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

Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914

Gabrielle Queiroz Vacari
Bióloga

2021

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

Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914

Gabrielle Queiroz Vacari

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

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

2021

V112c

Vacari, Gabrielle Queiroz

Caracterização morfológica, citogenética e molecular de Mazama rondoni Miranda-Ribeiro, 1914 / Gabrielle Queiroz Vacari. -- Jaboticabal, 2021

62 f. : tabs., fotos, mapas

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

Orientador: José Maurício Barbanti Duarte

1. Taxonomia. 2. Citogenética clássica e molecular. 3. DNA mitocondrial. 4. Genética animal. 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).

Essa ficha não pode ser modificada.

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

Câmpus de Jaboticabal

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama rondoni* MIRANDA-RIBEIRO, 1914

AUTORA: GABRIELLE QUEIROZ VACARI
ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

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

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

Prof. Dr. ELIAS ALBERTO GUTIERREZ CARNELOSSI (Participaçao Virtual)
Universidade Federal de Sergipe - Campus do Sertão / Nossa Senhora da Glória/SE

Pós-Doutorando PEDRO HENRIQUE DE FARIA PERES (Participaçao Virtual)
Nupecce-FCAV/UNESP / Jaboticabal

Jaboticabal, 01 de setembro de 2021

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

Gabrielle Queiroz Vacari – nascida em 09 de julho de 1992, na cidade de Ribeirão Preto, SP, Brasil. Possui graduação em Ciências Biológicas (Bacharelado, 2017 e Licenciatura, 2019) pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho (UNESP), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) de Jaboticabal. Durante o curso de graduação foi bolsista do Programa de Apoio ao Estudante – Pró-Reitoria de Extensão Universitária e Assuntos Comunitários (PAE-PROEX) – Bolsa de Apoio Acadêmico I, pelo Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (FCAV-UNESP). Realizou iniciação científica na área de Genética desenvolvido no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) com bolsa da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP em 2018. Em março de 2019, iniciou o curso de Mestrado em Genética e Melhoramento Animal, na mesma faculdade (FCAV-UNESP), sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte com bolsa por 6 meses financiado pela CAPES e por 18 meses financiado pela FAPESP, desenvolvendo parcialmente seu Mestrado no Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Uruguai, com Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior (BEPE) da FAPESP.

DEDICO:

A minha mãe Maria de Fatima Queiroz que sempre me apoiou para que eu realizasse meus sonhos e por ser meu maior exemplo de mulher guerreira.

AGRADECIMENTOS

À Deus por todo cuidado e amor e por estar presente em cada detalhe na minha vida.

Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pelos ensinamentos, por me ajudar a pensar como uma verdadeira pesquisadora, pela oportunidade de desenvolver este trabalho e toda contribuição para minha formação.

À FAPESP pelo financiamento e bolsa através do Processo n°2019/05420-4, pelo financiamento da Bolsa Estágio de Pesquisa no Exterior através do Processo n°2020/02744-0 e apoio através do Projeto Temático Processo n°2017/07014-8.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal e ao Programa de Pós-graduação em Genética e Melhoramento Animal. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

À Profa. Dra. Suzana Gonzalez pela parceria, ensinamentos e possibilidade de executar parte deste trabalho em seu laboratório no Uruguai.

Ao técnico de laboratório João Airton Bôer por toda disposição, ajuda e instruções no laboratório.

A todos os integrantes do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), principalmente à Eluzai e Agda que me apoiaram e ajudaram em vários momentos no laboratório e pela amizade, à Maria Helena, Yuki, Valdir pela amizade e ajuda em vários momentos, ao Rullian, Bel, David, Bianca, D. Lúcia, Lola, Jeferson, Marina, Laura, Pedro, Chico e Marcio pelos momentos alegres e trabalho em equipe.

À minha família pelo amor, união e apoio, especialmente minha mãe Maria de Fatima Queiroz meu maior orgulho e que sempre me apoio a lutar pelos meus sonhos.

Ao Rubens pelo apoio, por participar das angústias e das vitórias, pelos conselhos, me apoiando e incentivando para sempre seguir em frente.

Às minhas amigas e amigos de Jaboticabal e Ribeirão Preto por me apoiarem e entenderem minha ausência em vários momentos.

Aos parceiros da Prefeitura de Vilhena - Rondônia que foram essenciais para a realização deste trabalho na busca do topótipo. E a todos os que aqui não citei, mas de alguma forma contribuíram com essa conquista.

SUMÁRIO

RESUMO.....iii
ABSTRACT.....iv
1.INTRODUÇÃO.....1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....2
2.1 Gênero *Mazama*.....2
2.2 Veados cinzas.....3
2.3 *Mazama rondoni*.....5
3.OBJETIVOS.....9
4.MATERIAL E MÉTODOS.....9
4.1 Obtenção do Animal.....9
4.2 Análise morfológica.....10
4.2.1 Documentação fotográfica.....10
4.2.2 Biometria.....10
4.2.3 Biopsia de pele.....10
4.2.4 Retirada e processamento da pele completa-.....11
4.2.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo.....11
4.2.6 Preparação do crânio e pós-crânio.....11
4.2.7 Morfologia externa.....13
4.3 Análise citogenética.....14
4.3.1 Cultivo celular.....14
4.3.2 Biometria cromossômica.....15
4.3.3 Bandamento G.....15
4.3.4 Bandamento C.....15
4.3.5 Coloração Ag NOR.....16
4.3.6 Hibridação in situ fluorescente.....16
4.4 Análise Mitogenoma.....17
4.4.1 Extração de DNA.....17
4.4.2 Amplificação e sequenciamento.....17
4.4.3 Análise das sequencias e análise filogenética.....19
4.5 Amostras do Museu.....20
4.5.1 Extração.....21

4.5.2 Amplificação e sequenciamento.....21
5.RESULTADOS.....23
5.1 Análise Morfológica.....23
5.2 Análise Citogenética.....31
5.3 Análise Molecular.....35
5.4 Análise das amostras do museu.....37
6.DISCUSSÃO.....38
6.1 Análise Morfológica.....38
6.2 Análise Citogenética.....39
6.3 Análise Molecular.....40
6.4 Análise das amostras do museu.....40
6.CONCLUSÃO.....44
7.REFERÊNCIAS.....44

Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914

RESUMO - A espécie *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914 tem sido posicionada dentro da sinonímia de *Mazama nemorivaga* (Cuvier, 1817), pertencendo ao grupo de veados cinzas que ocupa a região Amazônica. A classificação taxonômica de *M. nemorivaga* apresenta inconsistências que sugerem a presença de mais de uma espécie dentro do táxon. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivo contribuir com a taxonomia do gênero *Mazama*, mediante a indicação de um topotipo de *M. rondoni*, e sua caracterização morfológica, citogenética e molecular, permitindo assim sua comparação com outros espécimes, a fim de conhecer diferenças entre eles e revisar a taxonomia do grupo. Para tanto, amostras de osso e pele foram obtidas no Museu Nacional do Rio de Janeiro do holótipo e parátipo de *M. rondoni* para extração e amplificação de DNA mitocondrial. Um exemplar também foi coletado na localidade tipo de *M. rondoni* (Vilhena-RO, Brasil) com o auxílio de caçadores locais. O topótipo foi caracterizado por técnicas de morfologia tradicional (medidas crânio-mandibulares, medidas biométricas, coloração da pele), assim como análises citogenéticas (Banda G, Banda C, coloração convencional de Giemsa, coloração Ag-NOR e FISH) e moleculares (análises filogenéticas de genes mitocondriais). Os resultados morfológicos posicionam o topótipo junto com os pequenos *Mazama*. O animal possui os cromossomos semelhantes ao topótipo de *M.nemorivaga*, porém com sistema sexual múltiplo. Por fim, os resultados da caracterização molecular, mostraram o agrupamento do topótipo de *M. rondoni* com exemplares da região do Amazônia ocidental (Rondônia), ajudando em um correto posicionamento do táxon para possível validação da espécie *Mazama rondoni*.

Palavra-chave: taxonomia, citogenética clássica e molecular, DNA mitocondrial

Morphological, cytogenetic and molecular characterization of *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914

ABSTRACT - The *Mazama rondoni* species has been placed as synonymy of *Mazama nemorivaga*. It is considered part of the gray brocket group that occupies the Amazon region. The taxonomic classification of *M. nemorivaga* has demonstrated inconsistencies suggesting the presence of more than one species within the taxon. Thus, the present study aimed to contribute to the taxonomy of the genus *Mazama* by collecting a specimen of *M. rondoni* in its type locality. It was performed a detail morphological, cytogenetic, and molecular characterization for comparison with other specimens of *Mazama* in order to evaluate the differences between them and review the taxonomy of the species. For this purpose, we extracted and amplificated mitochondrial DNA from the skull and skin tissue samples of the type series (holotype and paratypes) that were deposited in the National Museum of Rio de Janeiro. We also collected one specimen from the type locality of *M. rondoni* (Vilhena-RO, Brazil) with the support of local hunters. The topotype was characterized by traditional morphological techniques (craniomandibular measurements, body biometry, and skin color), cytogenetic (conventional Giemsa staining, C band, G band, Ag-NOR and FISH), and molecular (phylogenetic analysis of mitochondrial genes). Our phylogenetic tree recovered the *M. rondoni* topotype with other individuals of *M. nemorivaga* from the western Amazon region (Rondônia). We believe that our results contributes as the first step to clarify the identity of the taxon and possible validation of the *Mazama rondoni* species.

Keyword: taxonomy, classical and molecular cytogenetics, mitochondrial DNA

1. INTRODUÇÃO

As características morfológicas do gênero *Mazama* são muito semelhantes, causando dúvidas sobre a classificação taxonômica desses animais, sendo um dos casos de convergência morfológica mais surpreendente (Duarte et al., 2008). Pesquisas mostram que o próprio gênero *Mazama* não é válido para algumas espécies, devido ao gênero ser polifilético. No qual separa *M. gouazoubira e M. nemorivaga,* de outras espécies de *Mazama* do grupo vermelho, sugerindo receber outras nominações em nível genérico para o grupo cinza (Duarte et al., 2008; Gutiérrez et al., 2017). Essas duas espécies, *M. gouazoubira e M. nemorivaga,* foram consideradas sinônimas por muito tempo, mas através de estudos morfológicos, *M. nemorivaga* passou a ser considerada como uma espécie válida (Rossi, 2000).

Atualmente *Mazama nemorivaga* possui aproximadamente 34 sinonímias, sendo algumas também consideradas para *M.gouazoubira* (Rossi et al., 2010). Dentre os sinônimos de *M.nemorivaga* temos o *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914, que ocorre na região Noroeste do Brasil (Rossi et al., 2010). Trabalhos com análise filogenética de genes mitocondriais sugerem a possibilidade de separação dentro da espécie, que foi observada dividida em três clados com distribuições biogeográficas distintas (Figueiredo 2014; Morales Donoso, 2017). Figueiredo (2014) também sugere em seu trabalho uma revalidação da espécie *M. rondoni* e propõe uma revisão taxonômica dessa espécie.

Além disso, estudos citogenéticos mostram que *M. nemorivaga* apresenta cariótipo polimórfico com variação de 2n=67 a 69 e NF=70 a 72 devido à ocorrência de rearranjos Robertsonianos (Duarte, 1998; Resende, 2012; Fiorillo et al., 2013). Essas diferenças cromossômicas também é observada em *M. americana,* em que levam a isolamento reprodutivo e são fatores importantes para identificação de espécies tão semelhantes morfologicamente (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017). Dessa forma, podemos assemelhar *M. nemorivaga* à *M. americana*, que constitui, na verdade, um complexo de espécies (Abril et al., 2010, Fiorillo et al., 2013).

Em vista disso, para auxiliar na resolução das incertezas taxonômicas das espécies do gênero *Mazama* é necessário utilizar uma abordagem integrativa de

métodos utilizando a morfologia, a citogenética e a genética molecular (Duarte; Gonzalez, 2010; Heckeberg et al., 2016). Portanto, a proposta dessa pesquisa foi contribuir com a resolução das incertezas taxonômicas que envolvem *M. nemorivaga*, revelando os padrões morfológicos, citogenéticos e moleculares do topótipo de *Mazama rondoni,* proposta por Miranda-Ribeiro em 1914.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Gênero *Mazama*

O gênero *Mazama* Rafinesque (1817), apresenta a maior distribuição entre os cervídeos neotropicais, estendendo-se desde a região do centro sul do México até o norte da Argentina. Esses animais habitam florestas montanhosas, florestas tropicais chuvosas, florestas tropicais secas e savanas arbóreas. As espécies desse gênero possuem tamanho de pequeno (45 cm) a médio (70 cm) porte e os machos apresentam chifres curtos, simples e pontiagudos (Allen, 1915; Czernay, 1987; Eisenberg, 1989; Rossi 2000).

Atualmente, são aceitas as seguintes espécies neste gênero: *Mazama americana* (Erxleben, 1777); *M. temama (*Kerr, 1792); *M. gouazoubira (*Fisher, 1814); *M. nemorivaga (*Cuvier, 1817)*; M. rufina* (Pucheran, 1851); *M. nana* (Hensel, 1872); *M. pandora* (Merriam, 1901); *M. chunyi* Hershkovitz, 1959; *M. bororo* Duarte, 1996, a revalidação da espécie *M. rufa* (Illiger, 1811) (Luduvério, 2018) e a indicação de *M. bricenii* Thomas, 1908 como sinônimo de *M.rufina* (Bourcier e Pucheran, 1852) (Gutiérrez et al., 2015). No Brasil ocorrem cinco delas, *M. americana, M. gouazoubira, M. nemorivaga, M. nana* e *M. bororo* (Fontana; Rubini, 1990; Duarte; Merino, 1997; Wemmer, 1998; Duarte; Jorge, 2003; Abril et al., 2010).

Essas espécies são divididas no grupo dos veados vermelhos (*M. americana, M. nana, M. bororo, M. temama, M. rufina* e *M. bricenii*) e o grupo dos veados cinzas (*M. gouazoubira, M. pandora, M. chunyi* e *M. nemorivaga*) (Duarte, 2008; Duarte; Gonzales, 2010). Além dessas espécies aceitas, já foram descritos 42 táxons

nominais através de análises da morfologia externa, sendo atualmente considerados dentro das sinonímias das espécies relacionadas acima (Duarte e Gonzalez, 2010).

Entretanto, as características morfológicas desse gênero são semelhantes devido ao resultado de adaptação ao habitat durante o processo evolutivo, para se moverem com eficiência em ecossistemas fechados (Eisenberg, 1989), sendo um dos casos de convergência morfológica adaptativa mais surpreendente (Duarte et al., 2008). Mesmo com morfologia semelhante, há uma ampla diversificação cariotípica entre as espécies de *Mazama*, entre 32 e 70 cromossomos (Neitzel,1987; Yang et el., 1997; Abril et el., 2010). Essa grande variação cariotípica é explicada pela hipótese da alta taxa de fragilidade cromossômico, sendo esses cromossomos muito instáveis comparado a outros gêneros de cervídeos, possuindo rearranjos cromossômicos frequentes (Duarte e Jorge, 1996; Vargas-Munar, 2010, Tomazzella et al., 2017).

Através dos estudos citogenéticos foi possível identificar a espécie *Mazama americana* como um complexo de espécies crípticas, com uma grande variabilidade de cariótipos de acordo com a sua região de origem geográfica (Duarte, 1998; Abril et al., 2010; Cifuentes-Rincón, 2020). Ademais, *Mazama bororo* foi validada como espécie devido a sua diferença cromossômica numérica e estrutural comparado com *Mazama americana* (Duarte; Jorge, 2003), mas através de um estudo com análise filogenética de DNA antigo Mantellatto (2016) sugeriu a validação da espécie *Mazama jucunda* Thomas 1913 e *M. bororo* como sendo sinônimo.

Além disso, pesquisas com base em análises filogenéticas demonstram que o gênero *Mazama* é polifilético, a subtribo Odocoileina (*M. americana, M. bororo, M. nana, M. temama, M. pandora, M. briceni, M. rufina*) não se agrupam no mesmo clado da subtribo Blastocerina (*M. gouazoubira e M. nemorivaga*), sugerindo a mudança de gênero de *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira* (Duarte et al., 2008; Gutiérrez, 2017).

2.2 Veados cinzas

No grupo dos veados cinzas, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga* foram considerados a mesma espécie por vários autores. No entanto, através de estudos

com base em características morfológicas de espécimes da Amazônia, Rossi (2000) demonstrou que *M. nemorivaga* é uma espécie válida. Além disso, estudos moleculares e citogenéticos sustentam a validação de *M.nemorivaga*, pois o clado do grupo dos cinzas não possue ancestral comum único entre essas duas espécies (Duarte et al., 2008).

A espécie *M. gouazoubira* foi citato por Azara em 1801 no Paraguai, porém sua descrição não foi considerada por não seguir o Princípio de Nomenclatura Binomial do Código Internacional de Nomenclatura Zoológica (ICZN, quarta edição), dessa forma, Fischer 1814, realizou a diagnose da espécie *Cervus gouazoupira* através das observações de Azara, mas nenhum holótipo foi designado. A espécie possui orelhas grandes, arredondas na ponta, coloração marrom escuro acinzentado no pescoço até a região anterior do corpo e posteriormente marrom escuro salpicado de dourado e mais clara nos flancos e apresenta mancha superciliar (Black-Décima et al., 2010; Borges, 2018). Tem uma extensa distribuição geográfica ocorrendo no Brasil, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Argentina, podendo ser observadas inúmeras variações regionais, ecológicas e individuais de coloração (Rossi, 2000; Black-Décima et al., 2010).

Já M. nemorivaga foi descrito por Cuvier em 1817, como um animal de cor parda, com a parte ventral do pescoço, lábios e caudas brancos, membros anteriores e região peitoral até a coxa de cor branca com tonalidade canela (Cuvier, 1817; Cuvier, 1821). O macho possui chifres retos, tem a coloração cinza mesclando com pelos amarelos, orelhas pequenas e afiladas, mufla grande, olhos saltados da linha do crânio, pesando aproximadamente 15 kg e medindo 48 cm (Rossi e Duarte, 2008).

A espécie tipo de *M. nemorivaga* foi coletada em Caiena capital da Guiana Francesa e a espécie está distribuída pela região Amazônica, no Brasil ocorre no estado do Amazonas, Pará, Rondônia, Amapá, Acre, Roraima, no norte do Mato Grosso e noroeste do Maranhão (Rossi, 2000). Novos estudos com DNA fecal e armadilha fotográfica indicaram uma nova população de *M. nemorivaga* na Mata Atlântica entre fragmentos florestais do sul da Bahia e norte do Espírito Santo (Oliveira et al., 2020).

Segundo Rossi et al. (2010), há ao menos 2 táxons nominais considerados sinônimos de *M. nemorivaga*, *M.tschudii* Wagner, 1855 e *M.rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914 e outros 5 que também podem representar sinônimos desta espécie *M. americana citus* Osgood, 1912, *M. murelia* Allen, 1915, *M. cita sanctaemartae* Allen, 1915, *M. permira* Kellogg, 1946 e *M. gouazoubira medemi* Barriga-Bonilla, 1966.

Dentro das sinonímias de *M.nemorivaga* temos *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914 que ocorre na região Noroeste do Brasil (Rossi et al., 2010). Apesar de alguns autores considerarem *M.nemorivaga* sinônimo de *M. gouazoubira*, outros consideram como espécies distintas, por exemplo, Miranda-Ribeiro (1919) considerou *Mazama simplicicornis* (*M. gouazoubira*) e *Mazama rondoni* como duas espécies diferentes, já em 1959, Ávila-Pires classificou *M. rondoni* como subespécie de *M. gouazoubira*, e logo, Cabrera (1960) descreveu *Mazama rondoni* como sendo *Mazama gouazoubira superciliaris*, subespécie de *Mazama gouazoubira*. Czernay (1987) também considerou *M.rondoni* sinonímia de *M. g. superciliaris.* Duarte (1996) considerou as duas espécies *M. gouazoubira* e *M. rondoni* válidas e, por fim, Rossi (2000) considerou *M.gouazoubira* como espécie valida e *M. rondoni* como sinonímia de *Mazama nemorivaga*, que hoje é reconhecida como espécie válida (Duarte, 1996; Rossi & Duarte, 2008; Rossi et al., 2010).

2.3 *Mazama rondoni*

O *Mazama rondoni* foi descrito pela primeira vez por Miranda Ribeiro (1914), como um pequeno veado de chifre simples, olhos grandes e negros, orelhas medíocres, de cor sépiacea, abdômen fulvescente canelino. Apresenta grande desenvolvimento na parte posterior do corpo que é muito robusta e não apresenta glândula tarsal nem do calcâneo. O animal tipo foi coletado próximo da cidade de Vilhena – RO no Rio Cabixi (Figura 1) (Miranda-Ribeiro, 1914; Miranda-Ribeiro, 1919).

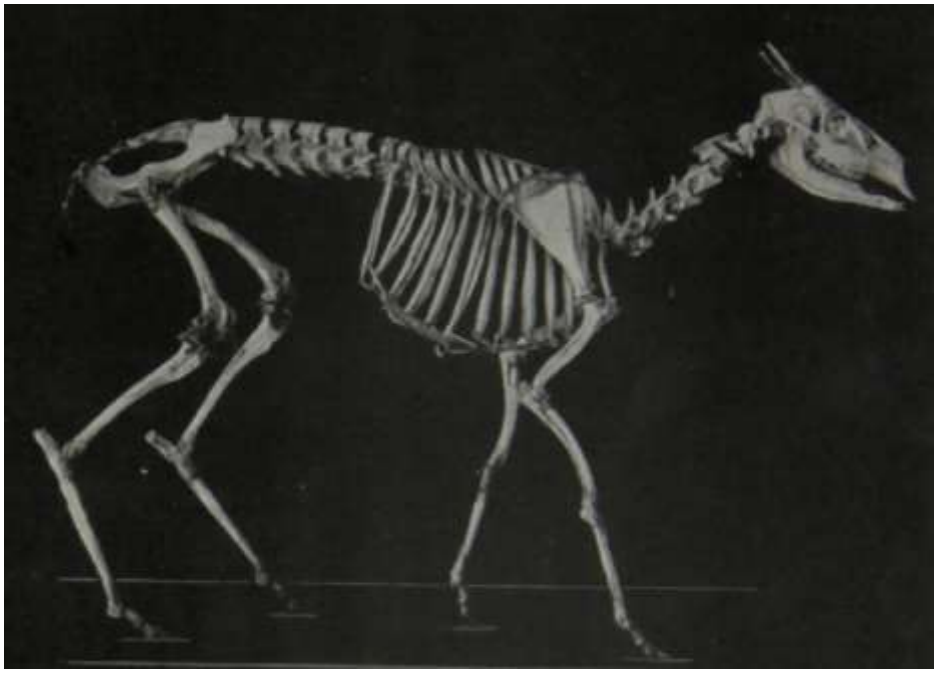
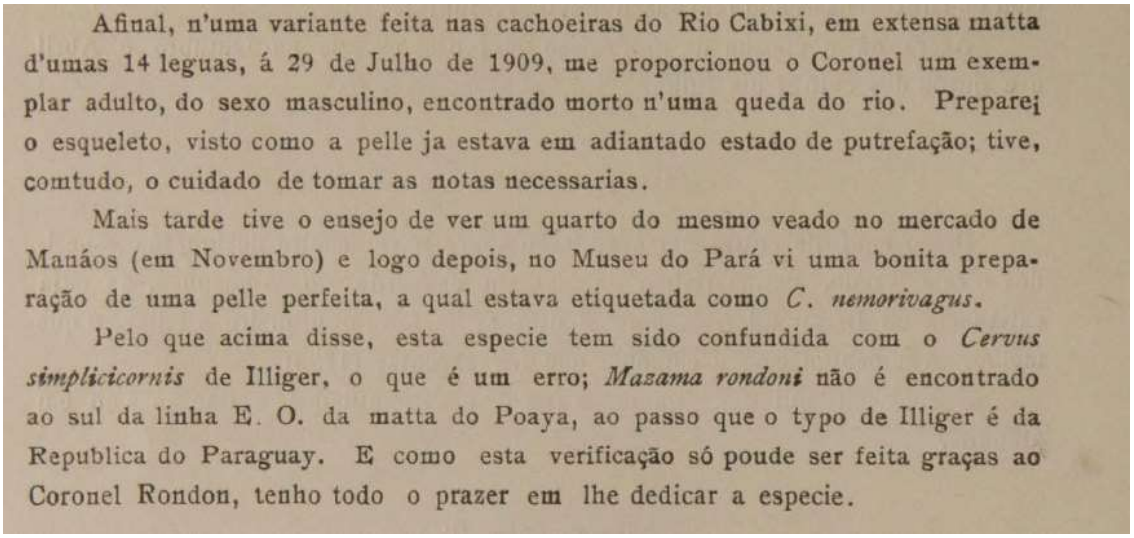


Figura 1: Holótipo de *Mazama rondoni* Miranda-Ribeiro, 1914

Em suas publicações Miranda-Ribeiro (1914;1919) descreve que está espécie era muito confundida com *Cervus simplicicornis* de Illiger da Republica do Paraguai, porém diz que não se tratava da mesma espécie, pois *M.rondoni* vive na região setentrional (região norte do Brasil) e logo também comenta que viu uma pele etiquetada no museu do Pará como *C.nemorivagus* (figura 2 e 3).



Afinal, n'uma variante feita nas cachoeiras do Rio Cabixi, em extensa matta d'umas 14 leguas, á 29 de Julho de 1909, me proporcionou o Coronel um exemplar adulto, do sexo masculino, encontrado morto n'uma queda do rio. Preparei o esqueleto, visto como a pelle ja estava em adiantado estado de putrefação; tive, comtudo, o cuidado de tomar as notas necessarias.

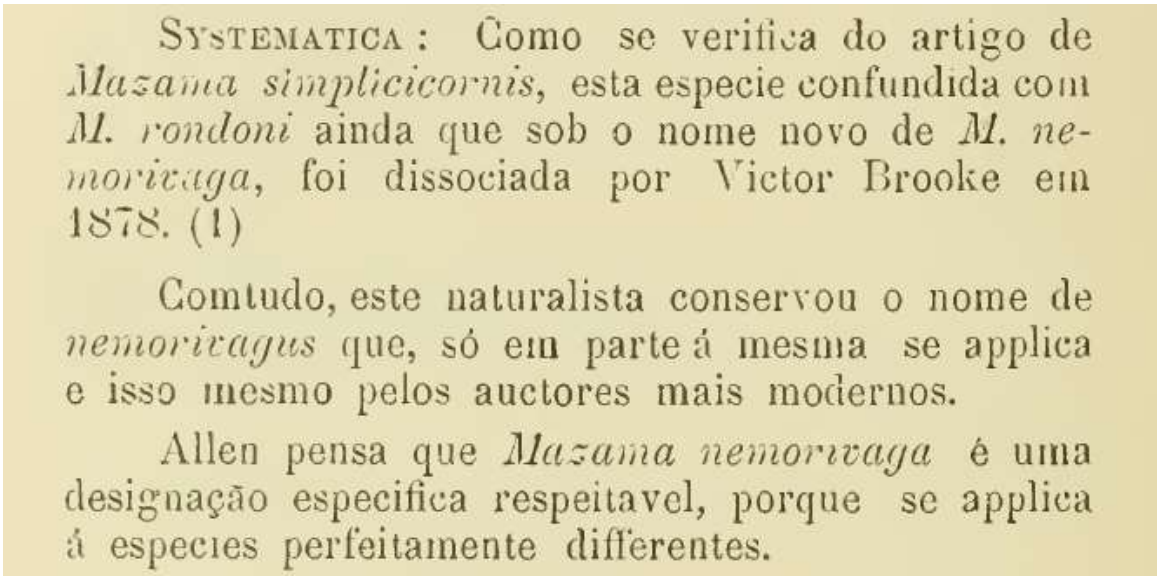
Mais tarde tive o ensejo de ver um quarto do mesmo veado no mercado de Manáos (em Novembro) e logo depois, no Museu do Pará vi uma bonita preparação de uma pelle perfeita, a qual estava etiquetada como *C. nemorivagus*.

Pelo que acima disse, esta especie tem sido confundida com o *Cervus simplicicornis* de Illiger, o que é um erro; *Mazama rondoni* não é encontrado ao sul da linha E. O. da matta do Poaya, ao passo que o typo de Illiger é da Republica do Paraguay. E como esta verificação só poude ser feita graças ao Coronel Rondon, tenho todo o prazer em lhe dedicar a especie.

Figura 2: Trecho de Miranda-Ribeiro (1914) sobre *Mazama rondoni*

A seguir, segue a descrição do trecho:

“Afinal, numa variante feita nas cachoeiras do Rio Cabixi, em extensa mata de umas 14 léguas, a 29 de julho de 1909, me proporcionou o Coronel um exemplar adulto, do sexo masculino, encontrado morto numa queda do rio. Preparei o esqueleto, visto como a pele já estava em adiantado estado de putrefação; tive, contudo, o cuidado de tomar as notas necessárias. Mais tarde tive o ensejo de um quarto do mesmo veado no mercado de Manaus (em novembro) e logo depois, no Museu do Pará vi uma bonita preparação de uma pele perfeita, a qual estava etiquetada como *C.nemorivagus*. Pelo que acima disse, esta espécie tem sido confundida com *Cervus simplicicornis* de Illiger, o que é um erro; *Mazama rondoni* não é encontrado ao sul da linha E.O. da mata do Poaya, ao passo que o tipo de Illiger é da República do Paraguai.”



SYSTEMATICA: Como se verifica do artigo de *Mazama simplicicornis*, esta especie confundida com *M. rondoni* ainda que sob o nome novo de *M. nemorivaga*, foi dissociada por Victor Brooke em 1878. (1)

Comtudo, este naturalista conservou o nome de *nemorivagus* que, só em parte á mesma se applica e isso mesmo pelos auctores mais modernos.

Allen pensa que *Mazama nemorivaga* é uma designação especifica respeitavel, porque se applica á especies perfeitamente differentes.

Figura 3: Trecho de Miranda-Ribeiro (1919) sobre *Mazama rondoni*

Descrição do trecho: “Sistemática: Como se verifica do artigo de *M. simplicicornis*, esta espécie confundida com *M.rondoni* ainda que sob o nome novo de *M. nemorivaga*, foi dissociada por Victos Brooke em 1878. Contudo, este naturalista conservou o nome *nemorivagus* que, só em parte à mesma se aplica e isso mesmo pelos autores mais modernos. Allen pensa que *Mazama nemorivaga* é uma designação especifica respeitável, porque se aplica á espécies perfeitamente diferentes”

Nesses dois trechos acima, Miranda-Ribeiro (1914, 1919) deixa claro que há diferenças entre *M. rondoni* e *Cervus simplicicornis*/*M. simplicicornis*, se assemelhando com *C.nemorivagus*, além disso, em suas publicações as características morfológicas que ele descreve e compara, como olhos grandes e orelhas pequenas, são muito semelhantes das características descritas de *M.nemorivaga*. Atualmente *M. rondoni* é considerado sinônimo de *M. nemorivaga* devido à ausência de diferenças morfológicas significativas entre eles (Rossi et al., 2010).

3. OBJETIVOS

- Caracterizar um topótipo de *Mazama rondoni,* por meio de análises morfológicas (biometria corporal, padrões de coloração, craniometria, caracterização de pós-crânio), citogenéticas (cariótipo convencional, biometria cromossômica, bandamento C, bandamento G, badamento RON) e moleculares (mitogenoma).
- Comparar os padrões obtidos para este animal com os já descritos na literatura para outros espécimes associados a *M. rondoni* e de outros *Mazama*, possibilitando revisar a taxonomia e validade desta espécie.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção do animal

A partir da realização de levantamento bibliográfico, foi definida a localidade tipo para coleta de um macho adulto de *Mazama rondoni*, sendo próximo da cidade de Vilhena – RO, conforme descrição de Miranda (1914). A coleta foi realizada por um caçador local, que foi contratado para tal tarefa. Foi coletado um macho adulto da espécie no Distrito de São Lourenço, Vilhena-RO, coordenadas: 12°26’55,36”S x 60°30’41,76”W (Figura 4).



Figura 4: Local de coleta do holótipo

4.2 Análise morfológica

4.2.1 Documentação fotográfica

O animal foi posicionado em decúbito lateral, sobre um pano azul com o número da coleta (T420). Foram tomadas fotos na posição lateral, ventral, dorsal e close lateral da cabeça.

4.2.2 Biometria

A biometria foi realizada após o abate do animal, utilizando balança pendular, fita métrica e paquímetro, com os quais foram avaliadas as seguintes medidas: massa, comprimento de cabeça, largura de cabeça, comprimento da orelha, distância entre olhos, largura da mandíbula, perímetro do pescoço, comprimento do metacarpo, comprimento do metatarso, altura, comprimento do corpo, comprimento da cauda, comprimento do testículo, diâmetro do testículo, comprimento do chifre, distância entre chifres, largura do chifre, perímetro torácico e abdominal.

A partir dos dados quantitativos das medidas corporais do topótipo e também de outros indivíduos do gênero *Mazama* do banco de dados do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) foi realizada uma análise de clusters com o programa “Paleontological Statistics” PAST (Hammer et al., 2001).

4.2.3 Biopsia de pele

Foi retirado um fragmento de 5 cm x 2 cm de pele sendo depositado em um tubo contendo meio de transporte (com altos níveis de antibiótico), permanecendo sob refrigeração até a chegada ao laboratório de campo. Ali o fragmento de pele foi dividido em 10 fragmentos, depositados em tubos criogênicos contendo meio de congelação de peles (200 mL meio McCoy´s (Vitrocell ®) + 40 mL soro equino inativado + 2 mL dimeteilsulfóxido (DMSO) + 24g de polivinil pirrolidona + 100 mg/L sulfato de gentamicina + 4 mg/L anfotericina) (DUARTE et al., 1999). Esse material permaneceu por 3,5 horas sob refrigeração e por 30 minutos no vapor do Nitrogênio Líquido, sendo após estocado em imersão no Nitrogênio Líquido (-196°C). Estas células, que permanecem vivas nessa condição, foram utilizadas para cultivos de fibroblastos para estudos citogenéticos.

4.2.4 Retirada e Processamento da Pele Completa

A pele foi totalmente retirada e limpa, sendo mergulhada em solução de limpeza a (25mL de ácido acético glacial + 3L de água), onde permaneceu por 50 minutos. Após limpeza minuciosa, a mesma foi mergulhada em solução de curtume para dessecação do material (500g de sulfato de alumínio comercial + 500g de cloreto de sódio + 3L de água), permanecendo por 3 dias. Foi esticada na sombra para secar, sendo manipulada periodicamente para manter a flexibilidade. Depois de totalmente seca e flexível, a superfície interna foi lixada. A pele foi depositada no Museu do NUPECCE

4.2.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo

Durante o processamento da carcaça foram coletadas amostras de tecido (músculo, fígado, rim e baço) para estudos moleculares. Fragmentos de 1 cm^3 destes tecidos foram armazenados totalmente imersos em tubos com etanol absoluto, permanecendo à temperatura ambiente para as análises moleculares.

4.2.6 Preparação craniana e medidas cranianas

O esqueleto completo (crânio e pós-crânio) foi limpo de todo resto muscular no local da coleta do animal e o material foi acondicionado em caixas plásticas sob temperatura ambiente. O crânio foi fotografado em todos os ângulos (Figura 5) com o uso de uma câmera digital e foram medidas regiões do crânio segundo Rees (1969) e Driesch (1976) (Figura 6), utilizando um paquímetro digital de 0,01 mm de precisão. Através desses dados quantitativos das medidas cranianas foi realizada uma análise de clusters com o programa “Paleontological Statistics” PAST (Hammer et al., 2001) incluindo medidas do holótipo de *M.rondoni* e de outros indivíduos do gênero *Mazama* do Museu Cervidológico do NUPECCE (3 *M.bororo*, 9 *M.nemorivaga*, 4 *M. americana*, 2 *M. nana* e 4 *M. gouazoubira*) (Tabela 1).



Figura 5: Crânio do topótipo de *M. rondoni* T420 coletado na localidade tipo.

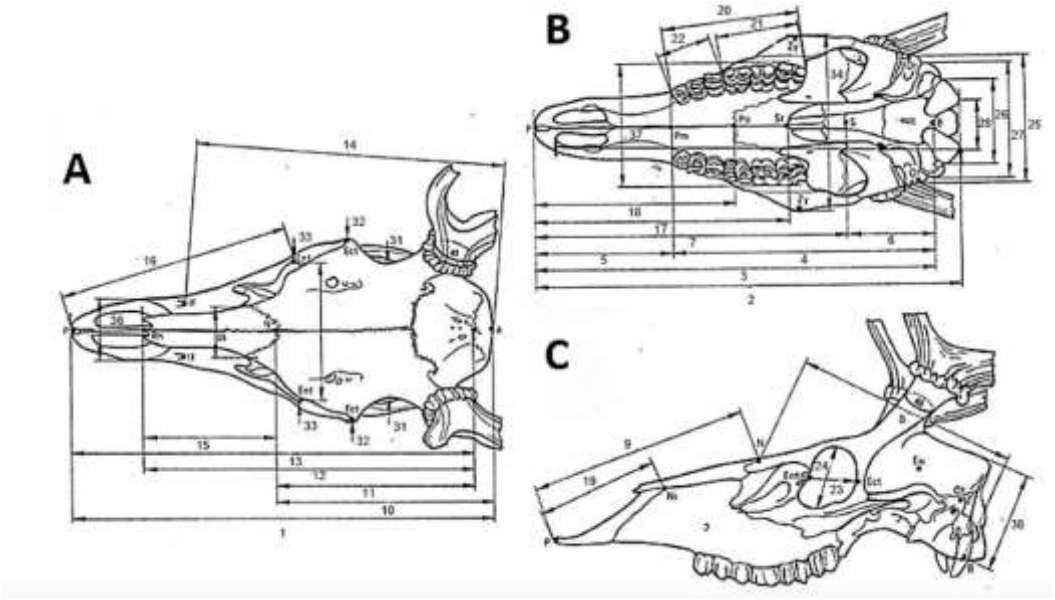


Figura 6: Padrão de medidas cranianas de cervídeos. A: vista dorsal B: vista ventral C: vista lateral esquerda (Rees, 1969; Driesch, 1976). Crânio 1) Comprimento total 2) Comprimento côndilo-basal 3) Comprimento basal 4) Comprimento curto do crânio 5) Pré-molar - prosthion 6) Eixo base-cranial 7) Eixo base-facial 8) 9) Comprimento víscero-craniano 10) Comprimento frontal mediano 11) Lambda - nasal 12) Lambda - rhinion 13) Lambda - prosthion 14) Acrocrânio 15) Maior comprimento dos nasais 16) Comprimento facial - lateral curto 17) Comprimento palatal mediano 18) Comprimento palatal - oral 19) Comprimento lateral do pré-maxilar 20) Distância corrida de dentes 21) Comprimento da linha molar 22) Comprimento da linha pré-molar 23) Maior comprimento interno da órbita 24) Maior altura interna da órbita 25) Maior largura do mastóide 26) Maior largura dos côndilos occipitais 27) Maior largura das

bases do processo para-occipital 28) Maior largura do forâmen magno 32) Maior largura entre as órbitas 33) Menor largura entre as órbitas 34) Largura do zigomático 35) Maior largura entre os nasais 36) Maior largura entre o pré-maxilar 37) Maior largura palatal 38) Basion - ponto mais alto da crista nucal superior. *Os números e as abreviações das medidas correspondem às utilizadas por DRIESCH (1976).

Tabela 1. Relação de espécimes utilizadas para comparação nas análises craniométricas, com seu número de identificação do museu, origem e sexo.

Espécie	N° NPC	Origem	Sexo
Mazama bororo	NPC001Mb	Campina Grande do Sul-PR	M
	NPC002Mb	-	F
	NPC024Mb	Pq. Estadual Intervales, SP. Vida livre	M
Mazama nemorivaga	NPC004Mn	Açailândia, MA	F
	NPC005Mn	Santarém, PA	F
	NPC006Mn	Santarém, PA	M
	NPC010Mn	Macapá	F
	NPC053Mn	Imperatriz, Maranhão	M
	NPC062Mn	-	F
	NPC064Mn	Pará	F
	NPC080Mn	Guiana Francesa	M
	NPC108Mn	Pará	F
Mazama americana	NPC007Ma	Juína, MT	M
	NPC055Ma	Rondônia	M
	NPC079Ma	Regina, Guiana Francesa	M
	NPC117Mru		M
Mazama nana	NPC020Mna	-	F
	NPC114Mna	-	M
Mazama gouazoubira	NPC057Mg	São Simão, SP	M
	NPC089Mg	PGSV, Minas Gerais	M
	NPC104Mg	Descalvado	F
	NPC113Mg	Paraguai	M

4.2.7 Morfologia externa

A análise da morfologia externa do espécime foi realizada a partir de critérios utilizados por Rossi (2000), observando-se a pele inteira taxidermizada e as fotos tomadas logo após a coleta. Foram examinados os campos cromogenéticos do corpo:

região da cabeça e pescoço, linha mediana dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal posterior do corpo, região ventral do corpo, ventre da cauda e região distal dos membros. Padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo. Ocorrência de faixas de pelos antevertidos. E a ocorrência de tufo arredondado de pelos na região tarsal.

4.3 Análise Citogenética

4.3.1 Cultivo Celular

No laboratório de citogenética do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos) FCAV, UNESP, Jaboticabal SP, as amostras de pele foram descongeladas em banho-maria a 37°C e colocadas em placas de Petri, lavando duas vezes na solução tampão fosfato (PBS), sendo então divulsionadas mecanicamente e divididas em fragmentos finos na placa de Petri, contendo meio de cultura DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco). Estes fragmentos foram transferidos para os frascos de cultivo T25 com 2ml de meio de cultura DMEM, enriquecido com 0,5mL de soro fetal bovino, e levados a estufa a 37°C e 5% de CO2. Os cultivos foram supervisionados a intervalos de 24 horas, e o meio foi trocado a cada dois dias.

Quando o crescimento da monocamada foi adequado, o meio foi retirado e as células lavadas duas vezes com PBS, tratadas com 1 ml de solução de tripsina ATV durante um minuto, sob monitoramento em microscópio invertido. Posteriormente, as células foram passadas para outro frasco de cultivo onde foram "realimentados" da mesma maneira, até obter um número suficiente de cultivos secundários.

Os cultivos secundários com ótimo crescimento celular, após 24 horas de cultivo, foram tratados com 60µL de Colchicina 0,016% durante 60 minutos antes da colheita e uma solução de tripsina no momento da colheita. Em seguida, as células foram ressuspendidas em 8mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubadas numa temperatura de 37,5°C por 20 minutos. Depois, o material foi centrifugado, o sobrenadante descartado novamente e o sedimento foi restituído a 6mL de solução fixadora de metanol e ácido acético 3:1 respectivamente, em três ocasiões.

4.3.2 Biometria Cromossômica

Para a classificação cromossômica, foram utilizadas 10 metáfases do animal coletado. As referidas medidas foram feitas a partir do centrômero até a extremidade do cromossomo (telômero) utilizando o programa computacional “AxioVision 4.8” e, de acordo com a razão de braços (RB), foram classificados como metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos ou acrocêntricos (LEVAN et al., 1964). De acordo com o comprimento relativo (CR), os cromossomos autossomos foram classificados como sendo dGrupo A (grandes cromossomos de dois braços com CR> 6%); Grupo C (pequenos cromossomos de dois braços com CR <6%); Grupo D (grandes cromossomos acrocêntricos com CR> 5%); Grupo E (pequenos cromossomos acrocêntricos com CR <5%); e Grupo B (microcromossomos ou cromossomos extranumerários com CR <1,5%) (CIFUENTES-RINCÓN et al., 2020).

4.3.3 Bandamento G (Seabright, 1971, modificada)

No procedimento da Banda G, as lâminas foram previamente envelhecidas a 37°C durante 7 dias. Após o envelhecimento, as lâminas foram mergulhadas em solução de tripsina (0,5%) a 37°C no banho maria durante 3 segundos, sendo, em seguida, lavadas 2 vezes com água destilada gelada. Após as lâminas secarem, as mesmas foram coradas com solução corante Wright-Giemsa (2,5g de Wright + 0,85g de Giemsa + 500mL de glicerina) em tampão fosfato (0,06M pH 6,8) (2:1) durante 9 minutos.

4.3.4 Bandamento C (Sumner, 1972)

As lâminas, previamente coradas com coloração convencional Giemsa, foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico HCL (0,02N) por vinte minutos a temperatura ambiente e, em seguida foram lavadas com água destilada. Depois foram incubadas em solução de hidróxido de bário (0,07N) em banho-maria a 40°C durante 12 minutos e, lavadas novamente com água destilada. Em seguida, as mesmas foram incubadas em solução salina concentrada 2xSSC (17,53g de NaCl + 8,82g de Na3C6H5O7-2H2O + 500mL de água destilada) por 2 horas a 56°C. As lâminas foram enxaguadas com água destilada e coradas com Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol) a 2% em tampão fosfato (0,01M, pH 6,8) por 25

minutos.

4.3.5 Coloração Ag-RON (Howell; Black, 1980)

Foram pingadas na lâmina duas gotas de nitrato de prata à 50% e uma gota de solução coloidal reveladora (1g de gelatina P.A.em 50 mL de água deionizada+0,5 mLde ácido fórmico) e colocado uma lamínula sobre a preparação. A lâmina foi colocada em placa de Petri com papel absorvente embebido em água, sendo aquecida a 56°C em estufa, por 4 a 5 minutos até obter uma coloração dourada. Após isso, a mesma foi mergulhada em água destilada para retirada da lamínula, sendo depois lavada com água corrente e analisada ao microscópio. As lâminas submetidas às técnicas de bandamento cromossômico foram analisadas e fotografadas em um microscópio Olympus CX31, em objetiva de 100xou60x, com uma câmera digital Olympus Camedia C5060. Todas as imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS6.

4.3.6 Hibridização *in situ* fluorescente

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

Concomitantemente, foi preparado o mix de hibridização para volume final de 10 µl contendo: 7 µl Master Mix* (*5ml formamida+1g Sulfato de dextrano+ 1 ml 20XSSC); 1 µl DNA C0t bovino; 0.6 µl DNA de esperma de Salmão; 0,7 µl -1,4 µl por Sonda Bac, sendo utilizados 130E10, 20L8 E 188ª20. Os clones BAC foram adquiridos da biblioteca bovina CHORI-240 com base no NCBI ARS-UCD1.2 Assembly data e obtidos do BACPAC Genomics, Emeryville, CA, USA.

A mistura de hibridização foi aquecida a 92 °C por 10 minutos e incubada a 37ºC por 30 minutos. Posteriormente, essa foi adicionada as lâminas que foram cobertas por lamínula e incubadas em câmara úmida a 37 °C por 40 horas.

Para a lavagem pós-hibridização, as lâminas foram incubadas em solução 0.7 XSSC por 2 minutos a 70 °C e em 2XSSC por 2 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, foram incubadas em câmara úmida a 37 ºC com 100 µL de solução bloqueio (0,1g de solução bloqueio Sigma- Aldrich®, dissolvido em 9 ml H2O + 1 ml solução TN) por 10 minutos.

A detecção foi realizada com Streptavidine-Cy5 (Invitrogen/Molecular Probes Camarillo, CA, USA), para as sondas marcadas com biotina-16-dUT, e com antidigoxigenina-rodamina (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) para as sondas marcadas com digoxigenina-11-dUTP. Para isso, 0,25 µl de cada anticorpo diluído em 100 µl de solução bloqueio foram adicionados a cada lâmina, as quais foram incubadas em câmara úmida por 45 minutos. Após a detecção, as lâminas foram lavadas em solução 1xTNT três vezes por 5 minutos cada. Os cromossomos foram contrastados com 40,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vozdova et al., 2019).

Os sinais de hibridização foram examinados usando um microscópio fluorescente Zeiss Axio Imager Z2 e as imagens digitais foram capturadas com o software ISIS (Meta-Systems, Altlussheim, Alemanha). As imagens obtidas foram editadas com o auxílio do software ISIS e Adobe Photoshop CC 2015.

4.4 Análise do mitogenoma

4.4.1 Extração de DNA

A extração e purificação do DNA de amostras de tecidos foram realizadas com o kit DNeasy® Blood & Tissue (QIAGEN) de acordo com as instruções do fabricante e a amostra extraída foi quantificada no Qubit® 2.0 Fluorometer.

4.4.2 Amplificação e Sequenciamento de Nova Geração

Para realizar a caracterização molecular da espécie coletada foi utilizado o DNA mitocondrial completo, sendo construída uma biblioteca indexada exclusivamente com DNA genômico (gDNA) fragmentado via shotgun, usando o kit Illumina® TruSeq® Nano DNA LibraryPrep.

Para obtenção da sequência foi realizado o sequenciamento de nova geração tecnologia Illumina® HiSeq 2000 que permite gerar dezenas de milhões de segmentos

curtos de DNA, sendo realizado na modalidade paired-end, onde o mesmo fragmento é lido em ambos os sentidos, aumentando a profundidade de leitura, tendo fragmentos sobreponíveis e espaçados.

A montagem do mitogenoma e a consenso foram feitas através do Galaxy, foi utilizado como genoma de referencia *Mazama nemorivaga* (JN632660.1). Os genes foram visualizados no IGV (Visualizador de Genômica Integrativa) e a identificação dos genes foram realizadas através da ferramenta da web MITOS (tabela 2) com os números das bases de cada gene.

Tabela 2. Numeração dos nucleotídeos de começo e parada de cada gene apresentado no MITOS

Name	Start	Stop	Strand	Length	Structure
trnF(ttc)	1	69	+	69	svg ps
rrnS	70	1024	+	955	svg ps
trnV(gta)	1024	1091	+	68	svg ps
rrnL	1090	2659	+	1570	svg ps
trnL2(tta)	2661	2735	+	75	svg ps
nad1	2744	3688	+	945	
trnI(atc)	3694	3762	+	69	svg ps
trnQ(caa)	3760	3831	-	72	svg ps
trnM(atg)	3834	3902	+	69	svg ps
nad2	3903	4940	+	1038	
trnW(tga)	4945	5012	+	68	svg ps
trnA(gca)	5014	5082	-	69	svg ps
trnN(aac)	5084	5156	-	73	svg ps
trnC(tgc)	5189	5254	-	66	svg ps
trnY(tac)	5255	5322	-	68	svg ps
cox1	5324	6862	+	1539	
trnS2(tca)	6866	6934	-	69	svg ps
trnD(gac)	6942	7009	+	68	svg ps
cox2	7011	7691	+	681	
trnK(aaa)	7698	7766	+	69	svg ps
atp8	7768	7962	+	195	
atp6	7929	8603	+	675	
cox3	8609	9391	+	783	
trnG(gga)	9393	9461	+	69	svg ps
nad3	9462	9806	+	345	
trnR(cga)	9809	9877	+	69	svg ps
nad4l	9893	10171	+	279	
nad4	10168	11535	+	1368	
trnH(cac)	11546	11614	+	69	svg ps
trnS1(agc)	11615	11674	+	60	svg ps
trnL1(cta)	11676	11745	+	70	svg ps
nad5	11746	13551	+	1806	
nad6	13556	14074	-	519	
trnE(gaa)	14078	14146	-	69	svg ps
cob	14160	15284	+	1125	
trnT(aca)	15294	15363	+	70	svg ps
trnP(cca)	15363	15428	-	66	svg ps

tRNA gene rRNA gene protein coding gene



4.4.3 Análise das sequencias e análise filogenética

As sequências obtidas do DNA mitocondrial foram comparadas com as já existentes no Genbank, sendo alinhadas no BioEdit (Hall, 1999) e corrigidas manualmente, substituindo com “N” nas extremidades. Foi utilizado como grupo externo o genoma de referência *Alces alces* (MF784604) e *Rangifer tarandus* (AB245426).

A distância genética foi examinada utilizando o programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genome Analysis). O modelo evolutivo para inferência bayesiana foi gerado através do Partitionfinder2 (Tabela 3) utilizando a plataforma CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010).

A partir das sequências e do modelo evolutivo obtido, foram realizadas análises filogenéticas para aferição das árvores filogenéticas, a árvore de inferência bayesiana foi gerada no MrBayes através da plataforma CIPRES. Para estimar a probabilidade posterior foi utilizado o método “Markov Chain Monte Carlo” (MCMC) com nchains=4, nruns=2 com 10.000.000 gerações, adotando um descarte por “burn-in” de 25%. . As árvores obtidas de todas as análises foram editadas com auxílio do programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

Tabela 3. Modelo evolutivo para inferência bayesiana foi gerado através do Partitionfinder2

Subset	Best Model	# sites	subset id	Partition names
1	F81	69	b2eb643652e3e34d61f9526dee98fc4e	tRNA_Phe
2	HKY+I	955	c255e9e335ddbb267647651e3a905239	rrnS
3	HKY	67	2cbbe61b86ec389da60b35ce3143e8bb	tRNA_Val
4	GTR+G	1568	0c489b303940d6790433765be1446177	rrnL
5	HKY	318	deaf2d1c7afc0a6be3c3e9f465236dd3	nad1_pos1
6	K80+I	318	1c9b2b13e12932c5484b3e20a32a4e76	nad1_pos2
7	F81	317	560b5669320f1bdc3ff03dd0dea101ba	nad1_pos3
8	HKY	74	06afc687992c4d984b50429d836a088e	tRNA_Ile
9	K80	69	193639fdc1c4e0cfcef82e4bc3d1bc22	tRNA_Gln
10	K80+I	71	bcd120885b1d3592a1845c4c3fb279c0	tRNA_Met
11	HKY	346	49883f5bbea79b26996898244fd19d57	nad2_pos1
12	HKY+G	346	8cfe7eb4813ce907dc46c7e863e3d0a5	nad2_pos2
13	HKY+I	346	a237be8f9c8601f7e307cf30bd1bf608	nad2_pos3
14	K80+I	72	4ac55ab29b3bc074ff21e23b8eba4afd	tRNA_Trp
15	HKY+I	70	2dadcbde8e07bbb76fe236c35f123cbf	tRNA_Ala

16	K80+I	74	a6a061f268580716ac5917e503c8d3e7	tRNA_Asn
17	JC	98	6f8f73351c0270443b1188b66d85afc3	tRNA_Cys
18	K80+I	68	e337a213d56b752747ebf85244c2f1a8	tRNA_Tyr
19	HKY+G	514	0d6cc303b9dddfe73e6005cf4045bbb6	cox1_pos1
20	SYM+I	513	abf19e7c36693fac600b8efab656eb7e	cox1_pos2
21	F81+I	513	ce2115b38bad1e9f40b753a498de6c59	cox1_pos3
22	K80+I	75	22747e006fdeb83f0e86f86d1a36070a	tRNA_Asp
23	HKY+G	228	1e81e153d9c59b74d4589c9a472b93a0	cox2_pos1
24	K80+I	227	690cb0ab866557cfb88e6424b827a88b	cox2_pos2
25	F81	227	fcae9ee67b13c0d404b7fca8a94b6232	cox2_pos3
26	HKY+I	75	a7a677bc8e5783db38509a4a0ae31a6f	tRNA_Lys
27	HKY+G	66	bc2cb159624333cb6b0d326d7deca721	atp8_pos1
28	HKY	65	4e1cdb6a8882d75db8855e40bc73c1d3	atp8_pos2
29	HKY	65	261a45536a35ef91a0121439990ba82c	atp8_pos3
30	HKY	214	944f781e0002a40d26ede6b1c7c7e23d	atp6_pos1
31	HKY	214	461a4dc244ca8fe40b72d6c2b2be66fc	atp6_pos2
32	HKY+I	213	61bfaf1156b5c2f7f0c240e522014862	atp6_pos3
33	HKY+I	263	588dac673fef57a813772aa4c7badc5c	cox3_pos1
34	HKY+I	263	294386c83a6caf0fb1a1f314954a4f5e	cox3_pos2
35	K80+I	262	e99303b33a66520f08e017364d22cf20	cox3_pos3
36	K80+I	70	480101bb8a19682596ff363d260b3a75	tRNA_Gly
37	SYM+I	115	e5c276ea902a46b20899e0f8f258148e	nad3_pos1
38	HKY+I	115	81ebbfc391e7e493be4e0e605e2ca3b2	nad3_pos2
39	HKY	115	f4a96dff8f1e87b27732439a8c3208ed	nad3_pos3
40	HKY+I	71	94ac40d426cef286c8d18267783b68e4	tRNA_Arg
41	HKY	98	ec2ce89eb9077f21445581f1276d7128	nad4l_pos1
42	SYM	98	9c979b52b0f9a755fb152b69a20d36e7	nad4l_pos2
43	F81	98	c87906401d9b70bd4be96178e881e36a	nad4l_pos3
44	HKY+G	455	5c577d0b225352427fdcf48c4fc8ddd2	nad4_pos1
45	HKY+I	455	ead2736fa7f0bb88d07f48a88433db64	nad4_pos2
46	HKY	454	1140b1c822a2e7760a59f4673dc8d9d8	nad4_pos3
47	HKY	79	29b3bbef536cec1ac83cab7dda1c8a1f	tRNA_Hlx
48	K80	60	1d7a34d6634681ad869b9ced2a5c6ec3	tRNA_Ser
49	K80	71	b042f9e39843fad862b07c567948b168	tRNA_Leu
50	HKY+I	602	f2d26240edff6d5be2a2c7c4f1ef266f	nad5_pos1
51	HKY	602	a8a3af1f446d490af26832fed06682a2	nad5_pos2
52	HKY+I	602	d5b385a27754c464a344575bbb6ba597	nad5_pos3
53	HKY+G	175	d8a2d37b17bb810fa15918a6c2daa29e	nad6_pos3
54	F81+I	174	836e6320dd9e8795a28945968c725e61	nad6_pos2
55	HKY+I	174	4506ae11e6b9fe31bc3935297a974fc3	nad6_pos1
56	F81	72	db4b5c8e2d9272cd634f3bd12cfd5051	tRNA_Glu
57	K80+I	380	118a23aa0139b128f4e4fe625384b474	cob_pos1
58	HKY+I	379	30387ae0496053b3197aa6e68cc75447	cob_pos2
59	HKY+I	379	669a4c98e9ed29cc14fe89b1459ae59a	cob_pos3
60	HKY+G	79	241a39d80a71a2ba267eacd2acce2705	tRNA_Thr
61	K80	96	7ce4296a0267781fdae6c909cdc1b0af	tRNA_Pro

4.5 Amostra do Museu Nacional do Rio de Janeiro

Foram coletadas amostras do holótipo (MNRJ n°841) (figura 7) e de outros espécimes (MNRJ n°1441, MNRJ n°1371 e MNRJ n°1372) de *Mazama rondoni* que se encontram na coleção de tipos de Mamíferos do Museu Nacional do Rio de Janeiro para realizar análises filogenéticas e comparar com o animal que foi coletado na localidade tipo. Esse material foi analisado no Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) Montevidéu – Uruguai.



Figura 7: Holótipo *Mazama rondoni* coletado por Miranda Ribeiro 1914.

4.5.1 Extração de DNA antigo

A extração de DNA de amostras do museu foi realizada usando o Protocolo de Medrano et al. (1990) modificado. Para minimizar os riscos de contaminação e garantir a confiabilidade dos resultados, foram utilizados controles negativos. Após a extração, as amostras foram quantificadas em NanoDrop 2000 ("Thermo Scientific").

4.5.2 Amplificação e sequenciamento das amostras de museu

Para realizar a caracterização molecular da espécie, nove primers de DNA mitocondrial foram testados. Dois fragmentos do gene do citocromo b (Cytb), três fragmentos da subunidade 5 da desidrogenase (NADH5) e quatro fragmentos da região de controle mitocondrial (D-loop), porém apenas três foram amplificados com sucesso, sendo Cytb 224bp, ND5 224bp e ND5b 249bp (tabela 4).

Tabela 4. Genes mitocondriais com suas respectivas sequências dos primers e tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb)

Genes	Primers	Sequencia (Foward/Reverse)	Tamanho do Fragmento (pb)

Cit-b	IDMAZ224 L IDMAZ H	-CATCCGACACAATAACAGCA-3′ 5′- TCCTACGAATGCTGTGGCTA-3′	224 pb
ND5	ND5 F ND5 R	5’- TGTCACATGGTCCATCATAG-3’ 5’- GCAGAGCTGCTGTGTTT3-3’	224 p8ub
ND5	ND5b F Fec ND5b R Fec	5’-CCAACCCTACCTAGCATTTCTC-3’ 5’-TACGACGTATTGGCGGTTTC-3’	249 pb

A amplificação do DNA foi realizada por PCR em tempo real, em termociclador Rotor Gene (Qiagen), com alíquotas de amostra entre 10 e 30 ng / µL. Para uma reação de volume final de 10ul, foi adicionado: 5 µL de SensiFASTTM HRM Kit (1X), 0,4 µL de cada iniciador (10 uM), 2 µL de DNA (10 ng / µL) e 2,2 µL de água. Os tempos e ciclos da reação foram: 95 ° C por 2 minutos / 95 ° C por 5 segundos / 54 ° C por 10 segundos (20 ciclos) / 53 ° C por 10 segundos (20 ciclos) / 52 ° C por 10 segundos (20 ciclos) / 72 ° C por 20 segundos.

Após a PCR, o produto da amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose, para verificação da qualidade do produto amplificado, e posteriormente purificado utilizando o produto comercial QIAquick PCR Purification kit (Qiagen).

Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando o kit ABI Prism Big DyeTerminator (AppliedBiosystens), analisando o produto final no sequenciador automático ABI Prism 377 (AppliedBiosystems) do Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO / Unesp Jaboticabal).

A distância genética também foi examinada utilizando o programa MEGA X (Molecular Evolutionary Genome Analysis). O modelo evolutivo para inferência bayesiana foi gerado através do Partitionfinder2 utilizando a plataforma CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010).

Tabela 5. Modelo evolutivo para inferência bayesiana gerado através do Partitionfinder2

Subset	Best Model	# sites	subset id	Partition names
1	K81UF	62	70f01c73c266d126c6b634edd7290cce	nad5codon1
2	TIM+I	129	fc6ac7857b694ad039adaffb0ce3796b	nad5codon2, cobcodon2
3	GTR+I	194	bd03a2f807916ed326a342ce24534d85	nad5codon3, cobcodon1, cobcodon3

5. RESULTADOS

5.1 Análise Morfológica

As imagens do animal coletado (T420) na posição lateral, ventral, dorsal e close lateral da cabeça podem ser verificadas nas figuras 8, 9 e 10.

Descrição emendada de *Mazama rondoni* MIRANDA-RIBEIRO, 1914 (MAMMALIA, CERVIDAE): O espécime coletado apresenta porte pequeno com 49 cm e massa 12,36 Kg, a pelagem com cor marrom acinzentado escuro (Figura 11), com alguns pelos salpicados de amarelo; membros posteriores e anteriores também com a coloração marrom acinzentado escuro e com alguns pelos salpicados de amarelo. A região dorsal apresenta a tonalidade da cor mais escura comparado com a região lateral do corpo que é levemente mais clara, e levemente branco amarelado na região abdominal e nos flancos. Parte ventral do pescoço e lábios brancos, na região ventral dos membros anteriores e região peitoral até a coxa de cor branca e parda, possui tufo de pelos frontais (topete), a cauda na região dorsal da mesma coloração do corpo e a região ventral branca. Apresenta olhos pretos, órbita ocular grande e orelha pequena com 8,4 cm com a face da orelha interna branca e borda da face interna da orelha marrom escuro. Fossa lacrimal relativamente profunda. Possui chifres simples e pontiagudos.

Localização do registro: Distrito de São Lourenço, Vilhena-RO

Coordenadas geográficas do ponto de coleta: 12°26’55,36”S x 60°30’41,76”W

Depositado em: Museu Cervidológico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias (FCAV) - Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” - Campus de Jaboticabal/SP

N. de tombo: NPC137 **N. de tese**: T420

Cariótipo: 2n=69 NF=70 + 4-5Bs



Figura 8: Animal na posição lateral



Figura 9: Animal na posição ventral



Figura 10: Animal na posição dorsal



Figura 11: Pele aberta taxidermizada do topótipo de *Mazama rondoni* (T420)

Foi realizada uma análise de componentes principais e de cluster (Figura 12 e 13) utilizando o programa “Paleontological Statistics” PAST (Hammer et al., 2001) a partir dos dados quantitativos das medidas corporais do animal coletado (Tabela 6) e comparadas com informações de indivíduos disponíveis na literatura e dos indivíduos do banco de dados do NUPECCE pertencentes as espécies *M. nemorivaga* (incluindo espécimes do estado de Rondônia, Acre, Pará, Amapá, e da Guiana Francesa), *M. gouazoubira*, *M. americana*, *M. rufa*, *M. bororo*, *M. nana*.

Tabela 6. Medidas biométricas do topótipo de *Mazama rondoni* (em cm, massa em kg).

Comprimento da cabeça:	20 cm	Corpo:	65 cm
Largura da cabeça:	7 cm	Cauda:	10,5 cm
Comprimento da orelha:	8,4 cm	Metatarso:	19,5 cm
Distância entre olhos:	4,21 cm	Perímetro do pescoço:	23,5 cm
Mandíbula:	5,87 cm	Tórax:	56 cm
Metacarpo:	12 cm	Abdômen:	61,5 cm
Altura:	49 cm	Massa corporal:	12,36 Kg

Nas análises de componentes principais das medidas biométricas e cranianas, machos e fêmeas foram colocados na mesma matriz seguindo as considerações de Rossi (2000) sobre ausência de dimorfismo sexual para o gênero *Mazama.* As medidas crânio-mandibulares (Tabela 7) foram avaliadas utilizando análise de componentes principais e de cluster (Figura 14 e 15) para medir a similaridade entre indivíduos e para discriminar espécies (Sneath e Sokal, 1973).

Tabela 7. Medidas cranianas do topótipo T420(NPC137) e do holótipo de *Mazama rondoni* representadas em milímetros (mm) de acordo com DRIESCH (1976).

	NPC137	Holótipo
1. TL	167.80	194.00
2.CL	162.68	178.60
3. BL	148.35	162.00
4. SKL	98.91	104.30
5.PP	50.09	57.50
6. BCA	28.95	32.50
7. BFA	118.95	114.30
8. NCL	98.97	102.50
9. VCL	75.89	91.90
10.MFL	101.05	101.60
11.LNT	93.96	93.30
12. LRN	137.68	163.40
13. LPT	160.67	189.40
14. AKI	116.11	123.00
15. GLN	48.01	63.50
16. SLFL	72.40	124.30
17. MPL	105.28	114.10
18. OPL	68.61	79.20

	NPC137	Holótipo
19. LLP	36.76	43.00
20. LCR	51.23	55.10
21. LMR	30.84	29.20
22. LPR	23.01	24.20
23. GILO	31.90	28.80
24. GIHO	30.19	30.00
25. GMB	64.19	68.50
26. GBO	28.77	33.50
27. GBBP	40.85	49.40
28. GBFM	14.86	15.00
31. LFB	44.44	
32. GBAO	59.17	71.10
33. LBBO	44.77	60.00
34. ZB	68.03	71.20
35. GBAW	18.97	14.20
36. GBAP	18.52	20.00
37. GPB	50.07	34.30
38. BASION	37.27	49.10

Crânio 1) Comprimento total 2) Comprimento côndilo-basal 3) Comprimento basal 4) Comprimento curto do crânio 5) Pré-molar - prosthion 6) Eixo base-cranial 7) Eixo base-facial 8) 9) Comprimento víscero-craniano 10) Comprimento frontal mediano 11) Lambda - nasal 12) Lambda - rhinion 13) Lambda - prosthion 14) Acrocrânio 15) Maior comprimento dos nasais 16) Comprimento facial - lateral curto 17) Comprimento palatal mediano 18) Comprimento palatal - oral 19) Comprimento lateral do pré-maxilar 20) Distância corrida de dentes 21) Comprimento da linha molar 22) Comprimento da linha pré-molar 23) Maior comprimento interno da órbita 24) Maior altura interna da órbita 25) Maior largura do mastóide 26) Maior largura dos côndilos occipitais 27) Maior largura das bases do processo para-occipital 28) Maior largura do forâmen magno 32) Maior largura entre as órbitas 33) Menor largura entre as órbitas 34) Largura do zigomático 35) Maior largura entre os nasais 36) Maior largura entre o pré-maxilar 37) Maior largura palatal 38) Basion - ponto mais alto da crista nucal superior

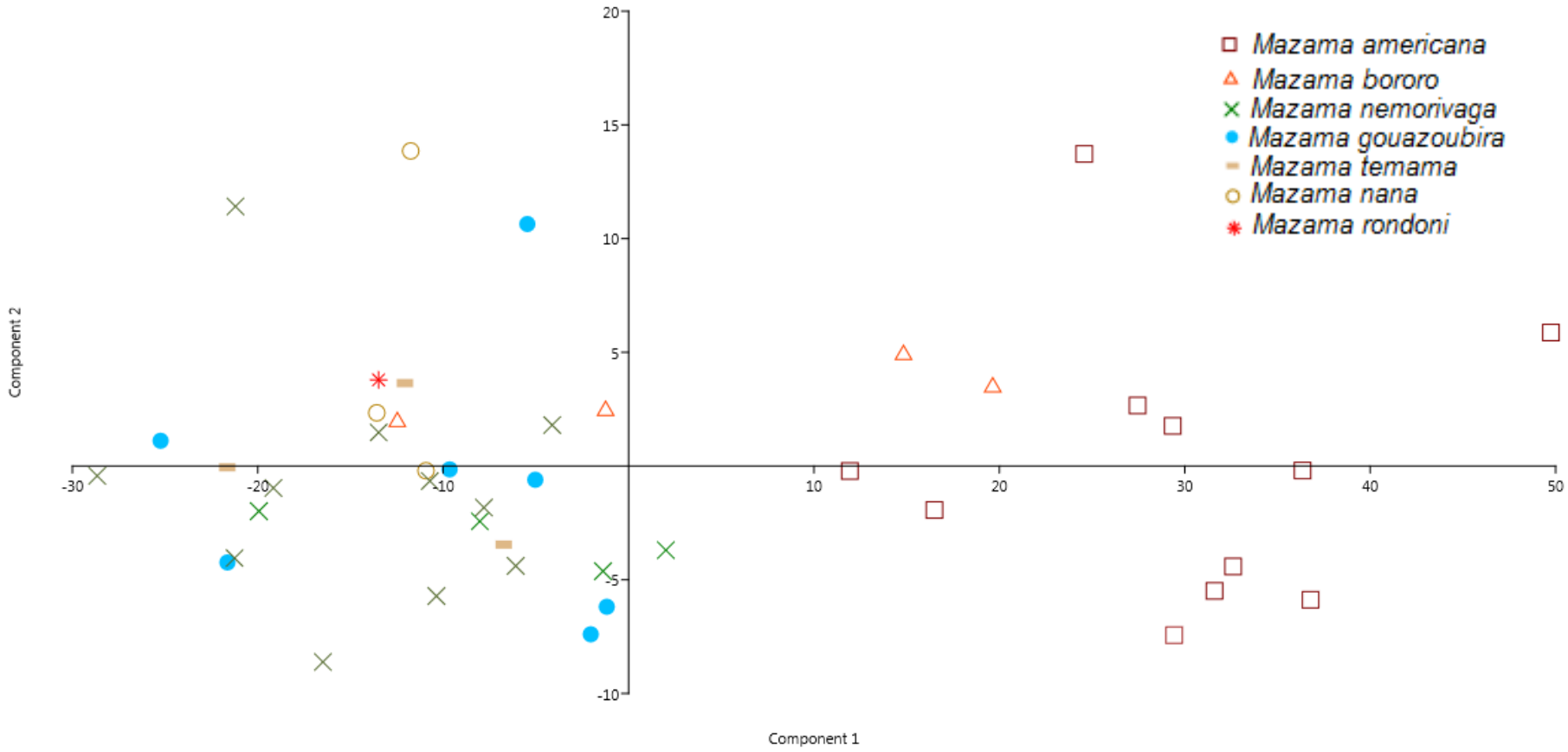


Figura 12: Análise de componentes principais (PCA) da biometria corporal de exemplares do gênero *Mazama*

A análise de componentes principais da biometria (Figura 12) mostrou um padrão de sobreposição de pontos para maioria das espécies como *M. nana, M. gouazoubira, M. nemorivaga, M. temama.* *M.bororo* e outra aglomeração de pontos para as espécies de porte médio como *M. bororo* e *M. americana.*

A árvore de distância morfológica feita a partir das medidas biométricas dos indivíduos (Figura 13) mostrou a formação de dois clados principais. Um grupo é formado por indivíduos de médio porte sendo *M. americana, M. rufa* e *M. bororo* e no outro grupo são agrupados o topótipo (T420) junto com *M. nana, M. temama, M. nemorivaga, M. gouazoubira* e também *M. bororo*, não sendo possível a distinção entre as espécies dentro dos grupos.

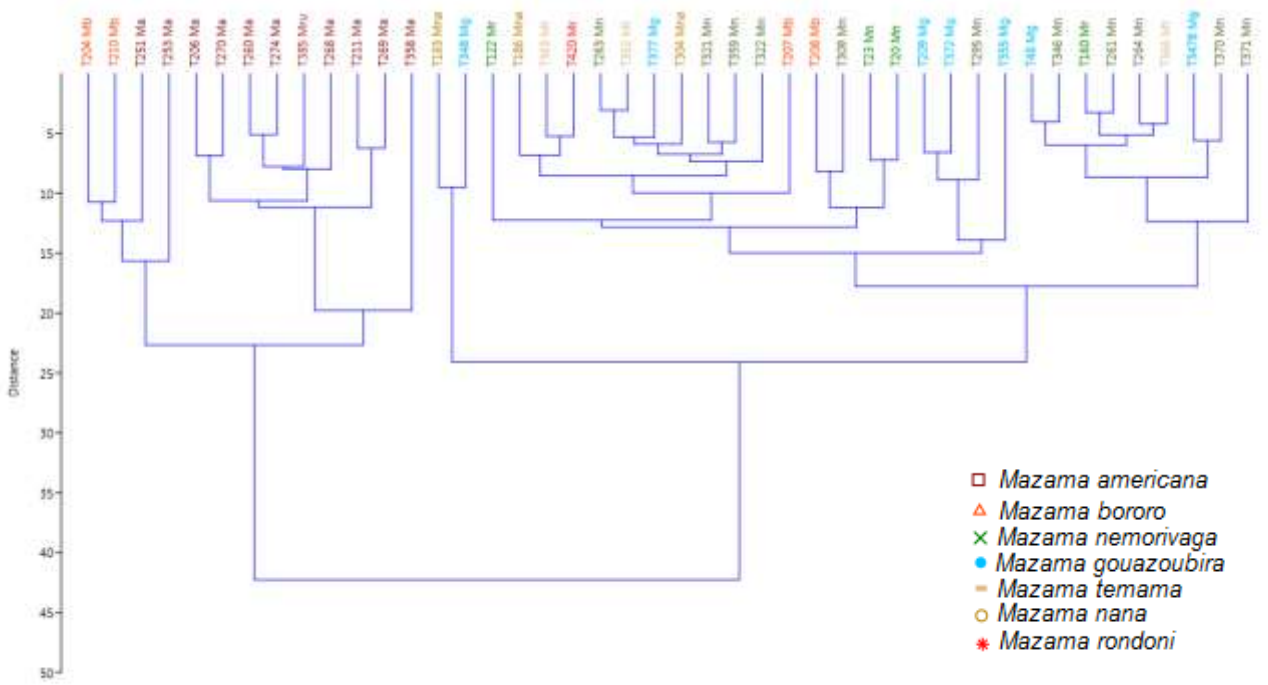


Figura 13: Análise de cluster (UPGMA) da biometria corporal de *Mazama*

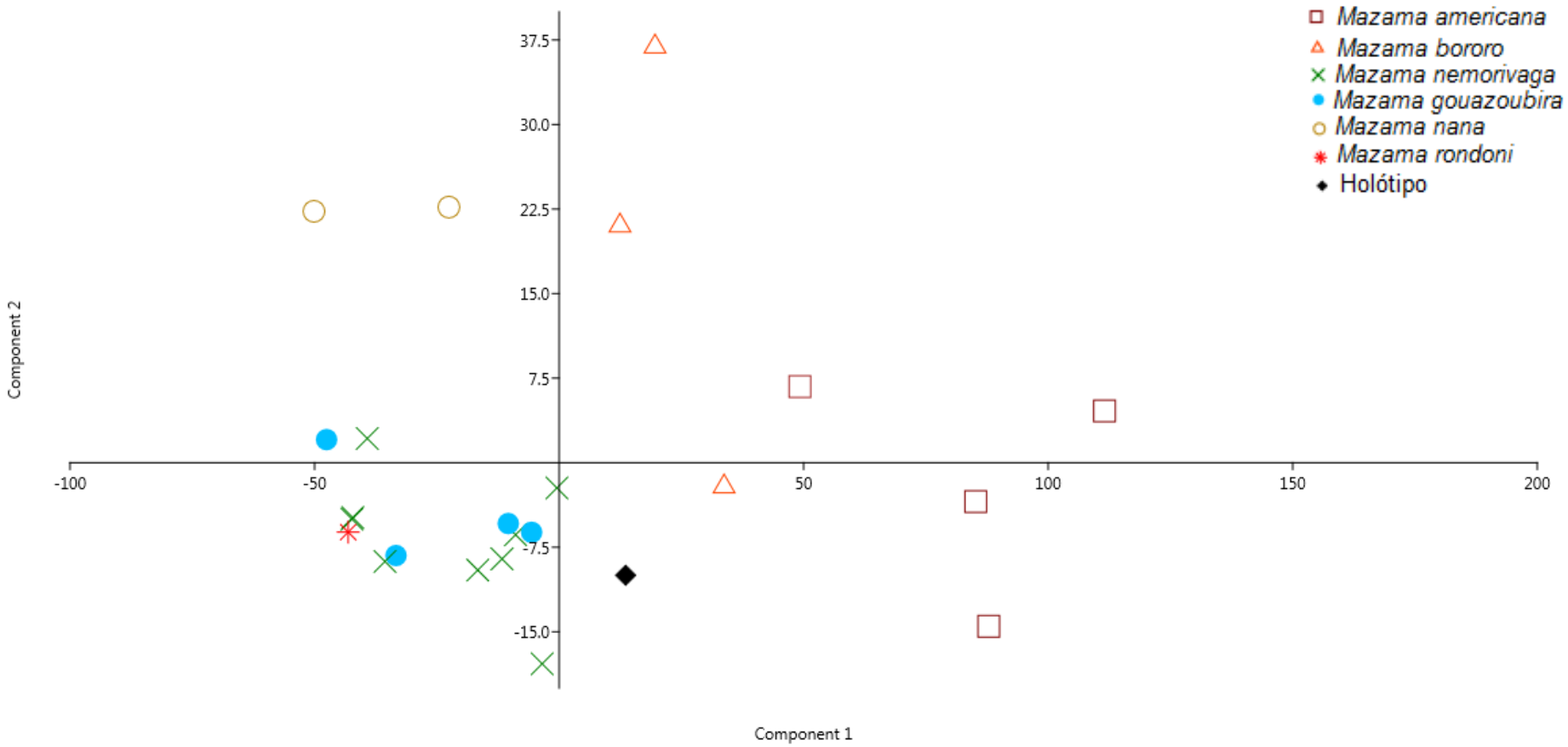


Figura 14: Análise de componentes principais (PCA) da craniometria de alguns exemplares do gênero *Mazama.*

A árvore de distância (Figura 15), construída pelo método UPGMA utilizando os caracteres cranianos, assim como na PCA, mostrou dois grupos separados, um grupo representando por *M. americana* e outro grupo separado com o topótipo de *M.rondoni* (T420) com *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira*, *M. nana* e o holótipo junto com *M. bororo* e *M. rufa,* não havendo também distinção entre espécies dentro do grupo.

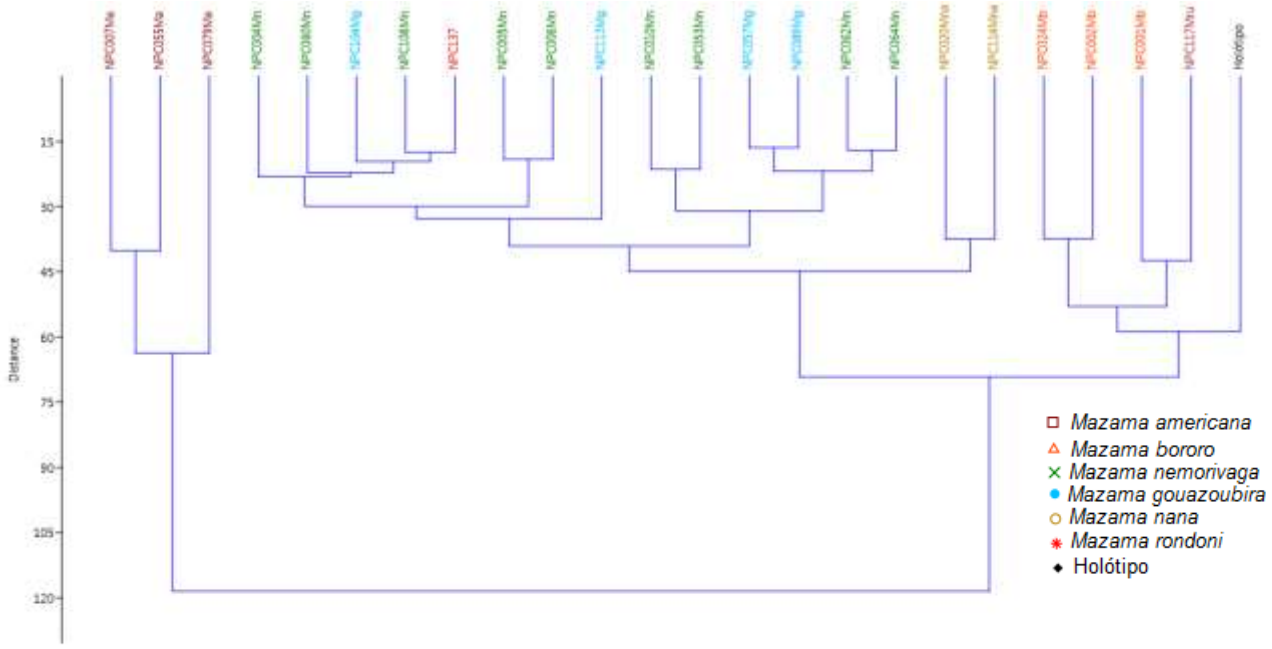


Figura 15: Análise de cluster (UPGMA) de dados craniométricos de alguns exemplares do gênero *Mazama.*

5.2 Análise Citogenética

Após o pareamento dos cromossomos foram comparados os padrões cariotipicos do topótipo coletado T420 (Figura 16) que apresenta 2n=69, XY1Y2/NF=71 + 05B com o topótipo de *M. nemorivaga* da Guiana Francesa (Figura 17) que apresenta um cariótipo com 2n=69, XY/NF=72 + 03B (Morales Donoso, 2017).

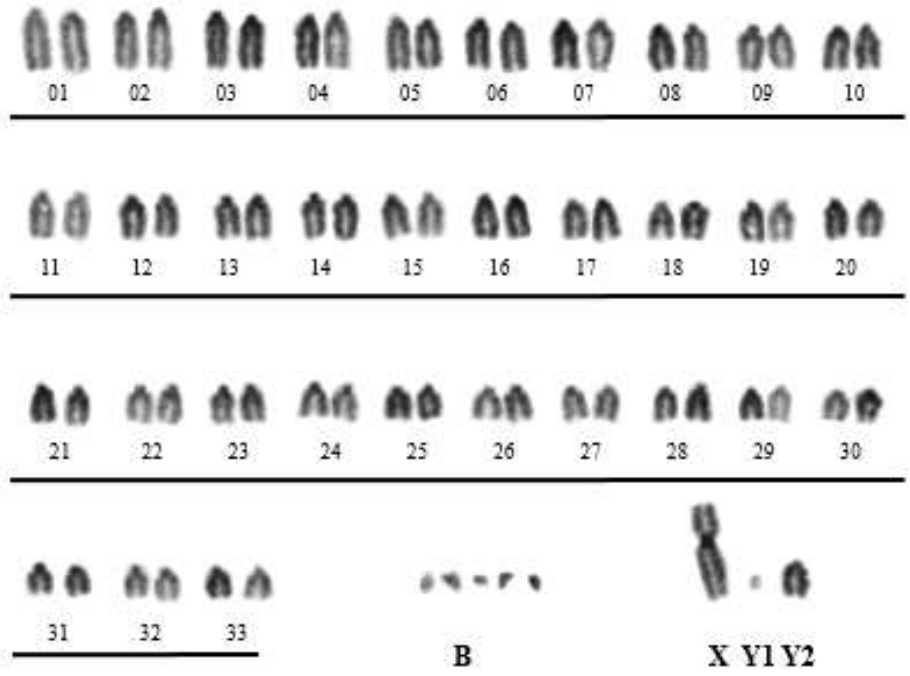


Figura 16: Cariótipo do topótipo macho T420 coletado em Vilhena, sob coloração convencional Giemsa.

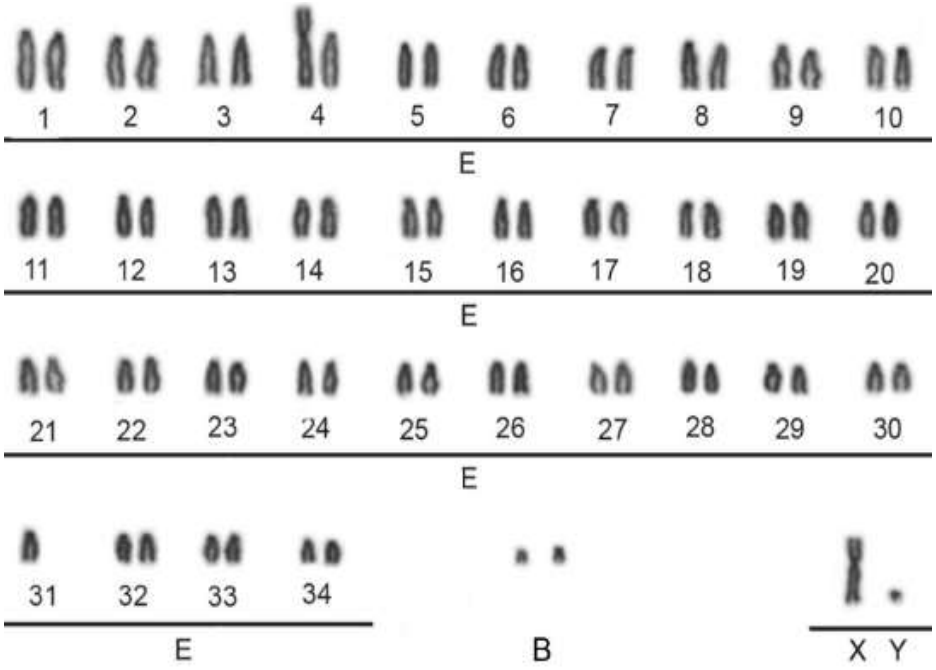


Figura 17: Cariótipo do topótipo macho de *Mazama nemorivaga*, sob coloração convencional Giemsa (Morales Donoso, 2017).

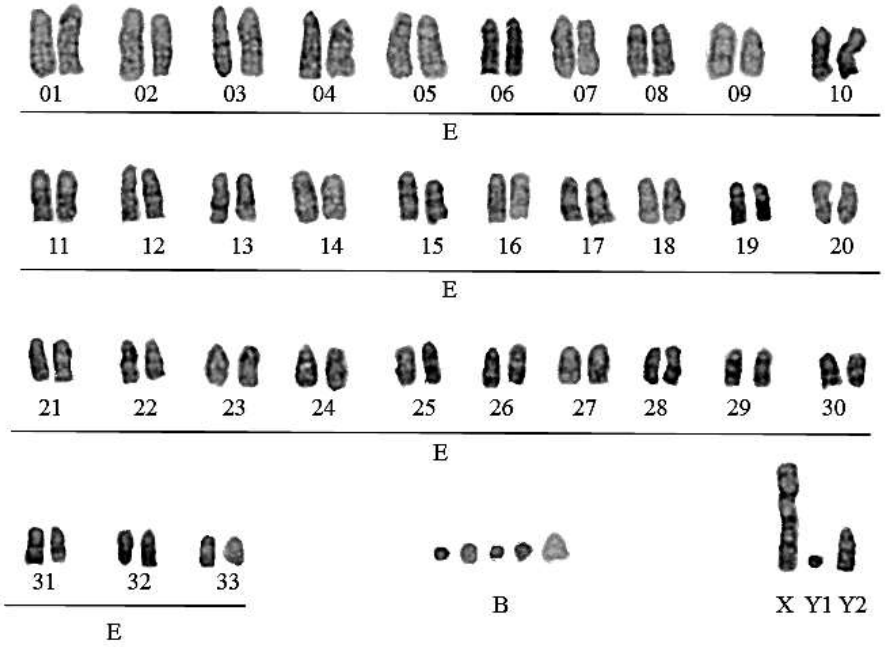


Figura 18: Cariótipo do topótipo macho T420 coletado em Vilhena, sob bandamento G.

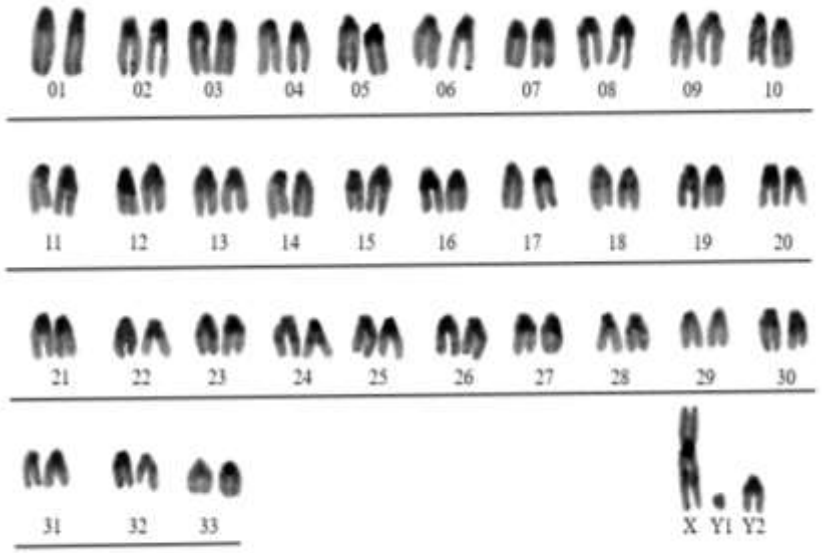


Figura 19: Cariótipo do topótipo macho T420 coletado em Vilhena, sob bandamento C.

O cariótipo analisado apresentou 33 pares autossômico de cromossomo acrocêntrico e o cromossomo sexual X submetacêntrico. Foi encontrado a presença

do sistema sexual múltiplo (XY1Y2), produto de uma fusão do cromossomo X com um cromossomo autossômico. A técnica de bandamento G permitiu o pareamento correto dos cromossomos homólogos (Figura 18) e com o bandamento C (Figura 19) é possível visualizar a marcação dos centrômeros e também de blocos de heterocromatina do cromossomo X, sendo vestígio de um rearranjo cromossômico.

Além do mais, com a análise da Hibridização in situ fluorescente foi possível descrever a translocação dos cromossomos sexuais, no qual o cromossomo X apresentou fluorescência das sondas Bta19 ou Mgo15 de acordo com a classificação das sondas em *Mazama*, ou seja, cromossomo 15 de *M. gouazoubira*, a 130E10 é a sonda marcada com Green-dUTP (verde), 50L8 com digoxigenina (rosa) e 188A20 com biotina (amarela), sendo diferente da translocação encontrada no topótipo da Guiana Francesa (Figura 20).

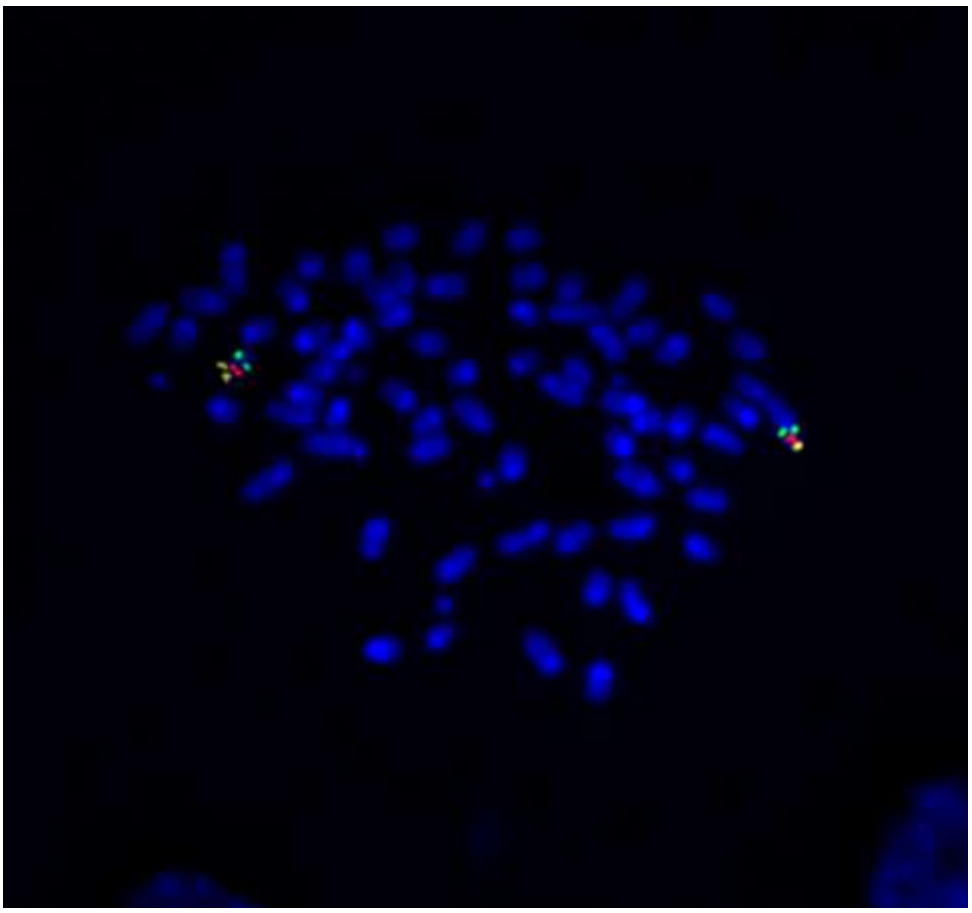


Figura 20: Hibridização in situ fluorescente identificando a translocação dos cromossomos sexuais

5.3 Análise Molecular

A distância genética calculada para o mitogenoma demonstra que o topótipo de *M.rondoni* T420 apresenta menor distância com *M.nemorivaga* comparado a outras espécies, e está mais próximo dos espécimes *M.nemorivaga* de Porto Velho e do Peru.

Tabela 8: Distância genética do topótipo de *M.rondoni* com *M.nemorivaga*

	T420_Mazama_rondoni_Topotipo_Vilhena
T359_Mazama_nemorivaga_Tipo_GuianaFrancesa	0,0532
T24_Mazama_nemorivaga_PortoVelho	0,0075
T246_Mazama_nemorivaga_JurupariPA	0,0403
Mazama_nemorivaga_JN632659_Peru	0,0070
Mazama_nemorivaga_JN632660_ GuianaFrancesa	0,0398
T321_Mazama_nemorivaga_Amapa	0,0316

Para a árvore gerada pela análise do Mitogenoma, foram utilizados 32 sequencias do banco de dados do Nupecce e sequencias obtidas do GeneBank. O melhor modelo evolutivo foi definido para cada gene (tabela3). Nessa árvore é possível observar que o gênero *Mazama* é polifilético, tendo suas espécies posicionadas de forma separadas em 3 linhaens, duas na subtribo Blastocerina (Figura 21 em azul com *M. nemorivaga*/ *M. gouazoubira*) e uma na subtribo Odocoileina (Figura 21 em vermelho com *M. americana, M. bororo, M.* nana e M*. temama*)

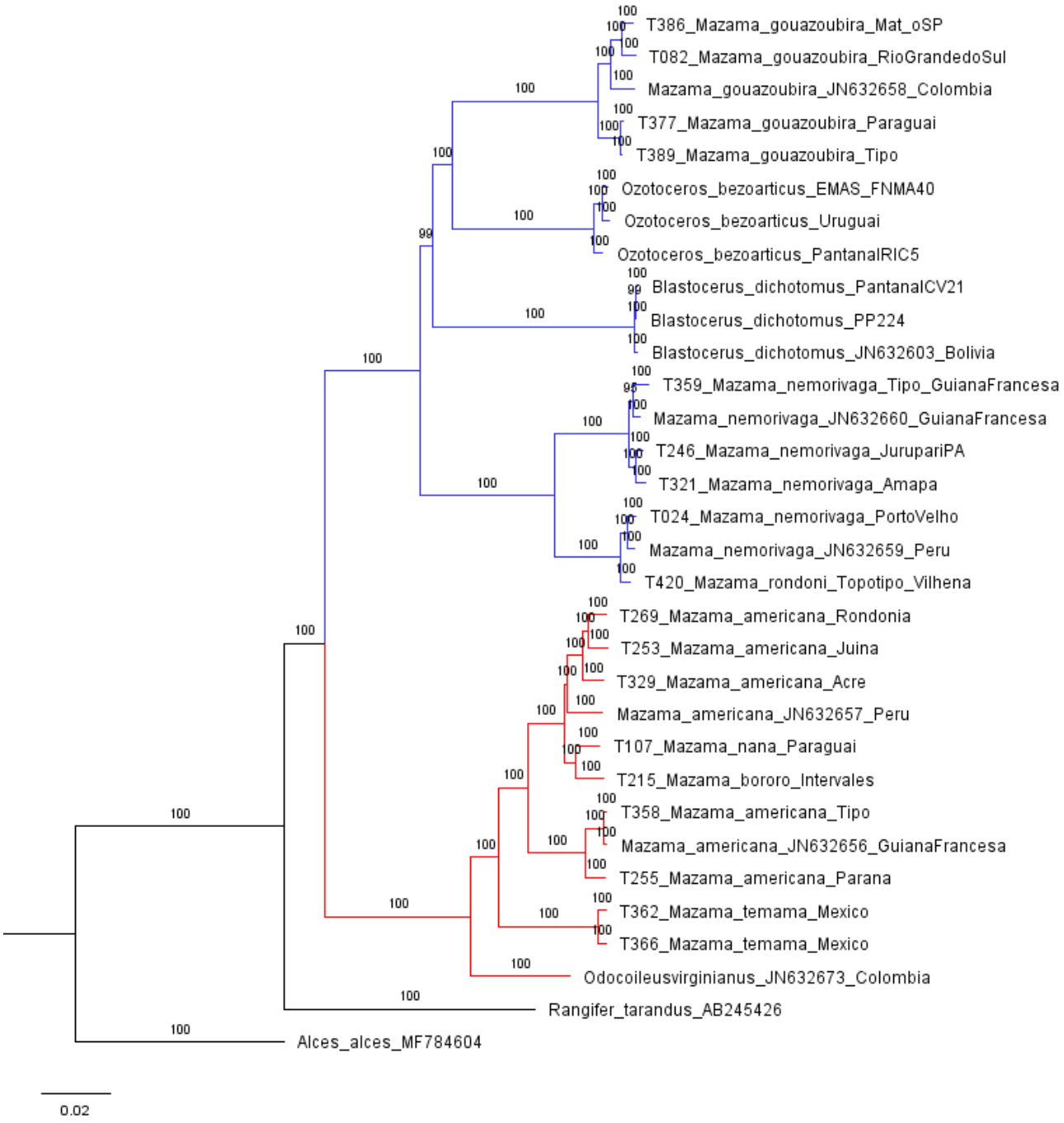


Figura 21: Árvore filogenética do Mitogenoma da análise de Inferência Bayesiana. Em azul representando a subtribo Blastocerina e em vermelho a subtribo Odocoileina.

O topótipo T420 de *M.rondoni* está agrupado junto com *M.nemorivaga*, onde podemos observar a separação de clados, um representado pelo clado norte amazônico com *M. nemorivaga* da Guiana Francesa, e indivíduos do Amapá e Pará,

e outro representado pelo clado oeste amazônico, no qual se apresenta o topótipo de *M.rondoni* junto com *M. nemorivaga* Porto Velho e Peru.

5.4 Análise das amostras do Museu

Todas as amostras do acervo do museu foram extraídas, apesar da quantificação do DNA ter uma boa concentração para amplificação, o material antigo tem DNA muito degradado e sua amplificação é difícil, além de também ter DNA contaminado com micro-organismos e insetos. As soluções de trabalho foram preparadas a partir das soluções estoque com uma diluição final de 20 ng / µL.

Foram amplificados com sucesso apenas os genes Cytb 224bp, ND5 224bp e ND5b 249bp, devido ao DNA obtido em amostras de museu ser altamente degradado, com baixa quantidade e qualidade (Besnard et al., 2016).

A distância genética calculada para os genes concatenados Citb e ND5 demonstra que os espécimes MNRJ841 (0,016), MNRJ1441 (0,05) e MNRJ1371 (0,0426) tem uma menor distancia com os *M.gouazoubira* e o espécime MNRJ1372 (0,08) apresenta menor distância com *M.nemorivaga* comparado a outras espécies.

Tabela 9: Distância genética entre os espécimes do museu e o grupo de *M.nemorivaga* e *M.gouazoubira*

	M.nemorivaga	***M.gouazoubira***
MNRJ841	0,0905	0,0166
MNRJ1441	0,1160	0,0500
MNRJ1371	0,1060	0,0426
MNRJ1372	0,0810	0,1051

A árvore gerada pela análise do gene mitocondrial dos animais do museu evidencia o agrupamento do MNRJ841, MNRJ1441 e MNRJ1371 em um grupo junto com *Mazama gouazoubira* e o MNRJ1372 junto com *Mazama nemorivaga* (figura 23).

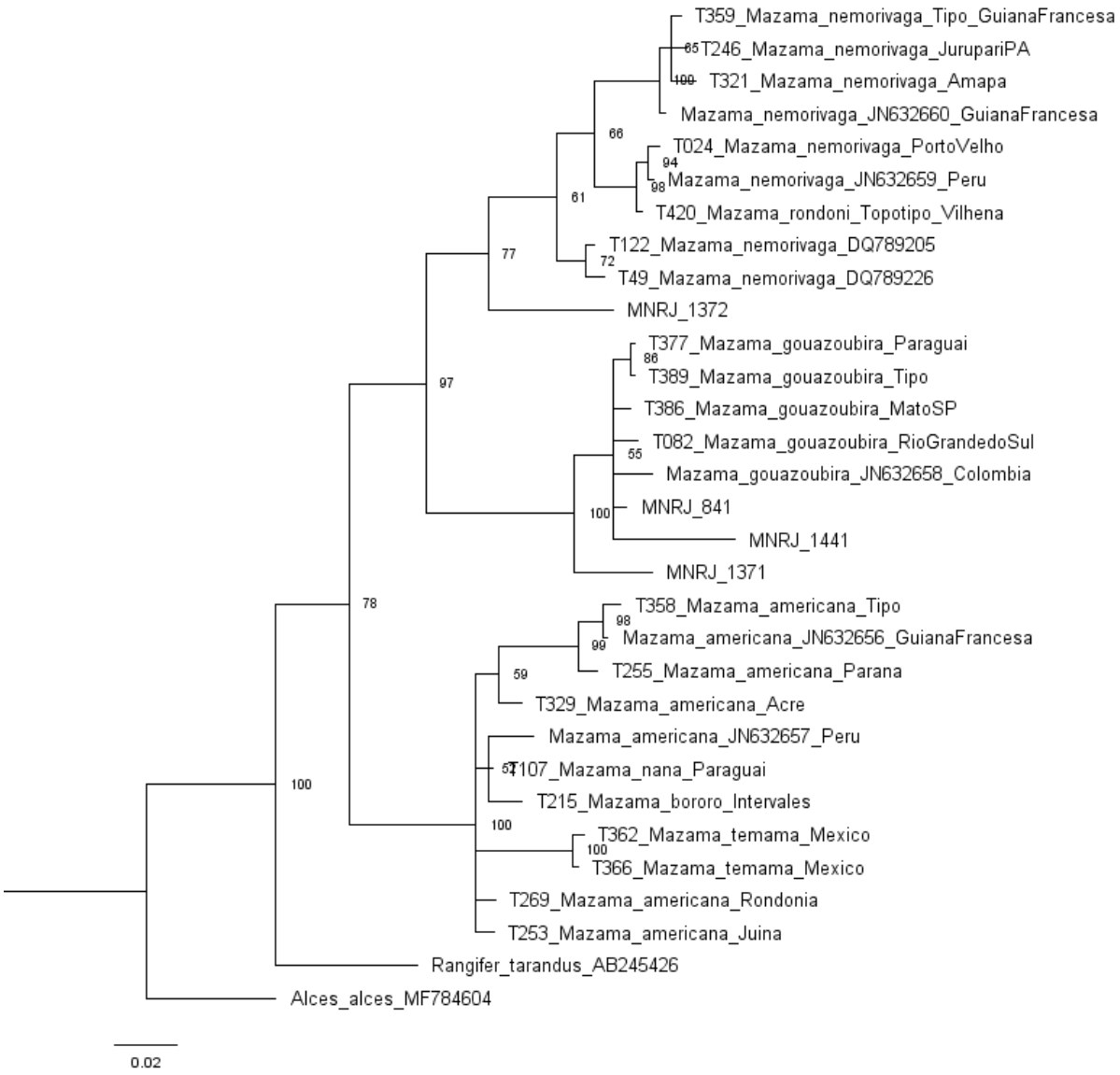


Figura 23: Árvore filogenética do fragmento dos genes mitocondriais da Inferência Bayesiana

6. Discussão

6.1 Análise morfológica

As características morfológicas das espécies do gênero *Mazama* são muito semelhantes, sendo de difícil diferenciação dessas espécies apenas com dados morfológicos (Rossi, 2000; Duarte et al., 2008).

A partir dos resultados do padrão de cores e morfologia externa foi possível comparar características o topótipo de *M.rondoni* que apresenta coloração acinzentada com características muito semelhante ao *M.nemorivaga*, porém com a coloração mais escura do que o topótipo de *M.nemorivaga recém proposto*. A presença de mancha superciliar é uma característica que apresenta variação em *M. nemorivaga* (Rossi, 2000), porém, assim como no topótipo de *M. nemorivaga* o espécime não apresenta mancha superciliar (Morales Donoso, 2017).

Apesar disso, considerando a análise de apenas um exemplar de *M.rondoni* não foi possível a discriminação, ou identificação de um padrão morfológico exclusivo e distintivo para essa espécie através das medidas cranianas e biométricas.

Nas análises de componentes principais da biometria e craniometria e as árvores de distância morfológica feita a partir das medidas mostrou apenas a formação de dois clados principais. Um grupo formado por indivíduos de médio porte sendo *M. americana, M. rufa* e *M. bororo* e no outro grupo são agrupados o topótipo (T420) junto com *M. nana, M. temama, M. nemorivaga, M. gouazoubira* e também *M. bororo*, não sendo possível a distinção entre as espécies dentro dos grupos, corroborando com os trabalhos de outros autores (Rossi, 2000; Duarte et al., 2008).

6.2 Análise citogenética

O topótipo coletado de *M.rondoni* (T420) apresenta o cariótipo com 2n=69, XY1Y2/NF=71 + 05B diferente do encontrado no topótipo de *M. nemorivaga* da Guiana Francesa que apresenta um cariótipo com 2n=69, XY/NF=72 + 03B (Morales Donoso, 2017). A variação encontrada em *M. nemorivaga* é de 2n=67 a 69 e NF=70 a 72 apresentando cariótipo polimórfico, devido à ocorrência de rearranjos Robertsonianos (Duarte, 1998; Resende, 2012; Fiorillo et al., 2013).

No cariótipo analisado, foi encontrado a presença do sistema sexual múltiplo (XY1Y2), produto de uma fusão do cromossomo X com um cromossomo autossômico, sendo diferente do sistema sexual encontrado no topótipo de *M. nemorivaga* (sistema

sexual simples - XY) e da fusão Robertsoniana de dois cromossomos autossômicos (Morales Donoso, 2017). Resende (2012) em seu trabalho apresenta alguns animais da espécie *M.nemorivaga* com sistema sexual múltiplo, outros com sistema sexual simples e a presença de fusão Robertsoniana dos cromossomos autossômicos, com 6 animas de regiões abaixo do rio Amazonas (Santarém, Imperatriz, Juína, Rondônia, Rio branco e Marabá) que apresentavam 33 pares de cromossomo autossômico e 2 animas de regiões acima do rio Amazonas (Macapá) com 34 pares de cromossomos autossômicos, semelhante ao encontrado no topótipo de *M.nemorivaga* da Guiana Francesa nos quais também não possuíam sistema sexual múltiplo.

Essa alta fragilidade cromossômica encontrada nos *Mazama* gera uma grande diversificação cariotípica dentro do gênero, que não está relacionada com baixos níveis de diversificação morfológica dessas espécies (Grooves e Grubb; 1987; Duarte; Merino, 1997). Essas diferenças numéricas ou estruturais entre os cariótipos de dois indivíduos podem gerar descendentes inférteis devido ao desbalanceamento no número dos cromossomos nos gametas, tendo potencial para separação dessas espécies, devido ao início de um isolamento reprodutivo (Abril e Duarte, 2008).

6.3 Análise molecular

Nessa árvore é possível observar que o gênero *Mazama* é polifilético, separando a subtribo Blastocerina (Figura 22 em azul com *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*) da subtribo Odocoileina (Figura 22 em vermelho com *M. americana, M. bororo, M.* nana e M*. temama*), corroborando com outros estudos com análises moleculares de cervídeos que também observaram a polifilia dos *Mazama* (Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012; Figueiredo, 2014; Heckeberg et al., 2016 Gutiérrez, 2017).

Figueiredo (2014), através da análise filogenética de genes mitocondriais, divide a espécie *M. nemorivaga* em três clados com distribuições biogeográficas distintas, um no Norte (Amapá, acima do rio Amazonas), outro no Leste (Pará, nas ecorregiões de Tapajós, Xingu e Belém) e outro no Oeste amazônico (Rondônia e Acre). Da mesma forma, Morales Donoso (2017), ao analisar um topótipo de *M.*

nemorivaga, que demonstraria o padrão básico da espécie, sugeriu a existência de três espécies distintas com o mesmo padrão sugerido por Figueredo (2014).

De Oliveira et al. (2020) também corroboram com esse resultado mostrando alto suporte estatístico de subgrupos de *M. nemorivaga* incluindo também os animais do Espirito Santo, sugerindo *M. nemorivaga* como um complexo de espécies crípticas. Apesar de ser recente a identificação de *M. nemorivaga* na Mata Atlântica Miranda-Ribeiro (1919) já destacava a semelhança entre *M. rondoni* e alguns exemplares do Museu Paulista da região do Rio Doce, no estado do Espírito Santo, afirmando que se tratava da mesma espécie.

6.4 Análise das amostras de museu

É importante ressaltar que para estudos de táxons extintos ou grupos com problemas taxonômicos, amostras de coleções de museus representam uma fonte crucial de informação morfológica e genética (Chakraborty et al., 2006).

O espécime tipo MNRJ841 selecionado por Miranda-Ribeiro, apesar de cair no clado de *M.gouazoubira*, vale ressaltar que esse animal foi encontrado morto e o próprio autor relata que a pele já estava em adiantado estado de putrefação. Posteriormente, em 1919 o autor declara que o animal que reuniu não tinha a cor descrita por ele dos outros animais analisados, sendo mais tendente para o sépiaceo castanho (figura 24, 25).

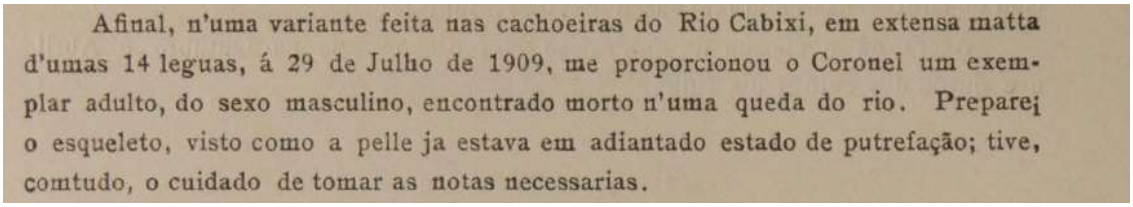

Afinal, n'uma variante feita nas cachoeiras do Rio Cabixi, em extensa matta d'umas 14 leguas, á 29 de Julho de 1909, me proporcionou o Coronel um exemplar adulto, do sexo masculino, encontrado morto n'uma queda do rio. Preparei o esqueleto, visto como a pelle ja estava em adiantado estado de putrefação; tive, comtudo, o cuidado de tomar as notas necessarias.

Figura 24: Trecho de Miranda-Ribeiro (1914) sobre *Mazama rondoni*

Descrição do trecho: “Afinal, numa variante feita nas cachoeiras do Rio Cabixi, em extensa mata de umas 14 léguas, a 29 de julho de 1909, me proporcionou o Coronel um exemplar adulto, do sexo masculino, encontrado morto numa queda do

rio. Preparei o esqueleto, visto como a pele já estava em adiantado estado de putrefação; tive, contudo, o cuidado de tomar as notas necessárias.”

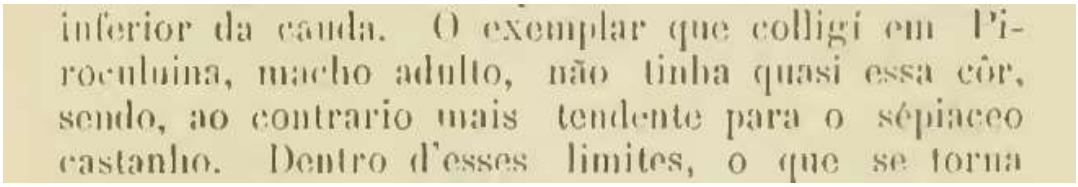

inferior da cauda. O exemplar que colligi em Piroculuina, macho adulto, não tinha quasi essa côr, sendo, ao contrario mais tendente para o sépiaceo castanho. Dentro d'esses limites, o que se torna

Figura 25: Trecho de Miranda-Ribeiro (1919) sobre *Mazama rondoni*

Descrição do trecho: “O exemplar que coligi em Piroculuina, macho adulto, não tinha quase essa cor, sendo, ao contrário mais tendente para o sepiaceo castanho.

Além disso, o espécime MNRJ1441 que também está no clado de *M.gouazoubira* (figura 26) é de um couro de uma fêmea jovem que veio de Aripuanã-Mato Grosso, encontrado morto, apesar do autor confirmar que o animal é *M.rondoni* a identificação de filhotes de *Mazama* é muito difícil devido a morfologia ser muito semelhante entre o gênero.



Figura 26: Pele MNRJ1441 de *Mazama rondoni*

Os resultados mostram que essas amostras da série tipo não são da mesma espécie, pertencendo a duas espécies de *Mazama* que representam as duas linhagens dentro do clado cinza *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*. Durante a classificação taxonômica baseado em morfologia podem acontecer alguns erros de classificação para algumas espécies, um estudo com genes mitocondriais mostrou

que o lectótipo de crânio e pele da *Gazella arabica* não eram derivados do mesmo animal, sendo de duas espécies que representam duas linhagens monofiléticas (Bärmann, et al., 2013).

Ademais, em suas descrições, Miranda-Ribeiro relata muito bem a diferença entre *M. simplicicorni* e *M.rondoni* e evidencia várias vezes que a espécie que esta descrevendo é semelhante a *M. nemorivaga* (figura 27) descrevendo também os nomes populares que a população local dava para espécie (figura 28), sendo o mesmo nome que a população cita para *M.nemorivaga*, como veado-roxo, por exemplo.

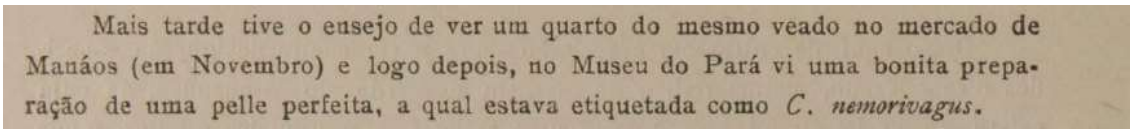

Mais tarde tive o ensejo de ver um quarto do mesmo veado no mercado de Manáos (em Novembro) e logo depois, no Museu do Pará vi uma bonita preparação de uma pelle perfeita, a qual estava etiquetada como *C. nemorivagus*.

Figura 27: Trecho de Miranda-Ribeiro (1914) sobre *Mazama rondoni*

“Mais tarde tive o ensejo de um quarto do mesmo veado no mercado de Manaus (em novembro) e logo depois, no Museu do Pará vi uma bonita preparação de uma pele perfeita, a qual estava etiquetada como *C.nemorivagus*.”

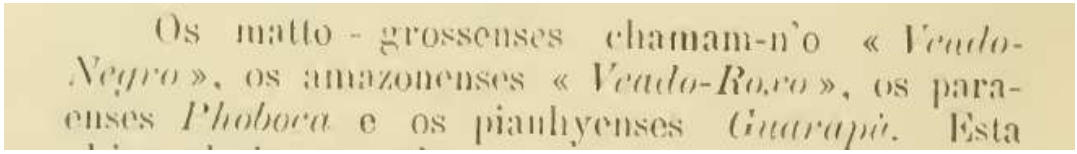

Os matto-grossenses chamam-n'o « *Veado-Negro* », os amazonenses « *Veado-Roxo* », os paraenses *Phoboca* e os pianhyenses *Guarapá*. Esta

Figura 28: Trecho de Miranda-Ribeiro (1919) sobre *Mazama rondoni*

“Os mato-grossenses chamam-no Veado-negro, os amazonenses Veado-roxo, os paraenses Phoboca e os pianhiense Guarapa ”

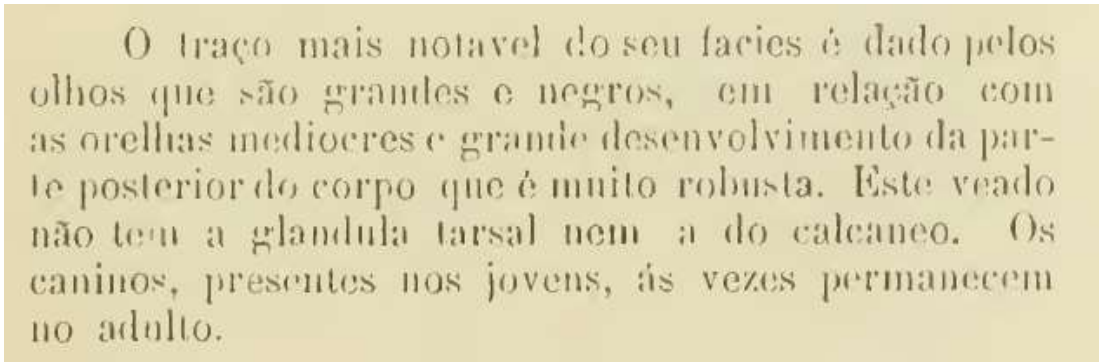

O traço mais notavel do seu facies é dado pelos olhos que são grandes e negros, em relação com as orelhas medioeres e grande desenvolvimento da parte posterior do corpo que é muito robusta. Este veado não tem a glandula tarsal nem a do calcaneo. Os caninos, presentes nos jovens, ás vezes permanecem no adulto.

Figura 29: Trecho de Miranda-Ribeiro (1919) sobre *Mazama rondoni*

"O traço mais notável da sua face é dado pelos olhos que são grandes e negros, em relação as orelhas medíocres e grande desenvolvimento da parte posterior do corpo que é muito robusta."

Outro caso semelhante foi citado por Tate (1939), no qual ele fala do status confuso de alguns veados da América do Sul, o autor discute sobre a confusão do material tipo de *Mazama americana tumatumari*, em que o crânio não é de *Mazama*, mas de *Odocoileus*, porém a pele e outros espécimes são de *Mazama*.

7. Conclusão

O presente trabalho demonstrou que o topótipo da espécie *M. rondoni*, apresenta características morfológicas de acordo com o padrão da espécie descrita por Miranda-Ribeiro, porém os dados craniométricos não foram conclusivos. Com relação aos resultados citogenéticos, o animal possui sistema sexual múltiplo (XY1Y2) e cariótipo (2n=69, XY1Y2/NF=71 + 05B). Por fim, os resultados filogenéticos mostraram clados separados de *M.nemorivaga* onde o topótipo de *M.rondoni* está junto com os animais do oeste amazônico, corroboram para uma potencial separação dessa espécie.

5. REFERENCIAS

Abril, V.V.; Carnelossi, E.A.G.; González, S.; Duarte, J.M.B. (2010) Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and Genome Research**.v.128, p.177-187.

Abril, V.V.; Duarte, J.M.B. (2008) Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, Mazama nana (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, Riberão Preto, v. 31, p. 53-57.

Allen, A (1915). Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. New York, v. 34, p.521-553.

Avila-Pires, F. D. (1959) As formas sul-americanas do veado-virá. **An. Acad. Brasileira Ciências.** v.31, p.547-556.

Bärmann, E.V., Börner, S., Erpenbeck, D., Rössner, G.E., Hebel, C., Wörheide, G. (2013). The curious case of Gazella arábica. **Mammalian Biology.** doi:10.1016/j.mambio.2012.07.003

Besnard, G.; Bertrand, J.A.M.; Delahaie, B.; Bourgeois, Y.X.C.; Lhuillier, E.; Thébaud, C. (2016) Valuing museum specimens: high-throughput DNA sequencing on historical collections of New Guinea crowned pigeons (Goura). **Biological Journal of the Linnean Society**, v.117, p.71–82.

Black-Décima, P.; Rossi, R. V.; Vogliotti, A.; Cartes, J. L.; Maffel, L.; Duarte, J. M. B.; González, S.; Juliá, J. P. (2010) Brown brocket deer *Mazama gouazoubira* (Fischer 1814) – Em: Duarte, J. M. B., Gonzalez, S. Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer. Jaboticabal, Funep – IUCN, p. 190-201.

Cabrera, A. (1960); Catalogo de los mamíferos de America del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia**, Argentina, v.4, p.309-732.

Chakraborty, A.; Sakai, M.; Iwatsuki, Y (2006). Museum fish specimens and molecular taxonomy: a comparative study on DNA extraction protocols and preservation techniques. **Journal of Applied Ichthyology**, v. 22, n. 2, p. 160-166.

Cracraft, J. (1983)Species concepts and speciation analysis.In: Johnston, R.F. **Current Ornithology.** Plenum Press, New York, v.1, p.87-159.

Cifuentes-Rincón, A ; Morales-Donoso, J.A. ; Sandoval, E. D. P. ; Tomazella, I. M. ; Mantellatto, A.M. B. (2020); De Thoisy, B. ; Duarte, J. M. B. Designation of a neotype for *Mazama americana* (Artiodactyla, Cervidae) reveals a cryptic new complex of brocket deer species. ZOOKEYS (ONLINE), v. 958, p. 143-164.

Cursino, M.S.; Salviano, M.B.; Abril, V.V.; Zanetti, E.S; Duarte, J.M.B. (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 v.14, 40p.

Cuvier, G.L.C.F.D. (1817) Dictionnarie des Sciences Naturelles. **Zoologie. Mammiferes**. F.G. Levrault, Paris, v.7, n.1, p. 534.

Cuvier, G.L.C.F.D. (1821) Recherches sur le ossemens fossiles de quadrupédes, ou l´on rétablit les caracteres des plusieurs espéces. **D´animaux que les révolutions du Globe ont paroissent avoir détruites**. 2nd edition. Edmond D´Ocagne, Paris 4.

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

De Oliveira, M.L. ; De Faria Peres, P. H. ; Gatti, A.; Morales-Donoso, J.A.; Mangini, P.R.; Duarte, J.M.B. (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**, v. 66, p. 28

Driesch, A. (1976) A Guide to the Measurement of Animal Bones from Archaeological Sites. **Peabody Museum**, Harvard University, 136p.

Duarte, J.M.B.; Gonzalés, S.; Maldonado, J.E (2008). The surprising evolutionary history of South American Deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v.49, p. 17-22.

Duarte, J.M.B.; Gonzalez, S. (2010) **Neotropical Cervidology. Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal: FUNEP e IUCN, 394p.

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

Duarte, J.M.B.; Merino, M.L. (1997) Taxonomia e Evolução, in: Duarte, J.M.B (Ed.), **Biologia e conservação de Cervideos sul-americanos: *Blastocerus, Ozotoceros e Mazama***. FUNEP, Jaboticabal. p. 1-21.

Duarte, J. M. B.; Jorge, W. (1998) Análise Citotaxonômica dos Mazamas Cinzas do Brasil (Mazama gouazoubira and Mazama rondoni). In: Duarte, J. M. B. **Análise citogenética de taxonômica do gênero Mazama (Cervidae: Mammalia) no Brasil**. Tese de doutorado, Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

Duarte, J.M.B & Jorge, W (1996). Chromosomal polymorphism in several populations of deer (genus Mazama) from Brazil. **Archivos de Zootecnia**, v. 45, n. 170, p. 281-287.

Eisenberg, J.F. (1989) **Mammals of the neotropics. The northern Neotropics. Panama, Colombia, Venezuela, Guyana, Suriname, French Guiana**. University of Chicago, 449p.

Figueiredo, M. (2014) **Filogenia e taxonomia dos veados cinzas (Mazama gouazoubira e M. nemorivaga).** 108 f. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Fiorillo, B.F., Sarria-Perea, J.A., Abril, V.V., Duarte, J.M.B. (2013) Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket Mazama nemorivaga (Artiodactyla; Cervidae). **Conparative cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 25-31.

Fontana, F.; Rubini, M. (2013) Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, Amsterdam, v. 34, p, 157-174.

Grooves, C.P. & Grubb, P. (1987). Relationships of living deer. In: Wemmer, C.M. Biology and Management of the Cervidae. Washington: Smithsonian Institution Press. p.21-59.

Gutiérrez, E.E., Maldonado, J.E., Radosavljevic, A., Molinari, J., Patterson, B.D., Martínez-C, J.M., Rutter, A.R., Hawking, M.T.R., García, F.J., Helgen, K.M. (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, E.E, Helgen K.M, McDonough, M.M, Bauer, F., Hawkins M.T.R, EscobedoMorales L.A,Patterson B.D. , Maldonado J.E. (2017). A gene-tree test of the traditional taxonomy of American deer: the importance of voucher 59 specimens, geographic data, and dense sampling. **ZooKeys** v.697. p. 87–131

Hall, T.A. (1999) Bioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Version 6.0.7.

Hammer Φ,. Harper, D. A. T., Ryan, P. D. (2001) PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. **Palaeontologia Electronica** 4, p.1–9. Disponível em: <http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>.

Hassanin, A., Delsuc, F., Ropiquet, A., Hammer, C., Van Vuuren, B.J., Matthee, C., Ruiz-Garcia, M., Catzeflis, F., Areskoug, V., Nguyen, T.T., Coulox, A. (2012) Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia; Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analisys of mitocondrial genomes. **Comptes Rendum Biology**, v.335, p. 32-50.

Heckeberg, N.S.; Erpenbeck, D.; Worheide, G.; Rossner, G.E. (2016) Systematic relationship of five newly sequenced cervid species. **PEERJ**, v 4, p. e2307.

Hershkovitz, P. (1951) Mammals from British Honduras, Mexico, Jamaica and Haiti. **Fieldiana Zoology**, v. 31, p 547-569.

Howell, W.W.; Black, D.A. (1980) Controlled silver staining of nuclçeous organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Experientia**, v.36, p.1014-1015.

Mantellatto, A.M.B. (2016) Padrões de distribuição histórica, relações filogenéticas e filogeográficas de veado-mateiro-pequeno, Mazama bororo DUARTE, 1996 (Mammalia : Cervidae).. Tese de Doutorado - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias..

Medellin, R., Gardner, A., Aranda, M. (1998) The taxonomic status of the Yucatán brown brocket, Mazama pandora (Mammalia: Cervidae). **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 111, n. 11, p.1-14.

Medrano J. F.; Aasen E.; Sharrow L. (1990) DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, v. 8, n. 1, p. 43.

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

Miranda-Ribeiro. (1914) História natural. Zoologia. Mamíferos. Anexo nº5. **Comissão de linhas Telegráficas Estratégicas de Mato Grosso ao Amazonas**, Rio de Janeiro.

Miranda-Ribeiro. (1919) Os veados do Brasil segundo as coleções de Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista**, v. 11, p.308.

Morales Donoso, J. (2017) **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama nemorivaga* (CUVIER, 1817) a partir de um topótipo atual.** 80 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal.

Neitzel, H. (1987) Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. In: OBE, G.; BASLER, A. (eds.). Cytogenetic, basic and applied aspects, Berlin: Springer Verlag, p.90-112.

Pinder, L. & Leeuwenberg, F. (1997). Veado-catingueiro (Mazama gouazoubira, Fischer 1814). In: Duarte, J.M.B. (Ed). Biologia e conservação de cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama. FUNEP, Jaboticabal, p.60-68.

Rafinesque, C.S. (1817). American Monthly Magazine.v. 1(5). p. 363.

Rambault, A. (2012). Figtree v1.3.1. Computer program and documentation. Disponível em: http://tree.bio.ed.ac.uk/software/

Rees, J. W. (1969) Morphologic variation in the mandible of the white-tailed deer (Odocoileus virginianus): A study of populational skeletal variation by principal component and canonical analysis. **Journal of Morphology**, v. 128, n. 1, p. 113-13.

Resende, J. P. A. (2012). **Comparação cariotípica entre Mazama cinzas do Brasil (Mazama gouazoubira e Mazama nemorivaga, Artiodactyla; Cervidae)**. Dissertação (Mestrado Melhoramento Genético Animal) Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrarias e Veterinárias. Jaboticabal. p.15.

Rossi, R. V. (2000) **Taxonomia de *Mazama* Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla, Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciencias Biologicas) Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo, São Paulo. 147 p.

Rossi, R. V.; Bodmer, R.; Duarte, J.M.B.; Trovati, R. G. (2010) Amazonian Brown Brocket Deer. Mazama nemorivaga (Cuvier 1817). in: Duarte, J.M.B., González, S. (eds): **Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer**, Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland, IUCN. 393p.

Rossi, R.V.; Duarte, J.M.B. (2008). *Mazama nemorivaga*. in: IUCN 2008. **IUCN Red List of Threatened Species**. <www.iucnredlist.org>.

Salviano, M. B.; Cursino, M. S.; Zanetti, E. S.; Abril V. V.; Duarte, J. M. B. (2017) Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (Mazama americana), Biology of Reproduction, v 96, p 1279-1287.

Seabright, M. A. (1971) A rapid banding technique for human chromosomes. **TheLancet**, v. 1, p. 9971-972.

Sneath, P., Sokal, R. R. (1973) **Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical taxonomy**. San Francisco, W. H. Freeman and Company. USA.

Sumner, A.T. (1972) A simple technique of demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v.75,p. 304-306.

Tate, G. ,H,H. (1939). The mammals of the Guiana region. Bulletin Americano Museum Natural History, LXXVI, p. 151-229.

Tomazella, I.M.; Abril, V.V.; Duarte, J.M.B. (2017) Identifying Mazama gouazoubira (Artiodactyla; Cervidae) chromosomes involved in rearrangements induced by doxorucibin. Genet Mol Biol, 40:460- 467.

Vargas-Munar, D.S.F., Sarria-Perea, J.A., Duarte, J.M.B. (2010) Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 3, p 1545-1549.

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

Yang, F.; O'brien, P.C.M.; Wienberg, J.; Neitzel, H.; Lin, C.C.; Fergusonsmith, M. A. (1997) Chromosomal evolution of the Chinese muntjac (Muntiacus reevesi). Chromosoma, v.106, p.37-43.