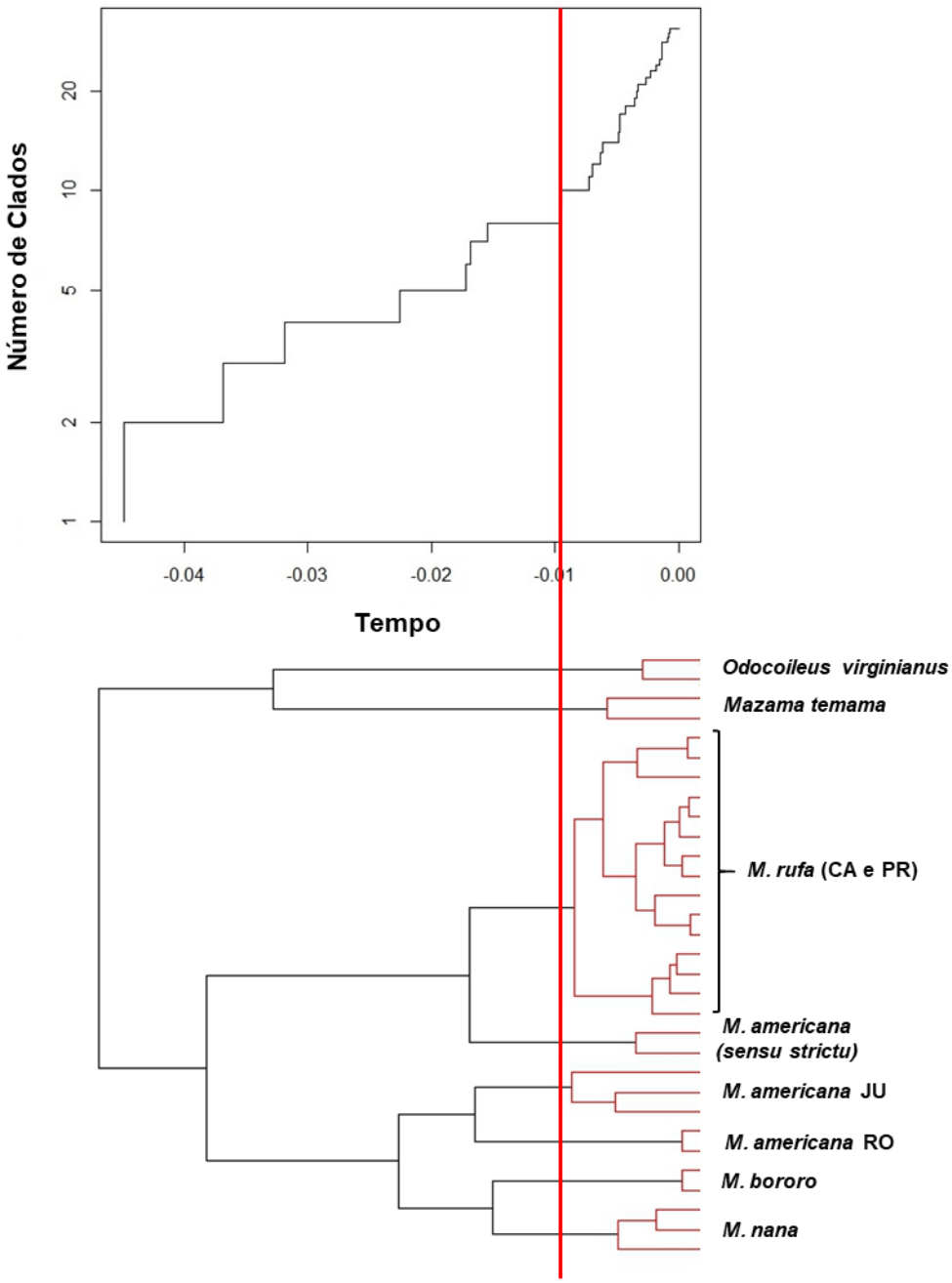


Figura 16. Análise de delimitação molecular de espécies da subtribo Odocoileina (Odocoileini:Capreolinae:Cervidae) pelo método GMYC para a matriz de amostras de referência completa. O primeiro gráfico mostra a cladogênese em função do tempo e o segundo mostras a hipótese filogenética com as 8 MOTUs identificadas pela análise destacadas em vermelho, ambos os gráficos com o limiar único significativo do modelo GMYC em vermelho (P=0,04).

No gênero *Mazama*, a espécie *M. temama* se posicionou de forma externa às demais, sendo recuperada como grupo monofilético e indicada como uma MOTU pela análise de delimitação. O restante do gênero (clado II) é sub dividido em dois clados com alto suporte, um que traz *M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*

(III) e outro apenas com linhagens de *M. americana* (IV), reforçando o caráter polifilético já conhecido do complexo da espécie. No clado III, *M. nana* e *M. bororo* foram recuperadas de forma monofilética, como grupos irmãos, e indicadas cada uma como uma MOTU. O clado III, ainda, foi composto por amostras dos citótipos Juína e Rondônia de *M. americana*, que também foram recuperados de forma monofilética, como grupos irmãos, e indicados cada um como potenciais espécies.

O neótipo de *M. americana* foi posicionado no grande clado IV e agrupado com outra amostra da Guiana Francesa. O clado das duas (V) amostras foi indicado como uma MOTU única, e deve representar a espécie *M. americana* (*sensu strictu*). Esse clado da Guiana Francesa, por sua vez, é irmão do clado (VI) que traz os citótipos de Carajás e Paraná e representa a espécie *Mazama rufa*. Os animais do citótipo Paraná foram agrupados de forma monofilética e bem suportada em relação aos animais do citótipo Carajás, o único citótipo não monofilético. Carajás ficou dividido em dois clados (VII e VIII), configurando o primeiro como diretamente irmão de Paraná e o segundo como irmão de ambos. A análise de delimitação molecular de espécies indicou que os três clados, dos dois citótipos, compõem apenas uma MOTU. Essa unidade contém o neótipo da recém revalidada *M. rufa*, o que amplia a composição da espécie para os dois citótipos e não apenas o citótipo Paraná como descrita originalmente.

A abordagem PTP recuperou 11 MOTUs, em que seis delas são coincidentes com o método GMYC. O suporte das unidades em geral foi baixo, entre valores 0,56 e 0,92 de probabilidade. Além das unidades já identificadas, a análise trouxe outras cinco: cada animal do citótipo Juína e cada animal de *M. temama* foram identificados como unidades distintas. Essas unidades apresentaram suporte intermediário (0,74-0,81) e carecem de sentido biológico, o que sugere que a abordagem deve ser avaliada com cautela.

A filogenia obtida pela matriz de DNA fecal completa, inferida apenas por IB, apresentou topologia congruente com a matriz de referência (Figura 17). A árvore exibiu bom suporte, com valores de probabilidade posterior acima de 0,9 para a maioria dos clados, com exceção dos clados de divergência mais recente. A análise de delimitação molecular de espécies apontou o modelo GMYC como significativamente maior que o modelo nulo para o limiar único (p=0,005; Figura 18). Ele retornou 10 MOTUs, em que, mais uma vez, quase todas convergem

com as espécies válidas e com a caracterização citogenética em *M. americana* (*sensu lato*). Por outro lado, para múltiplos limiares o modelo GMYC não foi significativamente maior (p=0,054).

A árvore gerada e as MOTUs identificadas foram comparadas perante a distribuição das amostras fecais e o cariótipo de cada amostra de referência (Figura 17). A espécie *Odocoileus virginianus* foi posicionada como grupo irmão de *Mazama temama* (I). Porém, vale apontar que essa relação não apresenta suporte satisfatório, de forma análoga a árvore que avaliou o delineamento fecal apenas com amostras de referência (Apêndice C). Apenas as amostras do PE do Rio Doce-MG (30) e da proximidade do rio Guaporé-RO (19) foram alocadas no clado composto pela linhagem de baixo número cromossômico de *M. americana* (*sensu lato*) e as espécies *M. nana* e *M. bororo* (clado II). A árvore não teve resolução para definir o posicionamento das amostras do Rio Guaporé (19), dado o baixo suporte que as unem com *M. nana* e *M. bororo* (IV).

É mais parcimonioso, do ponto de vista de distribuição geográfica, que elas fossem representantes da linhagem de *M. americana* que ocorre na região, do que representantes de espécies da Mata Atlântica. Por sua vez, as amostras do Rio Doce (30) foram posicionadas de forma bem suportada no clado composto por *M. nana* e *M. bororo* (V), indicando que não se trata de *M. americana* (*sensu lato*). Essa relação não havia sido resolvida apenas com a sequência de Cytb na triagem das amostras fecais (Apêndice A). A princípio, tais amostras poderiam ser consideradas como *M. bororo* (VI), fazendo, inclusive, sentido geográfico. No entanto, as amostras do Rio Doce formaram um clado bem suportado, irmão de *M. bororo*, que foi indicado como MOTU independente.

No clado III, apenas com amostras do complexo *Mazama americana*, nenhuma amostra fecal foi agrupada com o clado (e com a MOTU) que possui o neótipo da espécie *M. americana*. De tal forma, reforçando a ideia de que a ocorrência da espécie no Brasil está restrita ao extremo norte. Amostras de referência do citótipo Carajás ficaram novamente divididas em dois clados, bem suportados (0,92 e 1 de PP). O primeiro (VII), mais externo, permaneceu apenas com amostras de referência, não sendo possível afirmar sobre sua posição geográfica exata.

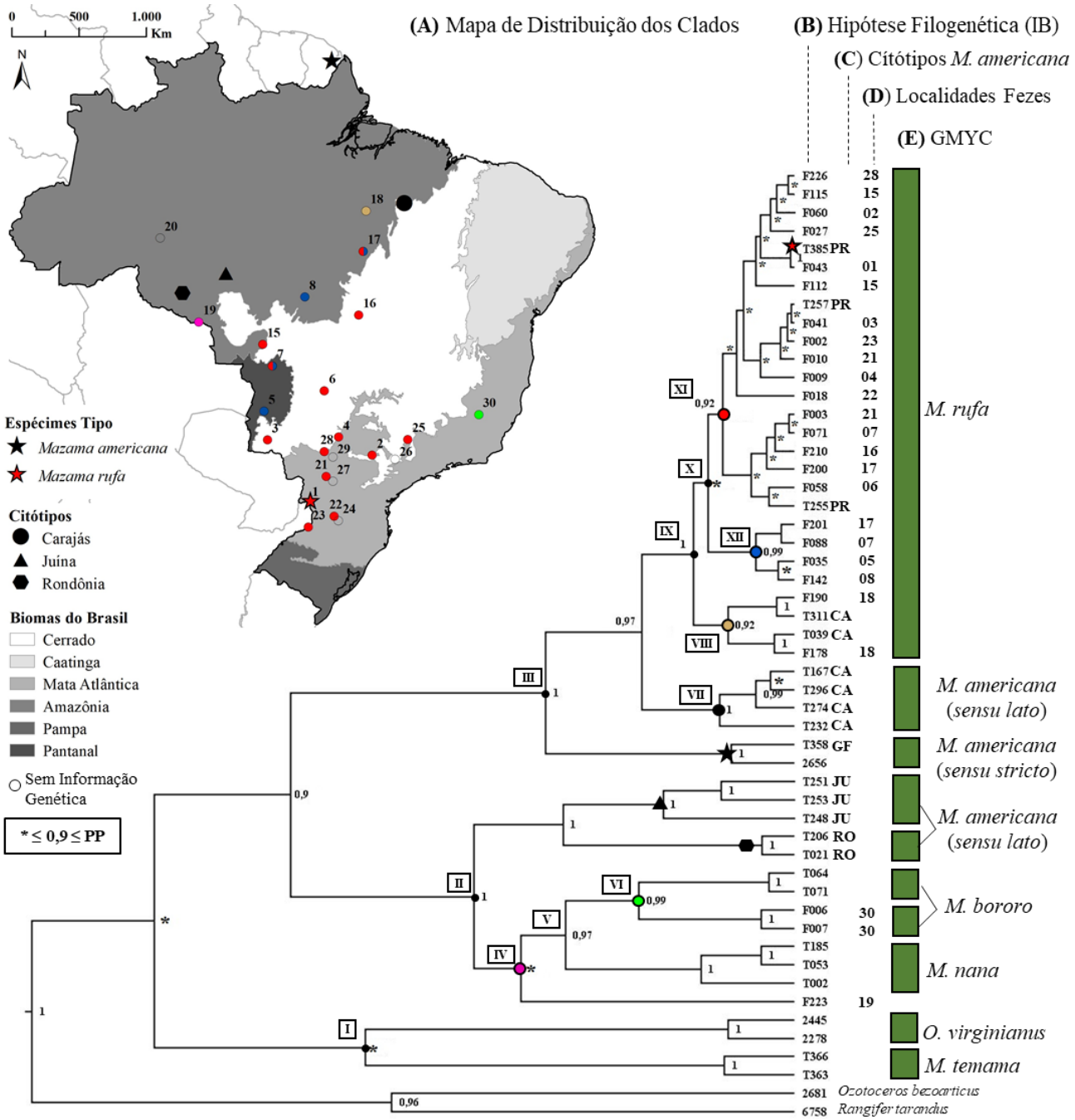


Figura 17. Sumarização da inferência filogenética e da delimitação de espécies baseadas em dados moleculares na sub-tribo Odocoileina (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae) a partir da matriz de DNA fecal completa. (A) Mapa de distribuição das áreas de estudo; (B) Árvore ultramétrica representando a hipótese filogenética gerada por inferência bayesiana pelo aplicativo Beast em que os valores de suporte dos clados estão representados pela probabilidade posterior (PP≥ 0,9); (C) Citótipos de *Mazama americana* (Erxleben, 1777) das amostras de referência (PR-Paraná; CA-Carajás; JU-Juína; RO-Rondônia e GF- Guiana Francesa); (D) Identificação das áreas de amostragem fecal. (E) *Molecular Operational Taxonomic Units* obtidas pelo método de coalescência GMYC por limiar único (p=0,005). Os números de I à XII identificam clados em destaque. Amostras identificadas com T### representam vouchers das amostras de referência no Nupecce, F### representam amostras fecais com seu número identificador e amostras #### representam o final da identificação das sequências obtidas no GenBank.

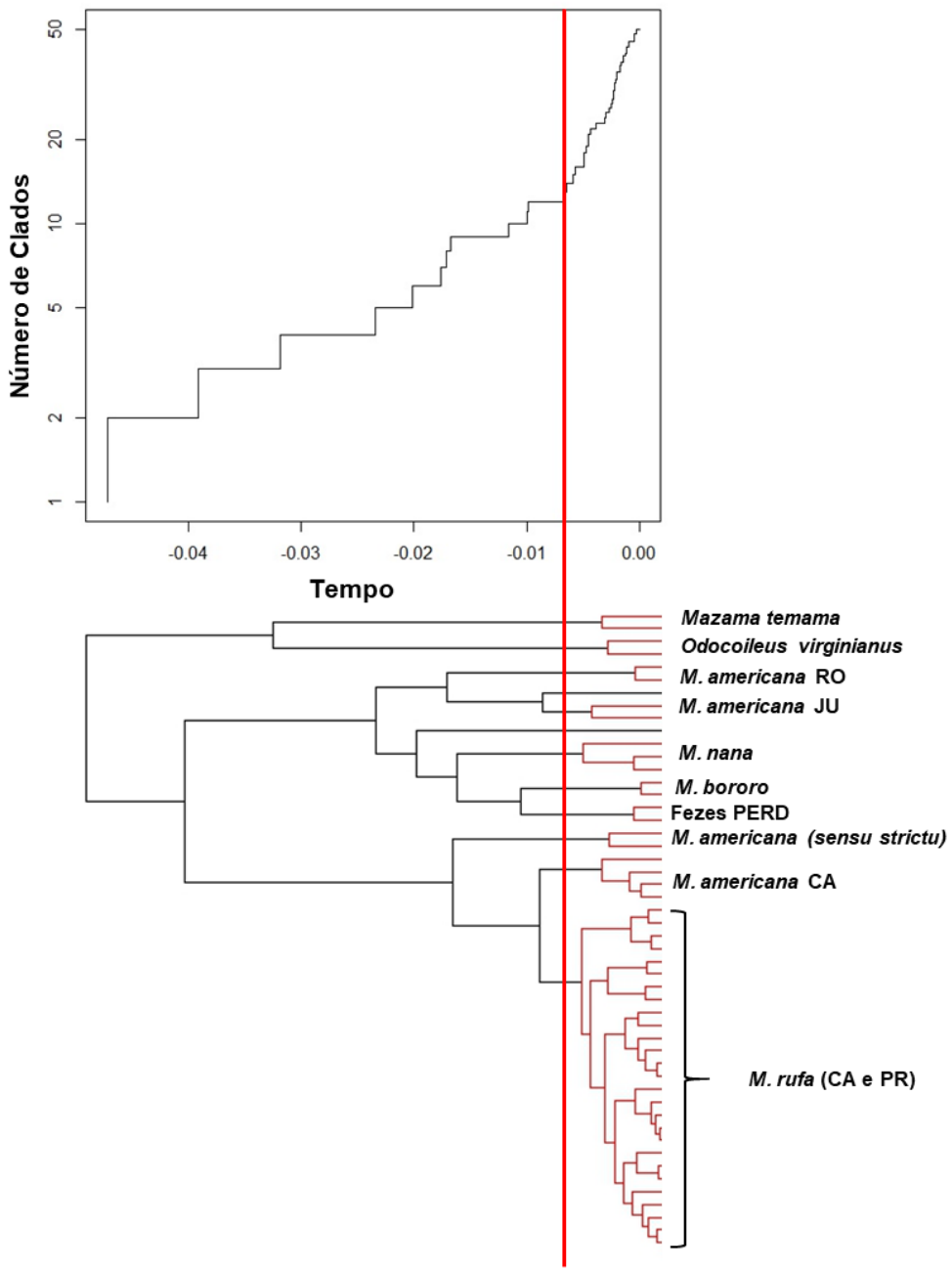


Figura 18. Análise de delimitação molecular de espécies da subtribo Odocoileina (Odocoileini:Capreolinae:Cervidae) pelo método GMYC para a matriz de DNA fecal completa. O primeiro gráfico mostra a cladogênese em função do tempo e o segundo mostras a hipótese filogenética com as 10 MOTUs identificadas pela análise destacadas em vermelho, ambos os gráficos com o limiar único significativo do modelo GMYC em vermelho (P=0,005).

Em relação a análise anterior, a novidade se apresenta com o clado de Carajás que foi indicado como MOTU exclusiva pelo GMYC. As amostras da FLONA de Carajás (18) não se agruparam com ele, mas apenas com o clado VIII, sugerindo pelo menos uma região de ocorrência natural desse citótipo.

Ao final, a última MOTU identificada é formada por um clado bem suportado (IX/ 1 PP) e representa a espécie recém proposta *M. rufa*. Os resultados indicam que a espécie tem ampla distribuição (Figura 19), presente não apenas na Mata Atlântica, mas também no Pantanal (5 e 7), Cerrado (especialmente às margens do Rio Araguaia, 6 e 16) e até mesmo no limite sul da Amazônia (15, 8 e 17). Além do sub-clado VIII (da FLONA de Carajás), a espécie seria composta pelo sub-clado X, que não apresentou suporte adequado, e, dessa forma, não deixa clara suas relações filogenéticas. Dois sub-clados ficam evidentes, o clado XI (0,92), que representaria potencialmente o citótipo Paraná, e o clado XII (0,99) composto apenas por amostras fecais oriundas da região do Pantanal e do sul da Amazônia (5 e 7; 8 e 17). Vale destacar que o clado clado XII não tem nenhuma amostra de referência associada a ele e que haplótipos de ambos os clados (XI e XII) ocorrem em simpatria em duas localidades (5 e 17).

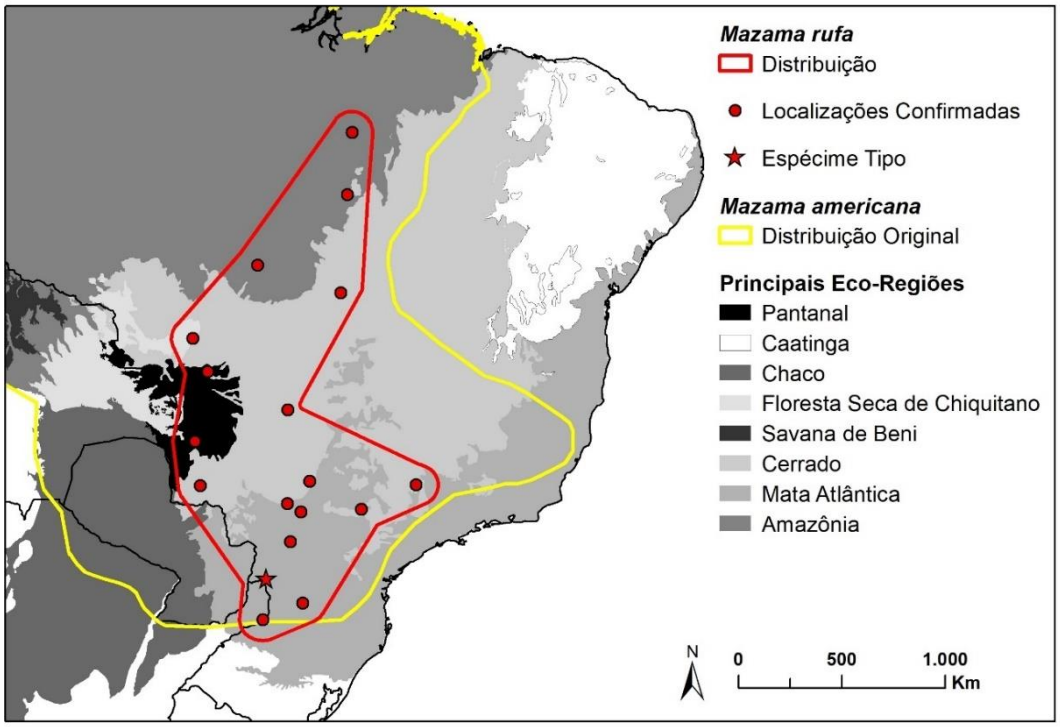


Figura 19. Mapa de distribuição de *Mazama rufa* (Illiger, 1811) traçado a partir de um bufer de 100km do perímetro ligando as localizações de ocorrência confirmada geneticamente. Eco-reigões mundiais definidas por Olson et al. (2005) que estariam ligadas às espécies *M. rufa* e *Mazama americana* (Erxleben, 1777).

5.DISCUSSÃO

5.1. Relações Filogenéticas do complexo *Mazama americana* (Erxleben, 1777)

Os resultados aqui observados reforçam que o status taxonômico atual de *M. americana* deve ser revisado, como já vinha sendo apontado em estudos anteriores (Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010; Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017; Heckberg, 2020; Rincón et al., 2020). Há uma convergência na indicação de que as populações de veado-mateiro que ocorrem no Brasil não fazem parte da espécie *Mazama americana* (*sensu strictu*) e que seus status taxonômicos devem ser revisados (RINCÓN et al., 2020). O avanço da amostragem (mais espécimes, maior cobertura espacial e mais genes) permitiu avaliar a relação entre citótipos de menor divergência e a espacialização geográfica das linhagens do veado-mateiro.

O estado polifilético de *Mazama americana* já é discutido desde Duarte et al. (2008), quando a espécie foi considerada um complexo de espécies crípticas. Nessa investigação, a espécie foi dividida em dois clados que formavam uma politomia juntamente com *Odocoileus virginianus*, sendo um desses clados composto ainda por *M. nana* e *M. bororo* (DUARTE et al 2008). Diferentes estudos observaram o mesmo padrão, partindo das mesmas sequências de *M. nana*, *M. bororo* e *M. americana* (*sensu lato*), mas com diversas outras sequências da tribo Odocoileini compondo a matriz (Escobedo-Morales et al 2016; Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al. 2017; Heckberg, 2020). Gutiérrez et al. (2017) discutiu a situação do complexo *M. americana* ao observar igual padrão polifilético, com a espécie subdividida em dois clados (chamados 1 e 2). O clado 1 ficou posicionado como irmão de *M. nana* e *M. bororo* e era composto por uma amostra da Guiana Francesa (localidade tipo) e várias do Brasil, considerado como a espécie *M. americana* (*sensu strictu*). O outro clado (clado 2) foi sugerido como potencial nova espécie e era composto por animais apenas da Amazônia (Gutiérrez et al. 2017).

Ao contrário do que apontou Gutiérrez et al. (2017), sua divisão de clados não representa a topologia de Abril et al. (2010), e não corresponde às linhagens avaliadas por Cursino et al. (2014). Os clados do trabalho de Gutiérrez et al

(2017) trazem, de maneira agregada, amostras das duas linhagens cromossômicas, de alto (citótipos Paraná/Carajás) e de baixo (citótipos Rondônia e Juína) número diploide. No mesmo sentido, animais do citótipo Rondônia (DQ789211/T018 e DQ789216/T021) estão presentes nos dois clados distintos. Topologia semelhante é observada em todos os trabalhos que analisaram apenas o gene Citocromo-b (Duarte et al., 2008; Escobedo-Morales et al 2016; Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al. 2017; Heckberg 2020).

A principal questão reside no fato de que o gene Citocromo-b sozinho não tem resolução para agrupar os espécimes de *M. americana* de forma coerente com a região de origem ou o citótipo. A separação filogenética das duas principais linhagens cromossômicas fica evidente quando o Cytb é analisado com o D-loop (Abril et al., 2010; Rincón et al., 2020). Nessa matriz mais informativa é demonstrado que cada linhagem cromossômica se encontra em clados distintos e bem suportados (Abril et al., 2010; Rincón et al., 2020). Ainda foi possível observar, utilizando parte dos dois genes, que o clado composto pela linhagem de baixo número diploide, citótipos Rondônia (RO) e Juína(JU) é irmão de *M. bororo* e que os animais da linhagem de alto número diploide, citótipos Paraná (PR) e carajás (CA) compõem um clado junto com o neótipo da Guiana Francesa (RINCÓN et al, 2020), exatamente como apontaram os presentes resultados.

A monofilia recíproca entre os citótipos PR e CA e uma politomia envolvendo amostras dos citótipos RO e JU é observada por um número menor de amostras por Abril et al. (2010). A inferência da relação entre citótipos próximos, utilizando o D-loop, não foi possível em outros trabalhos pela presença de apenas um indivíduo do citótipo Rondônia (Rincón et al., 2020) ou pela ausência de qualquer animal do citótipo Carajás (Luduvério, 2018). Em contraponto, a amostragem atual permitiu avaliar a relação de monofilia recíproca entre Rôndonia e Juína e a condição parafilética de Carajás em relação a Paraná. Essa topologia, a rigor, refuta a proposta de Carajás como espécie válida sob o conceito filogenético de espécie (Cracraft, 1983). No entanto, a falta de monofilia recíproca, observada apenas a partir do DNAmt, pode ser um viés oriundo da amostragem incompleta de linhagem (*incomplete lineage sorting*) e/ou de hibridização antiga (Gutiérrez et al. 2017).

Apesar do amplo uso do Cytb, cujo sinal filogenético é adequado para a identificação de espécies de cervídeos (Agnarsson E May-Collado., 2008; González et al., 2010), a inclusão do gene ND5 foi fundamental para melhorar a reconstrução da história filogenética do grupo. Ele está entre as regiões mais variáveis no DNA mitocondrial, juntamente com o Dloop, (Caparroz et al 2015; Ambriz-Morales et al 2016). Em contrapartida ao seu aspecto informativo, a região D-loop traz dificuldade para identificar regiões conservadas para construção de iniciadores. Nesse sentido, a construção de iniciadores para o DNA fecal foi facilitada no gene ND5.

O avanço das inferências filogenéticas deve abordar análise de regiões nucleares a fim de avaliar as relações observadas sem o viés da herança uniparental, circunstância que deve sanar dúvidas em relação à ILS e hibridização (Shaw, 2002; Dool et al., 2016). O uso de *introns* em mamíferos tem se mostrado válido na composição de análises multilócus, em inferências filogenéticas e métodos para delimitação de espécie (Castillo et al., 2005; Salicini et al., 2011; Igea et al., 2015; Dool et al., 2016). Na mesma linha, um conjunto de *íntrons* já foi proposto para questões que envolvem espécies de divergência recente, apontando alta taxa evolutiva (Igea et al 2010). Outro avanço a ser pontuado é o uso de marcadores SNPs (*single nucleotide polymorphism*), através de sequenciamento de nova geração. Tais abordagens tem auxiliado a elucidação de aspectos taxonômicos e de genética da conservação (Mcmahon et al. 2014; Ivy et al. 2016) e devem representar os próximos passos no entendimento da evolução dos cervídeos neotropicais.

Embora não seja o foco principal da análise aqui desenvolvida, vale destacar que o presente resultado mostrou a relação de grupo irmão entre os gêneros *Odocoileus* e *Mazama* através da matriz de vários genes concatenados. Analisando os recortes da mesma matriz apenas para o Cyt-b e também para matriz menor de DNA fecal, foi observado que essa relação não apresenta resolução, o que implica a necessidade de grandes regiões polimórficas para abordá-la com propriedade. Esse ponto é importante, pois trabalhos anteriores posicionam *Odocoileus* internamente à *Mazama*. Desse modo, seria exigido uma revisão do primeiro, o que culminaria em um grande impacto na literatura e na nomenclatura de Cervidae (Heckberg et al 2016; Gutiérrez et al 2017; Heckberg, 2020).

A inferência filogenética apresentada mostrou os dois gêneros como clados-irmãos, mesmo incluindo na análise representantes de *M. americana* e a espécie *M. temama,* que antes invalidavam essa relação (Duarte et al., 2008; Escobedo-Morales et al 2016; Heckberg et al., 2016; Gutiérrez et al. 2017; Heckberg, 2020). No entanto, é preciso ressaltar que nossa matriz não contou com as espécies *M. pandora* (Merriam, 1901) e *M. rufina* (*sensu* Gutiérrez et al. 2015), que em razão do seu posicionamento filogenético, são essenciais na discussão da validade do gênero *Odocoileus*.

Em relação ao posicionamento de *M. americana*, *M. temama* e o gênero *Odocoileus*, a análise filogenética, utilizando dados moleculares e morfológicos, realizada por Heckberg (2020), vem de encontro com nossos resultados. Gutierrez et al. (2017) discutem com melhor propriedade essa questão, pois, apesar de só analisarem o gene Cyt-b, incluíram representantes de todas as espécies de *Mazama* e uma ampla amostragem de *Odocoileus*. Assim, o presente resultado reforça as observações de Heckberg (2020) e Gutierrez et al. (2017) sobre ser necessário examinar não somente todas as espécies envolvidas, mas avaliar uma região maior de DNA (ou até mesmo o mitogenoma), antes de proceder com uma revisão de nomenclatura tão importante.

5.2. Avanços da Amostragem Genética Não Invasiva

A amostragem fecal realizada permitiu avançar sobre lacunas geográficas na medida que incluiu populações do Cerrado e do Pantanal. O delineamento de amplificação de pequenos fragmentos para o DNA fecal foi informativo, não obstante a perda de sinal observada em relação à matriz de referência original. Tal questão já havia sido demonstrada por Heckberg et al. (2016) em uma matriz de Cervidae, em que observaram maior influência da diminuição do tamanho da sequência na análise filogenética do que a partição dos dados ou outros parâmetros da análise filogenética.

O DNA fecal revelou maior proximidade geográfica e filogenética entre os citótipos Paraná e Carajás. O aumento da amostragem trouxe dez haplótipos não observados anteriormente e evidenciou um clado muito bem suportado, que pode representar uma unidade genética intermediária entre os citótipos PR e CA (clado XII, azul na Figura 8). Esse clado tem ocorrência no Pantanal, bacia do

rio Paraguai, e no sul da Amazônia, às margens do rio Xingu e do rio Araguaia. Tais regiões são conectadas diretamente com as localidades de referência dos citótipos Paraná (PN do Iguaçú) e Carajás (FLONA de Carajás). Em uma análise preliminar desses resultados, entende-se que as regiões de ocorrência dos citótipos não são espacialmente ou ambientalmente isoladas, como postularam Abril et al. (2010). Desse modo, o aumento da amostragem expôs um posicionamento emaranhado entre os citótipos, sugerindo um isolamento incompleto das linhagens. Nesse contexto, pode ser altamente informativa a coleta de animais para caracterização citogenética nas regiões do clado intermediário.

Além disso, a amostragem fecal permitiu inferir sobre a distribuição de outros clados. No que tange as amostras fecais do PE do Rio Doce (PERD/ área 30) e do rio Guaporé (área 19), houve um destaque por serem as únicas localizadas no clado formado por *Mazama nana*, *M. bororo* e a linhagem de baixo número diploide de *M. americana* (*sensu lato*) (Figura X, clado II). As mesmas amostras do PERD já haviam sido avaliadas por Oliveira et al. (2020), porém o resultado não indicou a espécie, que se posicionou como grupo irmão do clado todo. Em contrapartida, a presente análise posicionou as sequências do PERD, com alto suporte, como grupo irmão de *M. bororo* (0,99 PP; clado VI), sendo essa sua identificação em uma primeira avaliação. Esse registro se faz importante, pois, está fora da área de distribuição atualmente reconhecida da espécie (Vogliotti et al., 2016), já que o registro se caracteriza mais ao norte (aproximadamente 170 km ao norte da distribuição) e mais interno ao continente (aproximadamente 230 km do litoral). Se confirmada, essa descoberta pode alterar a avaliação de ameaça de extinção da espécie, classificada como vulnerável sob os critérios C2aii pela IUCN (Vogliotti et al., 2016). Essa classificação significa que a espécie tem uma população estimada em menos de 10 mil indivíduos, (no presente caso, 8 mil) sob declínio, e com 100% dos indivíduos maduros restritos a uma subpopulação (IUCN, 2012).

Os novos dados geográficos e genéticos mostram que *Mazama bororo* está dividia em duas subpopulações, sendo necessário estimar o tamanho e a representatividade da nova subpopulação descoberta na região do PERD para ser possível reavaliar a espécie perante todos os critérios. Essa detecção também representa o primeiro registro de *M. bororo* confirmado para o estado

de Minas Gerais, no Brasil. Ademais, sobre as amostras oriundas da região do rio Guaporé, não foi possível uma identificação de espécie segura devido ao fraco suporte que as colocou como irmãs de *M. nana* e *M. bororo*. A indicação que as amostras do PERD constituem uma MOTU própria e a não alocação da amostra do Guaporé em nenhuma MOTU é precipitada para indicação de novas espécies. Todavia, não deixa de figurar um forte indício de que a diversidade genética é maior do que a atualmente conhecida, sendo muito recomendável a coleta de mais animais para investigação citogenética.

A triagem inicial de espécies realizada nesse trabalho (224 pb do Cyt-b; Apêndice A) e a análise de Oliveira et al (2020) (530 pb do Cyt-b) não permitiram a identificação da espécie do PERD de forma robusta. No presente estudo, fica evidente mais uma vez que a inclusão de regiões mais polimórficas (D-loop e ND5) favoreceu a análise. O uso do fragmento de 224 pb do Cyt-B para identificação de espécies de cervídeos foi primeiramente proposto por González et al (2009), aliado a uma metodologia que identificava sítios de restrição discriminantes. É necessário entender a limitação desse protocolo que tinha como foco regional a Mata Atlântica e suas espécies. A aplicação dessa região do Cyt-b em uma abordagem filogenética deve ser feita com cautela. O sequenciamento adicional de um ou mais fragmentos descritos aqui para a região D-loop e ND5, assim como a inclusão de mais espécimes de referência na matriz, pode fornecer mais robustez as identificações genéticas. Vale ressaltar que os iniciadores desenvolvidos para a região D-loop e ND5 no delineamento de DNA fecal são preservados para espécies da subtribo Odocoileina, mas apresentam mutações em relação às espécies de Blastocerina e devem ser melhor avaliados ou redesenhados.

Por fim, o sucesso da amostragem genética não invasiva aqui observado traz a possibilidade de amostragens mais amplas, com amostras georreferenciadas, permitindo análises espaciais. A inferência sobre a conectividade entre cada localidade amostrada e padrões de isolamento por distância ou por ambiente se torna possível, porém necessitará do sequenciamento de outras regiões do DNAmt para aumentar seu suporte e, principalmente, de regiões nucleares (Teske et al., 2018). O aumento da amostragem pode, também, revelar padrões de distribuição dos citótipos, como a ocorrência em simpatria, a formação de zonas híbridas estanques ou a

formação de clina, com mudança gradual na frequência das formas cromossômicas e frequência alélica. A presença em simpatria de duas linhagens evolutivas distintas (formas cromossômicas ou clados), sem a identificação de híbridos ou compartilhamento de alelos, é uma forma de demonstrar o isolamento reprodutivo concretizado. A perspectiva de aplicar métodos genômicos em amostras de DNA fecal representa um avanço crucial para estudos desse tipo com espécies elusivas como os veados florestais (Costa et al. 2017; Chiou e Bergey, 2018; Carroll et al., 2018).

5.3. Delimitação de espécies no gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 e a validade de *M. rufa* (Illiger, 1811)

O papel da divergência cromossômica tem sido relacionado à redução do fluxo gênico entre populações divergentes de mamíferos, o que pode levar a um processo de especiação (Rieseberg, 2001). Nesse contexto, a observação de diferenças cromossômicas extremas embasou a descrição amplamente aceita de duas espécies antes consideradas do complexo *M. americana* (*M. temama*, Jorge e Benirschke, 1977; e *M. bororo*, Duarte e Jorge, 2003). Experimentalmente, foi demostrado que os híbridos das linhagens de *M. americana* com grande divergência (diferença ≥ 7 cromossomos) têm suas condições reprodutivas comprometidas, resultando em azoospermia de machos híbridos, comprometimento da função ovariana em fêmeas híbridas e inviabilidade de embriões heterogaméticos (Cursino et al 2014; Salvianao et al. 2017). No bojo desse raciocínio está o conceito biológico de espécie (Mayr, 1942), em que o isolamento reprodutivo identificaria diferentes espécies, como critério na identificação de linhagens distintas (De Queiroz, 2007). Baseado no isolamento reprodutivo entre linhagens cromossômicas, foi proposta a revisão de *M. americana* para a existência de no mínimo duas espécies no Brasil. Porém, cada citótipo poderia, potencialmente, representar uma espécie válida, o que elevaria para no mínimo seis espécies novas (Abril et al., 2010; Cursino et al., 2014; Salviano et al 2017; Carranza et al 2018).

A partir do resultado observado com dados moleculares, fica evidente sua contribuição à revisão taxonômica do complexo *Mazama americana.* Isso, pois, há uma avaliação da hipótese citogenética perante o conceito filogenético de espécie e os métodos coalescentes de delimitação. Nesse sentido, a taxonomia

moderna vem com uma proposta integrativa em que diferentes grupos de dados, testando diferentes conceitos de espécie e levando o processo evolutivo em consideração, poderiam resultar em um acúmulo maior de evidência que suporte revisões taxonômicas (Padial et al., 2010).

Nossa análise indicou que nem todo citótipo pode ser considerado uma espécie distinta. A questão, então, não se resume em definir um limiar de quantos cromossomos de diferença definem diferentes espécies (e.g. mais de dois; Rincón et al., 2020). As duplas avaliadas (PRxCA/ROxJU) tiveram resultados diferentes nesse sentido, já que ambos os citótipos divergem por uma fusão em tandem (Abril et al., 2010). Apesar de mesma diferença cromossômica, a análise de delimitação identificou a primeira dupla como uma MOTU única e a segunda como duas MOTUs distintas. A dupla PR-CA não apresentou relação de monofilia recíproca, ao contrário da relação JU-RO. Adicionalmente, o tempo de divergência entre as duplas foi diferente, divergência observada como mais antiga entre os citótipos RO e JU, fator determinante para o método GMYC. A datação dessa divergência é tão antiga quanto às divergências de *M. americana*/*M. rufa* e *M. nana*/*M. bororo,* sendo a última datada em cerca de 0,7 MYA por Duarte et al. (2008). Assim, fica claro que não somente a divergência cromossômica tem influência determinante no isolamento das linhagens, mas outros fatores como o tempo de divergência são cruciais para concretizar e detectar esse isolamento.

Analisando os métodos coalescentes de delimitação empregados, do ponto de vista biológico, o método GMYC se mostrou robusto e mais adequado do que o método PTP. Espécies amplamente aceitas (*Odocoileus virginianus*, *Mazama nana*, *M. temama* e *M. bororo*) foram recuperadas nas duas análises de GMYC (referência e fecal) como MOTUs únicas, o que representa um ponto de congruência entre as avalições anteriores e a nova abordagem. As análises indicaram, ainda, a validade de *M. americana* (*sensu strictu*) e de *M. rufa*, mesmo com o aumento da amostragem e a cobertura de lacunas espaciais e citogenéticas entre as amostras avaliadas anteriormente por Luduvério (2018) e Rincón et al. (2020). A análise PTP, por sua vez, teve baixo suporte e sugeriu muitas subdivisões, indicando inclusive cada animal de *M. temama* e cada animal do citótipo Juína como potenciais espécies, o que a princípio não encontra suporte em nenhum outro conjunto de dados.

Embora a linhagem de baixo número diplóide dispor de uma amostragem pequena (dois animais de cada citótipo), o GMYC é um método que se mostra estável em diferentes circunstâncias como a baixa riqueza de espécies avaliadas e a presença de *gaps* em amostragem intraespecífica, por exemplo, pela retirada de haplótipos intermediários (Talavera et al. 2013). A delimitação por GMYC feita a partir de árvore ultramétrica do BEAST é inclusive indicada como a menos susceptível a vieses amostrais e ajustes de parâmetros da análise filogenética (Talavera et al. 2013; Tang et al 2014). Em relação ao agrupamento de CA-PR em uma MOTU, apesar de não haver consenso, a literatura discute uma tendência aglutinadora (*lumping*) do método GMYC, especialmente em casos de divergência recente (Esselstyn et al., 2012; Reid e Carstens, 2012; Talavera et al., 2013). É debatido que o método não deve ser considerado sozinho para decidir casos taxonômicos em particular, e sim aliado a outras inferências e conjunto de dados (Talavera et al., 2013; Tang et al., 2014). Desse modo, o método já contribuiu na revisão taxonômica de vertebrados como peixes (Larson et al., 2016; Machado et al., 2017) e morcegos (Esselstyn et al., 2012).

Concluindo a análise crítica perante os dados aqui observados, propõe-se que o isolamento entre PR e CA não está completo e que ambos compõem *M. rufa*. As duas linhagens devem estar posicionadas na faixa intermediária da especiação, área cinzenta de De Queiroz (2007), em que definir a limitação de espécie se faz difícil e quase sempre subjetiva (Zachos, 2018). Essa situação é natural, posto que o processo de isolamento que leva à especiação é contínuo e pode envolver outros processos como hibridização e introgressão (De Queiroz, 2007; Harrison e Larson, 2014; Zachos, 2018). O resultado conflitante do GMYC, que considerou um dos clados de Carajás como uma MOTU exclusiva na análise fecal é compreensível nesse contexto, tal como a incongruência parcial entre os dados moleculares e citogenéticos. A atual análise comparativa não buscou por congruência nos diferentes grupos de dados, o que pode ser biologicamente pouco provável em especiações recentes (Padial et al., 2010). Porém, buscou ser conservadora para não incorrer no sentido de uma inflação taxonômica (Zachos et al 2013; Zachos, 2018). O uso indiscriminado do conceito filogenético, a partir apenas de árvores de genes mitocondriais e sem nenhum caracter diagnóstico, pode levar ao exagero da divisão de espécies e deve ser evitado (Zachos et al., 2013).

Preconiza-se que uma análise taxonômica integrativa de caráter acumulativo deva ser a linha de raciocínio que guie futuras revisões, buscando destacar a citogenética como carácter taxonômico mais evidente para *Mazama*, ao mesmo tempo que se observe a monofilia das linhagens evolutivas. Com uma análise multilócus e melhor avaliação da distribuição espacial dos citótipos, o acúmulo de mais informações permitirá uma subdivisão mais embasada do complexo *M. americana* em mais espécies, se assim for necessário. O aumento da amostragem genética das populações amazônicas, muito pouco exploradas, é essencial para o entendimento da relação entre todos os citótipos. Além disso, permitirá incluir outras variantes cromossômicas que podem representar uma quantidade de espécies crípticas ainda não detectadas.

5.4 Implicações para a ecologia e conservação de *Mazama rufa* (Illiger, 1811)

Uma vez reconhecida e delimitada *Mazama rufa*, é essencial proceder com uma nova proposta de distribuição, caracterização ecológica e reavaliação do seu estado de conservação. Por conseguinte, se faz necessário acessar o maior número possível de populações para caracterizar geneticamente sua identificação, porquanto que a espécie faz parte de um complexo de espécies crípticas, juntamente com *M. americana* e *M. bororo*. O levantamento aqui realizado permite traçar um esboço da distribuição geográfica da espécie *M. rufa* (Figura 9). Além de ocorrer no Brasil, é provável que ela ocorra nas regiões de Mata Atlântica da Argentina e Paraguai, assim como possivelmente no Chaco e na Floresta Seca de Chiquitano, onde se estenderia à Bolívia no limite oeste da distribuição original de *M. americana.* A porção leste da distribuição de *M. americana* e a região central do cerrado precisam ser avaliadas em relação à presença da espécie.

Em específico, na Mata Atlântica a espécie ocorre nas formações ombrófila mista e estacional semi-decidual, também denominadas floresta de araucária e mata de interior respectivamente (Varela et al., 2010; Duarte et al., 2017). Em ambas formações ocorre em simpatria e sintopia com *M. nana* (Oliveira et al., 2019), partilhando o nicho ecológico em uma escala espacial fina (Vogliotti, 2008). Por outro lado, na floresta ombrófila densa a espécie é substituída por *Mazama bororo*, em que não há informação de simtopia entre

elas (Duarte et al., 2017). As formações onde a espécie ocorre (araucária e interior) são as mais impactadas da Mata Atlântica, caracterizadas por intensa fragmentação (Ribeiro et al., 2009). No que se relaciona a sua distribuição no Cerrado, seria naturalmente menos abrangente, se limitando às formações florestais do bioma como mata ciliares, capões e cerradões (Varela et al., 2010). O alto grau de conversão da vegetação nativa e a intensa fragmentação impactam seriamente o bioma, que perdeu mais de 50% da sua cobertura nativa (Klink e Machado, 2005; Reynolds et al., 2016). Ademais, o Cerrado carece de unidades de conservação, com apenas 3% de sua área sob proteção integral (Françoso et al., 2015). Em uma situação, por hora, um pouco mais confortável, o Pantanal representa um refúgio de grandes contingentes populacionais para vários mamíferos, em especial veados (Tomas et al., 2010). O avanço da fronteira agrícola, o uso de pastagens não nativas e alterações do fluxo hídrico por construções de barragens no entorno da planície representam as principais ameaças à região (Alho et al., 2011).

Curiosamente, Allen (1915) já indicava a presença de *Mazama rufa* na região do Pantanal e do Mato Grosso. Allen (1915) coloca que “sem dúvida” os sete espécimes de veado-mateiro obtidos pela Expedição Roosevelt-Rondon (1913-14), analisados por ele, correspondem à *M. rufa* e não à outras espécies de *Mazama* vermelhos. Os espécimes em questão são oriundos do morro do Urucum, município de Corumbá (MS), Rio Sipotuba (proximidade de Cáceres-MT) e Chapada (MT), regiões agora geneticamente confirmadas para a espécie.

Vários estudos postularam que a potencial espécie representada pelo citótipo Paraná, hoje a revalidada *M. rufa,* estaria limitada à Mata Atlântica e provavelmente estaria em alto grau de amaça (Aabril et al., 2010; Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017). Por outro lado, os resultados obtidos aqui indicam que a espécie apresenta uma ampla distribuição, estando presente não só na Mata Atlântica, mas como também Cerrado, Pantanal e até mesmo na região sul-sudeste da Amazônia. Observando os critérios da IUCN (IUCN, 2012), é possível supor um declínio acentuado nos últimos 15 anos, porém observa-se que *M. rufa* tem ampla distribuição, várias subpopulações e um número de indivíduos maduros provavelmente elevado. Dessa forma, em uma análise preliminar, quando devidamente avaliada pelo processo da IUCN, projeta-se que a espécie não deve ser classificada dentro de uma categoria de ameaça de

extinção. Não obstante, destaca-se que existem sérias ameaças ao táxon, como o avanço da fronteira agrícola, a degradação de ecossistemas, o contato com doenças de ungulados domésticos, a presença de cães em UCs e a caça, isto é, ameaças comuns entre as espécies de *Mazama* (Duarte et al., 2015; Vogliotti et al., 2016; Duarte e Vogliotti, 2016).

Refinar as informações de distribuição, como já realizado para *M. nana* e *M. bororo* através de modelagem de nicho (Duarte et al., 2017; Oliveira et al., 2019), se configura como uma possibilidade real e muito informativa com os dados aqui produzidos. Outras iniciativas, como o levantamento das populações amazônicas, são essenciais para entender e avaliar seu estado de ameaça. Desse modo, também se faz prioritário melhorar a amostragem e caracterização genética nas zonas de contato entre *M. rufa* e os citótipos Rondônia e Juína de *M. americana*, no oeste amazônico. Assim como também se faz necessário averiguar o contato entre *M. rufa* e *M. bororo*, em Minas Gerais e nas regiões central e norte da Mata Atlântica, onde a presença da espécie não é confirmada geneticamente.

6. CONCLUSÕES

O complexo *Mazama americana* (Erxleben, 1777) foi recuperado como não monofilético e os citótipos Juína e Rondônia devem ser consideradas potenciais novas espécies a serem descritas. A utilização de amostragem fecal não invasiva foi informativa, tal método proporcionou aumento na amostragem genética das diferentes espécies de *Mazama*. Ambas as espécies *M. americana* (*sensu strictu*) e *Mazama rufa* (Illiger, 1811) foram consideradas válidas, sendo que *M. rufa* é composta pelos citótipos Paraná e Carajás, e tem ampla distribuição pelos biomas da Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal e pelo menos a faixa sul sudeste da Amazônia. A utilização da taxonomia integrativa contribuiu para melhor entendimento da diversidade do grupo, visto que proporcionou a análise de questões que não puderam ser sanadas somente com dados morfológicos tradicionais, informações citogenéticas ou dados do gene Cytb.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abril VV; Duarte JMB (2008) Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, 3:53-57.

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

Agnarsson I, May-Collado LJ (2008) The phylogeny of Cetartiodactyla: The importance of dense taxon sampling, missing data, and the remarkable promise of cytochrome b to provide reliable species-level phylogenies. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 48:964–985.

Alho CJR (2011) Biodiversity of the Pantanal: its magnitude, human occupation, environmental threats and challenges for conservation. **Brazilian Journal of Biology** 71(1):229-232.

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

Ambriz-Morales P, De La Rosa-Reyna XF, Sifuentes-Rincon AM, Parra-Bracamonte GM, Villa-Melchor A, Chassin-Noria O, Arellano-Vera W (2016) The complete mitochondrial genomes of nine white-tailed deer subspecies and their genomic differences. **Journal of Mammalogy** 97(1): 234-245.

Azara, F (1802) Apuntamentos para la História Natural de los Quadrúpedos del Paraguay y Rio de la Plata. Madrid: En La 318 p.

Barrette C. (1987) The comparative behaviour and ecology of chevrotains, musk deer and morphologically conservative deer. In: Wemmer CM (Ed.). **Biology and management of the Cervidae**. Washington: Smithsonian Institution Press, p. 200-213.

Bickford D et al. (2007) Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 22 (3):148-155.

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

Caparroz R, Mantellatto AMB, Bertioli D, Figueiredo M, Duarte JMB (2015) Characterization of the complete mitochondrial genome and a set of polymorphic microsatellite markers through next-generation sequencing for the brown brocket deer *Mazama gouazoubira*. **Genetics and Molecular Biology** 38(3):338-345.

Carranza J, Roldán M, Duarte JMB (2018) Lack of mate selectivity for genetic compatibility within the red brocket deer *Mazama americana* complex, **Mammalian Biology** 88:168-175.

Carroll EL, Bruford MW, Dewoody JA, Leroy, G, Strand A, Waits L, Wang J (2018) Genetic and genomic monitoring with minimally invasive sampling methods. **Evolutionary Applications** 11(7):1094-1119.

Cassini GH, Toledo, N (2020) An Ecomorphological Approach to Craniomandibular Integration in Neotropical Deer. **Journal of Mammalian Evolution** 1-13.

Castillo AH, Cortinas MN, Lessa, EP (2005) Rapid diversification of South american tuco-tucos (Ctenomys; Rodentia, Ctenomyidae): contrasting mitochondrial and nuclear intron sequences. **Journal of Mammalogy** 86(1):170-179.

Chiou KL, Bergey CM (2018) Methylation-based enrichment facilitates low-cost, noninvasive genomic scale sequencing of populations from feces. **Scientific reports** 8(1):1975.

Costa EBV, De Oliveira ML, Peres PHDF, Grotta-Neto F, Vogliotti A, Piovezan U, Duarte JMB (2017) Low accuracy of identifying Neotropical deer species by scat morphology. **Studies on Neotropical Fauna and Environment** 52(1):37-42.

Costa V, Rosenbom S, Monteiro R, O'rourke SM, Beja-Pereira A (2017) Improving DNA quality extracted from fecal samples—a method to improve DNA yield. **European Journal of Wildlife Research** 63(1) 3.

Cracraft, J. (1983). Species concepts and speciation analysis. In: Johnston, R. F. (ed) **Current Ornithology**, Lawrence: University of Kansas, 1:159–187.

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

Czernay S (1987) Die Spiesshirsche und Pudus: die Gattungen Mazama und Pudu **A. Ziemsen, Wittenberg Lutherstadt.** Die Neue Brehm-Bucherei Heft p. 581-84.

Darriba D., Taboada GL, Doallo R, Posada D (2012) JModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. **Nature Methods** 9(8):772.

De Queiroz K (2007) Species concepts and species delimitation. **Systematic Biology** 56: 879–886.

Dool SE, Puechmaille SJ, Foley NM, Allegrini B, Bastian A, Mutumi GL, Maluleke TG, Odendaal LJ, Teeling EC, Jacobs DS (2016) Nuclear introns outperfom mitochondrial DNA in inter-specific phylogenetic reconstruction: Lessons from horseshoe bats (Rhinolophidae: Chiroptera). **Molecular Phylogenetics and Evolution** 97:196-212.

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

Duarte JMB (1998) **Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil**. 45 f. Tese (Doutorado em Genética) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Botucatu.

Duarte JMB, Jorge W (2003) Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte,1996) in Brazil. **Mammalia** 67(3):403-410.

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

Duarte JMB, Vogliotti, A, Cartes JL, Oliveira ML (2015) *Mazama nana*. **The IUCN Red List of Threatened Species** 2015: eT29621A22154379

Duarte JMB e Vogliotti A (2016) *Mazama americana*. **The IUCN Red List of Threatened Species** 2016: e.T29619A22154827.

Duarte JMB, Talarico AC, Vogliotti, A, Garcia JE, Oliveira ML, Maldonado JE, Gonzalez S (2017) Scat detection dogs, DNA and species distribution modelling reveal a diminutive geographical range for the Vulnerable small red brocket deer *Mazama bororo*. **Oryx** 51(4):656-664.

Erxleben JCP (1777) Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates cum synonymia et history animalium, Classis 1. Mammalia. Impensis Weygandianis 1:1–636.

Escobedo-Morales LA, Mandujano S, Eguiarte LE, Rodríguez-Rodríguez MA, Maldonado JE (2016) First phylogenetic analysis of Mesoamerican brocket deer *Mazama pandora* and *Mazama temama* (Cetartiodactyla: Cervidae) based on mitochondrial sequences: Implications on Neotropical deer evolution. **Mammalian Biology-Zeitschriftfür Säugetierkunde** 81(3):303-313.

Esselstyn JA, Evans, BJ, Sedlock, JL, Anwarali Khan FA, Heaney, LR (2012) Single-locus species delimitation: a test of the mixed Yule–coalescent model, with an empirical application to Philippine round-leaf bats. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences** 279(1743):3678-3686.

Fiorillo BF, Sarria-Perea JA, Abril VV, Duarte JMB (2013) Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla, Cervidae). **Comparative Cytogenetics**, 7 (1):25-31.

Floyd R, Abebe E, Papert A, Blaxter M (2002) Molecular barcodes for soil nematode identification. **Molecular Ecology** 11(4):839-850.

Fontana F; Rubini M (1990) Chromosomal evolution in Cervidae. **Biosystems**, 34:157-174.

Françoso RD, Brandão R, Nogueira CC, Salmona YB, Machado RB, Colli GR (2015) Habitat loss and the effectiveness of protected areas in the Cerrado Biodiversity Hotspot. **Natureza & Conservação** 13(1):35-40.

Fujita MK, Leaché AD, Burbrink FT, McGuire JA, Moritz C (2012) Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. **Trends in Ecology and Evolution** 27(9):480-488.

Geist V (2000) Descent, adaptation, adjustment: lessons from the Cervidae and other beasts. In: Vrba ES; Schaller GB (Eds) **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation.** New Haven: Yale University Press, p. 180-188.

Gilbert, C, Ropiquet A., Hassanin A (2006) Mitochondrial and nuclear phylogenies of Cervidae (Mammalia, Ruminantia): Systematics, mophology, and biogeography. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 40:101-117.

Gippoliti S, Cotterrill FPD, Zinner D, Groves CP (2018) Impacts of taxonomic inertia for the conservation of African ungulate diversity: an overview. **Biological Reviews** 93:115–130.

González S, Maldonado JE, Ortega J, Talarico AC, Bidegaraybatista L, Garcia JE, Duarte JMB (2009) Identification of the emdangered small red brocket deer (*Mazama bororo*) using noninvasive genetic techniques (Mammalia; Cervidae). **Molecular Ecology Resources**, 9:754-758.

González, S.; Duarte, J. M. B.; Maldonado, J. E. Molecular Phylogenetics and Evolution (2010). In: Duarte JMB e Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology**, Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, pp. 2-11.

González S, Mantellatto AMB, Duarte JMB (2018) Craniometrical differentiation of gray brocket deer species from Brazil. **Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales nueva serie,** 20:179–193

Graur D, Higgins DG (1994). Molecular evidence for the inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla. **Molecular Biology and Evolution** 11: 357–364.

Gutiérrez EE, Maldonado JE, Radosavljevic A, Molinari J, Patterson BD, Martínez-C JM, Rutter AR, Hawking MTR, García, FJ, Helgen, KM (2015) The taxonomic status of *Mazama bricenii* and the significance of the Tíchira depression for mammalian endemism in the Cordillera de Mérida Venezuela**.** **PLoS One** 10(6): e0129113.

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.

Hall TA (199) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. **Nucl. Acids. Symp. Ser.** 41:95-98.

Harrison RG, Larson EL (2014) Hybridization, introgression, and the nature of species boundaries. **Journal of Heredity** 105(S1):795-809.

Hassanin A, Delsuc F, Ropiquet A, Hammer C, Van Vuuren BJ, Matthee C, Ruiz-Garcia M, Catzeflis F, Areskoug V, Nguyen TT, Couloux A (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.

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

Heckberg NS (2020) The systematics of the Cervidae: a total evidence approch. **PeerJ** 8:e8114.

Hernández Fernández M, Vrba ES (2005) A complete estimate of the phylogenetic relationships in Ruminantia: a dated species-level supertree of the extant ruminants. **Biological Reviews** 80(2):269–302.

Herzog S; Harrington R (1991) The role of hybridization in the karyotype evolution of deer (Cervidae; Artiodactyla; Mammalia). **Theoretical and Applied Genetics**, 82 (4):425-429.

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

Igea J, Juste J, Castresana J (2010) Novel intron markers to study the phylogeny of closely related mammalian species. **BMC Evolutionary Biology** 10(1):369.

Igea J, Aymerich P, Bannikova AA, Gosálbez J, Castresana J (2015) Multilocus species trees and species delimitation in a temporal context: application to the water shrews of the genus *Neomys*. **BMC Evolutionary Biology** 15(1):209.

Illiger JKW (1815) Überblick der Säugthiere nach ihrer Vertheilung über die Welttheile in **Abhandlungen der physikalishe Klasse der Koeniglich-Preussischen** Berlin, Akademie der Wissenschaften, 1804-1811 p. 39-159.

Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC (1991) Evolution of the cytochrome b gene of mammals. **Journal of Molecular Evolution** 32:128–144.

IUCN (2012) **IUCN Red List Categories and Criteria: Version 3.1**. Second edition. Gland, Switzerland and Cambridge, UK: IUCN p. 32, 2012.

IUCN 2020. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-1. <https://www.iucnredlist.org>

Ivy JA, Putnam AS, Navarro AY, Gurr J, Ryder OA (2016). Applying SNP-derived molecular coancestry estimates to captive breeding programs. **Journal of Heredity** 107(5):403-412.

Jorge W, Benirsche K (1977) Centromericheterochromatine and G-banding of the red broket deer, *Mazama americana temama* (Cervoidea, Artyodactyla) with a probable nonrobertsonian translocation. **Cytologia (Tokio)** 42(3-4):711-721.

Katoh K., Rozewicki, J., & Yamada, K. D. (2019). MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. **Briefings in bioinformatics**, 20(4), 1160-1166.

Klink CA, Machado RB (2005) Conservation of the Brazilian cerrado. **Conservation Biology** 19(3):707-713.

Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K (2018) MEGA X: Genetics analysis across computing platforms. **Molecular Biology and Evolution** 35(6):1547-1549.

Larson ER, Castelin M, Williams BW, Olden J D, Abbott, CL (2016) Phylogenetic species delimitation for crayfishes of the genus *Pacifastacus*. **PeerJ**, 4, e1915.

Luduvério DJ (2018) **Status taxonômico de *Cervus rufus* Illiger, 1811 e sua caracterização genética e morfológica.** 83 f Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) Unesp, Jaboticabal.

Lydekker R (1898) **The Deer of All Lands A History of the Family Cervidae Living and Extinct** London: Rowland Ward p. 329.

Mace GM (2004) The role of taxonomy in species conservation. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences** 359(1444):711-719.

Machado CDB, Ishizuka TK, Freitas PDD, Valiati, VH, Galetti Jr PM (2017) DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). **Systematics and Biodiversity** 15(4):372-382.

Maddison WP, Maddison DR (2019) **Mesquite: a modular system for evolutionary analysis.** Version 3.51.

Maffei L, Taber AB (2003) Area de acción de *Mazama americana* (Cervidae) enun bosque seco de Bolivia. **Ecología en Bolivia** 38(2):179-180.

Mantellatto AMB, González S, Duarte JMB (2020) Molecular identification of *Mazama* species (Cervidae: Artiodactyla) from natural history collections. **Genetics and Molecular Biology** 43(2) e20190008.

Mayr, E. (1942). **Systematics and the origin of species**. Columbia University Press, New York.

McMahon BJ, Teeling EC, Höglund J (2014) How and why should we implement genomics into conservation? **Evolutionary Applications** 7(9):999-1007.

Merino ML, Milne N, Vizcaíno SF (2005) A cranial morphometric study of deer (Mammalia, Cervidae) from Argentina using threedimensional landmarks. **Acta Theriologica** 50 (1):91–108

Merino ML e Rossi RV (2010) Origin, Systematics, and Morphological Radiation. In: Duarte JMB e Gonzalez S (Eds.) **Neotropical Cervidology**, Biology and Medicine of Latin American Deer. Funep/IUCN, Jaboticabal/Gland, pp. 2-11.

Miller MA, Pfeiffer W, Schwartz T (2010) Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. In: 2010 GATEWAY COMPUTING ENVIRONMENTS WORKSHOP (GCE). Piscataway: IEEE, p.1-8

Monaghan MT, et al (2009) Accelerated species Inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. **Systematic Biology** 58:298–311.

Montgelard C, Catzeflis FM, Douzery E (1997) Phylogenetic relationships of artiodactyls and cetaceans as deduced from the comparison of cytochrome b and 12S rRNA mitochondrial sequences. **Molecular Biology and Evolution**. 14:550–559.

Oliveira ML, Do Couto HTZ, Duarte JMB (2019) Distribution of the elusive and threatened Brazilian dwarf brocket deer refined by non-invasive genetic sampling and distribution modelling. **European Journal of Wildlife Research** 65(2):21.

Oliveira ML, Peres PHF, Gatti A, Morales-Donoso JA, Mangini PR, Duarte JMB (2020) Faecal DNA and camera traps detect an evolutionarily significant unit of the Amazonian brocket deer in the Brazilian Atlantic Forest. **European Journal of Wildlife Research** 66(2):1-10.

Olson DM, et al. (2001) Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on EarthA new global map of terrestrial ecoregions provides an innovative tool for conserving biodiversity. **BioScience** 51(11):933-938.

Padial JM, Miralles A, De La Riva I, Vences M (2010) The integrative future of taxonomy. **Frontiers in Zoology** 7(1):16.

Peres PHF (2015) **Uso do espaço pelo veado-catingueiro (*Mazama gouazoubira*; Fisher, 1814): uma comparação entre colares GPS e DNA fecal.** 84 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Pons J, Barraclought TG, Gomez-Zurita, J, Cardoso A, Duran DP, Hazell S, Kamoun S, Sumlin WD, Vogler AP (2006) Sequence-Based species delimitation fot the DNA taxonomy of undescribed insects. **Systematic Biology** 55(4):595-609.

Pougens, Paris, France 1:lxxx 1 1–366.Beja-Perreira A, Oliveira R, Alves PC, Schwartz MK, Luikart G (2009) Advancing ecological understandings through technological transformations in noninvasive genetics. **Molecular Ecology Resources** 9(5):1279–1301.

Putman RJ (1988) **The natural history of deer**. London: Christopher Helm, 191 p.

R Core Team (2017). **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL https://www.R-project.org/

Rafinesque CS (1817) **Analyse de la Nature. Tableau de l'Univers et des Corps organisés**. Palerme, 1:224.

Reid NM e Carstens BC (2012) Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. **BMC Evolutionary Biology** 12(1):196.

Reynolds J, Wesson K, Desbiez AL, Ochoa-Quintero JM, Leimmgruber P (2016) Using remote sensing and random forest to assess the conservation status of critical Cerrado habitats in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Land** 5(2):1-12.

Ribeiro MC, Metzger JP, Martensen AC, Ponzoni, FJ, Hirota, MM (2009) The Brazilian Atlantic Forest: How much is left, and how is the remaining forest distributed? Implications for conservation. **Biological Conservation** 142(6):1141-1153.

Rieseberg LH (2001) Chromosomal rearrangements and speciation. **Trends in Ecology and Evolution** 16:351–358.

Rincón AC, Morales-Donoso JA, Sandoval EDP, Tomazella, IM, Mantellatto AMB, Thoisy B, Duarte JMB (2020) Designation of a neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla: Cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. **ZooKeys** *in press.*

Rossi RV (2000) **Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae).** 174 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas-Zoologia), Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo, São Paulo.

Salicini I, Ibanez C, Juste J (2011) Multilocus phylogeny and species delimitation within the Natterer's bat species complex in the Western Paleartic. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 61(3):888-898.

Salviano MB, Cursino MS, Zanetti ES, Abril VV, Duarte JMB (2017) Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction** 96:1279–1287.

Sambrook J, Fritsch E, Maniats T (1989) **Molecular Cloning: a Laboratory Manual**. New York: Cold Spring Harbor Press, 2:18-47.

Sandoval EDP (2019) **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama temama* (Kerr, 1792): proposição de um neótipo para a espécie.** 70p. v Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal). Unesp, Jaboticabal.

Shaw KL (2002) Conflict between nuclear and mitochondrial DNA phylogenies of a recent species radiation: what mtDNA reveals and conceals about modes of speciation in Hawaiian crickets. **Proceedings of the National Academy of Sciences** 99(25):16122-16127.

Souza JN, Oliveira ML, Duarte JMB (2013) A PCR/RFLP methodology to identify non-Amazonian Brazilian deer species. **Conservation Genetics Resources** 5:639–641.

Stamatakis A (2014) RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies. **Bioinformatics** 10.1093/bioinformatics/btu033 http://bioinformatics.oxfordjournals.org/content/early/2014/01/21/bioinformatics.btu033.abstract, 2014

Talavera G, Dincã V, Vila R (2013) Factors affecting species delimitations with the GMYC model: insights from a butterfly survey. **Methods in Ecology and Evolution** 4(12):1101-1110.

Tang CQ, Humphreys AM, Fontaneto D, Barraclough TG (2014) Effects of phylogenetic reconstruction method on the robustness of species delimitation using single-locus data. **Methods in Ecology and Evolution** 5(10):1086-1094.

Teske PR, Golla TR, Sandoval-Castillo J, Emami-Khoyi A, Van Der Lingen CD, Von Der Heyden S, Chiazzari B, Van Vuuren BV, Beheregaray LB (2018) Mitochondrial DNA is unsuitable to test for isolation by distance. **Scientific Reports** 8, 8448.

Thomas O (1913). On certain of the smaller S. American Cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, 8(11):585-589.

Tomas, WM, Cáceres, NC, Nunes, AP, Fischer E, Mourão G, Campos Z (2010) Mammals in the Pantanal wetland, Brazil.I In.: Junk, WJ, Da Silva, CJ, Nunes da Cunha C, Wantzen KM (Eds.)**The Pantanal: ecology, biodiversity and sustainable management of a large neotropical seasonal wetland.** Sofia-Moscow: Pensoft Publishers, p. 563-595

Udvardy, MDF (1975) **A classification of the biogeographical provinces of the world**. Zurique, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, 50 p.

Varela DM, Trovat IRG, Guzman KR, Rossi, RV, Duarte JMB (2010) Red brocket deer *Mazama americana* (Erxleben 1777). In.: Duarte JMB, González S (Eds.) **Neotropical Cervidology**. IUCN/FUNEP:Jaboticabal, p. 151-159.

Vilà C, Amorim IR, Leonard JA, Posada D, Castroviejo J, Petrucci-Fonseca F, Crandall KA, Ellegren H, Wayne RK (1999) Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf Canis lupus. **Molecular Ecology, Oxford** 8(12):2089-2103.

Vogliotti A (2003) **História Natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da Etnozoologia, Monitoramento Fotográfico e Rádio-Telemetria**. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas)

Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Vogliotti A (2008) **Partição de habitats entre os cervídeos no Parque Nacional do Iguaçu.** 69 f. Tese (Doutorado em Ecologia Aplicada) Escola Superior de Agricultora “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba.

Vogliotti, A, Oliveira ML, Duarte JMB (2016) *Mazama bororo* **The IUCN Red List of Threatened Species** 2016: e.T41023A22155086. Downloaded on 24 June 2020

Webb DS (2000) Evolutionary History of new world cervidae. In: Vrba ES; Schaller GB. **Antelopes, Deer, and Relatives: fossil record, behavioral ecology, systematic, and conservation.** New Haven: Yale University Press, p. 38-64.

Weber M, González S (2003) Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience,** 10(4):443-454.

Weckel M, Giuliano W, Silver S (2006) Jaguar (*Panthera onca*) feeding ecology: distribution of predator and prey through time and space. **Journal of Zoology**, 270 (1):25-30.

Xia X, Xie Z, Salemi M, Chen L, Wang Y (2003) An index of substitution saturation and its application. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 26:1-7.

Xia X, Lemey, P (2009) Assessing substitution saturation with DAMBE. In.: Lemey P, Salemi M, Vandamme A **The Phylogenetic Handbook: A Practical Approach to DNA and Protein Phylogeny**. 2nd. Edition, Cambridge, Cambridge University Press, p. 615-630.

Xia X (2018) DAMBE7: new and improved tools for data analysis in molecular biology and evolution. **Molecular Biology and Evolution** 35(6):1550-1552.

Zachos FE et al. (2013) Species inflation and taxonomic artefacts—A critical comment on recent trends in mammalian classification. **Mammalian Biology**, 78(1):1-6.

Zachos FE (2018) Mammals and meaningful taxonomic units: the debate about species concepts and conservation. **Mammal Review** 48(3):153-159.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A

TRIAGEM DE IDENTIFICAÇÃO DE ESPÉCIES DE CERVÍDEOS

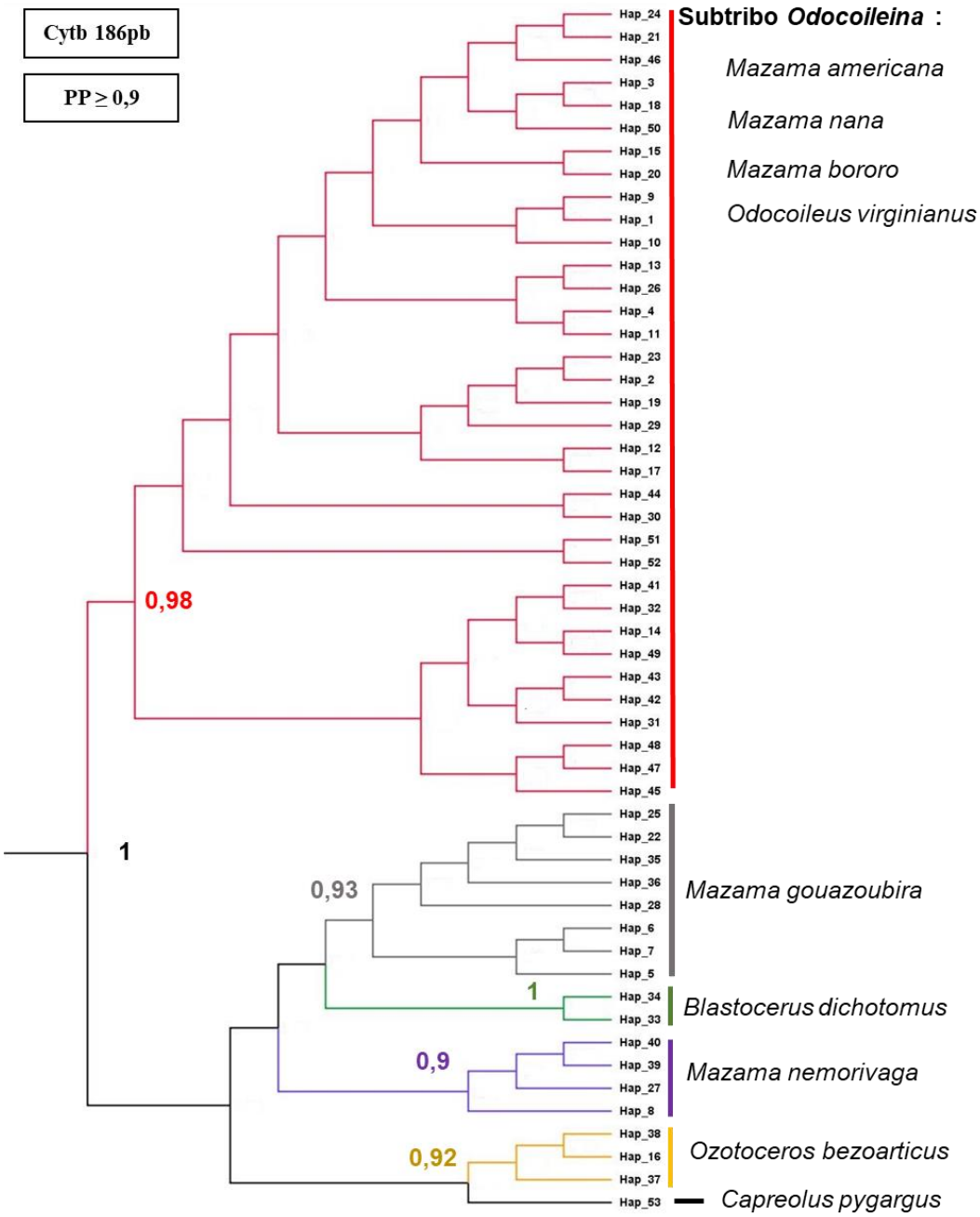


Figura 1A- Hipótese filogenética gerada a partir de sequencias do gene Cytb (186 pb) de 53 haplótipos referentes a 45 animais de referência da matriz de Duarte et al (2008) e 147 amostras fecais de cervídeos (Cetartiodactyla:Cervidae). A análise foi gerada por inferência bayesiana através do programa BEAST. Nós com valores de suporte abaixo de 0,8 de probabilidade posterior foram omitidos da árvore. O clado vermelho representa a subtribo Odocoileina, cuja identificação a nível de espécie foi realizada após a triagem inicial, que descartou amostras fecais das espécies *Mazama gouazoubira* (Fischer, 1814), *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), *Ozotoceros bezoarticus* (Linnaeus, 1758) e *Blastocerus dichotomus* (Illiger, 1815).

APÊNDICE B

ANÁLISE DE SATURAÇÃO POR SUBSTITUIÇÃO

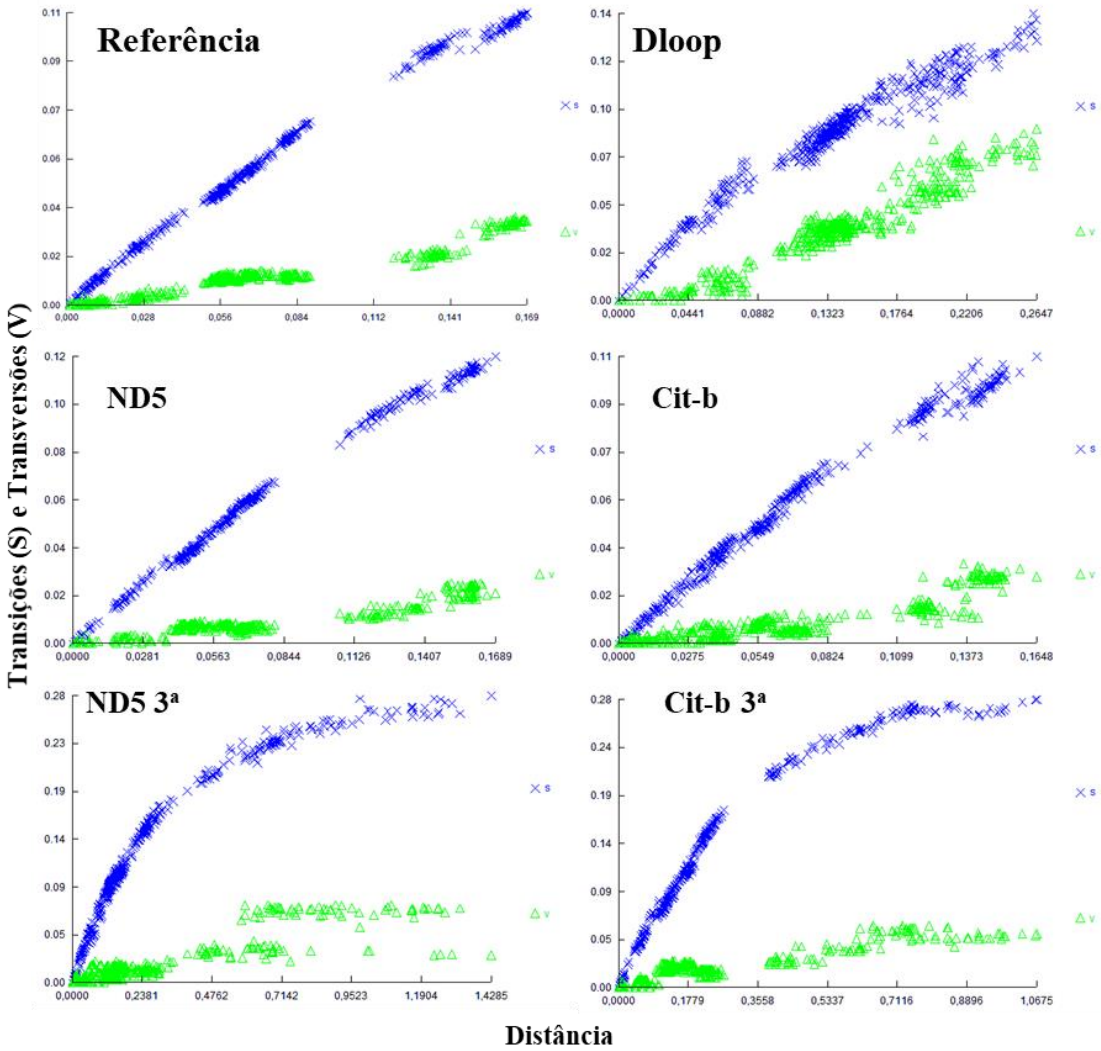


Figura 1B-Gráfico de saturação por substituição, em que se demonstra as transições (S, em azu) e transversões (V, em verde) em função da distância genética, calculada par-a-par através do modelo GTRI. A análise foi realizada para 35 sequências de cervídeos das matrizes de referência completa (2625 pb), Dloop (453 pb), ND5 (1179 pb) e Cit-b (993 pb). Por fim, o resultado da análise da terceira posição do códon dos genete Cit-b (331 pb) e ND5 (393 pb).

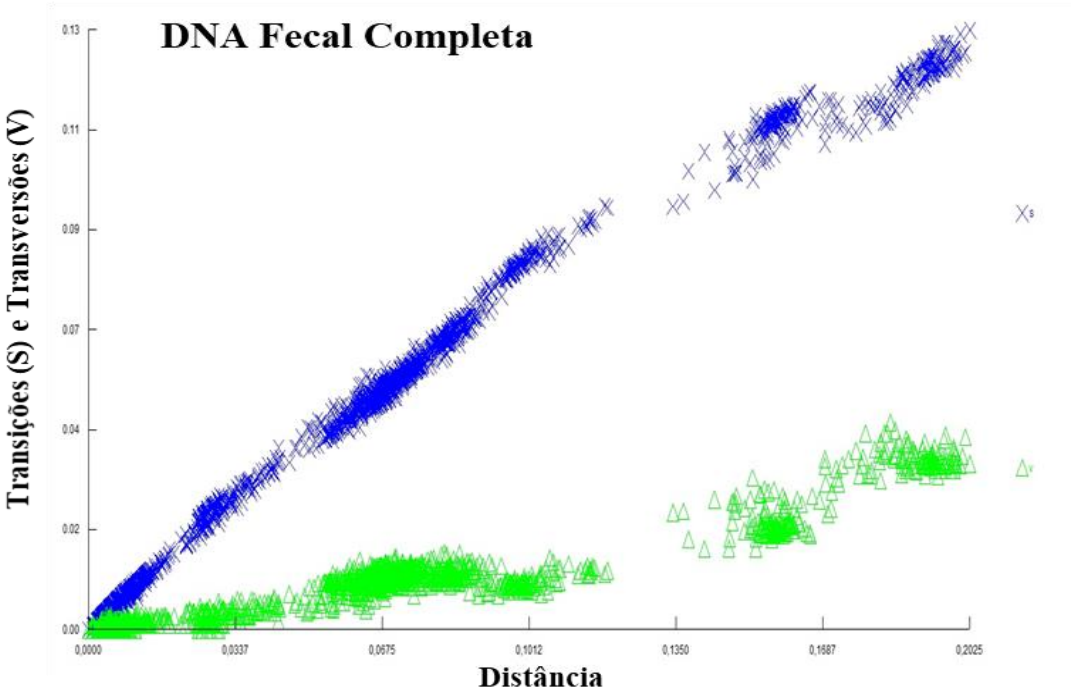


Figura 2B- Gráfico de saturação por substituição, em que se demostra as transições (S, em azu) e transversões (V, em verde) em função da distância genética, calculada par-a-par através do modelo GTRI, para 56 sequências de cervídeos da matriz de DNA fecal completa (1104 pb).

Tabela 1B- Teste pelo índice de saturação por substituição (Iss) realizado para as matrizes avaliadas, sendo que valores do índice estimado significativamente (p<0,05) menores que o índice de referência (Iss.c) indicativo de baixa saturação.

Matriz	Iss Estimado	Iss.c de Referência			
		Árvore Simétrica	*p*	Árvore Assimétrica	*p*
Referência Completa	0,197	0,79	<0,01	0,52	<0,01
Cit-B	0,15	0,728	<0,01	0,407	<0,01
Dloop	0,287	0,682	<0,01	0,354	<0,05
ND5	0,202	0,746	<0,01	0,439	<0,01
Cit-B 3	0,234	0,684	<0,01	0,361	<0,01
ND5 3	0,256	0,684	<0,01	0,354	<0,01
DNA Fecal Completa	0,114	0,693	<0,01	0,365	<0,01

APÊNDICE C

INFERÊNCIAS FILOGENÉTICAS DAS MATRIZES DERIVADAS: GENES E RECORTE DNA FECAL

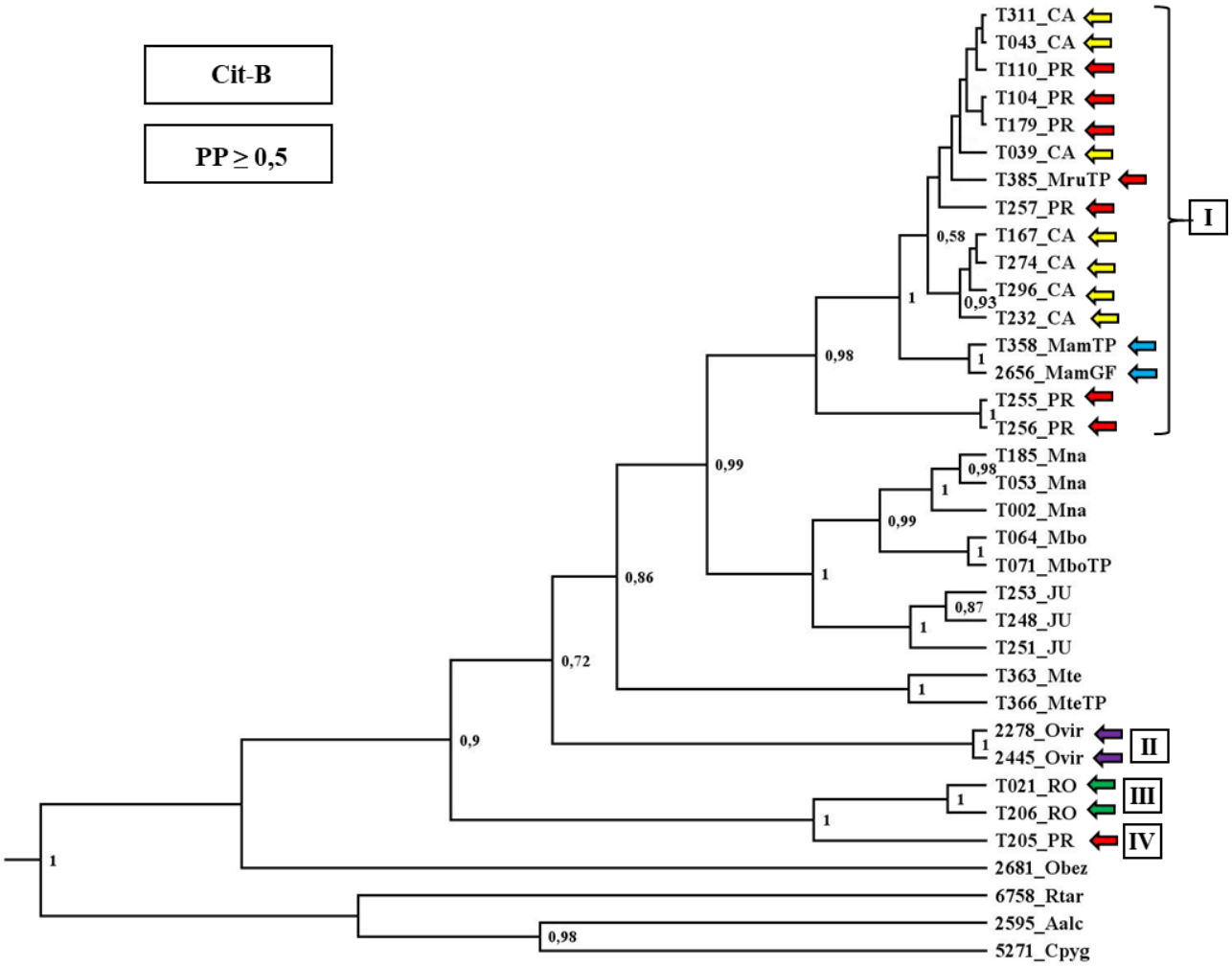


Figura 1C- Hipótese filogenética gerada a partir de sequencias do gene Cytb (993 pb) de 35 amostras de referência de animais da subtribo Odocoileina (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae). A análise foi gerada por inferência bayesiana através do programa BEAST. Nós com valores de suporte abaixo de 0,5 de probabilidade posterior foram omitidos da árvore. O clado I demostra ausência de monofilia entre os citótipo Paraná (vermelho), Carajás (amarelo) e Guiana Francesa (azul), o clado II mostras o posicionamento interno do gênero *Odocoileus* Rafinesque, 1832 (roxo) em relação ao gênero *Mazama* Rafinesque, 1817, o clado III representa o citótipo Rondônia (verde) em posição externa e como grupo irmão do clado IV, que mostra um espécime do citótipo Paraná numa posição distante dos demais animais de cariótipo semelhante.

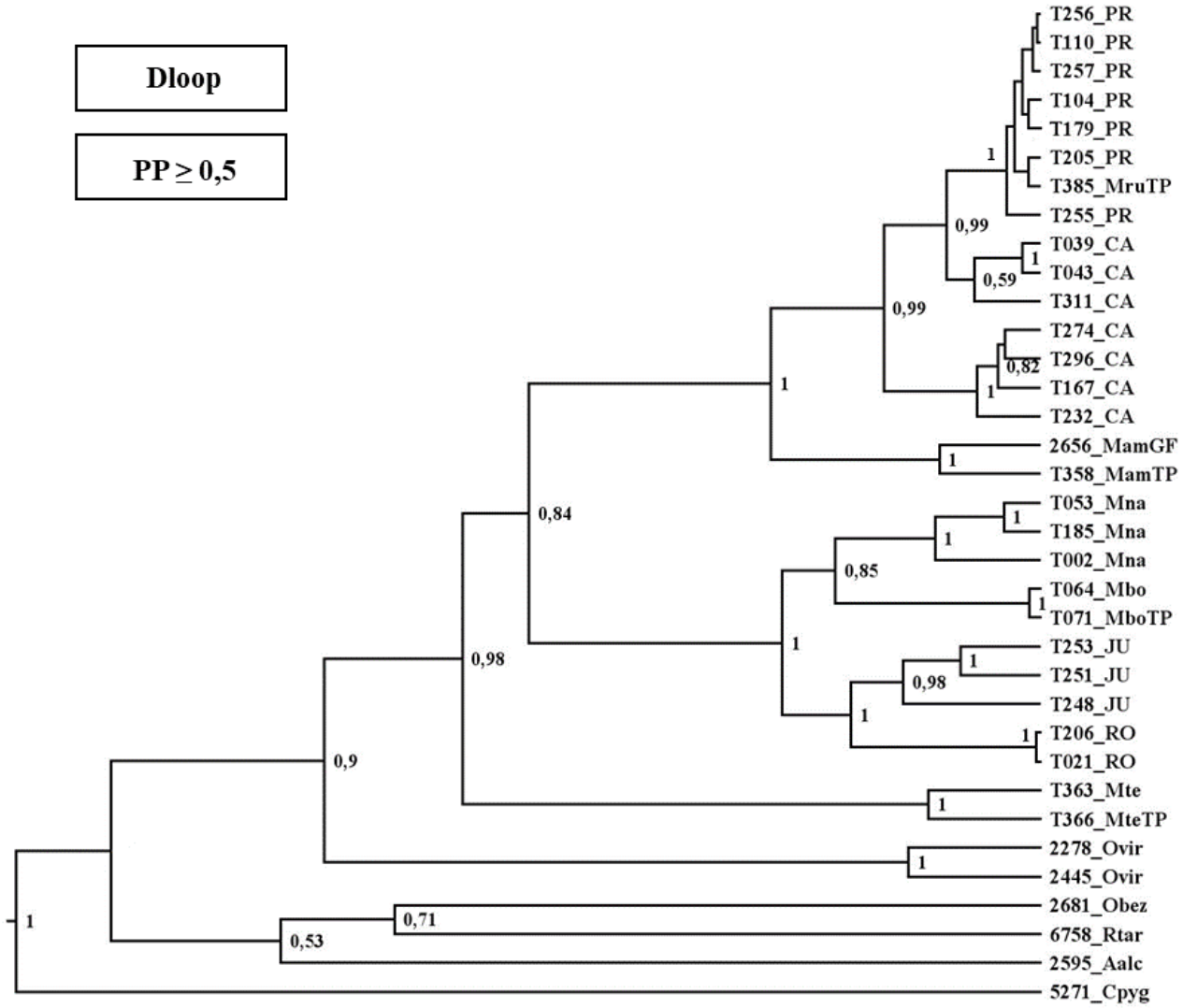


Figura 2C- Hipótese filogenética gerada a partir de sequencias da região controle Dloop (453 pb) de 35 amostras de referência de animais da subtribo Odocoileina (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae). A análise foi gerada por inferência bayesiana através do programa BEAST. Nós com valores de suporte abaixo de 0,5 de probabilidade posterior foram omitidos da árvore. A topologia inferida coincide com a topologia da matriz de referência completa, com menor suporte em alguns clados.

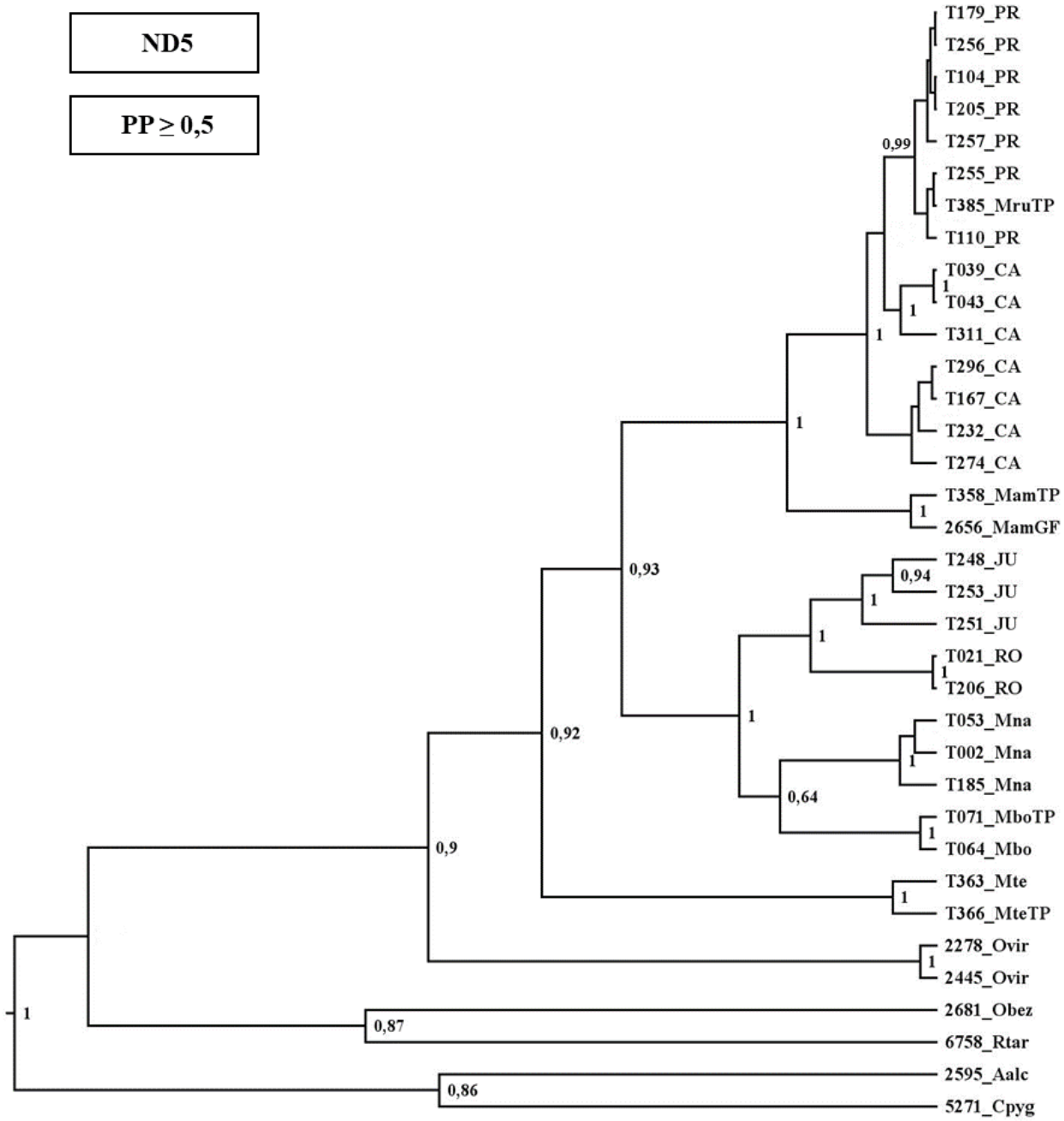


Figura 3C- Hipótese filogenética gerada a partir de sequencias do gene ND5 (1179 pb) de 35 amostras de referência de animais da subtribo Odocoileina (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae). A análise foi gerada por inferência bayesiana através do programa BEAST. Nós com valores de suporte abaixo de 0,5 de probabilidade posterior foram omitidos da árvore. A topologia inferida coincide com a topologia da matriz de referência completa, com menor suporte em alguns clados.

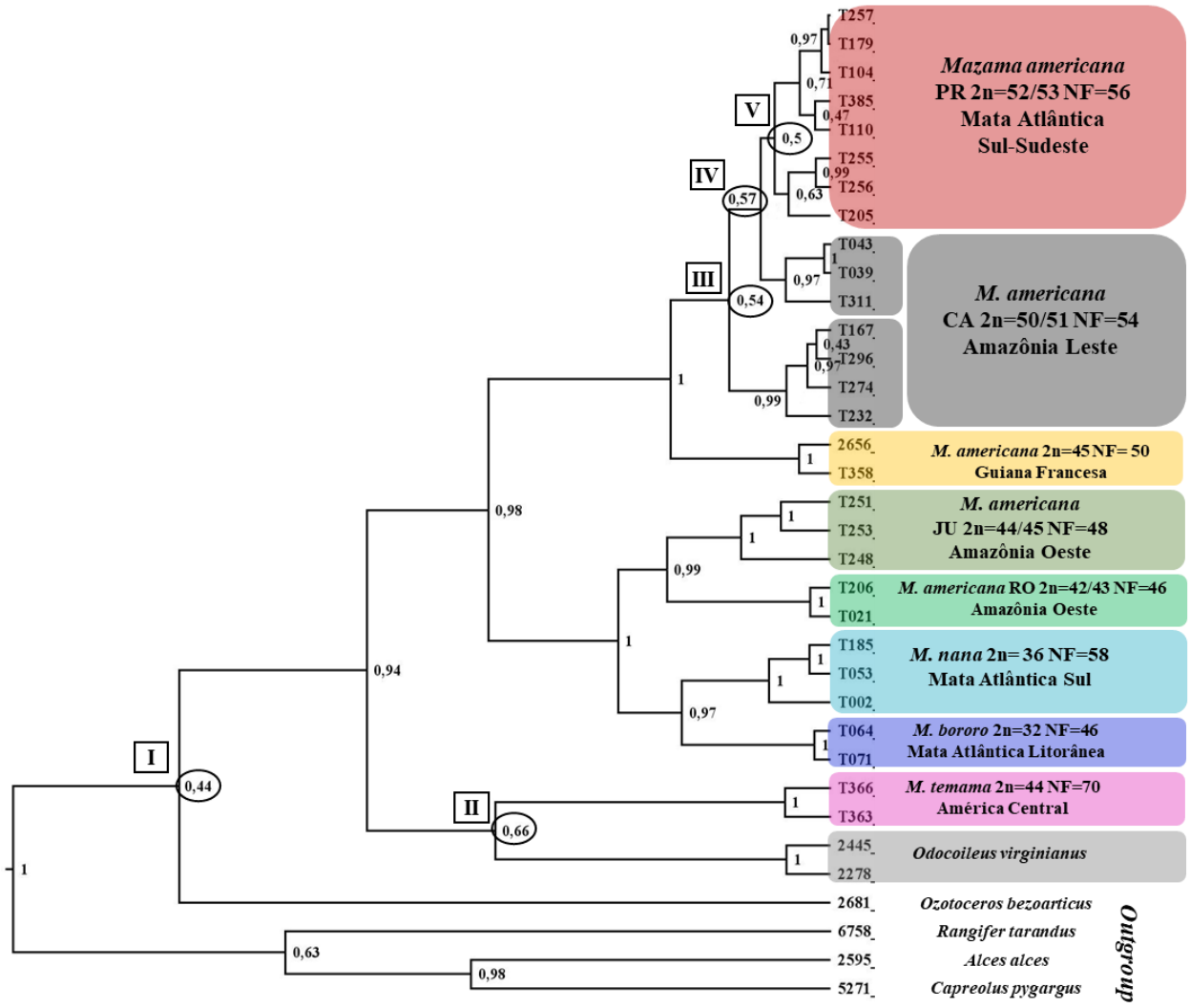


Figura 4C- Hipótese filogenética gerada a partir da matriz de referência derivada para o recorte de DNA fecal (1104 pb) de 35 amostras de referência de animais da subtribo Odocoileina (Odocoileini: Capreolinae: Cervidae). Todos os valores de suporte dos nós, probabilidades posteriores, estão representados na árvore. A análise foi gerada por inferência bayesiana através do programa BEAST. A topologia inferida apresenta menor suporte nos clado em destaque (I, II, III, IV, V) em relação à matriz original e traz *Mazama temama* (Kerr, 1792) e *Odocoileus virginianus* (Zimmermann, 1780) como grupos irmãos, apesar de suporte fraco (clado II, suporte 0,66). A hipótese filogenética gerada pela matriz de referência, no entanto, recupera *Odocoileus* Rafinesque, 1832 em posição externa ao gênero *Mazama* Rafinesque, 1817, com alto suporte.