

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E
MOLECULAR DE *Mazama sarae* e *Mazama chunyi*
(CETARTIODACTYLA; CERVIDAE) A PARTIR DE
TOPÓTIPOS ATUAIS**

Liz Jiannine Fuentes Rojas

Médica Veterinária Zootecnista

2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP

CÂMPUS DE JABOTICABAL

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E
MOLECULAR DE *Mazama sarae* e *Mazama chunyi*
(CETARTIODACTYLA; CERVIDAE) A PARTIR DE
TOPÓTIPOS ATUAIS**

Discente: Liz Jiannine Fuentes Rojas

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

Dissertação de mestrado 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

R741c Rojas, Liz Jiannine Fuentes
Caracterização morfológica, citogenética e molecular de Mazama sarae e Mazama chunyi (Cetartiodactyla; Cervidae) a partir de topótipos atuais / Liz Jiannine Fuentes Rojas. -- Jaboticabal, 2021
145 p. : tabs., fotos, mapas

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

1. Cromossomos. 2. DNA. 3. Genoma mitocondrial. 4. Incertezas taxonômicas. 5. Topótipo. 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



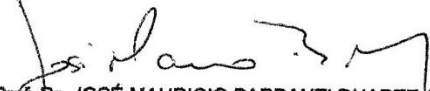
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO


TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGÊNÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama sarae* E *Mazama chunyi* (CETARTIODACTYLA; CERVIDAE) A PARTIR DE TOPÓTIPOS ATUAIS

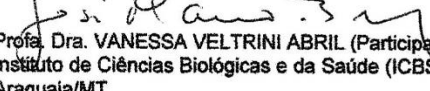
AUTORA: LIZ JIANNINE FUENTES ROJAS

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 (Participação Virtual)
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal


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


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

Jaboticabal, 21 de maio de 2021

DADOS CURRICULARES DA AUTORA

LIZ JIANNINE FUENTES ROJAS - Nascida em 11 de janeiro de 1993, natural de Santa Cruz, Bolívia, Médica Veterinária Zootecnista formada em 2016 pela UAGRM - Universidade Autônoma Gabriel Rene Moreno, de Santa Cruz de la Sierra. Durante o curso trabalhou como Auxiliar na Clínica Veterinária Vida Animal e depois da formatura continuou como Médica Veterinária. No último ano da formatura fez práticas dirigidas no LIDIVET - Laboratório de Pesquisa e Diagnóstico Veterinário, e continuou trabalhando como Médica Veterinária até final de 2016. Em agosto de 2017, fez estágio profissional no Cempas (Centro de Medicina e Pesquisa em Animais Selvagens) na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Botucatu. Em agosto de 2018, ingressou no curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP - Universidade Estadual Paulista, Câmpus de Jaboticabal, Departamento de Zootecnia, NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos), na linha de genética da conservação, sob orientação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte. A aluna recebeu financiamento para o mestrado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

DEDICATÓRIA

A Deus, o maior orientador da minha vida, meu guia e acompanhante nesta longa caminhada, sem ele nada seria possível. Aos meus pais Rosse Mary Rojas e Lucio Fuentes, e meus irmãos Wendy e Kevin, pelo carinho, conforto, sorrisos, pelas palavras de apoio e compreensão, que dão sentido à minha vida e a tornam mais fácil e prazerosa de viver. Aos “meus bebês” Chispita, Lucas e Luna, que eu amo com toda a minha alma. Em memória do meu “tio Chinano” que foi como um irmão para mim, um exemplo de bondade, força, tenacidade e dedicação, toda a gratidão pelo seus exemplos e ensinamentos.

AGRADECIMENTOS

- O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.
- À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo auxílio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa - Processo nº2017/07014-8.
- À Unesp, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Câmpus de Jaboticabal, em especial ao Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE), baixo a coordenação do Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela oportunidade de ser parte da equipe, o ensino, a ajuda e as instalações para a elaboração do presente trabalho.
- Aos funcionários e professores da UNESP-Jaboticabal pelo apoio na minha formação acadêmica.
- Ao técnico João, pela ajuda nas análises laboratoriais, além da companhia e boa disposição de ajudar entre uma análise e outra.
- Ao Professor Renato Caparroz, pelo apoio e as contribuições nas análises filogenéticas do presente trabalho.
- Ao Dr. Damian Ruiz, à Lic. Kathia Rivero e todo o pessoal do Museu Noel Kempff Mercado de Santa Cruz-Bolívia, que foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho.
- A todos meus colegas e amigos: Guilherme, Rony, David, Dennis, Milo, Pierina, Diego, e todas as pessoas que me apoiaram ao longo deste caminho.
- Agradecer também a todo o pessoal estrangeiro de Jaboticabal. Sem dúvida a saudade de casa se torna mais leve com a presença de vocês por perto.
- A todos os que aqui não citei, mas de alguma forma contribuíram com essa conquista.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

	Página
CERTIFICADO DA COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	vi
RESUMO.....	vii
ABSTRACT.....	viii
LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xiv
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES GERAIS.....	1
INTRODUÇÃO	1
REVISÃO DA LITERATURA	3
1. Família Cervidae	3
2. <i>Mazama sarae</i>	6
3. <i>Mazama chunyi</i>	7
3.1 Morfologia tradicional de <i>Mazama chunyi</i>	10
4. Citogenética de <i>Mazama sarae</i> e <i>Mazama chunyi</i>	13
5. Estudos de sequências do mtDNA de <i>Mazama sarae</i> e <i>Mazama chunyi</i>	13
REFERÊNCIAS.....	17
CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE <i>Mazama sarae</i>	22
RESUMO.....	22
INTRODUÇÃO	23
MATERIAL E MÉTODOS	25
1. Permissão de coleta	25

2. Confirmação da existência do holótipo.....	25
3. Obtenção do exemplar	25
4. Procedimento após a coleta do exemplar	26
4.1 Documentação fotográfica.....	26
4.2 Biometria	26
4.3 Biopsia de pele	27
4.4 Retirada e processamento da pele completa.....	27
4.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo.....	28
4.6 Preparação do crânio e pós-crânio	28
5. Relação de espécies utilizadas	28
6. Caracterização morfológica.....	30
7. Análise citogenética	32
7.1 Cultivo celular.....	32
7.2 Coloração Convencional	33
7.3 Biometria cromossômica.....	33
7.4 Bandamento G.....	33
7.5 Bandamento C	34
7.6 Coloração Ag NOR	34
7.7 Análise das preparações cromossômicas.....	34
8. Genética Molecular	35
8.1 Extração de DNA.....	35
8.2 Sequenciamento do mitogenoma	35
8.3 Análise filogenética do topótipo de <i>Mazama sarae</i>	37

RESULTADOS	38
1. Descrição emendada de <i>Mazama sarae</i>	38
2. Análises morfológicas de biometria e craniometria	45
2.1 Análises de biometria corporal	45
2.2 Análises de craniometria.....	47
3. Citogenética	50
3.1 Coloração convencional.....	50
3.2 Bandamento C	51
3.3 Colocação Ag-NOR.....	52
3.4 Bandamento G.....	53
4. Análise do Mitogenoma	55
DISCUSSÃO	58
1. Análise morfológica	58
2. Análise citogenética	59
3. Análise filogenética	60
CONCLUSÕES	61
REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO 3 - Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de <i>Mazama chunyi</i>	65
RESUMO	65
INTRODUÇÃO	66
MATERIAL E MÉTODOS	68
1. Permissão de coleta	68

2. Confirmação da existência do holótipo.....	69
3. Obtenção do exemplar	69
4. Procedimento após a coleta do exemplar	70
4.1 Biometria	70
4.2 Documentação fotográfica.....	70
4.3 Biopsia de pele.....	70
4.4 Retirada e processamento da pele completa.....	71
4.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo.....	71
4.6 Preparação do crânio e pós-crânio	71
5. Relação de espécies utilizadas	71
6. Caracterização morfológica.....	73
7. Análise citogenética	75
7.1 Cultivo celular.....	75
7.2 Coloração Convencional	77
7.3 Biometria cromossômica.....	77
7.4 Bandamento C	77
7.5 Coloração Ag-NOR	77
7.6 Análise das preparações cromossômicas.....	78
8. Genética Molecular	78
8.1 Extração de DNA.....	78
8.2 Amplificação e sequenciamento de três genes mitocondriais.....	78
8.3 Análise filogenética do topótipo de <i>Mazama chunyi</i>	80
RESULTADOS.....	82

1. Descrição emendada de <i>Mazama chunyi</i>	82
2. Análises morfológicas de biometria e craniometria	88
2.1 Análises de biometria corporal	88
2.2 Análises de craniometria.....	91
3. Citogenética	93
3.1 Coloração convencional.....	93
3.2 Bandamento C	94
3.3 Colocação Ag-NOR.....	95
4. Análise de três genes mitocondriais	96
DISCUSSÃO	101
1. Análise morfológica	101
2. Análise citogenética	102
3. Análise filogenética	103
CONCLUSÕES	105
REFERÊNCIAS	106
APÊNDICES	110
Apêndice A.....	111
Apêndice B.....	113
Apêndice C.....	115
Apêndice D.....	116
Apêndice E	117
Apêndice F	119
Apêndice G.....	122



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



CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

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

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

Jaboticabal, 16 de maio de 2019.

Prof.ª Dr.ª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA, CITOGENÉTICA E MOLECULAR DE *Mazama sarae* e *Mazama chunyi* (CETARTIODACTYLA; CERVIDAE) A PARTIR DE TOPÓTIPOS ATUAIS

RESUMO - O gênero *Mazama* está cercado de incertezas taxonômicas devido à alta diversidade cariotípica inter e intra-específica, origem polifilética e convergência morfológica, sendo que o número de espécies descritas em diferentes revisões varia entre quatro e dezoito. Dentro da espécie *Mazama americana* é sugerida a existência de novas espécies, já que além das diferenças moleculares e citogenéticas, existem evidências de isolamento reprodutivo pós-zigótico entre populações de veado-mateiro. Na Bolívia, até o momento foram descritas duas formas do gênero *Mazama*. A primeira delas é *M. sarae* Thomas, 1925; uma forma de veado vermelho descrito na região sul da Bolívia. Atualmente é considerado sinônimo de *M. americana*, com base nas características morfológicas daquele único exemplar descrito por Thomas (1925), sem nenhum tipo de abordagem genética. A segunda é *M. chunyi* Hershkovitz, 1959; uma forma de veado marrom de tamanho pequeno, que habita gradientes altitudinais de Puna-Yungas, no noroeste da Bolívia. Apesar de ser aceita como espécie única, as análises moleculares tem sido escassas e ainda não foi descrita cromossomicamente. Portanto, o presente estudo objetivou a caracterização de um topótipo de *Mazama sarae* e um topotipo de *Mazama chunyi*, sob aspectos morfológicos (biometria corporal, padrões de coloração da pele, craniometria), citogenéticos (coloração convencional Giemsa, biometria cromossômica, bandamento C, bandamento G, coloração Ag-NOR), e moleculares (análises filogenéticas do genoma mitocondrial, no caso de *M. sarae*, e de 3 genes mitocondriais para *M. chunyi*). Os resultados morfológicos posicionam ambas as espécies no clado dos pequenos *Mazama* (*M. temama*, *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*). Segundo os padrões citogenéticos, os topótipos de ambas as espécies não se enquadram em nenhuma variante das espécies de *Mazama* atualmente conhecidas. As árvores filogenéticas geradas para o topótipo de *M. sarae*, permite evidenciar a espécie dentro da subtribo Odocoileina, mostrando uma distância considerável em relação ao *M. americana* e ao resto das espécies incluídas na subtribo. Por sua vez, o topótipo de *M. chunyi*, posiciona-se dentro da subtribo Blastocerina, próximo ao haplogrupo monofilético formado pelos espécimes de *M. gouazoubira*. Assim, propõe-se a caracterização de um topótipo para cada espécie estudada, o qual é o ponto de partida para a descrição de novas espécies e possível mudança completa na nomenclatura do gênero *Mazama*.

Palavras-Chave: cromossomos, DNA, genoma mitocondrial, incertezas taxonômicas, topótipo, veados.

**MORPHOLOGICAL, CITOGENETICS AND MOLECULAR CHARACTERIZATION
OF *Mazama sarae* and *Mazama chunyi* (CETARTIODACTYLA; CERVIDAE)
FROM CURRENT TOPOTYPES**

ABSTRACT - *Mazama* genus' taxonomic uncertainties are due to high inter and intraspecific karyotypic diversity, polyphyletic origin, and morphological convergence. The number of species described in different reviews ranges from four to eighteen. Within the *Mazama americana* species, new species' existence is suggested since, in addition to molecular and cytogenetic differences, there is evidence of post-zygotic reproductive isolation between red brocket deer populations. In Bolivia, two forms of the genus *Mazama* have been described to date. The first of these is *M. sarae* Thomas, 1925; a form of red deer described in the southern region of Bolivia. It is currently considered a synonym of *M. americana*, based on the morphological characteristics of that single specimen described by Thomas (1925), without having any genetic approach. The second is *M. chunyi* Hershkovitz, 1959, a small-sized brown deer that inhabits altitudinal gradients of Puna-Yungas in northwestern Bolivia. Although accepted as a unique species, molecular analyses have been scarce and have not yet been described chromosomally. Therefore, the present study aimed at the characterization of a topotype of *Mazama sarae* and of a topotype of *Mazama chunyi*, under morphological aspects (body biometrics, skin color patterns, craniometry), cytogenetic (Giemsa conventional coloration, chromosomal biometry, C banding, G banding, Ag-NOR coloration) and molecular (phylogenetic analyses of the mitochondrial genome, in the case of *M. sarae*, and of 3 mitochondrial genes for *M. chunyi*). The morphological results position both species in the clade of the small *Mazama* (*M. temama*, *M. nana*, *M. nemorivaga* e *M. gouazoubira*). According to cytogenetic patterns, both species' topotypes do not fit any variant of the *Mazama* species known until now. The phylogenetic trees generated for the topotype of *M. sarae*, allow us to evidence the species within the subtribe Odocoileina, showing a considerable distance from *M. americana* and the rest of the species subtribe. In this way, *M. chunyi* topotype is positioned within subtribe Blastocerina, close to the monophyletic haplogroup formed by specimens of *M. gouazoubira*. Thus, we propose the characterization of a topotype for each species studied, which is the starting point for the description of new species and possible complete change in the nomenclature of the genus *Mazama*.

Keywords: chromosomes, DNA, mitochondrial genome, taxonomic uncertainties, topotype, deer.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais.....	1
Figura 1. Registros e avistamentos de <i>Mazama chunyi</i> na Bolívia. Fonte: Rumiz et al. (2007)	9
Figura 2. Registros de <i>M. chunyi</i> , em áreas protegida na Bolívia com base em 25 localidades; incluindo 61 registros múltiplos. Fonte: Rumiz et al. (2007)	10
Figura 3. Aspecto dorsal e ventral dos crânios de A) <i>M. whitelyi</i> (Cuzco, Peru), B) <i>M. chunyi</i> (Tipo, Cocapunco-Bolívia), C) <i>M. chunyi</i> (San Juan, Peru). Fonte: Herskovitz (1959)	11
Figura 4. Figura 4. Vista lateral do crânio e a mandíbula esquerda de: A) <i>M. chunyi</i> (Tipo, Cocapunco-Bolívia), B) <i>M. chunyi</i> (San Juan, Peru), C) <i>Pudu mephistophiles</i> (Cauca, Colombia), D) <i>Pudu puda</i> (Chiloé Island, Chile). Fonte: Herskovitz (1959)	12
Figura 5. Dentes anteriores inferiores de: A) <i>P. mephistophiles</i> (Cauca, Colombia), B) <i>M. chunyi</i> (Tipo, Cocapunco-Bolívia). Fonte: Herskovitz (1959)	12
Figura 6. Árvore filogenética de sequências de Citocromo b da tribo Odocoileini, subtribo Blastocerina resultado de inferência bayesiana. Fonte: Heckeberg et al. (2016).....	15
Figura 7. Árvore filogenética de sequências de Citocromo b da tribo Odocoileini, subtribo Blastocerina resultado de inferência bayesiana. Fonte: Gutiérrez et al. (2017)	16
CAPÍTULO 2 - Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de <i>Mazama sarae</i>.....	22
Figura 1. Distribuição geográfica do <i>Mazama americana</i> na América do Sul. Fonte: Varela et al. (2010).....	23

Figura 2.	Corzuela Colorada (<i>Mazama sarae</i>). Foto: Alec Earnshaw.....	24
Figura 3.	Mapa da Bolívia com o ponto de coleta do topótipo de <i>M. sarae</i> utilizado no estudo	26
Figura 4.	Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vista dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C) (Rees, 1969; Driesch, 1976).....	30
Figura 5.	Mitogenoma recuperado para o topótipo de <i>M. sarae</i>	36
Figura 6.	(A) Vista lateral do topótipo de <i>M. sarae</i> , (B) Detalhes da vista lateral da cabeça.....	39
Figura 7.	(A) Vista dorsal anterior e posterior do topótipo de <i>M. sarae</i> , (B) Detalhes da vista dorsal anterior	40
Figura 8.	(A) Vista ventral anterior do topótipo de <i>M. sarae</i> , (B) Vista ventral posterior	41
Figura 9.	Pele aberta taxidermizada do topótipo de <i>M. sarae</i>	42
Figura 10.	Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D) do crânio do topótipo de <i>M. sarae</i>	43
Figura 11.	Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas corporais de indivíduos de <i>Mazama</i> provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de <i>M. sarae</i> analisado neste estudo. Bootstrap 1000	45
Figura 12.	Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 12 medidas corporais tomadas do topótipo de <i>M. sarae</i> , e de outras espécies do gênero <i>Mazama</i>	47
Figura 13.	Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas cranianas de indivíduos de <i>Mazama</i> provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de <i>M. sarae</i> analisado neste estudo. Bootstrap 1000	48

Figura 14. Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 36 medidas cranianas tomadas do topótipo de <i>M. sarae</i> e de outras espécies do gênero <i>Mazama</i>	49
Figura 15. Cariótipo do topótipo macho de <i>M. sarae</i> T411 sob coloração convencional de Giemsa.....	50
Figura 16. Cariótipo do topótipo macho de <i>M. sarae</i> T411 sob Bandamento C	51
Figura 17. Cariótipo do topótipo macho de <i>M. sarae</i> T 411 sob coloração Ag-NOR com dois regiões organizadoras de nucléolo	52
Figura 18. Cariótipo do topótipo macho de <i>M. sarae</i> T 411 sob coloração Ag-NOR com dois regiões organizadoras de nucléolo	53
Figura 19. Cariótipos do topótipo macho de <i>M. sarae</i> T 411 (A e B) sob Bandamento G	54
Figura 20. Árvore filogenética do genoma mitocondrial. Análise de Inferência Bayesiana (IB).....	56
Figura 21. Árvore filogenética do genoma mitocondrial. Análise de Máxima Verossimilhança (MV)	57
 CAPÍTULO 3 - Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de	
<i>Mazama chunyi</i>	65
Figura 1. Chuñi (<i>Mazama chunyi</i>). Foto: Carlos Gussoni – Inaturalist.....	66
Figura 2. Faixa estimada de <i>Mazama chunyi</i> e populações atualmente conhecidas no Peru e na Bolívia. Fonte: Rumiz et al. (2007).....	67
Figura 3. Mapa da Bolívia com o ponto de coleta do topótipo de <i>M. chunyi</i> (Topótipo-La Paz) utilizado no estudo	68
Figura 4. Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vista dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C) (Rees, 1969; Driesch, 1976).....	74
Figura 5. (A) Vista lateral do topótipo de <i>M. chunyi</i> , (B) Detalhes da vista lateral da cabeça.....	83

Figura 6.	(A) Vista dorsal anterior e posterior do topótipo de <i>M. chunyi</i> , (B) Detalhes da vista dorsal anterior	84
Figura 7.	(A) Vista ventral anterior do topótipo de <i>M. chunyi</i> , (B) Vista ventral posterior	85
Figura 8.	Pele aberta taxidermizada do topótipo de <i>M. chunyi</i>	86
Figura 9.	Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D) do crânio do topótipo de <i>M. chunyi</i>	87
Figura 10.	Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas corporais de indivíduos de <i>Mazama</i> provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de <i>M. chunyi</i> analisado neste estudo. Bootstrap 1000	89
Figura 11.	Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 12 medidas biométricas corporais tomadas do topótipo de <i>M. chunyi</i> , e de outras espécies do gênero <i>Mazama</i>	90
Figura 12.	Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas cranianas de indivíduos de <i>Mazama</i> provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de <i>M. chunyi</i> analisado neste estudo. Bootstrap 1000	91
Figura 13.	Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 36 medidas craneanas tomadas do topótipo de <i>M. chunyi</i> , e de outras espécies do gênero <i>Mazama</i>	92
Figura 14.	Cariótipo de um topótipo fêmea de <i>M. chunyi</i> T427 sob coloração convencional de Giemsa	93
Figura 15.	Cariótipo de um topótipo fêmea de <i>M. chunyi</i> T427 sob Bandamento C.....	94
Figura 16.	Cariótipo de um topótipo fêmea de <i>chunyi</i> T 427 sob coloração Ag-NOR com dois regiões organizadoras de nucléolo	95

Figura 17.	Árvore filogenética do gene CIT-B. Análise de Inferência Bayesiana (IB)	97
Figura 18.	Árvore filogenética do gene CIT-B. Análise de Máxima Verossimilhança (MV)	98
Figura 19.	Árvore filogenética da análise concatenada de três genes mitocondriais (CIT-B+D-LOOP+ND5). Análise de Inferência Bayesiana (IB).....	99
Figura 20.	Árvore filogenética da análise concatenada de três genes mitocondriais (CIT-B+D-LOOP+ND5). Análise de Máxima Verossimilhança (MV) .	100

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2 - Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de <i>Mazama sarae</i>.....	22
Tabela 1. Relação de animais do NUPECCE e do GenBank (Mitogenomas) utilizados para as análises filogenéticas de <i>M. sarae</i>	29
Tabela 2. Biometria corporal do topótipo de <i>M. sarae</i> (em cm, massa em kg)	43
Tabela 3. Medidas cranianas do topótipo de <i>M. sarae</i> representadas em milímetros (mm) de acordo com Rees (1969); Driesch (1976)	44
CAPÍTULO 3 - Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de <i>Mazama chunyi</i>.....	65
Tabela 1. Relação de animais do NUPECCE e do GenBank utilizados para as análises filogenéticas de <i>M. chunyi</i>	72
Tabela 2. Genes mitocondriais amplificados e os iniciadores (primers) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento	79
Tabela 3. Biometria corporal do topótipo de <i>M. chunyi</i> (em cm, massa em kg).....	86
Tabela 4. Medidas cranianas do topótipo de <i>M. chunyi</i> representadas em milímetros (mm) de acordo com Rees (1969); Driesch (1976)	87

CAPÍTULO 1 - Considerações gerais

INTRODUÇÃO

Entre os cervídeos neotropicais, o gênero *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 pequeno a 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, 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).

Esta diversidade se estende em nível cromossômico, tendo sido identificados cariótipos muito diferentes entre as espécies estudadas, que vão desde $2n=32$ até $2n=70$, muitos deles com diversas variantes e sendo frequentes os polimorfismos cromossômicos (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990; Duarte e Jorge, 2003; Abril e Duarte 2008; Abril et al., 2010). Ademais, algumas espécies (e. g. *Mazama americana* e *Mazama nemorivaga*) possuem sistema sexual múltiplo, em que são observados três cromossomos sexuais (X, Y1, Y2) nos machos (Abril et al., 2010; Fiorillo et al., 2013). Também são observadas variabilidade cromossômica intra-específica entre populações, como ocorre no complexo *M. americana* ($2n=42/43-52/53$ e $NF=46-56$) (Abril et al., 2010). Para este grupo de cervídeos, o estudo dos cromossomos pode ser uma ferramenta importante para a taxonomia, uma vez que a variação cariotípica intra-específica tem um limite imposto pela estabilidade meiótica na produção dos gametas. Dependendo da diferença numérica e estrutural entre os cromossomos de dois indivíduos, o seu descendente será infértil. Seguindo o conceito biológico de espécie, se o descendente de um cruzamento é infértil, os pais deveriam ser considerados como espécies distintas, uma vez que existiria entre eles uma eficiente barreira reprodutiva (Abril et al., 2010; Cursino et al., 2014).

As espécies do gênero apresentam similaridades fenotípicas, tornando sua discriminação quase impossível. Entretanto, os membros do gênero dividem-se em dois grupos com base na coloração da pelagem: os veados vermelhos (*M. americana*, *M. nana*, *M. bororo*, *M. temama*, *M. rufina*, *M. bricenii*) e os veados marrons ou cinzas (*M. gouazoubira*, *M. pandora*, *M. chunyi* e *M. nemorivaga*) (Duarte, 2008; Duarte e Gonzales, 2010).

Na Bolívia, até o momento, foram descritas duas formas do gênero *Mazama*. A primeira delas é *M. sarae* Thomas, 1925; uma forma de veado vermelho descrito na região sul da Bolívia (Tarija). Atualmente é considerado sinônimo de *M. americana* Erxleben, 1777 (Varela et al., 2010), com base nas características morfológicas daquele único exemplar descrito por Thomas (1925), sem nenhum tipo de abordagem genética. A segunda é *M. chunyi* Hershkovitz, 1959; uma forma de veado marrom de tamanho pequeno, que habita gradientes altitudinais de Puna-Yungas (La Paz e Cochabamba) (Pardo, 2001; Rumiz, 2002), no noroeste da Bolívia. Apesar de ser aceita como espécie única, as análises moleculares tem sido escassas e ainda não foi descrita cromossomicamente.

Por essas razões, o presente estudo busca agrupar tanto dados morfológicos, quanto genéticos a partir da coleta, na Bolívia, dos topótipos de *M. sarae* e *M. chunyi*, no sentido de caracterizar um topótipo para cada espécie a partir de uma visão integrativa, permitindo compará-las com os diversos padrões já descritos na literatura. Os resultados poderão ajudar na validação taxonômica destas espécies e permitirá avaliar o seu status populacional, bem como estabelecer planos de conservação. Além disso, contribuirá com a ciência e a análise integrativa realizada pelo Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) para resolução taxonômica do gênero *Mazama* na América latina, partindo da geração de novos holótipos (topótipos) e realizando uma abordagem cronológica de todos os nomes descritos na literatura.

REVISÃO DE LITERATURA

1. Família Cervidae

A família Cervidae faz parte da ordem Cetartiodactyla, e dentre as 22 famílias da ordem, Cervidae é a segunda mais diversa, com 55 espécies e 18 gêneros, atrás apenas de Bovidae (Hassanin et al., 2012; Zurano et al., 2019). 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 Higgins, 1994; Montgelard et al., 1997). A fusão das duas ordens em Cetartiodactyla já é amplamente aceita (Hassanin et al., 2012; Zurano et al., 2019).

Cerca de 17 espécies de cervídeos habitam o Neotrópico e se dividem em duas formas morfológicas, as espécies de pequeno a médio porte representadas pelos gêneros *Mazama* e *Pudu*, as quais apresentam adaptações morfológicas para se desenvolver na floresta fechada, e as espécies de grande porte representadas pelos gêneros *Blastocerus*, *Hippocamelus*, *Odocoileus* e *Ozotoceros*, que são espécies de corpo maior, chifres ramificados e geralmente habitam áreas abertas (Duarte et al., 2008).

O gênero *Mazama* Rafinesque, 1817 agrupa cervídeos de pequeno a médio porte (10-65 kg), com chifres simples e não ramificados. Com uma ampla distribuição geográfica, os representantes deste grupo ocorrem desde o nordeste mexicano até a região central da Argentina, ocupando uma variedade de habitats entre florestas montanhosas, florestas tropicais chuvosas, florestas tropicais secas e savanas arbóreas e se adaptando a diferentes condições, desde o nível do mar até 4000m de altitude (Eisenberg, 1987; Allen, 1915).

A definição taxonômica do gênero *Mazama* com base na morfologia externa tem gerado muita controvérsia, devido à alta diversidade cariotípica inter e intra-específica, origem polifilética e convergência morfológica (Duarte et al., 2008), sendo que o número de espécies descritas em diferentes revisões varia entre quatro e dezoito (Cabrera, 1960; Allen, 1915). Assim, métodos mais avançados, como a

citogenética e genética molecular, tem auxiliado na resolução das incertezas taxonômicas do gênero (Duarte e González, 2010; Heckeberg et al., 2016).

A descrição das espécies de *Mazama* foi baseada em detalhes da morfologia externa (Allen, 1915; Miranda-Ribeiro, 1919), gerando 42 táxons nominais em toda sua distribuição, dos quais somente 10 são reconhecidas atualmente como espécies: *Mazama americana* Erxleben, 1777; *M. temama* Kerr, 1792; *M. rufina* Pucheran, 1851; *M. nana* Hensel, 1872; *M. bricenii* Thomas, 1908; *M. bororo* Duarte, 1996; *M. gouazoubira* Fisher, 1814; *M. nemorivaga* Cuvier, 1817; *M. pandora* Merriam, 1901; *M. chunyi* Hershkovitz, 1959 (Duarte e Gonzales, 2010). 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* Pucheran, 1851, por Gutiérrez et al. (2015), mantêm-se 10 espécies do gênero *Mazama* na região Neotropical.

O gênero *Mazama*, apresenta a maior diversidade dentro dos gêneros da família Cervidae no Neotrópico (Duarte e Merino, 1997) e tem como espécie tipo *Mazama americana*, popularmente conhecida como veado-mateiro, considerada a maior espécie do gênero, pesando entre 30 a 40 Kg, altura entre 58 a 80 centímetros e comprimento de 90 a 145 centímetros (Duarte, 1996). As primeiras descrições de *M. americana* foram baseadas apenas em aspectos morfológicos (Erxleben, 1777). A taxonomia de *M. americana* é incerta quanto ao número de subespécies e até mesmo quanto ao desdobramento destas subespécies em espécies (Vogliotti, 2004; Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010), uma vez que exhibe extensa variação cariotípica de acordo com a sua procedência geográfica, apesar da pequena variação morfológica (Rossi, 2000; Duarte et al., 2008; Abril et al., 2010; Cursino et al., 2014).

Dentro de *Mazama americana* é sugerida a existência de novas espécies, já que além das diferenças moleculares (Duarte et al., 2008; Carnelossi, 2008) e citogenéticas (Duarte, 1998; Abril et al., 2010), existem evidências de isolamento reprodutivo pós-zigótico entre populações de veado-mateiro (Cursino et al., 2014; Salviano et al., 2017). A variação cariotípica de *M. americana* e do gênero *Mazama* em geral, pode ser explicada, segundo Duarte e Jorge (1996) e Vargas-Munar (2010), pela teoria da fragilidade cromossômica, a qual indica que os cromossomos do gênero *Mazama* apresentam mais instabilidade do que outras espécies da família Cervidae.

Estudos citogenéticos revelam variações cromossômicas (citótipos), que sugerem sua divisão em várias espécies dentro de *M. americana*, podendo caracterizar uma superespécie. A descrição citogenética de 33 animais de várias localidades do Brasil feita por Duarte (1998) mostrou variação do número diplóide ($2n=42$ a 53) e do número fundamental de braços ($NF=48$ a 57), além da variação de cromossomos B. 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; $2n=44/45$; $NF=48$). 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).

Recentemente 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 cariótipo com $2n=45$ e $NF=50$. Assim, Rincón e colaboradores (2020) concluíram que a diferença cromossômica observada indicaria que nenhuma variante com ocorrência no Brasil corresponde à *M. americana* (sensu strictu), sendo necessária uma revisão de seu estado taxonômico.

Onze subespécies de *Mazama americana* foram reconhecidas por Grubb (2005), de acordo com a ordem cronológica e sua localidade tipo:

M. a. rufa Illiger, 1811: Margens do Rio Paraná, Paraguai = *M. rufa* (Luduvério, 2018)

M. a. whitelyi Gray, 1873: Vale de Cosnipata, Perú

M. a. zetta Thomas, 1913: Antioquia, Colombia

M. a. Sheila Thomas, 1913: Mérida, Venezuela

M. a. jucunda Thomas, 1913: Serra do Mar, Paraná, sul do Brasil = Sinônimo de *M. bororo* (Duarte, 1996)

M. a. gualea Allen, 1915: Gualea, Equador

M. a. trinitatis Allen, 1915: Caparo, Trinidad

M. a. zamora Allen, 1915: Zamora, sudeste do Equador

M. a. rosii Lönnberg, 1919: Chaco central, norte da Argentina

M. a. sarae Thomas, 1925: Carapari, sul da Bolívia

M. a. carrikeri Hershkovitz, 1959: Santa Marta, norte da Colômbia.

Reconhecem-se provisoriamente como sinonímias de *M. americana* (Varela et al., 2010), excetuando *M. rufa* (Luduvério, 2018) e *M. a. jucunda* Thomas, 1913 que tem como sinônimo a *M. bororo* (Duarte, 1996).

2. *Mazama sarae* Thomas, 1925

O huaso ou corzuela colorada são os nomes usados localmente para identificar a espécie *M. sarae* que representa o *Mazama* vermelho da região sul da Bolívia e Norte da Argentina. A primeira e única referência na literatura foi de Thomas (1925), que descreveu morfológicamente uma fêmea adulta a quem considerou como *M. sarae* na localidade tipo: Carapari, altitude de 1000 metros, departamento de Tarija, extremo sul da Bolívia, fronteira com o norte da Argentina. O holótipo (pele e crânio) encontra-se atualmente no Museu de História Natural de Londres.

A seguir a tradução da descrição original de Thomas (1925):

“Espécie vermelha de cabelos desganhados do grupo rufa, com a cabeça e o pescoço contrastando fortemente com a cor dos cervos, não ruiva. Tamanho aproximadamente como no rufa. Pêlo denso, mais comprido do que em outros membros do grupo. Pêlos de nuca invertidos ao longo das linhas médias. Cor geral do corpo rica em avermelhada, mas a cabeça e o pescoço são de um cinza escuro semelhante a *Odocoileus*, contrastando com a cor do corpo, bem diferente da edição mais pálida ou marrom do corpo vermelho encontrado nas outras espécies. Parte superior do focinho enegrecida, com uma mancha branca no lábio superior. Testa, entre os olhos e uma pequena faixa abaixo de cada olho pálida e ruiva. Orelhas grandes e o resto da cabeça

e pescoço inteiro cinza escuro. Todo o corpo ruivo, não ficando marrom nos quadris ou membros inferiores, região inguinal esbranquiçada. Cauda curta, seus pelos se misturam ruivos e brancos. Infelizmente, o crânio do tipo com o focinho quebrado; seu tamanho e forma geral aproximadamente como no tipo de *M. sheila*; fossas suborbitais rasas; comprimento médio da linha dentária entre os de *M. rufa toba* e *M. r. rosii* de Lönnberg. As Dimensões do tipo: Cabeça e corpo 1020 mm; cauda 99 mm; orelha 105 mm. Crânio: largura zigomática 83 mm; largura da caixa cerebral 58 mm”.

Posteriormente, Cabrera (1960) citou *M. sarae* como subespécie de *M. americana* de Erxleben (Varela et al., 2010) e mais tarde baseado em Grubb (2005) considera-se *M. sarae* como sinônimo de *M. americana* de Erxleben (Varela et al., 2010). Portanto, seu posicionamento taxonômico é ainda incerto.

3. *Mazama chunyi* Hershkovitz, 1959

O Chuñi, Chuñi taruka, cabrito ou venadito andino, são os nomes usados localmente para identificar a espécie *M. chunyi* no sudeste do Peru e noroeste da Bolívia. É o menor cervídeo conhecido na Bolívia, sendo que os adultos medem cerca de 70 cm de comprimento total (cabeça-corpo), com 50 cm de altura na cernelha e pesam aproximadamente 11 kg. Sua pele é marrom com lados avermelhados e os machos apresentam chifres simples (Rumiz et al., 2007). Ele é solitário e vive em florestas úmidas de yungas e florestas subandinas (1000-3600 m) em La Paz e Cochabamba, e possivelmente, no extremo oeste de Santa Cruz (Rumiz e Barrio, 2016).

Hershkovitz (1959) descreveu o holótipo de *Mazama chunyi* na Localidade Tipo: Cocapunco, na encosta oriental da Cordilheira Real no caminho para Mapiri, La Paz, Bolívia; altitude de 3200 metros. Em 28 de março de 1926, foram coltados pele e crânio completos deste espécime tipo (macho juvenil) que atualmente encontram-se depositados no Museu Americano de História Natural dos Estados Unidos. O espécime foi diagnosticado como pertencente ao grupo das espécies menores de *Mazama*. Foi feita uma descrição morfológica do espécime.

A seguir a tradução da descrição original de Hershkovitz (1959):

“O holótipo, um macho juvenil com os segundos molares superiores não completamente no lugar e sem traços de pedículos de chifre, pele e crânio em bom estado. Cor geral de cabeça e corpo canela marrom a castanho-avermelhado, abdômen branco; cauda curta, cascos dianteiros e traseiros longos e delgados. Chifres como de costume no gênero, semelhantes a espinhos, curto, voltado para a linha do plano dorsal da testa”.

Segundo Hershkovitz; “Existe uma diferença de cor entre o holótipo pálido da zona temperada dos Andes na Bolívia e os indivíduos mais escuros da zona subtropical do mesmo declive dos Andes no Peru. *M. chunyi* diferencia-se do cervídeo bem maior, *M. americana*, a única congênera simpátrica, pela ausência da direção invertida do crescimento de pêlos na nuca, ausência de estrias supraorbitais e pela cauda muito mais curta. *M. gouazoubira*, ainda é maior do que *M. chunyi*, mais pálida por toda parte, com cauda muito mais longa, faixa supraorbitária presente e cascos mais largos. *M. rufina*, descrita dos Andes do Equador, mas não conhecida no Peru e na Bolívia, difere do *M. chunyi* por sua cor corporal vermelha ou negra avermelhada. Seu tamanho foi menor do que outras espécies de veados machos potencialmente simpátricos, e os crânios mostraram diferenças morfológicas.”

Novas amostras e fotografias tomadas por armadilhas fotográficas na Bolívia (Yensen et al., 1994; Rumiz et al., 2007), e novos espécimes e fotografias do Peru, fornecem evidências de que a forma dos Andes do sul é o mesmo que *M. chunyi*, originalmente descrito por Hershkovitz (1959). Registros publicados de *M. chunyi* na Bolívia, consiste em dois espécimes coletados; em Cocapunco (Hershkovitz, 1959) e em Unduavi (Yensen et al., 1994), e sinais ou avistamentos na área protegida Cotapata (Ríos-Uzeda et al., 2001; Pacheco et al., 2003) no departamento de La Paz. No estudo de Rumiz et al., (2007) foram realizadas descrições morfológicas de alguns indivíduos de *M. chunyi* com base em avistamentos e fotografias de animais vivos fotografados nas áreas protegidas de Carrasco, Apolobamba e Madidi (La Paz e Cochabamba) (Figura 1), além de incluir registros da espécie em vários sítios novos, com base em 61 pontos (25 localidades), a extensão estimada da ocorrência abrange uma faixa dos Andes bolivianos de La Paz a Cochabamba, e uma gama de distribuição modelada identifica potenciais blocos de habitat no meio de áreas protegidas já

conhecidas e no Parque Amboró no departamento de Santa Cruz (Figura 2) (Rumiz et al., 2007).

Atualmente, não encontra-se razão para acreditar que esses novos espécimes sejam diferentes dos anteriormente descritos de *M. chunyi* (Herskovitz, 1959, 1982). No entanto, análises genéticas, bem como comparações morfológicas mais profundas são necessárias para confirmar o status taxonômico desta forma.



Figura 1. Registros e avistamentos de *M. chunyi* na Bolívia: A) Macho juvenil, Sehuencas (G. Cordova), B) Fêmea adulta, San Jacinto (C. Azurduy), C) Fêmea adulta, El Limbo (E. Pardo/WCS), D) Fêmea adulta, Sehuencas (E. Pardo/WCS). Fonte: Rumiz et al. (2007).

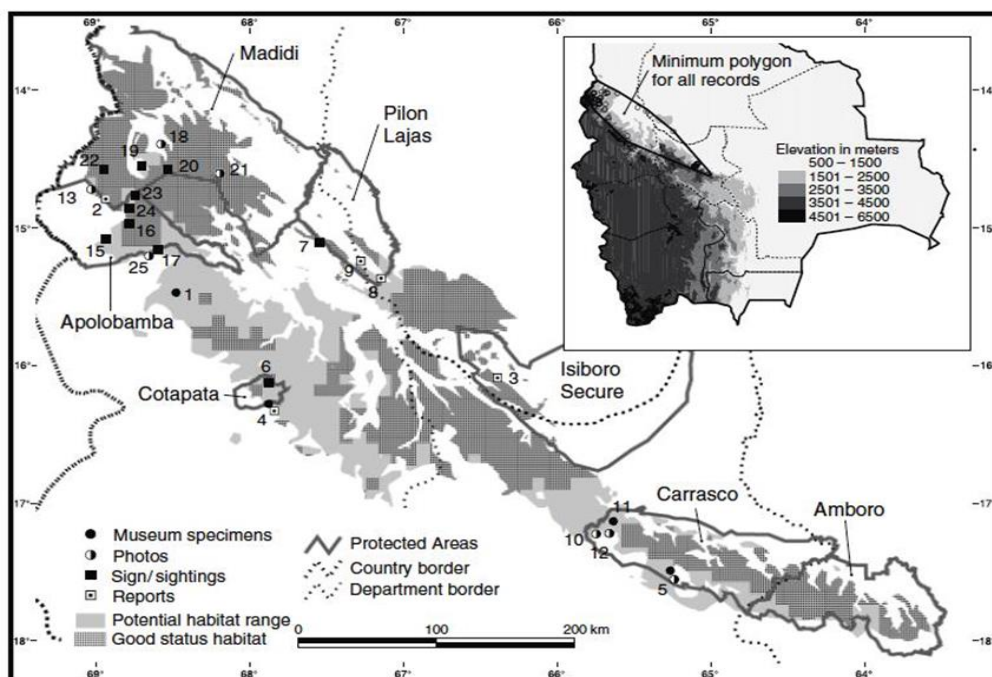


Figura 2. Registros de *Mazama chunyi*, em áreas protegida na Bolívia com base em 25 localidades; incluindo 61 registros múltiplos. Fonte: Rumiz et al. (2007).

3.1 Morfologia tradicional de *Mazama chunyi*

Herskovitz (1959), realizou a primeira descrição morfológica do holotipo de *M. chunyi*.

A seguir a tradução da descrição original do Hershkovitz (1959), sobre a comparação dos crânios, das mandíbulas e da dentadura do holótipo de *M. chunyi* da Bolívia e outros espécimes de veados andinos de diferentes países:

“Nasais na linha média mais curtos que os frontais na linha média; diastema mais curto que o comprimento alveolar dos dentes da arcada dentária superior; fossa anteorbital rasa ou em forma de disco, sem fenestrações; porção superior do ramo ascendente de premaxilar atingindo pontas laterais de nasais; longo eixo de vacuidade anteorbital oblíquo; área de vacuidade menos da metade da placa facial do lacrimal; maior largura supra-orbital menos do que a largura da caixa craniana” (Figura 3).

“A glândula pré-orbital em *M. chunyi* é pequena, a fossa pré-orbital pouco profunda, como em *Pudu mephistophiles*, enquanto em *Pudu puda* a glândula é grande, a fossa profunda ou em forma de tigela” (Figura 4 A-D).

“*M. chunyi* difere de *P. mephistophiles* na forma do primeiro incisivo anterior inferior, que é amplamente espatulado, com maior largura mais do que a largura combinada do segundo e terceiro incisivos” (Figura 5).

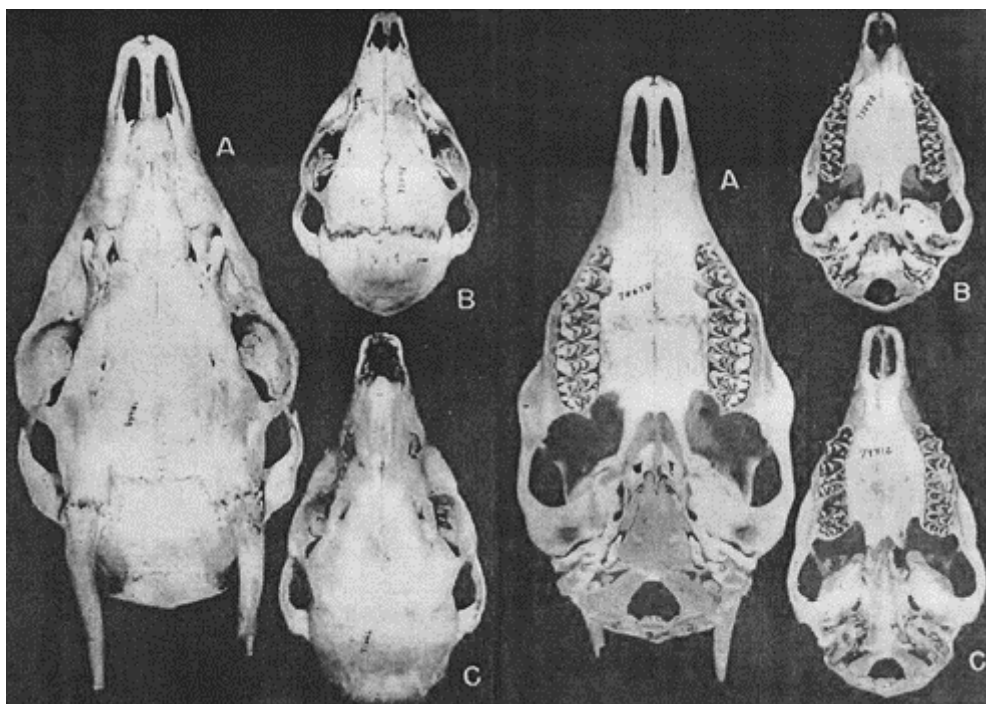


Figura 3. Aspecto dorsal e ventral dos crânios de A) *M. americana whitelyi* (Cuzco, Peru), B) *M. chunyi* (Tipo, Cocapunco-Bolívia), C) *M. chunyi* (San Juan, Peru). Fonte: Hershkovitz (1959).

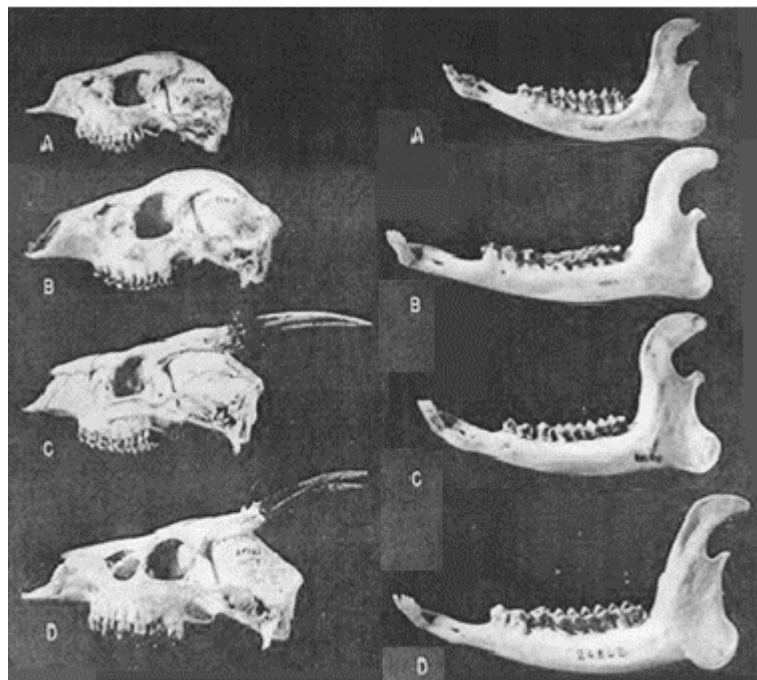


Figura 4. Vista lateral do crânio e a mandíbula esquerda de: A) *M. chunyi* (Tipo, Cocapunco-Bolívia), B) *M. chunyi* (San Juan, Peru), C) *Pudu mephistophiles* (Cauca, Colombia), D) *Pudu puda* (Chiloé Island, Chile). Fonte: Hershkovitz (1959).

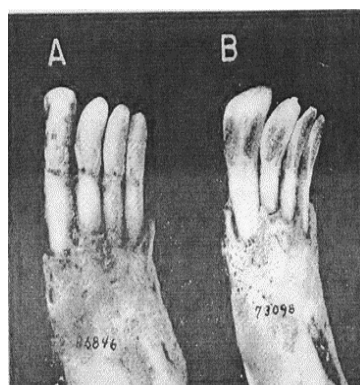


Figura 5. Dentes incisivos anteriores inferiores de: A) *Pudu mephistophiles* (Cauca, Colombia), B) *M. chunyi* (Tipo, Cocapunco-Bolívia). Fonte: Hershkovitz (1959).

Segundo Hershkovitz (1959), os caracteres externos, osteológicos e dentários de *Mazama chunyi* utilizados nas comparações acima referidas com as duas espécies conhecidas de *Pudu*, servem para distinguir os *Mazama* de *Pudu*. O material representando o *Mazama chunyi* é fragmentado, mas cada parte, seja pele, crânio ou ossos, é identificável como representando uma espécie extremamente pequena de *Mazama*.

4. Citogenética de *Mazama sarae* e *Mazama chunyi*

A citogenética tem sido indicada como importante ferramenta no estudo taxonômico da família Cervidae. 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 tribo Odocoileini se caracteriza pela ampla diversidade cariotípica, que varia de $2n=32$ e $NF=46$ em *M. bororo* até $2n=70$ e $NF=74$ em *Odocoileus virginianus*, *O. hemionus*, *Pudu puda* e *Hippocamelus bisulcus* (Neitzel, 1987; Fontana e Rubini, 1990; Duarte e Jorge, 2003; Abril e Duarte, 2008; Abril et al., 2010).

A grande variabilidade cariotípica entre as espécies do gênero *Mazama* tem gerado muita confusão no seu estudo. O padrão cariotípico das espécies do gênero é considerado o mais complexo dentro da família Cervidae (Fontana e Rubini, 1990). Os primeiros estudos publicados já mostraram uma enorme variação do número diploide, e as fusões cromossômicas foram consideradas como um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica que contribuem para o isolamento reprodutivo, com rápido processo de especiação (Chandra et al., 1967; Gustavsson e Sundt, 1969; Taylor et al., 1969; Jorge e Benirschke, 1977; Neitzel, 1987; Garagna et al., 2001).

Contudo, ainda surgem muitas perguntas acerca das diferenças nas taxas de evolução cromossômica entre os distintos gêneros e espécies, e do verdadeiro cariótipo ancestral do grupo. No caso de *M. sarae* e *M. chunyi*, não existem estudos citogenéticos, sendo esta a principal justificativa para a coleta de topótipos atuais, necessários para uma caracterização e descrição taxonômica completa de cada espécie.

5. Estudos de sequências do mtDNA de *Mazama sarae* e *Mazama chunyi*

As espécies de *Mazama* formam um grupo polifilético, evidenciado nas reconstruções filogenéticas do DNA mitocondrial (mt DNA) feitas por Hassanin et al. (2012). O estudo das relações filogenéticas dos cervídeos neotropicais, por meio de análises filogenéticas do CIT-B, tem demonstrado que as características morfológicas do gênero *Mazama* não são elementos diagnósticos do grupo, mas poderiam ser

resultantes de convergência evolutiva ou da presença em muitos dos cervídeos de plesiomorfias inerentes ao ancestral comum (Duarte et al., 2008; Hassanin et al., 2012; Heckeberg et al., 2016; Escobedo-Morales et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017).

Até o presente, não foram realizados estudos moleculares para esclarecer a identidade de *M. sarae* e as suas relações filogenéticas com as outras espécies do gênero.

No caso de *M. chunyi* alguns estudos moleculares têm sido feitos. A espécie foi incorporada apenas duas vezes nas avaliações filogenéticas (Heckeberg et al., 2016 e Gutiérrez et al., 2017) e, em cada caso, com base em uma única sequência de citocromo b, CIT-B (obtida de diferentes amostras de espécimes depositados nos Museus do Peru). No estudo de Heckeberg et al., (2016) os resultados do sequenciamento de *M. chunyi* mostram uma relação de táxon irmão com *M. gouazoubira* na subtribo Blastocerina em todas as suas topologias (Figura 6). Em Gutiérrez et al., (2017) *M. chunyi* foi encontrado novamente como táxon irmão de *M. gouazoubira* (Figura 7), que foi recuperado em um haplogrupo monofilético (com suporte forte e moderado nas análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança, respectivamente).

Assim, Gutiérrez et al., (2017) concluíram que, apesar de limitadas a poucos dados, as análises moleculares sugerem que *M. chunyi* e *M. gouazoubira* representem espécies irmãs; um membro é restrito a habitats montanhosos dos Andes boliviano e peruano (*M. chunyi*) e o outro é amplamente distribuído em habitats de terras baixas da América do Sul (*M. gouazoubira*). Se esse resultado for corroborado, ambas as espécies devem ser atribuídas a um gênero diferente de *Mazama*. Mesmo que análises posteriores não confirmem sua relação de espécies irmãs, ambas as espécies precisam ser transferidas para um gênero que não seja *Mazama*, porque compartilham um ancestral comum mais recente com membros da subtribo Blastocerina e não com o tipo de espécie de *Mazama*, que pertence na subtribo Odocoileina. 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 dessas indicações (Gutiérrez et al., 2017).

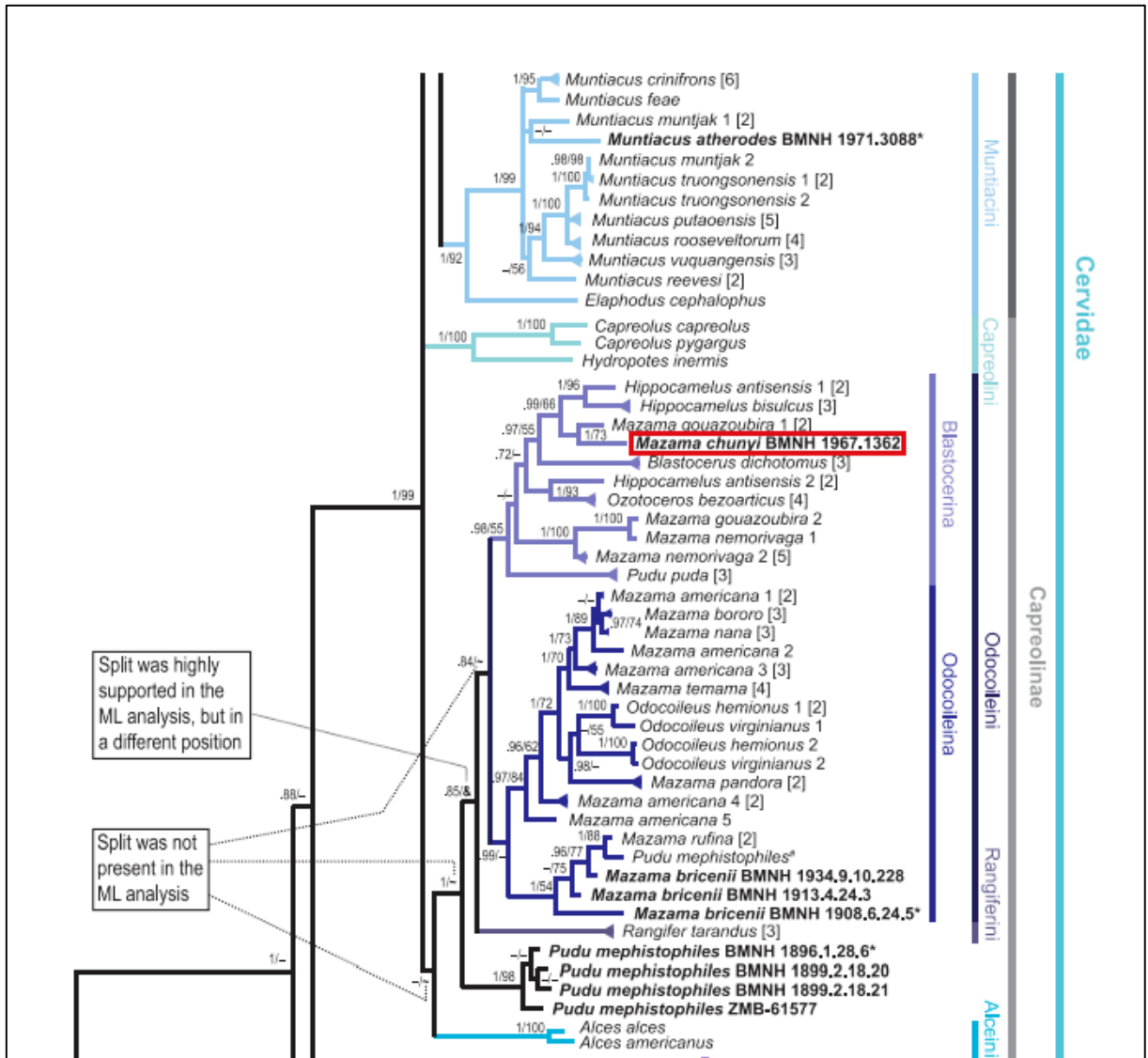


Figura 6. Árvore filogenética de seqüências de Citocromo b (CIT-B) da tribo Odocoileini, subtribo Blastocerina resultado de Inferência Bayesiana. Fonte: Heckeberg et al. (2016).

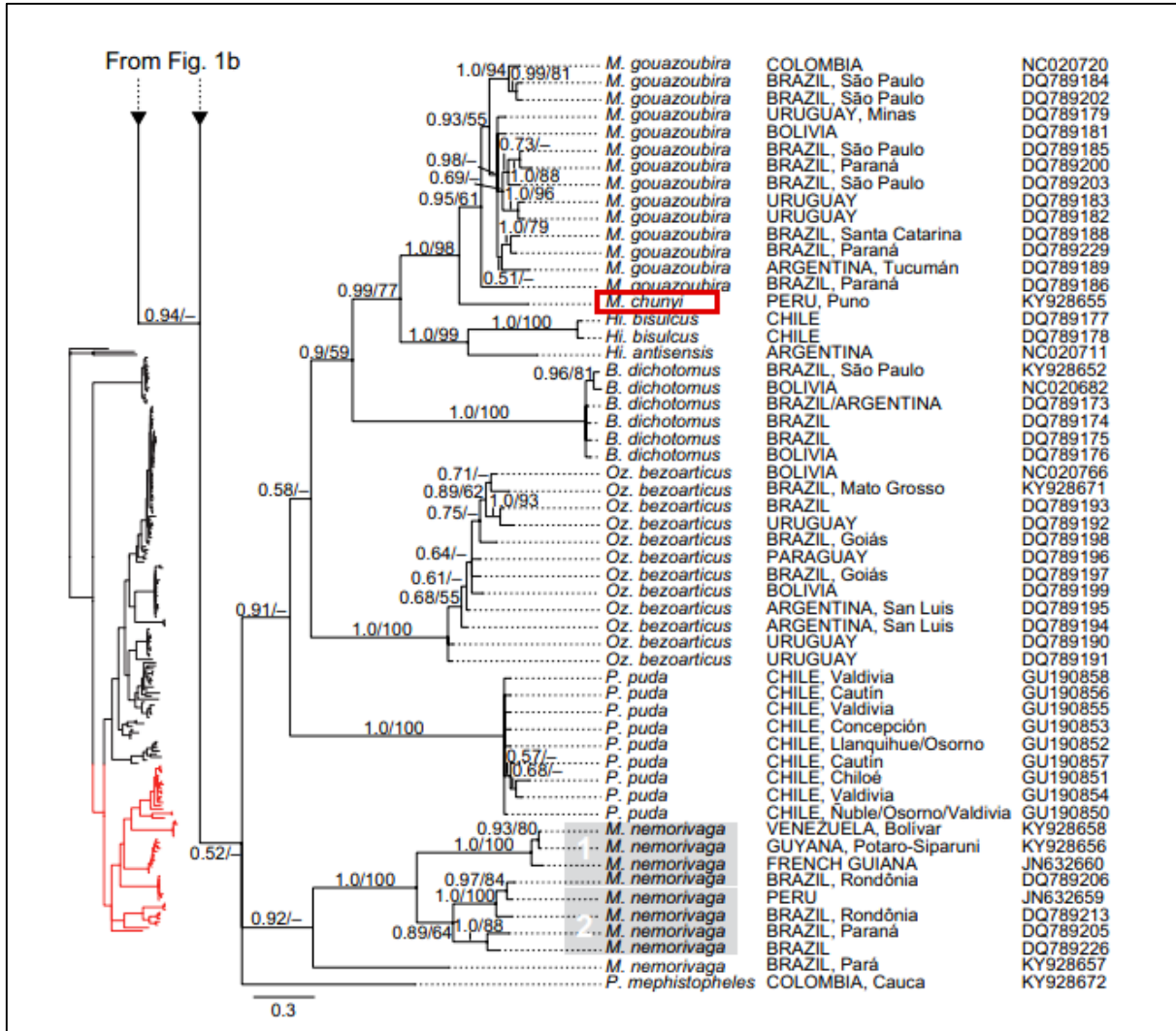


Figura 7. Árvore filogenética de seqüências de Citocromo b (CIT-B) da tribo Odoceoileini, subtribo Blastocerina resultado de Inferência Bayesiana. Fonte: Gutiérrez et al. (2017).

Assim, é necessário conhecer a verdadeira identidade taxonômica de *M. sarae* Thomas, 1925 e *M. chunyi* Hershkovitz, 1959, descritas originalmente na Bolívia, utilizando para isso tanto características morfológicas quanto citogenéticas e moleculares, além de comparar com outros espécimes do gênero *Mazama*.

REFERÊNCIAS

- ABRIL, V.V.; DUARTE, J. M. B. Chromosome polymorphism in the Brazilian dwarf brocket deer, *Mazama nana* (Mammalia, Cervidae). **Genetics and Molecular Biology**, 3:53-57, 2008.
- ABRIL, V. V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZALES, S.; DUARTE J. M. B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic Genome Research**, v. 128, p. 177–187, 2010.
- ALLEN, J. A. Notes on American deer of the genus *Mazama*. **Bulletin of the American Museum of Natural History**. v. 34, p. 521-553, 1915.
- CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia**, Argentina, v. 4, p. 309-732, 1960.
- CARNELOSSI, E.A.G. **Diferenças moleculares entre citótipos de *Mazama americana* (Mammalia: Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2008.
- CHANDRA, H. S.; HUGENFORD, D. A.; WAGNER, J. Chromosomes of five artiodactyls mammals. **Chromosoma**, Berlin, v. 2, p. 211-220, 1967.
- CURSINO, M. S.; SALVIANO, M. B.; ABRIL, V. V.; ZANETTI, E. S; DUARTE, J. M. B. 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, p. 40, 2014.
- CUVIER, G. L. C. F. D. Zoologie. Mammifères. F. G. **Dictionnaire des Sciences Naturels**. Levrault, Paris, v. 7, p. 1-534, 1817.
- DUARTE, J. M. B. **Guia de identificação de cervídeos brasileiros**. 1. Jaboticabal: FUNEP, 16p, 1996.
- DUARTE, J. M. B.; MERINO, M. L. **Taxonomia e Evolução**. In: Duarte, J.M.B. (Ed.), *Biologia e conservação de Cervídeos sul-americanos: Blastocerus, Ozotoceros e Mazama*. Jaboticabal: FUNEP, cap.1, p. 1-21, 1997.
- DUARTE, J.M.B. **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, 1998.
- DUARTE J.M.B.; JORGE W. Morphologic and cytogenetic description of the small red brocket (*Mazama bororo* Duarte, 1996) in Brazil. **Mammalia**, v. 67, p. 403–410, 2003.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S. Neotropical Cervidology, Biology and Medicine of Latin American Deer, Jaboticabal, Brazil: **Funep and Gland**, Switzerland, IUCN. 393pp, 2010.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 17–22, out. 2008.

EISEMBERG, J. F. Mammals of the neotropics. Vol. I. **University of Chicago Press**, Chicago, 449p, 1989.

ERXLEBEN, J. C. P. Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates cum synonymia et history animalium, Classis 1. **Mammalia**. Impensis Weygandianis, Lipsiae, p. 1-636, 1777.

ESCOBEDO-MORALES, L. A.; MANDUJANO, S.; EGUIARTE, L. E.; RODRÍGUEZ-RODRÍGUEZ, M. A.; MALDONADO, J. E. 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-Zeitschrift für Säugetierkunde** 81(3):303-313, 2016.

FIORILLO, B.F.; SARRIA-PEREA, J.A.; ABRIL, V.V.; DUARTE, J.M.B. Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla, Cervidae). **Comparative Cytogenetics**, 7 (1):25-31, 2013.

FISCHER, G. W. Tabulis synopticas illustrata, **Zoognosia**, p. 3-24, 1814.

FONTANA, F.; RUBINI, M. Chromosomal evolution in Cervidae. **BioSystems**, v. 34, p. 157-174, 1990.

GARAGNA, S.; MARZILIANO, N.; ZUCCOTTI, M.; SEARLE, J. B.; CAPANNA, E.; REDI, C. A. Pericentromeric organization at the fusion point of mouse Robertsonian translocation chromosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 98, p. 171-175, 2001.

GRAUR, D.; HIGGINS, D.G. Molecular evidence for the inclusion of cetaceans within the order Artiodactyla. **Molecular Biology and Evolution** 11: 357–364, 1994.

GRAY, J. E. On the deer of the west coast of South America, with the description of a new species from Peru (*Cervus whitelyi*). **Ann. Mag. Nat. Hist**, 4(12):161-164, 1873.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: Wilson DE, Reeder DM, editors. **Mammal species of the world**. 3rded. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 629-722, 2005.

GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C. O. Three polymorphic chromosome systems of centric fusion type in a population of Manchurian Sika Deer (*Cervus Nippon hotulorum*). **Chromosoma**, Berlin, v. 28, p. 245-254, 1969.

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.; The taxonomic status of *Mazama bricenii* and the significance of the Táchira depression for mammalian endemism in the Cordillera de Mérida Venezuela. **PLoS One** 10(6): e0129113, 2015.

GUTIÉRREZ, E.E.; HELGEN, K.M.; MCDONOUGH, M.M.; BAUER, F.; HAWKINS M.T.R.; ESCOBEDOMORALES, L.A.; PATTERSON, B.D.; MALDONADO, J.E. 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, 2017.

HASSANIN, A.; DELSUC, F.; ROPIQUET, A.; HAMMER, C.; VAN VUUREN, B.J.; MATTHEE, C.; RUIZGARCIA, M.; CATZEFLIS, F.; ARESKOU, V.; NGUYEN, T.T.; COULOUX, A. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus Biologies** 335:32-50, 2012.

HECKBERG, N. S.; ERPENDBECK, D.; WORDHEIDE, G.; ROSSNER, G. E. Systematic relationships of five newly sequenced cervid species. **Peer J**, 4; e 2307, 2016.

HECKBERG, N. S. The systematics of the Cervidae: a total evidence approach. **PeerJ** 8:e8114, 2020.

HENSEL, R. Beiträge zur Kenntniss der Säugethiere Süd-Brasiliens. **Abhandl. König. Akad. Wiss**, p. 1-130, 1872.

HERSHKOVITZ, P. Neotropical deer (Cervidae). Part I. *Pudu*, genus *Pudu* Gray. **Fieldiana, Zoology, news series**, v. 11, p. 1-86, 1982.

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

ILLIGER, J.A.; notes on american mazama. Deer of the genus. **Bulletin American Museum of Natural History**.V.34, P. 521-553, 1811.

JORGE, W. e BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer *Mazama americana* temama (Cervidae, Artiodactyla) with probable nonRobertsonian translocation. **Cytologia**, v. 42 p. 711–721, 1977.

KERR. The Animal Kingdom. *Cervus temama*, p.303, 1792.

LÖNNBERG, E. On some mammals from the Argentine Chaco. **Arkiv för Zoologi** 12:1-20,1919.

LUDUVÉRIO, D. J. **O status taxonômico de *Cervus rufus* Illiger, 1811 e sua caracterização genética e morfológica**. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, Brasil, 2018.

MERRIAM, C. H. A new brocket from Yucatan. **Proceedings of the Biological Society of Washington**, v. 14, p. 105-106, 1901.

MIRANDA-RIBEIRO, A. Os veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de vários museus nacionais e estrangeiros. **Revista do Museu Paulista**, v. 11, p. 209-308, 1919.

MONTGELARD, C.; CATZEFLIS, F.M.; DOUZERY, E. 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, 1997.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. Em: OBE G, BASLER A. **Cytogenetics: Basic and applied aspects**. Berlin, Springer Verlag, p. 90-112, 1987.

PARDO, E. **Distribución y abundancia de la familia Cervidae en la zona oeste del Parque Nacional Carrasco**. Tesis de Licenciatura, Universidad Mayor San Simón, Cochabamba, Bolivia, p. 88, 2001.

PACHECO, L.F.; GUERRA, J.F.; RÍOS-UZEDA, B. Eficiencia de atrayentes para carnívoros en bosques yungueños y praderas altoandinas en Bolivia. **Mastozoología Neotropical**, v. 10, p. 167-176, 2003.

PUCHERAN, J. Note sur une espèce nouvelle de Cerf (*Cervus rufinus*). **Revue et Magasin de Zoologie**. t. III, p. 561-565, 1851.

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

RINCÓN, A.C.; MORALES-DONOSO, J.A.; SANDOVAL, E.D.P.; TOMAZELLA, I.M.; MANTELLATTO, A.M.B.; 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** in press, 2020.

RÍOS-UZEDA, B.; WALLACE, R.B.; ARANÍBAR, H.; VEITCH, C. Evaluación de mamíferos medianos y grandes en el bosque semidecíduo del Alto Tuichi (PN y ANMI Madidi, Dpto. La Paz). **Ecología en Bolivia**, v. 36, p. 31-38, 2001.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla; Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 174, 2000.

RUMIZ, D.I. An update of studies on deer distribution, ecology and conservation in Bolivia. **Deer Specialist Group News**. 17, p. 610, 2002.

RUMIZ, D.I.; PARDO, E.; EULERT, C.F.; ARISPE, R.; WALLACE, R.B.; GÓMEZ, H. New records and a status assessment of a rare dwarf brocket deer from the mountain forests of Bolivia. **Journal of Zoology**, London, v. 271, p. 428-436, 2007.

RUMIZ, D.I.; BARRIO, J. 2016. *Mazama chunyi*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T12913A22165860.en>

SALVIANO, M.B.; CURSINO, M.S.; ZANETTI, E.S.; ABRIL, V.V.; DUARTE, J.M.B. Intraspecific chromosome polymorphisms can lead to reproductive isolation and speciation: an example in red brocket deer (*Mazama americana*). **Biology of Reproduction** 96:1279–1287, 2017.

THOMAS, O. A new deer of the brocket group from Venezuela. **Ann. Mag. Nat. Hist.** 1 v.8. p. 349-350, 1908.

THOMAS, O. On certain of the smaller South American Cervidae. **Ann. Mag. Nat. Hist.** London, v. 11, p. 585-589, 1913.

THOMAS, O. The Spedan Lewis South American exploration. On mammals from Southern Bolivia. **Ann. Mag. Nat. Hist.**, series 9, p. 581-582, 1925.

VARELA, D. M.; TROVAT, I. R. G.; GUZMAN, K. R.; ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. Red brocket deer *Mazama americana* (Erxleben 1777), in: Duarte, J. M. B., González, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology**. IUCN/FUNEP, Jaboticabal, p. 151-159, 2010.

VARGAS-MUNAR, D. S. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; DUARTE, J. M. B. Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 9, p. 1545-1549, 2010.

VOGLIOTTI, A. **História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através da etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. 2004. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2004.

YENSEN, E.; TATIFA, T.; ANDERSON, S. **New distributional records of some Bolivian mammals. *Mazama Chunyi***. La Paz, Bolívia, v. 3, p. 411, 1994.

ZURANO, J. P.; MAGALHÃES, F. M.; ASATO, A. E.; SILVA, G.; BIDAU, C. J.; MESQUITA, D. O.; COSTA, G. C. Cetartiodactyla: updating a time-calibrated molecular phylogeny. **Molecular Phylogenetics and Evolution** 133:256–262, 2019.

CAPÍTULO 2 - Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de *Mazama sarae*

RESUMO

A espécie *Mazama americana*, veado-mateiro, é um dos cervídeos mais abundantes nas florestas Neotropicais, mas que apresenta lacunas importantes no seu posicionamento taxonômico, sendo considerada um complexo de espécies crípticas. *Mazama sarae* Thomas, 1925 (Carapari, Tarija, Bolívia), representa o *Mazama* vermelho da região sul da Bolívia e Norte da Argentina. A espécie recebeu diferentes status taxonômicos, sendo descrita inicialmente por Thomas (1925), e atualmente considerado sinônimo de *M. americana*. A descrição original da espécie foi realizada apenas por caracteres morfológicos de um único indivíduo coletado na Bolívia, sem nenhum tipo de abordagem genética. Assim, o objetivo do trabalho foi caracterizar um topótipo de *Mazama sarae* sob aspectos morfológicos (biometria corporal, padrões de coloração da pele, craniometria), citogenéticos (coloração convencional Giemsa, biometria cromossômica, Bandamento C, Bandamento G, coloração Ag-NOR) e moleculares (análises filogenéticas do genoma mitocondrial). Os resultados morfológicos posicionam o espécime de *M. sarae* no clado dos pequenos *Mazama* (*M. temama*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira* e *M. chunyi*). Segundo os seus padrões citogenéticos, o topótipo da espécie não se enquadra em nenhuma variante das espécies de *Mazama* atualmente conhecidas. As árvores filogenéticas geradas para o topótipo de *M. sarae*, agrupa a espécie dentro da subtribo Odocoileina, mostrando uma distância considerável com *M. americana* e com as outras espécies incluídas na subtribo. Assim, de acordo com os resultados apresentados, é evidente a separação de *M. sarae* em relação a *M. americana*. O estudo de um topótipo atual permite a caracterização e revalidação de *M. sarae*, além de dar subsídios para a descrição de novas espécies e possível mudança da nomenclatura do gênero *Mazama*.

Palavras-Chave: cromossomos, filogenia, genoma mitocondrial, taxonomia, topótipo, veado-mateiro.

INTRODUÇÃO

Entre os cervídeos neotropicais, o gênero *Mazama* é o que apresenta maior distribuição, sendo *Mazama americana*, veado-mateiro, um dos cervídeos mais abundantes nas florestas Neotropicais, distribuindo-se ao longo da América tropical e subtropical, desde o norte da Argentina, Brasil, Bolívia, Colômbia, Equador e Venezuela, incluindo Suriname, Trinidad e Tobago, Guiana, Guiana Francesa, Peru e Paraguai (Eisenberg, 1989; Ribeiro, 1919) (Figura 1). A espécie, incluindo toda sua sinonímia, está categorizada como DD (Dados Deficientes) na IUCN (2016), que foi proposta justamente pelos grandes problemas taxonômicos e a potencial existência de diversas espécies dentro do que é reconhecido como *M. americana*.

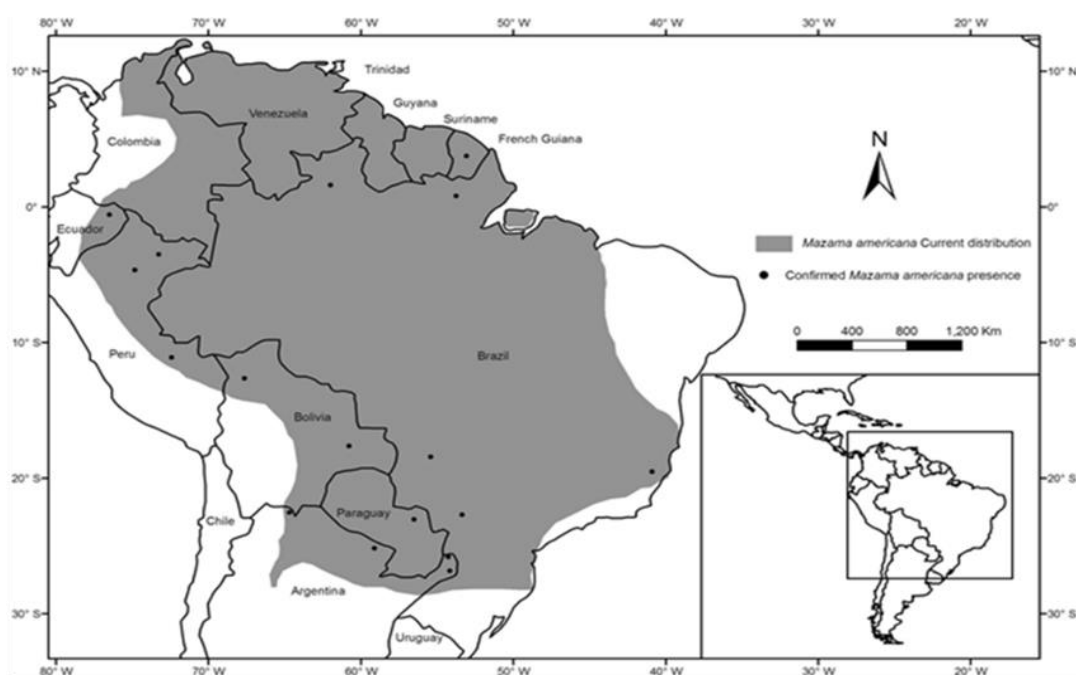


Figura 1. Distribuição geográfica do *M. americana* na América do Sul. Fonte: Varela et al. (2010).

Mazama sarae, conhecido como corzuela colorada (Figura 2), representa o *Mazama* vermelho da região sul da Bolívia e Norte da Argentina. A espécie recebeu diferentes status taxonômicos, sendo descrita inicialmente por Thomas (1925) na Bolívia, depois considerada uma subespécie de *M. americana* (Cabrera, 1960) e,

finalmente, baseado em Grubb (2005), considera-se *M. sarae* como sinônimo de *M. americana* Erxleben, 1777 (Varela et al., 2010).



Figura 2. Corzuela colorada (*Mazama sarae*). Foto: Alec Earnshaw.

Todas as descrições de *M. sarae* foram baseadas nas características morfológicas do único indivíduo coletado e descrito por Thomas (1925), sem nenhum tipo de abordagem genética. Com isso, muitas dúvidas permanecem sobre a espécie, como sua validade taxonômica, seus padrões citogenéticos e moleculares, bem como a distribuição geográfica.

Por essas razões, o presente estudo teve como objetivo caracterizar um topótipo de *Mazama sarae* Thomas, 1925 sob aspectos morfológicos (biometria corporal, padrões de coloração da pele, craniometria), citogenéticos (coloração convencional Giemsa, biometria cromossômica, Bandamento C, Bandamento G, coloração Ag-NOR) e moleculares (análises filogenéticas do genoma mitocondrial).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Permissão de coleta

O exemplar utilizado no estudo foi coletado em parceria com o Museo de História Natural Noel Kempff Mercado de Santa Cruz-Bolívia. A permissão de coleta foi outorgada pelo Ministerio de Meio Ambiente e Agua (MMAyA-Bolívia), e encontra-se na íntegra no Apêndice A. Todo o material foi devidamente autorizado como empréstimo para o seu estudo no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) UNESP-Jaboticabal (SP), como exposto no Apêndice B.

2. Confirmação da existência do holótipo

Para poder confirmar a existência do holótipo de *M. sarae* Thomas, 1925 foi realizada uma busca no portal de dados online da coleção de mamíferos do Natural History Museum de Londres, como exposto no Apêndice C.

3. Obtenção do exemplar

A partir da realização de levantamento bibliográfico, foi definida a localidade tipo da coleta de *M. sarae* Thomas, 1925, sendo a cidade de Carapari no departamento de Tarija, Bolívia. A coleta foi realizada em local próximo do local desejado, onde atualmente se tem registros do exemplar buscado.

A coleta do topótipo de *M. sarae* foi realizada por caçadores locais, auxiliados por cães de caça, na localidade de Cañadas, município de Entre Rios, província O'Connor, departamento de Tarija, coordenadas 21°23'59"S 63°58'47"W a 67 km de distância da localidade tipo (Figura 3). Foi coletado um macho adulto, no dia 13/05/2019.



Figura 3. Mapa da Bolívia com o ponto de coleta do topótipo de *M. sarae* (Topótipo-Tarija), utilizado no estudo.

4. Procedimentos após a coleta do exemplar

Assim que o animal foi abatido e chegou às mãos da equipe de campo, foi realizada uma sequência de procedimentos para o aproveitamento completo do animal:

4.1 Documentação fotográfica

O animal foi posicionado em decúbito lateral, em cima de um pano azul com o número da coleta. Foram tomadas fotos nas seguintes posições: a) Lateral, b) Ventral, c) Dorsal e d) Detalhe da lateral da cabeça.

4.2 Biometria corporal

Foi realizada uma avaliação morfológica do animal por meio de 22 medidas corporais: largura da cabeça (LC), comprimento da orelha (CO), distância entre olhos (DEO), metacarpo (MTC), altura (ALT), comprimento do corpo (CCO), comprimento da cauda (CCA), metatarso (MTT), perímetro do pescoço (PP), tórax (TX), abdômen

(AB), distância entre chifres (DEC), comprimento do testículo esquerdo (CTE), comprimento do testículo direito (CTD), diâmetro do testículo esquerdo (DTE), diâmetro do testículo direito (DCD), comprimento do chifre esquerdo (CCE), comprimento do chifre direito (CCD), diâmetro do chifre esquerdo (DCE), diâmetro do chifre direito (DCD), comprimento da cabeça (CCB) e mandíbula (MB). Estas medidas foram tomadas com fita métrica e paquímetro, e a massa com balança pendular.

4.3 Biópsia de pele

Após tricotomia e antissepsia da face medial do membro pélvico, foi excisado um fragmento de 5 cm x 2 cm de pele que foi depositado em um tubo contendo meio de transporte (Meio McCoy's + 500 mg/L gentamicina + 200 mg/L anfotericina B) (Duarte et al., 1999), permanecendo sob refrigeração até a chegada ao laboratório de campo. Ali o fragmento de pele foi dividido em 10 fragmentos, que foram depositados em tubos criogênicos contendo meio de congelação de peles (200 mL de Mc Coy's + 40 mL de soro equino + 12 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) + 24 g de polyvinil + 100 mg/L sulfato de gentamicina + 4 mg/L anfotericina B) (Duarte et al., 1999). Esse material permaneceu por 4 horas sob refrigeração a 4°C 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.

4.4 Retirada e processamento da pele completa

A pele na sua íntegra, foi retirada do animal sendo então mergulhada em uma solução de limpeza (25mL de ácido acético glacial + 3L de água), onde permaneceu por 50 minutos e depois foi limpa com o uso de uma faca para retirar os resíduos musculares, gordura e fâscias. Posteriormente, a pele foi mergulhada em uma solução curtume para sua desidratação (500gr de sulfato de alumínio comercial + 500gr de cloreto de sódio + 3L de água), na qual permaneceu durante três dias. Depois do processo de curtume ela foi estendida na sombra e deixada para secar, massageando e esticando periodicamente para manter a flexibilidade. Depois de totalmente seca e amolecida, a superfície sem pelos da pele foi lixada para finalizar o processo, e a mesma foi acondicionada aberta para estudos morfológicos. Em princípio, a pele do topótipo foi depositada no Museu do NUPECCE que mantém uma importante coleção

de cervídeos do gênero *Mazama*, com peles, crânios e pós-crânios de mais de 100 espécimes. Os números de catálogo para o topótipo de *M. sarae* foi NPC 145.

4.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo

Foram coletadas amostras de tecido (músculo, fígado, rim, baço) para estudos moleculares. Fragmentos de 1 cm³ destes tecidos foram mergulhados em tubos com etanol absoluto, permanecendo à temperatura ambiente.

4.6 Preparação do crânio e pós-crânio

O esqueleto completo foi extraído no local de abate do animal e deixado em baldes com água durante duas semanas com frequentes trocas e limpezas. Depois esse material já completamente limpo e seco foi acondicionado em caixas plásticas e catalogado junto com as peles no mesmo Museu.

5. Relação de espécimes utilizados

O topótipo coletado foi utilizado em todas as análises morfológicas, citogenéticas e moleculares. Para as análises biométricas e craniométricas foram utilizados exemplares do gênero *Mazama* depositados no banco de dados e no Museu do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos NUPECCE (Tabela 1 e 2, Apêndice E). Para as análises moleculares de *M. sarae* foram analisadas 28 sequências de mitogenoma compostas pela sequência do topotipo e mais 27 mitogenomas (12 obtidos do GenBank e 15 gerados pelo NUPECCE), cujos códigos de acesso e dados de origens encontram-se disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de animais do NUPECCE e do GenBank (Mitogenomas) utilizados para as análises filogenéticas de *M. sarae*, com seu numero de identificação do NUPECCE (ID), nome da espécie, origem, número de acesso do GenBank e fonte.

ID	Espécie	Origem	N° de acesso	Fonte
411	<i>Mazama sarae</i>	Topótipo (Bolívia)		NUPECCE
251	<i>Mazama americana</i>	Juína		NUPECCE
259	<i>Mazama americana</i>	Santarém		NUPECCE
310	<i>Mazama americana</i>	Jari		NUPECCE
297	<i>Mazama americana</i>	Carajás		NUPECCE
327	<i>Mazama americana</i>	Acre		NUPECCE
358	<i>Mazama americana</i>	Neótipo (Guiana Francesa)		NUPECCE
362	<i>Mazama temama</i>	Campeche (México)		NUPECCE
366	<i>Mazama temama</i>	Neótipo (México)		NUPECCE
373	<i>Mazama bororo</i>	Bocaúva do Sul, PR		NUPECCE
215	<i>Mazama bororo</i>	Intervales		NUPECCE
385	<i>Mazama rufa</i>	Neótipo (Foz do Iguaçu; Brasil)		NUPECCE
107	<i>Mazama nana</i>	Paraguai		NUPECCE
185	<i>Mazama nana</i>	Paraná		NUPECCE
377	<i>Mazama gouazoubira</i>	Neótipo (Paraguai)		NUPECCE
346	<i>Mazama nemorivaga</i>	Juruparí, PA		NUPECCE
	<i>Mazama americana</i>	Peru	JN632657	Hassanin et al. 2012
	<i>Mazama americana</i>	Guiana	JN632656	Hassanin et al. 2012
	<i>Mazama rufina</i>	Colombia	JN632661	Hassanin et al. 2012
	<i>Mazama gouazoubira</i>	Colombia	JN632658	Hassanin et al. 2012
	<i>Mazama gouazoubira</i>	NUPECCE	NC020720	Hassanin et al. 2012
	<i>Mazama nemorivaga</i>	Peru	JN632659	Hassanin et al. 2012
	<i>Ozotoceros bezoarticus</i>	Bolívia	JN632681	Hassanin et al. 2012
	<i>Odocoileus hemionus</i>	USA	JN632670	Hassanin et al. 2012
	<i>Odocoileus virginianus</i>	Guiana	JN632671	Hassanin et al. 2012
	<i>Blastocerus dichotomus</i>	Bolívia	JN632603	Hassanin et al. 2012
	<i>Hipocamelus antisensis</i>	Argentina	JN632646	Hassanin et al. 2012
	<i>Rangifer tarandus</i>	USA	NC007703	Wada et al. 2010

6. Caracterização morfológica

Para as análises morfológicas de biometria corporal e craniometria foram considerados somente animais adultos e preferencialmente provenientes de vida livre e origem conhecida.

Foi realizada uma análise de componentes principais e de cluster no programa PAST 3.08 (Hammer et al., 2001), a partir das medidas corporais do topótipo, comparadas com as medidas dos indivíduos do banco de dados do NUPECCE pertencentes as espécies *M. americana*, *M. temama*, *M. bororo*, *M. rufa*, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. chunyi*. Para isto, foram consideradas 12 medidas corporais encontradas na maioria dos indivíduos analisados.

As medidas do crânio foram tomadas, de acordo com o padrão de medições cranianas de cervídeos propostas por Rees (1969) e Driesch (1976) (Figura 4).

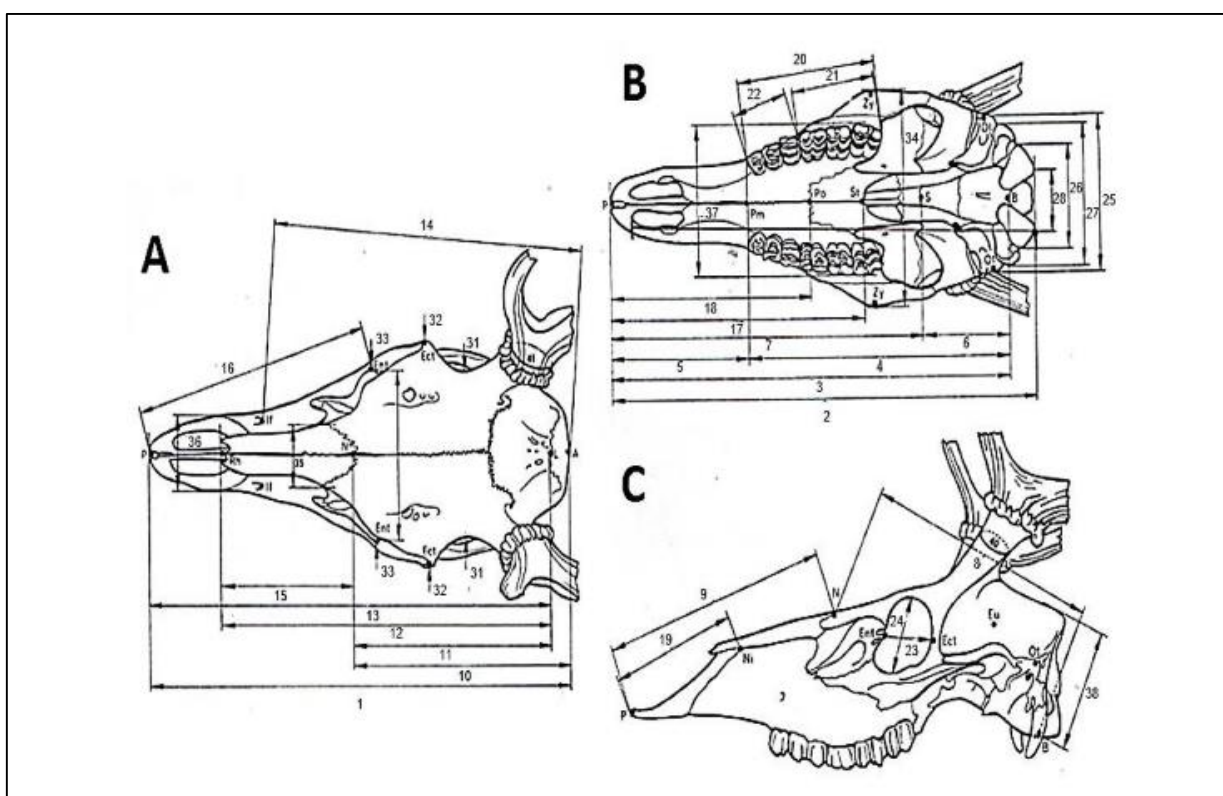


Figura 4. Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vistas dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). A medida 1 representa o comprimento total, 2 comprimento cômulo-basal, 3 comprimento basal, 4 comprimento curto do crânio, 5 pré-molar – prosthion, 6 eixo base-cranial, 7 eixo base-facial, 8 comprimento do neurocrânio,

9 comprimento vicero-craniano, 10 comprimento frontal mediano, 11 lambda – nasal, 12 lambda – região mais distal do osso nasal, 13 lambda – prosthion, 14 acrocânio, 15 maior comprimento dos nasais, 16 comprimento curto facial – lateral, 17 comprimento palatino mediano, 18 comprimento palatal-oral, 19 comprimento lateral do pré-maxilar, 20 distância corrida de dentes, 21 comprimento da linha do 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, 29 altura do forâmen magno, 30 maior largura neurocraniana, 31 menor largura frontal, 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 do palatal, 38 basion – ponto mais alto da crista nugal (Rees, 1969; Driesch, 1976).

As medidas cranianas do exemplar coletado de *M. sarae* foram comparadas com outras espécies do gênero *Mazama* disponíveis no Museu do NUPECCE. A partir desses dados foi realizada uma análise de componentes principais e de cluster no programa PAST 3.08 (Hammer et al., 2001), para medir a similaridade entre indivíduos, bem como para discriminar espécies e populações (Sneath e Sokal, 1973). Para isto, foram consideradas 36 medidas cranianas encontradas na maioria dos indivíduos analisados (foram omitidas as medidas 29 e 30 da figura 4).

Para a caracterização morfológica, também foram examinados na pele taxidermizada e nas fotografias, aspectos de coloração geral da pelagem, padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo, comprimento dos pelos nas diferentes regiões do corpo, ocorrência de faixas de pelos antevertidos e de tufo arredondado de pelos na região tarsal, com base nos critérios utilizados por Rossi (2000). Além disso, os campos cromogênicos da cabeça (faixas orbitais superiores e inferiores, mancha superciliar anterior, regiões auriculares anterobasal e posterobasal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular), e os campos cromogênicos 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), foram analisadas de acordo com a nomenclatura utilizada por Hershkovitz (1982).

7. Análises Citogenéticas

7.1 Cultivo celular

A biópsia de pele foi descongelada em banho-maria a 37°C e colocada em placas de Petri, contendo tampão fosfato (PBS), sendo então divulsionadas mecanicamente e divididas em fragmentos finos. Estes foram transferidos para os frascos de cultivo T25 com 2 mL de meio de cultura DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco), enriquecido com 50% de soro fetal bovino, suplementado com 5 µl de amicacina para cada 1 mL de meio, e levados a estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a aderência das células no frasco, o meio foi trocado por 2 mL de meio com 30% de soro fetal bovino (Verma e Babu, 1995).

Os cultivos foram supervisionados a intervalos de 24 horas, e o meio foi trocado a cada 48 horas. Quando as células alcançaram o ponto de confluência, da monocamada de células foi realizado o repique, que consistiu em retirar o meio "velho" das garrafas, lavar duas vezes com PBS e adicionar 1 mL de tripsina (8,0g NaCl/L + 0,4g KCl/L + 0,58 g NaHCO₃/L + 1 g glucose/L + 0,005 g vermelho fenol/L + 0,2 g EDTA/L + 0,5 g tripsina/L, pH 7,2-7,4) durante um minuto, sob monitoramento em microscópio invertido para verificar se as células soltaram do fundo do frasco e então, imediatamente, a tripsina foi inativada com 1mL de soro e 2 mL de DMEM. As células foram transferidas para outras garrafas de cultivo dividindo-se o material da garrafa mãe entre as garrafas novas, as quais foram realimentadas da mesma maneira até obter um número suficiente de cultivos secundários.

As células das garrafas com cultivos secundários foram colhidas assim que apresentaram confluência. Um dia antes da colheita realizou-se a pré-tripsinização. Então, 24 horas após foram tratados com 60 µl de Colchicina 0,016% em cada garrafa durante 30 a 60 minutos (incubado em estufa a 5% de CO₂ a 37°C), e uma solução de tripsina no momento da colheita.

O conteúdo do frasco foi transferido para um tubo de centrifuga cônico, centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspendido em 8mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubado a temperatura de 37,5°C por 20 minutos com pipetagem constante. Após a incubação, foi feita a pré-fixação adicionando-se três gotas de fixador (solução de metanol e ácido acético 3:1).

Depois o material passou por centrifugação, o sobrenadante foi descartado novamente e o sedimento foi restituído a 6 mL com solução fixadora. Foi realizado duas vezes o mesmo procedimento com 4 mL e 3 mL de solução fixadora.

Finalmente as células foram fixadas com mais 1 mL de solução fixadora e armazenadas a -5°C para depois preparar as lâminas e submetê-las as diferentes técnicas da citogenética clássica (análise convencional Giemsa, banca C, banda G e coloração Ag-NOR).

7.2 Coloração convencional

Uma vez que as lâminas foram preparadas, estas foram coradas pela metodologia convencional Giemsa (5mL de água destilada, 1mL de tampão fosfato 0,001M e 1mL de corante Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol) para cada uma por 8 minutos). Cinquenta metáfases foram analisadas para se verificar o número diplóide de cromossomos ($2n$) exato do espécime.

7.3 Biometria Cromossômica

Para a classificação cromossômica, foram utilizadas 10 metáfases de cada topótipo coletado. Os cromossomos foram medidos a partir do centrômero até o telômero utilizando o programa computacional "AxioVision", e com base nesses dados, foi estimada a razão entre braços ($r = \text{braço longo} / \text{braço curto}$). De acordo com o valor de r os mesmos foram classificados como metacêntricos ($1 \leq r < 1,7$), submetacêntricos ($1,7 \leq r \leq 3$) ou acrocêntricos ($r > 3$) (Levan et al., 1964). De acordo com o comprimento relativo (CR), os cromossomos autossomos foram classificados como sendo do grupo A (grandes cromossomos de dois braços, com $\text{CR} \geq 6\%$), C (pequenos cromossomos de dois braços, com $\text{CR} < 6\%$), D (grandes cromossomos acrocêntricos, com $\text{CR} \geq 5\%$), E (pequenos cromossomos acrocêntricos, com $\text{CR} < 5\%$) e B (micro-cromossomos ou cromossomos B = $\text{CR} < 1,5\%$) (Tomazella et al., 2017).

7.4 Bandamento G (Seabright, 1971, modificada)

Para a visualização de bandas escuras e claras, que são segmentos cromossômicos que se condensam mais cedo e mais tarde na prófase, respectivamente, foram empregadas lâminas previamente envelhecidas na estufa a

37°C durante uma semana. Após o envelhecimento, estas foram mergulhadas numa solução de tripsina (0,5%) em tampão fosfato (0,06M pH 6,8) a 37°C no banho-maria durante 2 a 5 segundos, sendo, em seguida, lavadas 2 vezes com água destilada gelada. Finalmente, logo 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 (2:1) durante 12 minutos.

7.5 Bandamento C (Sumner, 1972)

Para a detecção de heterocromatina constitutiva, que estão geralmente localizadas nas regiões centroméricas dos cromossomos, as lâminas foram mergulhadas em solução de HCl (0,02N) por 20 minutos, sendo em seguida lavadas com água corrente, mergulhando-se em solução de Ba(OH)₂ (0,07N) a 40°C por 20 a 25 minutos e posteriormente lavadas de novo com água corrente e mergulhadas em solução 2 x SSC por 1,5 a 2 horas. Após isso, as lâminas foram coradas com Giemsa a 2% em tampão fosfato (0,01 M), por 25 minutos.

7.6 Coloração Ag-NOR (Howell; Black, 1980)

As regiões organizadoras de nucléolo formam localizadas por meio da impregnação com prata. Em uma lâmina foram pingadas duas gotas de nitrato de prata a 50% e uma gota de solução coloidal (1 g de gelatina P.A. em 50 mL de água deionizada mais 0,5 mL de ácido fórmico), colocando-se uma lamínula sobre a preparação. A lâmina foi colocada em câmara úmida, sendo aquecida a 56°C em estufa, por 4 a 5 minutos até obter uma cor dourada. Após isso, foi mergulhada em água deionizada para retirada da lamínula, sendo depois lavada com água corrente e analisada ao microscópio.

7.7 Análise das preparações cromossômicas

As lâminas submetidas às técnicas de Bandamento cromossômico foram analisadas e fotografadas em um microscópio Olympus CX31 em objetiva de 100x com uma câmera digital Olympus Camedia C5060 equipado com uma câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision Release. Todas as imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2.

8. Genética molecular

8.1 Extração de DNA

Os fragmentos de fígado ou músculo foram utilizados para a extração do DNA dos animais amostrados. A extração de DNA genômico a partir das amostras de tecido foi realizada utilizando-se o “kit” comercial DNeasy Blood and Tissue (Qiagen, Valência, CA, EUA), digestão com proteinase K e extração por coluna de sílica, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante. As amostras foram quantificadas por fluorômetro Qubit®, sendo em seguida diluídas em uma solução de uso (50ng/μl) para o posterior sequenciamento.

8.2 Sequenciamento do mitogenoma

Amostras de DNA de 50 animais (banco de amostras do NUPECCE e topótipo de *M. sarae* coletado) com dados de morfologia, citogenética e origem conhecidos foram submetidas ao sequenciamento de nova geração (Illumina® HiSeq 2000).

O sequenciamento massivo paralelo gerou um total de 237.617.495 paired-reads, com média de 4.168.728 (mim= 222.720, max = 7.318.743) paired-reads por indivíduo. Em análise preliminar, para 42 (84%) dos 50 indivíduos analisados, foi possível recuperar o mitogenoma completo, com pelo menos 6x de cobertura por base.

Para a análise filogenética do topótipo de *M. sarae*, foram escolhidas mais 15 sequências de mitogenomas de diferentes espécies do gênero *Mazama*, considerando aquelas que tinham boa cobertura de bases e que já foram anteriormente descritas ou usadas para outros trabalhos. Também foram obtidas sequências de mitogenomas de diferentes espécies já existentes no banco de dados online GenBank. *Rangifer tarandus* foi utilizado como grupo externo nas análises filogenéticas. A figura 5 exemplifica a descrição do mitogenoma recuperado do topotipo de *Mazama sarae*.

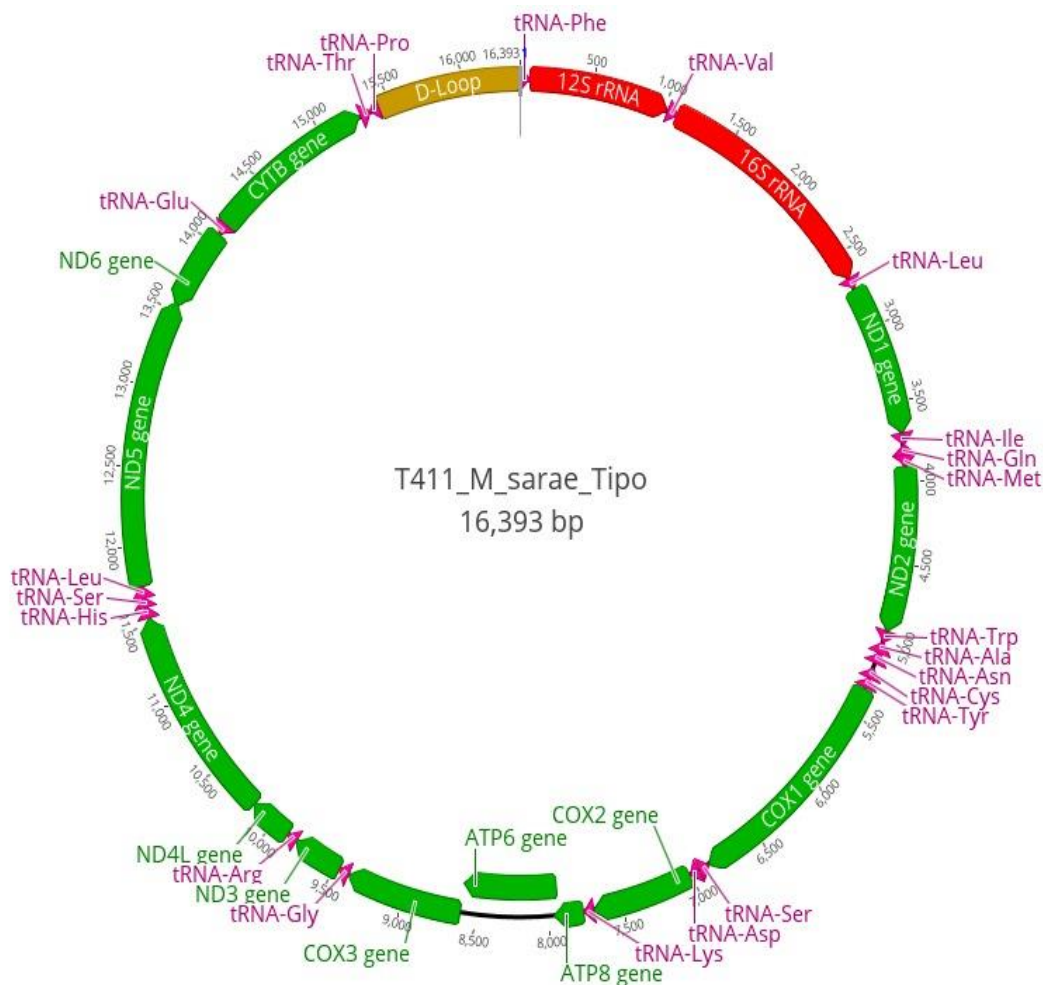


Figura 5. Mitogenoma recuperado para do topótipo de *Mazama sarae* (T411_M. sarae_Tipo), apresentando 16.393 pb. Os segmentos em verde indicam as regiões codantes, os segmentos em vermelho os RNA ribossômicos (rRNAs), a região controle (D-LOOP) é indicada em amarelo e o RNAs transportadores (tRNAs) pelas setas rosas.

8.3 Análise filogenética do topótipo de *Mazama sarae*

Para avaliação molecular do topótipo de *M. sarae*, a montagem da matriz (15369 pb) com todas as sequências selecionadas (das quais foi extraído D-LOOP por ser uma região hipervariável), o alinhamento e a edição foram feitas na plataforma do Genious Prime (Biomatters Ltd. Auckland, Nova Zelândia, 2018). Foi determinado o esquema de partição mais adequado e os melhores modelos de evolução molecular para o conjunto de dados dos genes mitocondriais com a anotação de cada gene mediante o programa PartitionFinder2 on XSEDE (Lanfear et al., 2016).

Foram utilizados dois métodos de análise filogenética. A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada no programa MrBayes on XSEDE 3.2 (Ronquist et al., 2012) com 25.000.000 de gerações até obter uma variância de <0.01 , adotando um descarte por “burn-in” de 25% das amostras iniciais. Para estimar a distribuição da probabilidade posterior foi utilizado a Metropolis-Coupled MCMC (Markov Chain Monte Carlo) com nchains=4, nruns=2 e burninfrac=0,25 para todos os genes. A Análise de Máxima Verossimilhança (MV) (Felsenstein, 1985) foi realizada no programa RAxML 8.0 (Stamatakis, 2014) que disponibiliza os valores de bootstrap dos clados. Todas as análises foram através do portal “online” CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). As árvores obtidas de todas as análises foram editadas com auxílio do programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

Todas estas análises descritas foram para conseguir uma comparação das sequências obtidas com as sequências já existentes no GenBank e assim obter uma avaliação preliminar da posição do exemplar coletado neste estudo em relação aos demais já avaliados quanto ao posicionamento filogenético.

RESULTADOS

1. Descrição emendada do topótipo de *Mazama sarae* Thomas, 1925 (Mammalia, Cervidae): Cor geral da pelagem marrom avermelhada, mas a cabeça e o pescoço estão entre um cinza entre claro e escuro, contrastando com a cor do corpo. Cauda curta, na região dorsal marrom avermelhada, da mesma coloração do corpo e com um tufo de pelos brancos proeminente na região ventral (Figura 6A, 8B). Pelame geral liso, com uma variação no seu comprimento segundo a região do corpo, os mais curtos e finos na região cranial, na cabeça e pescoço, e os pelos um pouco mais compridos densos na região caudal do corpo, nos membros, ancas e na cauda (Figura 6A, 7A). Parte superior do focinho enegrecida, com uma mancha branca no lábio superior e inferior. Testa, entre os olhos e faixas orbitais inferior e superior de cor castanhos avermelhado (Figura 6B). Orelhas grandes e anguladas, a borda cinza claro, face interna branca com pouca quantidade de pelos curtos e finos. Presença de um tufo de pelos castanho avermelhado no dorso da cabeça imediatamente anterior aos chifres (topete). Chifres relativamente pequenos e finos, inclinados póstero-dorsalmente, levemente curvados e paralelos entre si (Figura 6B, 7B). Resto da cabeça e pescoço inteiro cinza, ligeiramente mais escuro acima e discretamente mais claro abaixo. Pelos de nuca antevértidos ao longo das linhas médias de cor cinza mais escura (Figura 7A, 7B). Na região ventral anterior e posterior; a região mandibular é cinza mais claro em comparação da garganta e todo o pescoço, o peito e o abdômen são marrom avermelhado da mesma cor do dorso, a face interna proximal dos membros e a região inguinal são esbranquiçadas (Figura 8A, B).

Localização do registro: Localidade Cañadas, município Entre Ríos, província O'connor do Departamento de Tarija, Bolívia, altitude de 949 metros.

Coordenadas geográficas do ponto de coleta: 21°23'59"S 63°58'47"W

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

N. de tombo: NPC 145

N. de Registro do banco de amostras: T411

Cariótipo: $2n=52$, $NF=64 + 4-5Bs$.



Figura 6. (A) Vista lateral do topótipo de *M. sarae* (B) Detalhes da vista lateral da cabeça.



Figura 7. (A) Vista dorsal anterior e posterior do topótipo de *M. sarae* (B) Detalhes da vista dorsal anterior.



Figura 8. (A) Vista ventral anterior do topótipo de *M. sarae* (B) Vista ventral posterior.

Na figura 9 é apresentada a pele taxidermizada do topótipo estudado. Os dados da biometria corporal são apresentados na tabela 2.



Figura 9. Pele aberta taxidermizada do topótipo de *M. sarae*.

Tabela 2. Medidas corporais do topótipo de *M. sarae* (em cm, massa em kg).

Comprimento do chifre direito	5,59	Tórax	54,2
Comprimento do chifre esquerdo	5,46	Abdômen	50,1
Diâmetro do chifre direito	1,56	Comprimento da cauda	8,5
Diâmetro do chifre esquerdo	1,46	Altura	60,5
Distância entre chifres	3,12	Metacarpo	12,5
Comprimento da orelha	10	Metatarso	19
Distância entre olhos	5,18	Comprimento do testículo direito	5,46
Comprimento da cabeça	21,8	Comprimento do testículo esquerdo	5,11
Largura da cabeça	8,22	Diâmetro do testículo direito	2,47
Perímetro do pescoço	24,3	Diâmetro do testículo esquerdo	2,25
Mandíbula	6,36	Massa	16,150
Comprimento do corpo	79,5		

O crânio macerado do topótipo de *M. sarae* é apresentado na figura 10 enquanto as medidas cranianas são apresentadas na tabela 3.

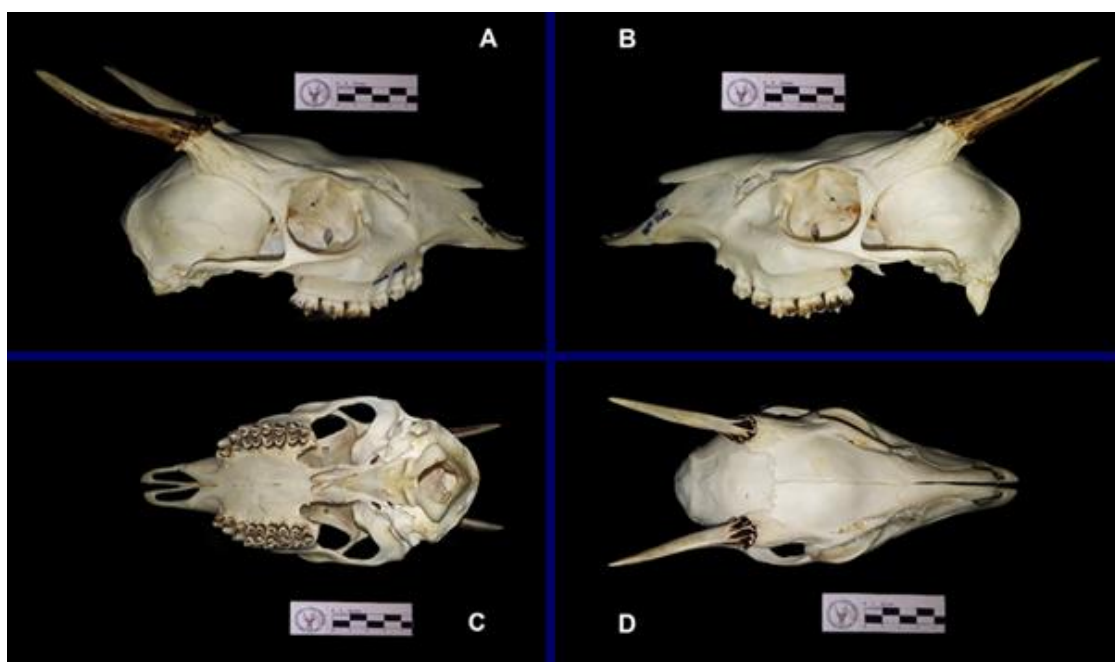


Figura 10. Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D), do crânio do topótipo de *M. sarae*. A régua ilustra medida em centímetros.

Tabela 3. Medidas cranianas do topótipo de *M. sarae* representadas em milímetros (mm) de acordo com Rees (1969); Driesch (1976).

Caráter	mm	Caráter	mm	Caráter	mm	Caráter	mm
CT	179,73	CFM	112,76	CLP	46,1	MLFM	18,86
CCB	167,88	LN	98,85	DCD	54,16	LFM	53,67
CB	156,6	LR	143,26	CLM	29,75	MLEO	40,96
CCC	102,49	LP	170,31	CLP	26,72	LMEO	31,94
PP	54,97	ACR	124,59	MCIO	30,31	LZ	80,59
EBC	31,45	MCN	45,72	MAIO	28,30	MLEN	22,77
EBF	126,19	CCFL	82,83	MLM	54,80	MLPM	27,02
NCL	100,63	MPL	105,2	MLCO	32,88	MLP	58,29
CVC	77,62	CPO	76,73	MLPP	49,79	BCNS	41,51

Onde: CT= comprimento total, CCB= comprimento condilobasal, CB= comprimento basal, CCC= comprimento curto do crânio, PP= premaxilar – prosthion, EBC= eixo basocranial, EBF= eixo basefacial, NCL= comprimento do neurocrânio, CVC= comprimento vicerocraniano, CFM= comprimento frontal mediano, LN= lambda – nasal, LR= lambda – região mais distal do osso nasal, LP= lambda – prosthion, ACR= acrocrânio, MCN= maior comprimento dos nasais, CCFL= comprimento curto facial – lateral, MPL= comprimento palatino mediano, CPO= comprimento palatal oral, CLP= comprimento lateral do premaxilar, DCD= distancia corrida de dentes, CLM= comprimento da linha do molar, CLP= comprimento da linha premaxilar, MCIO= maior comprimento interno da órbita, MAIO= maior altura interna da órbita, MLM= maior largura do mastoide, MLCO= maior largura dos côndilos oxipitais, MLPP= maior largura das bases do processo para-occipital, MLFM= maior largura do forâmen magno, LFM= menor largura frontal, MLEO= maior largura entre as órbitas, LMEO= largura mínima entre as órbitas, LZ= largura zigomática, MLEN= maior largura entre os nasais, MLPM= maior largura entre o premaxilar, MLP= maior largura do palatal, BCNS= basion – ponto mais alto da crista nugal.

2. Análises morfológicas de biometria e craniometria

2.1 Análises de biometria corporal

Nas análises de componentes principais das medidas corporais do topótipo de *M. sarae* e de outros indivíduos do gênero *Mazama*, machos e fêmeas foram colocados na mesma matriz (consideraram-se 12 medidas corporais presentes em todos os indivíduos analisados).

O escatograma dos dois primeiros componentes da PCA de 12 medidas biométricas (Figura 11) mostrou um aglomerado principal de pontos para espécies de pequeno porte: *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. temama*, *M. chunyi* e o topótipo de *M. sarae*, e outra aglomeração de pontos para todas as espécies de médio porte: *M. bororo*, *M. rufa*, *M. americana* e mais dois indivíduos de *M. gouazoubira*. Havendo uma mistura dos indivíduos de *M. gouazoubira* entre os grupos.

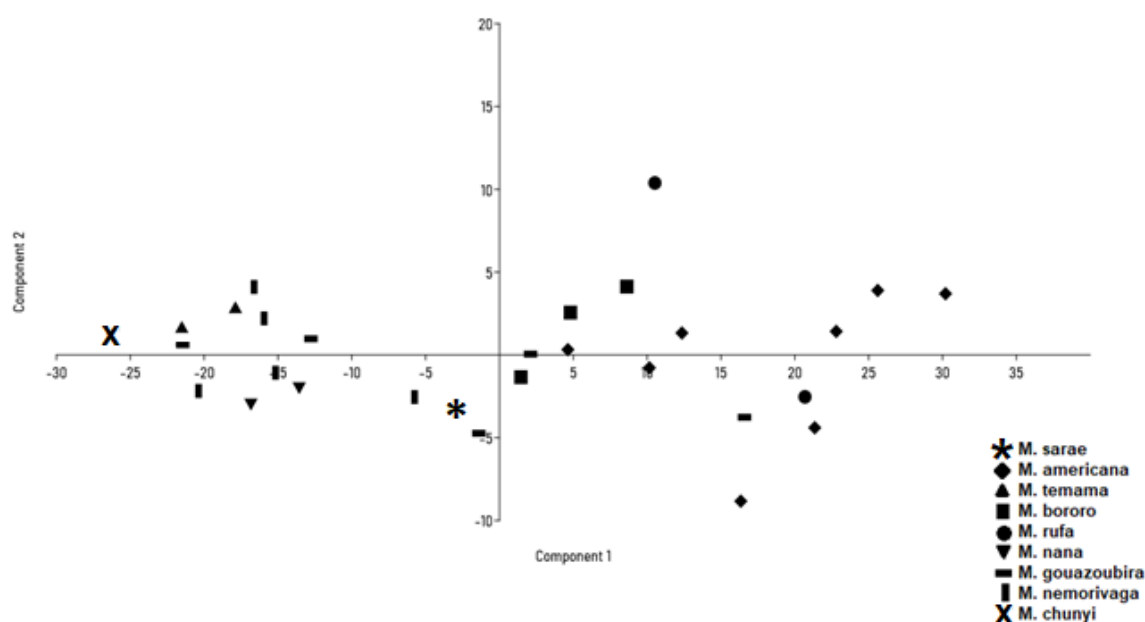


Figura 11. Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas corporais de indivíduos de *Mazama* provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de *M. sarae* analisado neste estudo. Bootstrap 1000.

Os dois primeiros componentes principais acumularam 94,14% da variância da matriz de dados (Tabela 1, Apêndice F). Pelo fato das cargas do primeiro componente (PC1) terem sido iguais (positivas), o PC1 é interpretado como um eixo que mostrou principalmente as diferenças de tamanho entre os indivíduos. Quatro medidas (CCO, ALT, TX, PP) tiveram as maiores cargas em PC1. Algumas cargas sobre o segundo componente (PC2) são negativas e outras positivas, por esse motivo, o PC2 foi interpretado como um eixo que mostrou principalmente diferenças nas proporções corporais entre os espécimes. Neste componente (PC2), as medidas com cargas maiores foram TX e ALT (cargas positivas) e CCO (carga negativa).

A árvore de distância morfológica feita a partir das medidas biométricas dos indivíduos (Figura 12) mostrou a formação dois cladogramas principais. Um grupo representando as espécies de pequeno porte: *M. temama*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. chunyi* e o topótipo *M. sarae*, e no segundo clado são agrupadas as espécies de médio porte: *M. americana*, *M. rufa*, *M. bororo* e dois indivíduos de *M. gouazoubira*. Apesar dos agrupamentos representarem as espécies de pequeno e médio porte, houve uma mistura dos indivíduos de *M. gouazoubira*.

A árvore de distância morfológica mostra claramente uma mistura entre todos os indivíduos que são citogenética e molecularmente distintos, evidenciando assim que a individualização das populações do gênero *Mazama* é impraticável pelos caracteres biométricos.

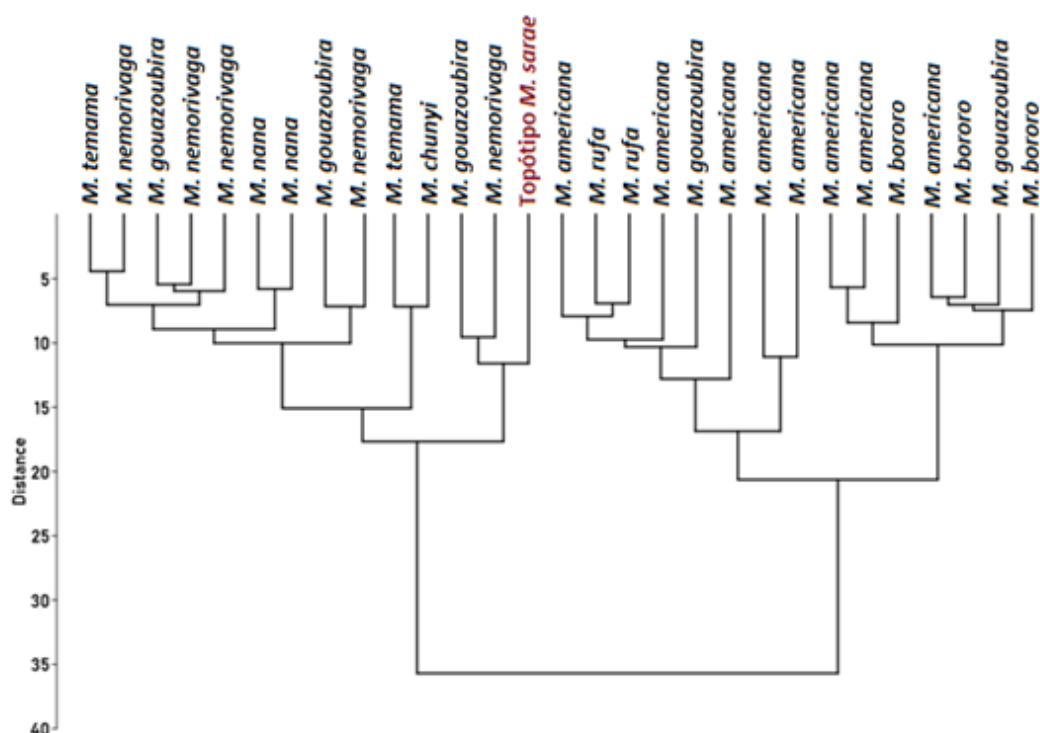


Figura 12. Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 12 medidas corporais tomadas do topótipo de *M. sarae* e de outras espécies do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. temama*, *M. bororo*, *M. rufa*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. chunyi* e *M. nana*).

2.2 Análises de craniometria

Nas análises de componentes principais das medidas cranianas do topótipo de *M. sarae* e de outros indivíduos do gênero *Mazama*, machos e fêmeas foram colocados na mesma matriz (consideraram-se 36 medidas cranianas presentes em ambos os sexos).

O escatograma dos dois primeiros componentes da PCA de 36 medidas cranianas (Figura 13) mostrou um padrão de aglomeração de pontos para espécies de pequeno porte: *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. temama*, *M. chunyi*, o topótipo de *M. sarae* e três indivíduos de *M. bororo*, e outra aglomeração de pontos para todas as espécies de médio porte: *M. rufa*, *M. americana* e *M. bororo*. Havendo uma mistura dos indivíduos de *M. bororo* entre os grupos.

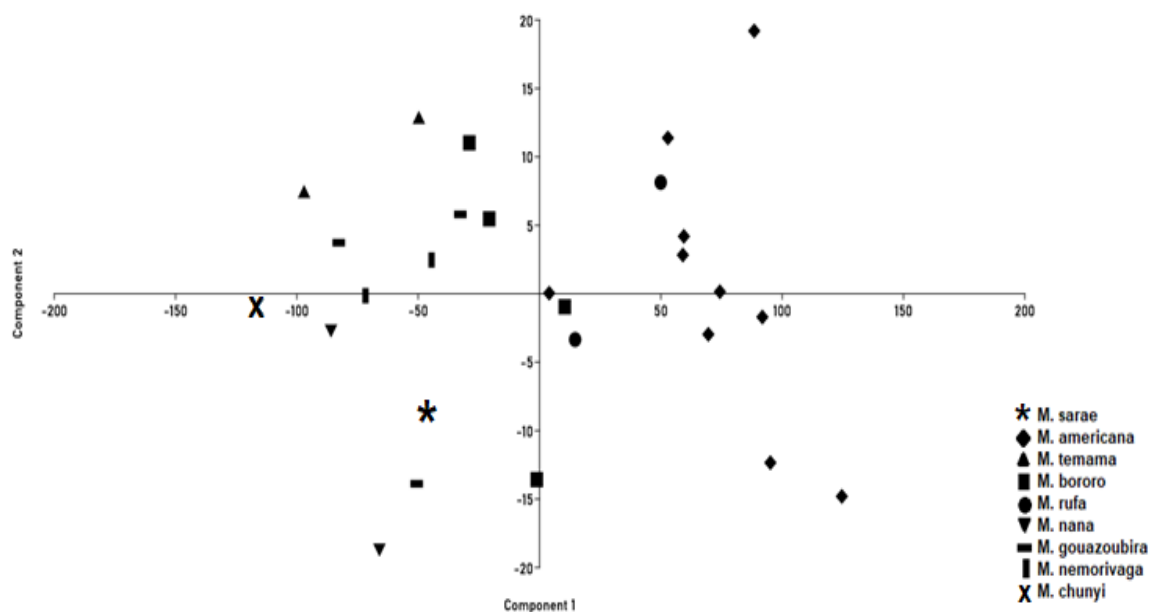


Figura 13. Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas cranianas de indivíduos de *Mazama* provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de *M. sarae* analisado neste estudo. Bootstrap 1000.

Os dois primeiros componentes principais acumularam 94,87 % da variância da matriz de dados (Tabela 2, Apêndice F). As medidas comprimento total (CT) e lambda – prosthion (LP) tiveram as maiores cargas no primeiro componente (PC1), sendo que a maior parte da variação entre os indivíduos é devida ao tamanho. A medição com maior carga no segundo componente (PC2) foi o maior comprimento dos nasais (MCN), e como as variáveis dentro desse componente possuíram escores com sinais opostos, o alto contraste está relacionado com a forma

A árvore de distância (Figura 14), construída pelo método UPGMA utilizando os caracteres cranianos, assim como na PCA, mostrou dois grupos separados, um grupo representando as espécies de pequeno porte: *M. temama*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. chunyi*, o topótipo de *M. sarae* e alguns indivíduos de *M. bororo*, *M. americana* e *M. rufa*, no outro grupo encontramos o resto de indivíduos das espécies de médio porte: *M. americana* e *M. rufa*. Apesar dos agrupamentos representarem as espécies de pequeno e médio porte, houve uma mistura dos indivíduos de *M. bororo*, *M. americana* e *M. rufa*.

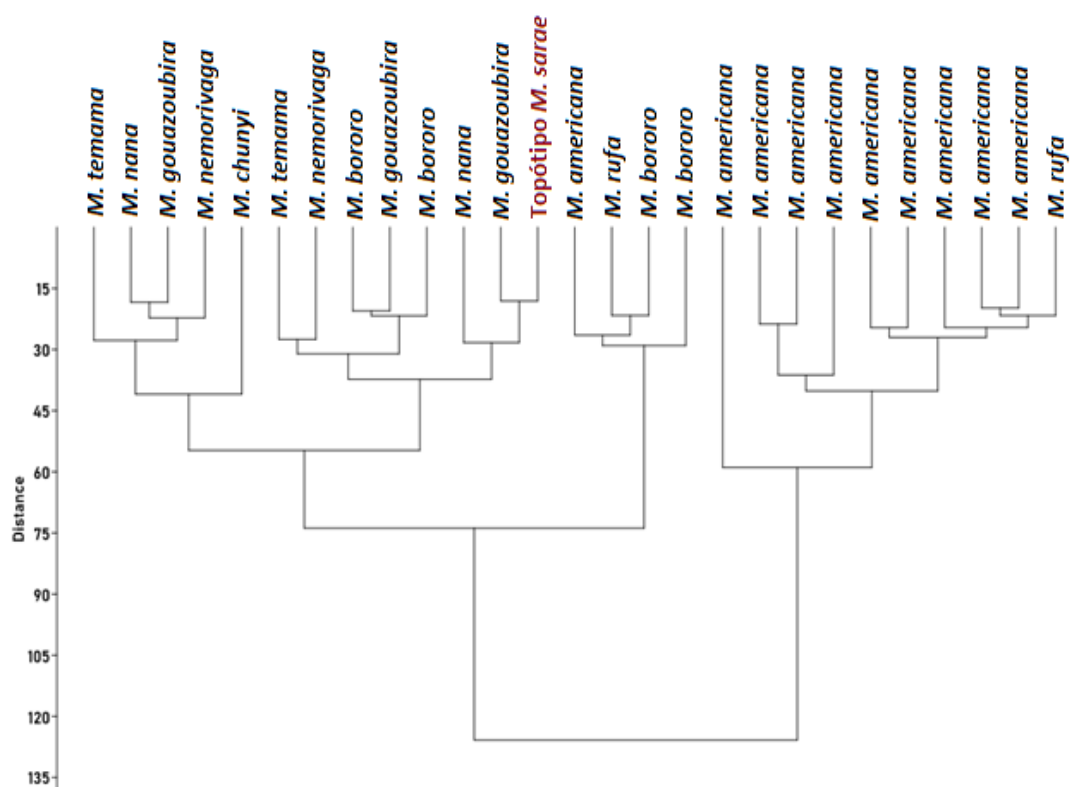


Figura 14. Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 36 medidas cranianas tomadas do topótipo de *M. sarae* e de outras espécies do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. temama*, *M. bororo*, *M. rufa*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. chunyi* e *M. nana*).

3. Citogenética

3.1 Coloração convencional

O topótipo coletado apresentou um cariótipo de $2n=52$, $NF=64 + 4-5Bs$, com 25 pares de cromossomos autossômicos e 1 par correspondente aos cromossomos sexuais "XY". A biometria feita sob coloração convencional permitiu classificar os cromossomos de acordo com o seu comprimento relativo de braços (CR), sendo que o grupo A é composto pelos pares 1 a 3, o grupo C pelos pares 4 e 5, o grupo D pelos pares 6 e 7, e o grupo E pelos pares 8 a 25. O cromossomo X se apresentou como um cromossomo grande metacêntrico e o Y como um pequeno metacêntrico (Figura 15).

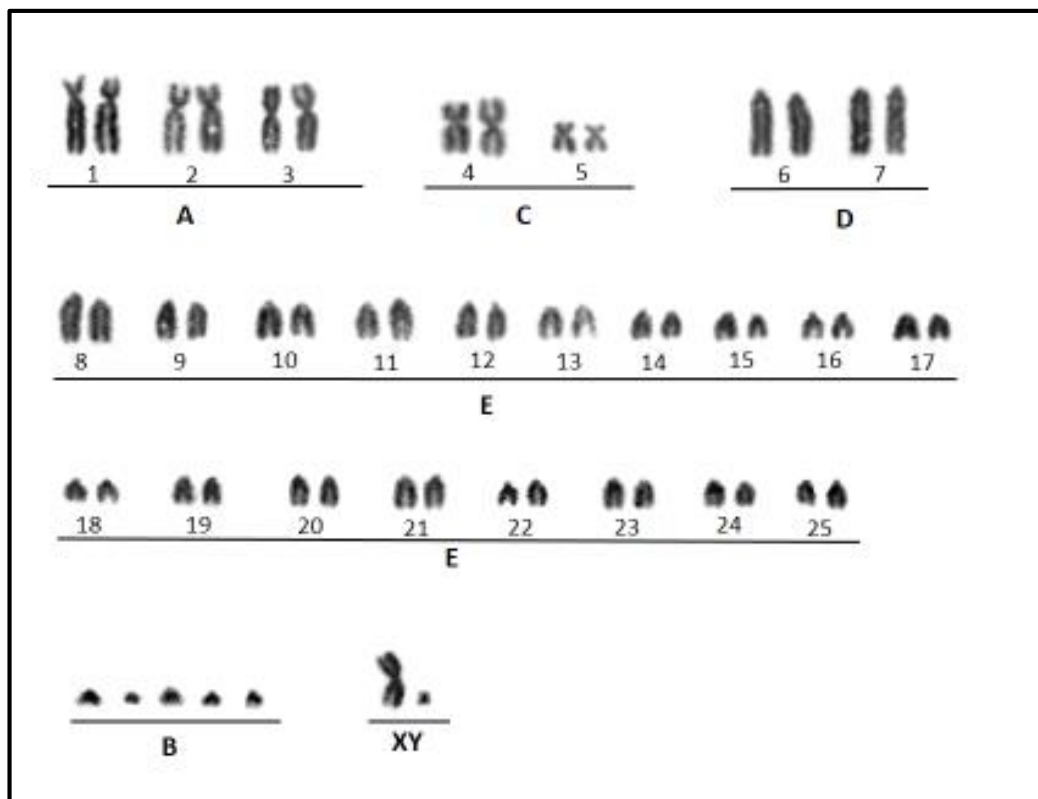


Figura 15. Cariótipo do topótipo macho de *M. sarae* ($2n=52$, $NF= 64 + 5Bs$) sob coloração convencional de Giemsa.

3.2 Bandamento C

Foi possível visualizar blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos. Os pares 2, 3, 6 e 7 apresentaram este padrão e uma discreta marcação de heterocromatina intersticial na região terminal dos braços longos de cada par. Tal característica é, possivelmente, o vestígio de um rearranjo tipo fusão em tandem. Em relação aos cromossomos sexuais, o cromossomo X apresentou uma marcação heterocromática na região centromérica sendo que o cromossomo Y mostrou-se eucromático. Os cromossomos B apresentaram-se dois heterocromáticos e os outros dois eucromáticos (Figura 16).

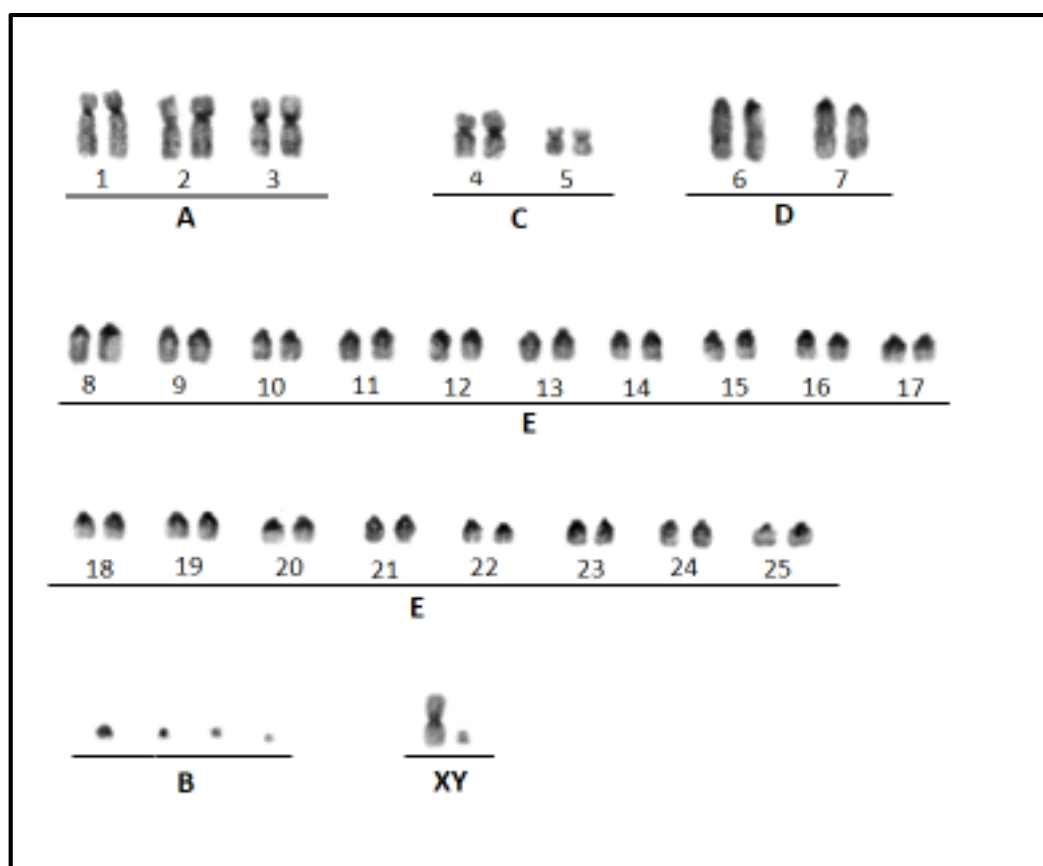


Figura 16. Cariótipo do topótipo macho de *M. sarae* T411 (2n=52, NF= 64 +4Bs) sob Bandamento C.

3.3 Coloração de Ag-NOR

Com a coloração Ag-NOR foi observado que no topótipo a região organizadora do nucléolo está localizada na região telomérica dos braços longos dos 2 cromossomos do par 8 (Figura 17) e também foram encontradas metáfases com marcação na região telomérica do braço longo de um cromossomo do par 7 e de um cromossomo do par 12 (Figura 18).

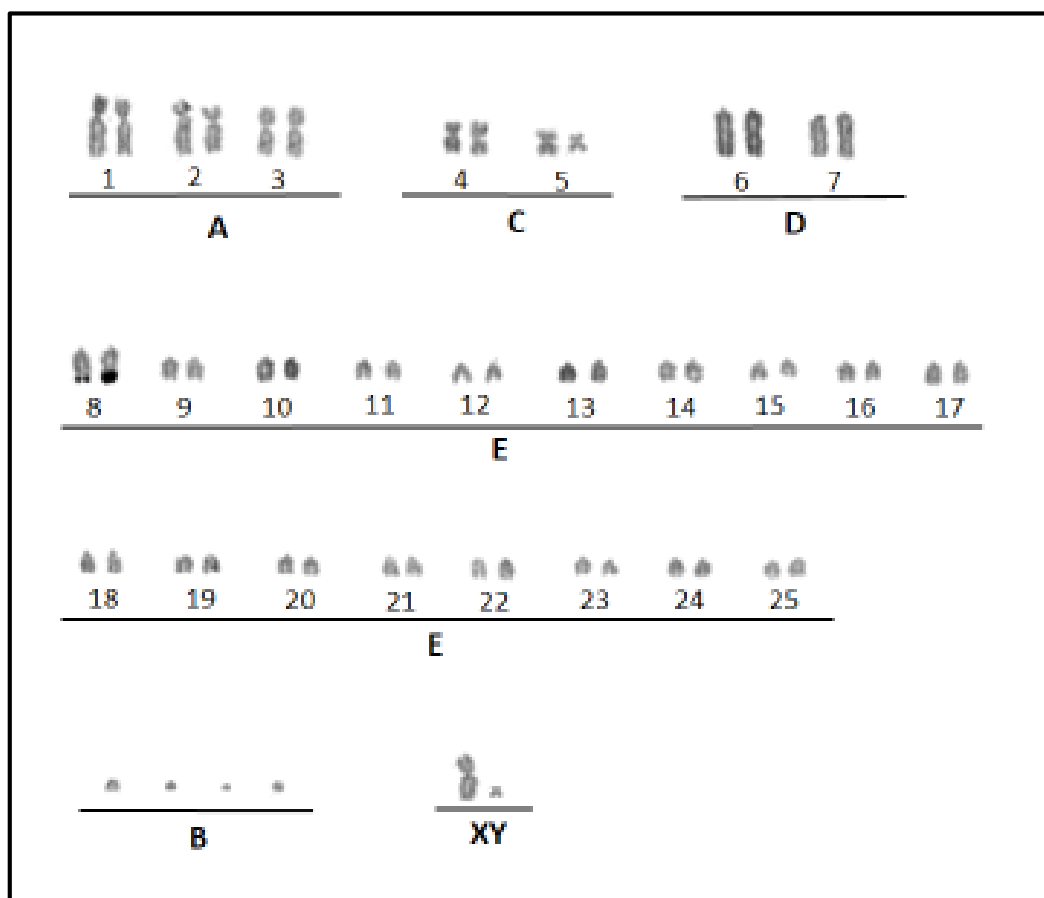


Figura 17. Cariótipo do topótipo macho de *M. sarae* T 411 ($2n=52$, $NF= 64 +4Bs$) sob coloração Ag-RON com dois regiões organizadoras de nucléolo.

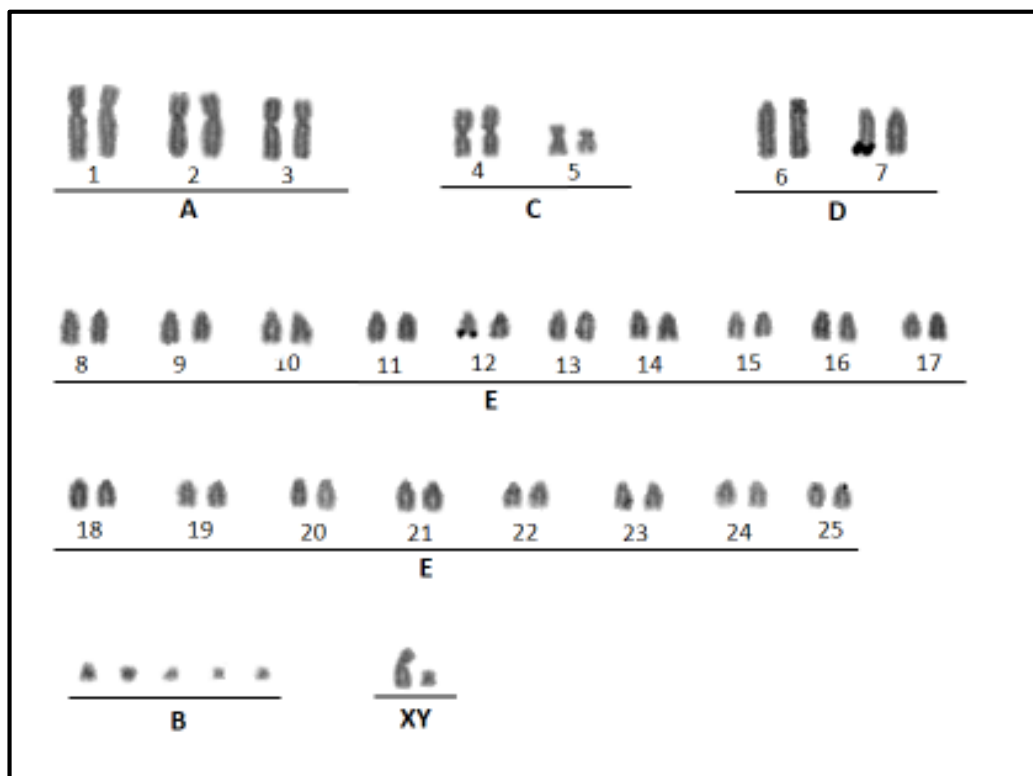


Figura 18. Cariótipo do topótipo macho de *M. sarae* T 411 ($2n=52$, $NF= 64 +5Bs$) sob coloração Ag-NOR com dois regiões organizadoras de nucléolo.

3.4 Bandamento G

A técnica de Bandamento G permitiu o pareamento correto dos cromossomos homólogos e a possibilidade de averiguar possíveis translocações e fusões, fatos que não ocorreram no estudo em questão (Figura 19 A e B).

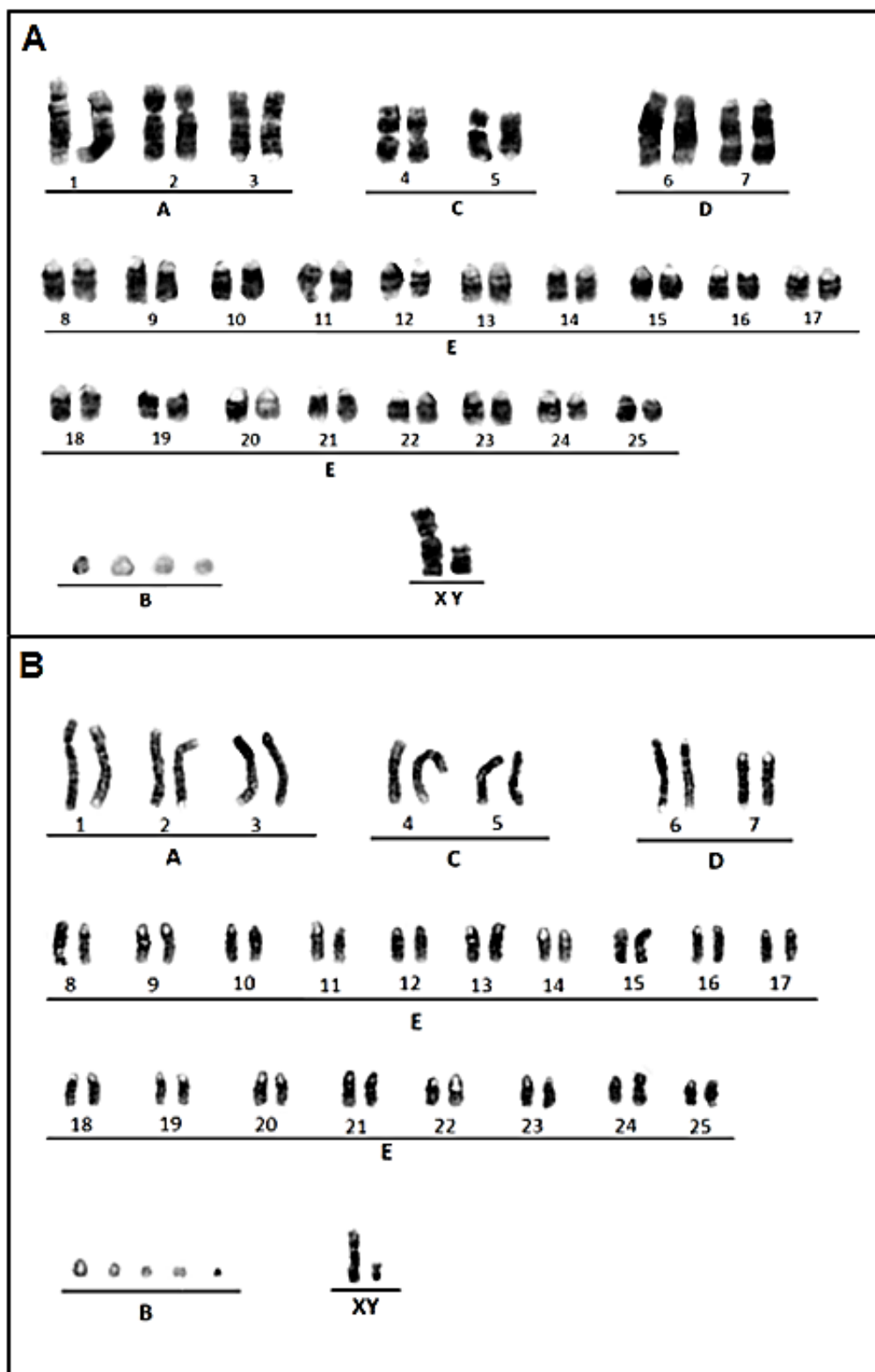


Figura 19. Cariótipos do topótipo macho de *M. sarae* T 411 ($2n=52$, $NF=64+ 4-5Bs$) A e B sob Bandamento G.

4. Análise do Mitogenoma

Na análise da Inferência Bayesiana (IB) o esquema de partições gerou 61 subset: HKY+I; Subset1, etc. A análise da Máxima Verossimilhança (MV) permite apenas um único modelo de heterogeneidade de taxa em análises particionadas: GTR+G+I. As topologias obtidas nas análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança da matriz dos mitogenomas alinhados foram congruentes e com alto suporte.

A tribo Odocoileini de cervídeos neotropicais foi dividida em dois clados principais, denominados subtribo Blastocerina e subtribo Odocoileina, segundo Heckeberg et al., (2016).

A subtribo Blastocerina foi composta pelas seguintes espécies: *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *B. dichotomus*, *O. bezoarticus* e *H. antisensis*. A subtribo Odocoileina compreendeu as espécies: *M. americana*, *M. bororo*, *M. nana*, *M. temama*, *M. rufina*, *M. rufa*, o topótipo estudado de *M. sarae*, *O. virginianus* e *O. hemionus*. No geral, a separação das subtribos Blastocerina e Odocoileina foi bem suportada pelos índices de suporte de ambas análises.

Assim, foi evidenciado que o topótipo de *M. sarae* encontra-se agrupado dentro da subtribo Odocoileina, estando mais próximo dos citótipos de *M. americana* com menor número cromossômico (citótipos Acre e Juína), bem como com os espécimes de *M. nana* e *M. bororo*, com alta probabilidade posterior e bootstrap (100%) nas análise de Inferência Bayesiana e na de Máxima Verossimilhança (Figura 20 e 21).

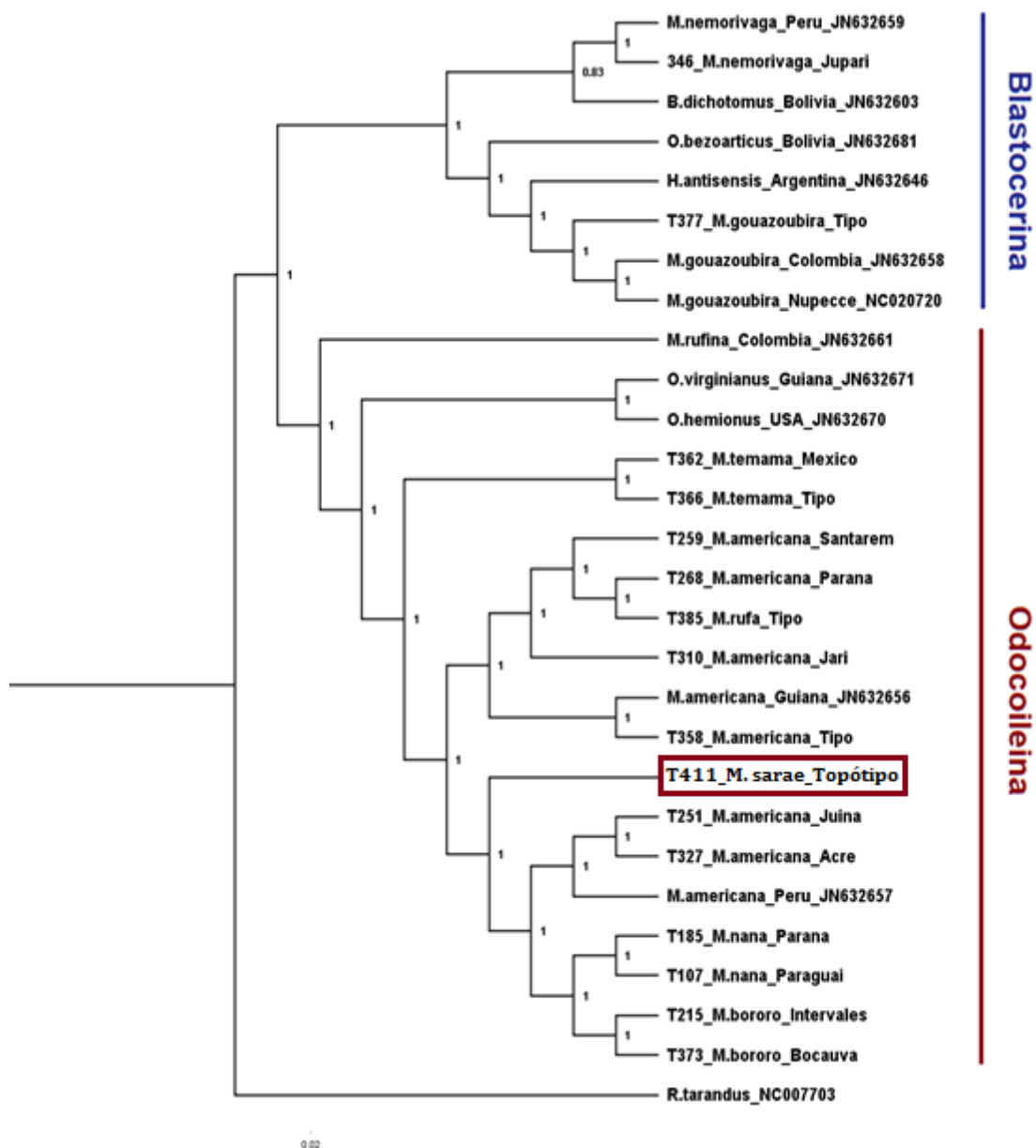


Figura 20. Árvore filogenética do genoma mitocondrial. Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

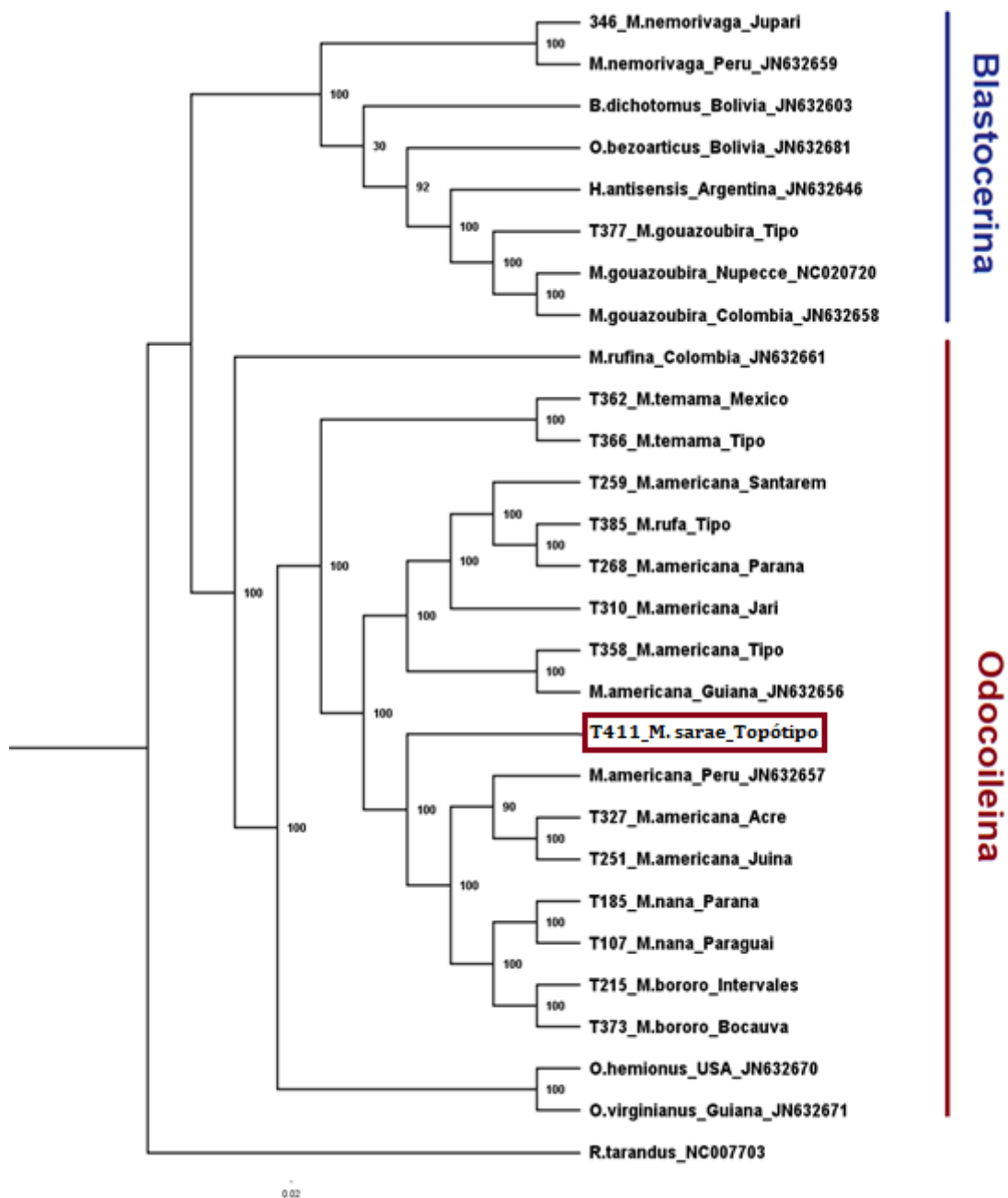


Figura 21. Árvore filogenética do genoma mitocondrial. Análise de Máxima Verossimilhança (ML). Os valores representam o “bootstrap” da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

DISCUSSÃO

1. Análise morfológica

Analisando caracteres morfológicos externos das espécies de *Mazama*, como mencionado por Rossi (2000) e Duarte et al., (2008), percebe-se que as diferentes espécies do gênero *Mazama* tem uma grande similaridade morfológica, tornando-se difícil diferenciar as espécies apenas pelos caracteres morfológicos.

M. sarae foi caracterizada por Thomas (1925) como uma espécie do gênero *Mazama* pertencente ao grupo vermelho e de menor porte, posteriormente foi considerada uma subespécie de *M. americana* (Cabrera, 1960) e, finalmente, baseado em Grubb (2005), como sinônimo de *M. americana* Erxleben, 1777 (Varela et al., 2010).

Na descrição morfológica, com base no padrão de cores e regiões cromogenéticas, o espécime analisado apresentou características semelhantes com a única descrição para *M. sarae* dada por Thomas (1925): Cor geral da pelagem marrom avermelhada, mas a cabeça e o pescoço são de um cinza entre claro e escuro (diferente da edição mas pálida ou marrom de outras espécies vermelhas), presença de pelos mais densos e compridos na região caudal do corpo, pelos antevertidos na nuca, e parte superior do focinho enegrecida, com uma mancha branca no lábio superior e inferior. Importante ressaltar que essas distinções podem ser características individuais do espécime e não características de *Mazama sarae*, sendo necessária uma análise populacional.

No escatograma dos dois primeiros componentes principais (PCA) e na árvore de distância morfológica das análises de biometria corporal e craniometria, o espécime de *M. sarae* se agrupa no clado dos *Mazama* de menor tamanho, possuindo uma massa de 16,150 kg, altura de 60,5 cm, comprimento do corpo de 79,5 cm, e comprimento total do crânio de 179,73 mm, sendo as medidas mais representativas.

Neste estudo, avaliando-se medidas cranianas e corporais, não foi possível a discriminação ou identificação de um padrão morfológico para *M. sarae*, considerando que foi analisado só um exemplar da espécie. Entretanto, pode-se observar que nas análises morfológicas *M. sarae* se separa de *M. americana* (sensu lato) de forma clara,

mesmo com as limitações desta técnica para diferenciação de espécies do gênero *Mazama*. Assim, a morfologia sugere que *M. sarae* não pertence à mesma entidade de *M. americana*.

2. Análise citogenética

O polimorfismo cromossômico encontrado em *Mazama americana* pode indicar a existência de várias espécies crípticas dentro dos veados vermelhos. Assim, torna-se muito provável a existência de mais de uma espécie no que se define como *M. americana* (Duarte et al., 2008; Gutierrez et al., 2017).

O padrão cariotípico apresentado para o topótipo de *M. sarae* foi de $2n=52$, $NF=64 + 4-5Bs$, diferente do neótipo de *M. americana* ($2n=45$, $NF=50 + 3Bs$) (Rincón et al., 2020), e das variantes conhecidas de veado-mateiro no Brasil. Outro estudo feito com indivíduos de *M. americana* da bacia do Rio Paraná encontrou um cariótipo de $2n=52$, $NF= 56 + 4-6Bs$, diferente da espécie tipo, levando à revalidação para a espécie *M. rufa* (Luduvério, 2018).

Em relação aos cromossomos sexuais, o topótipo macho de *M. sarae* apresentou um sistema sexual simple XY, diferente dos cromossomos sexuais da espécie *M. americana* (incluindo as variantes) e de *M. rufa*, que formam um sistema sexual múltiplo nos machos XY1/Y2, proposto por Neitzel (1987), que sugeriu que este sistema sexual foi produto de uma fusão X-autossômica.

Comparando-se o número diploide ($2n$) entre as variantes estudadas no Brasil, observa-se a aproximação do topótipo de *M. sarae* ao grupo dos indivíduos com alto número cromossômico ($2n= 49-53$) que ocorrem na região leste da Amazônia (estado do Pará e Maranhão) e na Mata Atlântica; os 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).

Assim, *M. sarae*, por apresentar o maior número diplóide, é considerado o padrão cariotípico mais próximo do citótipo Paraná ($2n=52/53$ e $NF=56$) que foi reclassificado como *M. rufa*, havendo uma variação notável no número fundamental de braços cromossômicos (NF), sendo maior em *M. sarae*.

Essa diferença cariotípica, certamente proporciona uma barreira pós-zigótica entre *M. americana* e *M. sarae* e entre *M. sarae* e os outros citótipos conhecidos como foi provado por Salviano et al., (2017) e Cursino et al., (2014), sendo a prole de cruzamentos de *M. americana* citótipo Paraná com outros citótipos do Brasil inférteis ou sub-férteis.

O uso das técnicas de bandamentos cromossômicos (C, G) e coloração Ag-NOR do topótipo estudado, permite estabelecer pela primeira vez um padrão cromossômico para *M. sarae*, a ser considerado em posteriores comparações e estudos citogenéticos. No caso do Bandamento C; além de apresentar blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos, foi visualizada uma discreta marcação de heterocromatina intersticial na região terminal dos braços longos de cada cromossomo dos pares 2,3,6 e 7. As marcas intersticiais podem ser vestígios de rearranjos do tipo fusão que aconteceram anteriormente, principalmente quando consideramos a redução do número de cromossomos como uma "tendência" para o processo de evolução cariotípica da família.

Dessa forma, sendo a citogenética determinante para a definição taxonômica do gênero *Mazama*, os resultados obtivos eleva *M. sarae* ao nível de espécie.

3. Análise filogenética

As análises filogenéticas de *M. americana* mostram uma origem polifilética para a espécie (Duarte et al., 2008; Gutierrez et al., 2017), fato que é corroborado com os dados apresentados por análises citogenéticas, pelas quais é definido *M. americana* como uma superespécie (Abril et al., 2010).

Foram realizadas análises filogenéticas da sequência do mitogenoma gerado para o topótipo *M. sarae* e de diferentes espécies de cervídeos neotropicais, para obter uma avaliação preliminar da posição do exemplar coletado neste estudo em relação aos demais já avaliados quanto ao posicionamento filogenético.

As topologias apresentadas em ambas as análises (Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança) foram semelhantes, mostrando uma distância considerável entre *M. sarae* e *M. americana* (sensu stricto) e *M. rufa*, se aproximando mais dos *M.*

americana de número diplóide baixo (citótipos Acre e Juína), bem como os espécimes de *M. nana* e *M. bororo*.

O fato de existir somente um indivíduo de *M. sarae* impede um posicionamento em termos de grupos monofiléticos, sendo necessária a inclusão de outros indivíduos de *M. sarae* em futuras análises filogenéticas.

CONCLUSÕES

O presente trabalho caracterizou um topótipo da espécie *M. sarae*, que apresentou características morfológicas de acordo com a descrição do holótipo de *M. sarae* Thomas, 1925. Segundo as análises craniométricas e biométricas, o espécime foi agrupado com as espécies de *Mazama* de menor porte (*M. temama*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira* e *M. chunyi*).

Citogeneticamente, *M. sarae* apresentou um padrão citogenético diferente do apresentado para o neótipo de *M. americana*, dos diferentes citótipos estudados no Brasil e da espécie *M. rufa*, evidenciando assim a existência de um cariótipo único (não antes conhecido) para a espécie *M. sarae*. As diferenças encontradas para as demais espécies e variantes de *M. americana* a posicionam claramente como uma espécie distinta.

Os resultados filogenéticos para o topótipo analisado demonstram claramente a distância filogenética de *M. sarae* em relação a *M. americana* e as outras espécies do gênero, que é corroborado com os resultados apresentados pelas análises citogenéticas.

Todas as análises morfológicas, citogenéticas e filogenéticas separaram a espécie *M. sarae* de *M. americana*, previamente considerada como sinônimo da mesma e confirmando que trata-se de espécies independentes.

Assim, propõe-se que o topótipo aqui estudado pertence à espécie *Mazama sarae* e os dados citogenéticos e moleculares devem ser utilizado como padrão da espécie.

REFERÊNCIAS

ABRIL, V. V.; CARNELOSSI, E. A. G.; GONZALES, S.; DUARTE J. M. B. Elucidating the evolution of the red brocket deer *Mazama americana* complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic Genome Research**, v. 128, p. 177–187, 2010.

BIOMATTERS LTD. Genius Prime. Auckland, Nova Zelândia, 2018. Disponível em: <https://www.geneious.com>.

CABRERA, A. Catálogo de los mamíferos de América del Sur. **Revista Museo Argentino Bernardino Rivadavia**, Argentina, v. 4, p. 309-732, 1960.

DRIESCH, A. A guide to the measurement of animal bones from archaeological sites. Harvard University, **Peabody Museum of Archaeology and Ethnology**, Peabody Museum Bulletin 1, 1976.

DUARTE, J. M. B.; RAMALHO, M. F. D. T.; LIMA, V. F.H.; JORGE, W. A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 22, n.3, p.399-400, 1999.

EISEMBERG, J. F. Mammals of the neotropics. Vol. I. **University of Chicago Press**, Chicago, 449p, 1989.

FELSENSTEIN, J. Confidence intervals on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: Wilson DE, Reeder DM, editors. **Mammal species of the world**. 3rded. Baltimore: Johns Hopkins University Press, p. 629-722, 2005.

HAMMER Φ .; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. 4(1): 9pp. Disponível em: <http://palaeo-eletronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>, **Paleontologia Electronica**, 2001.

HASSANIN, A.; DELSUC, F.; ROPIQUET, A.; HAMMER, C.; VAN VUUREN, B. J.; MATTHEE, C.; RUIZGARCIA, M.; CATZEFLIS, F.; ARESKOU, V.; NGUYEN, T. T.; COULOUX, A. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus Biologies** 335:32-50, 2012.

HERSHKOVITZ, P. Neotropical deer (Cervidae). Part I. Pudu, genus Pudu Gray. Fieldiana, **Zoology, news series**, v. 11, p. 1-86, 1982.

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Y. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

IUCN. IUCN Red List Threatened Species. IUCN Red List Unit, International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, Cambridge, United Kingdom, 2016. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org>>.

LANFEAR, R.; FRANDBSEN, P. B.; WRIGHT, A. M.; SENFELD, T.; CALCOTT, B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular biology and evolution**, 2016. DOI: [dx.doi.org/10.1093/molbev/msw260](https://doi.org/10.1093/molbev/msw260).

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-219, 1964.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in Proceedings of the Gateway **Computing Environments Workshop (GCE)**, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA p. 1-8, 2010.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: Karyotypic and molecular aspects. Em: OBE G, BASLER A. **Cytogenetics: Basic and applied aspects**. Berlin, Springer Verlag, p. 90-112, 1987.

RAMBAULT, A. Figtree v1.3.1. Computer program and documentation, 2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>

REES, J. W. Morphologic variation in the cranium and mandible of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a comparative study of geographical and four biological distances. **Journal of Morphology**, v. 128, p. 95-112, 1969.

RIBEIRO, A. M. Os veados do Brasil segundo as coleções Rondon e de varios museus nacionais e estrangeiros. **Rev. Museu Paulista**, 11:209-308, 1919.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology** 61:539-542, 2012.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla; Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 174, 2000.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Press**, New York, 1989.

SEABRIGHT, M. A rapid banding technique for human chromosomes. **The Lancet**, v. 1, p. 971-972, 1971.

SNEATH, P.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical taxonomy**. San Francisco, W. H. Freeman and Company. USA. 1973.

STAMATAKIS, A. "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". In **Bioinformatics**, 30:1312–1313, 2014.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

THOMAS, O. The Spedan Lewis South American exploration. On mammals from Southern Bolivia. **Ann. Mag. Nat. Hist**, series 9, p. 581-582, 1925.

TOMAZELLA, I. M.; ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. 2017 Identifying *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae) chromosomes involved in rearrangements induced by doxorubicin. **Genet Mol Biol**, 40:460- 467.

VARELA, D. M.; TROVAT, I. R. G.; GUZMAN, K. R.; ROSSI, R. V.; DUARTE, J. M. B. Red brocket deer *Mazama americana* (Erleben 1777), in: Duarte, J. M. B., González, S. (Eds.) **Neotropical Cervidology**. IUCN/FUNEP, Jaboticabal, p. 151-159, 2010.

VERMA, R. S., BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**. McGraw Hill, New York, 2. Ed., 1995, 419p.

WADA, K.; NAKAMURA, M.; NISHIBORI, M.; YOKOHAMA, M. The complete nucleotide sequence of mitochondrial genome in the reindeer (*Rangifer tarandus*) and red deer (*Cervus elaphus*). **National Center for Biotechnology Information**, NIH, Bethesda, USA. 2010.

CAPÍTULO 3 - Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de

Mazama chunyi

RESUMO

Entre os cervídeos neotropicais, existe um grupo de formas anãs, alocadas nos gêneros *Pudu* e *Mazama*, que habitam as florestas montanhosas andinas. *Mazama chunyi* Hershkovitz, 1959 (Cocapunco, La Paz, Bolívia), é considerado o único veado anão que ocorre no sudeste do Peru e noroeste da Bolívia e é atualmente definido como espécie única, apesar de ter descrições baseadas só em características morfológicas sem nenhuma informação citogenética e com informações filogenéticas escassas, gerando grandes confusões taxonômicas. Assim, o objetivo do estudo foi caracterizar um topótipo de *M. chunyi*, desde o ponto de vista morfológico (biometria corporal, padrões de coloração da pele, craniometria), citogenético (coloração convencional Giemsa, biometria cromossômica, Bandamento C, coloração Ag-NOR) e molecular (análises filogenéticas de três genes mitocondriais). Os resultados morfológicos posicionam o espécime de *M. chunyi* no clado dos pequenos *Mazama*. Segundo padrões citogenéticos, o topótipo da espécie não se enquadra em nenhuma variante de espécies de *Mazama* atualmente conhecidas. As árvores filogenéticas geradas para o topótipo de *M. chunyi*, posiciona a espécie dentro da subtribo Blastocerina, próximo ao haplogrupo monofilético formado pelos espécimes de *M. gouazoubira*. Assim, os resultados obtidos permitem a caracterização de *M. chunyi*, com propostas de novos padrões moleculares e citogenéticos para a espécie a partir do topótipo avaliado.

Palavras-Chave: cervidae, cromossomos, DNA, genes mitocondriais, incertezas taxonômicas, veados.

INTRODUÇÃO

Entre os cervídeos neotropicais, existe um grupo de formas anãs, alocadas nos gêneros *Pudu* e *Mazama*, cujo pequeno tamanho e chifres reduzidos parecem ser adaptações para se mover pelo denso sub-bosque das florestas montanhosas andinas que habitam (Redford e Eisenberg, 1992). No gênero *Mazama*, estas formas anãs compreendem a espécie *M. rufina* Pucheran, 1851 (Vale do Lloa, Equador) restrito as florestas da Colômbia e Equador; *M. bricenii* Thomas, 1908 (Mérida, Venezuela) na Venezuela e Colômbia; e *M. chunyi* Hershkovitz, 1959 (Cocapunco, La Paz, Bolívia) (Figura 1), que é considerado o único veado anão que ocorre no sudeste do Peru (Cuzco, Puno e Madre de Dios) e noroeste da Bolívia (La Paz e Cochabamba), com base em locais isolados de espécimes de museus e raros avistamentos na natureza (Rumiz e Pardo, 2010) (Figura 2). Para esta espécie, foi proposto o status de Vulnerável de acordo os critérios de ameaça da IUCN (Rumiz e Barrio 2016).



Figura 1. Chuñi (*Mazama chunyi*). Foto: Carlos Gussoni - Inaturalist.

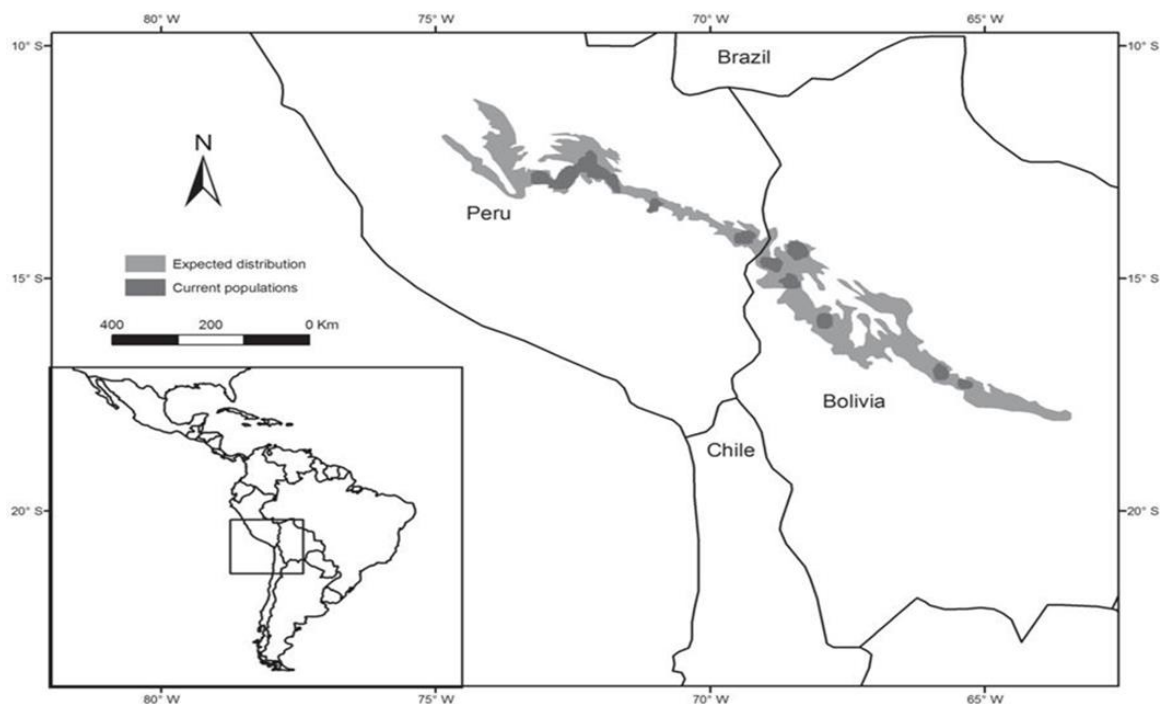


Figura 2. Faixa estimada de *Mazama chunyi* e populações atualmente conhecidas no Peru e Bolívia. Rumiz et al. (2007).

A espécie *M. chunyi* recebeu diferentes nomes e status taxonômicos, sendo descrita inicialmente por Hershkovitz (1959) na Bolívia, posteriormente Anderson (1997) a considerou como subespécie de *M. bricenii* Thomas, 1908. Mais tarde, Mattioli (2011) listou *M. bricenii* e *M. chunyi* como subespécies de *M. rufina* Pucheran, 1851, devido às enormes semelhanças fenotípicas; consideradas espécies menores do gênero *Mazama*, com 70-90 cm de comprimento cabeça-corpo e 45-50 cm de altura na cernelha, peso entre 10 e 15 kg, sendo *M. rufina* ligeiramente maior do que *M. bricenii* e *M. chunyi*. No caso de *M. rufina* e *M. bricenii*, a cor geral do corpo é avermelhada, muito semelhante a *M. americana* (Lizcano et al., 2010a; Lizcano et al., 2010b), e em *M. chunyi* a cor do corpo é marrom e os flancos avermelhados (Rumiz et al., 2007), mas a cabeça, pescoço e os quatro membros são enegrecidos nas três espécies (Rumiz et al., 2007; Lizcano et al., 2010a; Lizcano et al., 2010b).

Apesar das semelhanças morfológicas, há entre elas uma descontinuidade geográfica, já que *M. bricenii* está distribuído no oeste da Venezuela e no nordeste da Colômbia e, enquanto *M. rufina* ocorre ao longo dos Andes, da região central da Colômbia em direção ao Equador e o Norte do Peru (Weber e González, 2003; Lizcano et al., 2010), sendo essa uma distribuição intermediária entre *M. bricenii* e *M. chunyi*.

Este último é conhecido no sudeste do Peru e no noroeste da Bolívia, e a informação sobre a biologia e ecologia dessa espécie é escassa (Rumiz e Pardo, 2010). Todas as descrições de *M. chunyi* basearam-se em características morfológicas dos indivíduos coletados por Hershkovitz (1959,1982).

Embora tenha sido aceita a definição de *M. chunyi* como espécie única, análises filogenéticas têm sido escassas e controversas (Heckeberg et al., 2016; Gutiérrez et al., 2017) e, em cada caso, com base em uma única sequência de CIT-B (obtida de amostras depositadas nos Museus do Peru). Além disso, não existe cariótipo proposto para a espécie. Portanto, as dúvidas sobre a origem dos exemplares, as características taxonômicas, citogenéticas e moleculares gera a necessidade de conhecer aspectos genéticos de exemplares coletados na localidade tipo.

Por essas razões, o presente estudo teve como objetivo caracterizar um topótipo de *M. chunyi* Hershkovitz, 1959 desde o ponto de vista morfológico (biometria corporal, padrões de coloração da pele, craniometria), citogenético (coloração convencional Giemsa, biometria cromossômica, Bandamento C, coloração Ag-NOR) e molecular (análises filogenéticas de três genes mitocondriais).

MATERIAL E MÉTODOS

1. Permissão de coleta

O exemplar utilizado no estudo foi coletado em parceria com o Museu de História Natural Noel Kempff Mercado de Santa Cruz-Bolívia. A permissão de coleta foi outorgada pelo Ministerio de Medio Ambiente y Agua (MMAyA-Bolívia), e encontra-se na íntegra no Apêndice A. Todo o material foi devidamente autorizado como empréstimo para o seu estudo no Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) como exposto no Apêndice B.

2. Confirmação da existência do holótipo

Para poder confirmar a existência do holótipo de *M. chunyi* Hershkovitz, 1959 foi realizada uma busca online no Catálogo de tipos recentes de mamíferos do American Museum of Natural History (Nova Iorque-Estados Unidos), como exposto no apêndice D.

3. Obtenção do exemplar

A partir da realização de levantamento bibliográfico foi definida a localidade tipo da coleta de *M. chunyi* Hershkovitz, 1959 na localidade tipo; Cocapunco no departamento de La Paz, Bolívia. A coleta foi realizada em local próximo do local desejado, onde atualmente se tem registros do exemplar buscado.

A coleta do topótipo de *M. chunyi* foi realizada por caçadores locais, em Sacramento, “Estrada da Morte”, localidade de Yolosa, província Nor Yungas, departamento de La Paz, coordenadas 16°15'35"S 67°47'23"W a 98 km de distância da localidade tipo (Figura 3). Foi coletada uma fêmea adulta, no dia 11/03/2020.



Figura 3. Mapa da Bolívia com o ponto de coleta do topótipo de *M. chunyi* (Topótipo-La Paz), utilizado no estudo.

4. Procedimentos após a coleta do exemplar

Assim que o animal foi abatido e chegou às mãos da equipe de campo, foi realizada uma sequência de procedimentos para o aproveitamento completo:

4.1 Documentação fotográfica

O animal foi posicionado em decúbito lateral, em cima de um pano azul com o número da coleta. Foram tomadas fotos nas seguintes posições: a) Lateral, b) Ventral, c) Dorsal e d) Detalhe da lateral da cabeça.

4.2 Biometria corporal

Foi realizada uma avaliação morfológica do animal por meio de 13 medidas corporais: largura da cabeça (LC), comprimento da orelha (CO), distância entre olhos (DEO), metacarpo (MTC), altura (ALT), comprimento do corpo (CCO), comprimento da cauda (CCA), metatarso (MTT), perímetro do pescoço (PP), tórax (TX), abdômen (AB), comprimento da cabeça (CCB) e mandíbula (MB). Estas medidas foram tomadas com fita métrica e paquímetro, e a massa com balança pendular.

4.3 Biopsia de pele

Após tricotomia e antissepsia da face medial do membro pélvico, foi excisado um fragmento de 5 cm x 2 cm de pele que foi depositado em um tubo contendo meio de transporte (Meio McCoy's + 500 mg/L gentamicina + 200 mg/L anfotericina B) (Duarte et al., 1999), permanecendo sob refrigeração até a chegada ao laboratório de campo. Ali o fragmento de pele foi dividido em 10 fragmentos, que foram depositados em tubos criogênicos contendo meio de congelamento de peles (200 mL de Mc Coy's + 40 mL de soro equino + 12 mL de dimetil sulfóxido (DMSO) + 24 g de polyvinil + 100 mg/L sulfato de gentamicina + 4 mg/L anfotericina B) (Duarte et al., 1999). Esse material permaneceu por 4 horas sob refrigeração a 4°C 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.

4.4 Retirada e processamento da pele completa

A pele na sua íntegra, foi retirada do animal sendo então mergulhada em uma solução de limpeza (25mL de ácido acético glacial + 3L de água), onde permaneceu por 50 minutos e depois foi limpa com o uso de uma faca para retirar os resíduos musculares, gordura e fâscias. Posteriormente, a pele foi mergulhada em uma solução curtume para sua desidratação (500gr de sulfato de alumínio comercial + 500gr de cloreto de sódio + 3L de água), na qual permaneceu durante três dias. Depois do processo de curtume ela foi estendida na sombra e deixada para secar, massageando e esticando periodicamente para manter a flexibilidade. Depois de totalmente seca e amolecida, a superfície sem pelos da pele foi lixada para finalizar o processo, e a mesma foi acondicionada aberta para estudos morfológicos. Em princípio, a pele do topótipo foi depositada no Museu do NUPECCE que mantém uma importante coleção de cervídeos do gênero *Mazama*, com peles, crânios e pós-crânios de mais de 100 espécimes. Os números de catálogo para o topótipo de *M. sarae* foi NPC 145.

4.5 Coleta de fragmentos de órgãos e músculo

Foram coletadas amostras de tecido (músculo, fígado, rim, baço) para estudos moleculares. Fragmentos de 1 cm³ destes tecidos foram mergulhados em tubos com etanol absoluto, permanecendo à temperatura ambiente.

4.6 Preparação do crânio e pós-crânio

O esqueleto completo foi extraído no local de abate do animal e deixado em baldes com água durante duas semanas com frequentes trocas e limpezas. Depois esse material já completamente limpo e seco foi acondicionado em caixas plásticas e catalogado junto com as peles no mesmo Museu.

5. Relação de espécimes utilizados

O topótipo coletado de *M. chunyi* foi utilizado em todas as análises morfológicas, citogenéticas e moleculares. Para as análises biométricas e craniométricas foram utilizados exemplares do gênero *Mazama* depositados no banco de dados e no Museu do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos NUPECCE

(Tabela 1 e 2, Apêndice E). Para as análises moleculares de *M. chunyi*, foram analisadas 29 sequências de três genes mitocondriais (CIT-B, D-LOOP e ND5); as quais eram compostas pela sequência consenso do topótipo para os três genes, 2 sequências CIT-B obtidas do GenBank e mais 26 sequências subtraídas de mitogenomas (14 obtidos do GenBank e 12 gerados pelo NUPECCE), cujo código de acesso e dados da origem encontram-se disponíveis na Tabela 1.

Tabela 1. Relação de animais do NUPECCE e do GenBank utilizados para as análises filogenéticas de *M. chunyi*, com seu número de identificação do NUPECCE (ID), nome da espécie, origem, número de acesso do GenBank e fonte.

ID	Espécie	Origem	Gene			Concatenada	N° de acesso	Fonte
			Citb	D-loop	ND5			
427	<i>M. chunyi</i>	Topótipo (Bolívia)	X	X	X	X		NUPECC E
377	<i>M. gouazoubira</i>	Neótipo (Paraguai)	X	X	X	X		NUPECCE
386	<i>M. gouazoubira</i>	Matão- SP	X	X	X	X		NUPECCE
389	<i>M. gouazoubira</i>	Topótipo (Paraguai)	X	X	X	X		NUPECCE
82	<i>M. gouazoubira</i>	Engenho Grande- RS	X	X	X	X		NUPECCE
24	<i>M. nemorivaga</i>	Porto Velho, RO	X	X	X	X		NUPECCE
346	<i>M. nemorivaga</i>	Juruparí, PA	X	X	X	X		NUPECCE
411	<i>M. sarae</i>	Topótipo (Bolívia)	X	X	X	X		NUPECCE
358	<i>M. americana</i>	Neótipo (Guiana Francesa)	X	X	X	X		NUPECCE
385	<i>M. rufa</i>	Neótipo (Foz do Iguaçu; Brasil)	X	X	X	X		NUPECCE
366	<i>M. temama</i>	Neótipo (México)	X	X	X	X		NUPECCE
373	<i>M. bororo</i>	Bocaúva do Sul, PR	X	X	X	X		NUPECCE
107	<i>M. nana</i>	Paraguai	X	X	X	X		NUPECCE
	<i>M. gouazoubira</i>	NUPECCE	X	X	X	X	NC020720	Hassanin et al. 2012
	<i>M. gouazoubira</i>	Colombia	X	X	X	X	JN632658	Hassanin et al., 2012

	<i>M. nemorivaga</i>	Peru	X	X	X	X	JN632659	Hassanin et al., 2012
	<i>M. nemorivaga</i>	Guiana	X	X	X	X	JN632660	Hassanin et al., 2012
	<i>M. chunyi</i>	Peru	X				LT546655	Heckeberg et al., 2016
	<i>M. chunyi</i>	Peru	X				EEG297	Gutierrez et al., 2017
	<i>M. americana</i>	Peru	X	X	X	X	JN632657	Hassanin et al., 2012
	<i>M. Rufina</i>	Colombia	X	X	X	X	JN632661	Hassanin et al., 2012
	<i>P. puda</i>	Chile	X	X	X	X	JN632692	Hassanin et al., 2012
	<i>P. mephistophiles</i>	Colombia	X	X	X	X	JN632691	Hassanin et al., 2012
	<i>O. bezoarticus</i>	Bolivia	X	X	X	X	JN632681	Hassanin et al., 2012
	<i>O. hemionus</i>	USA	X	X	X	X	JN632670	Hassanin et al., 2012
	<i>O. virginianus</i>	Guiana	X	X	X	X	JN632671	Hassanin et al., 2012
	<i>B. dichotomus</i>	Bolivia	X	X	X	X	JN632603	Hassanin et al., 2012
	<i>H. antisensis</i>	Argentina	X	X	X	X	JN632646	Hassanin et al., 2012
	<i>R. tarandus</i>	USA	X	X	X	X	NC007703	Wada et al., 2010

6. Caracterização morfológica

Para as análises morfológicas de biometria corporal e craniometria foram considerados somente animais adultos e preferencialmente provenientes de vida livre e origem conhecida.

Foi realizada uma análise de componentes principais e de cluster no programa PAST 3.08 (Hammer et al., 2001), a partir das medidas corporais do topótipo,

comparadas com as medidas dos indivíduos do banco de dados do NUPECCE pertencentes as espécies *M. americana*, *M. temama*, *M. bororo*, *M. rufa*, *M. sarae*, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivagai*. Para isto, foram consideradas 12 medidas corporais encontradas na maioria dos indivíduos analisados.

As medidas do crânio foram tomadas, de acordo com o padrão de medições cranianas de cervídeos propostas por Rees (1969) e Driesch (1976) (Figura 4).

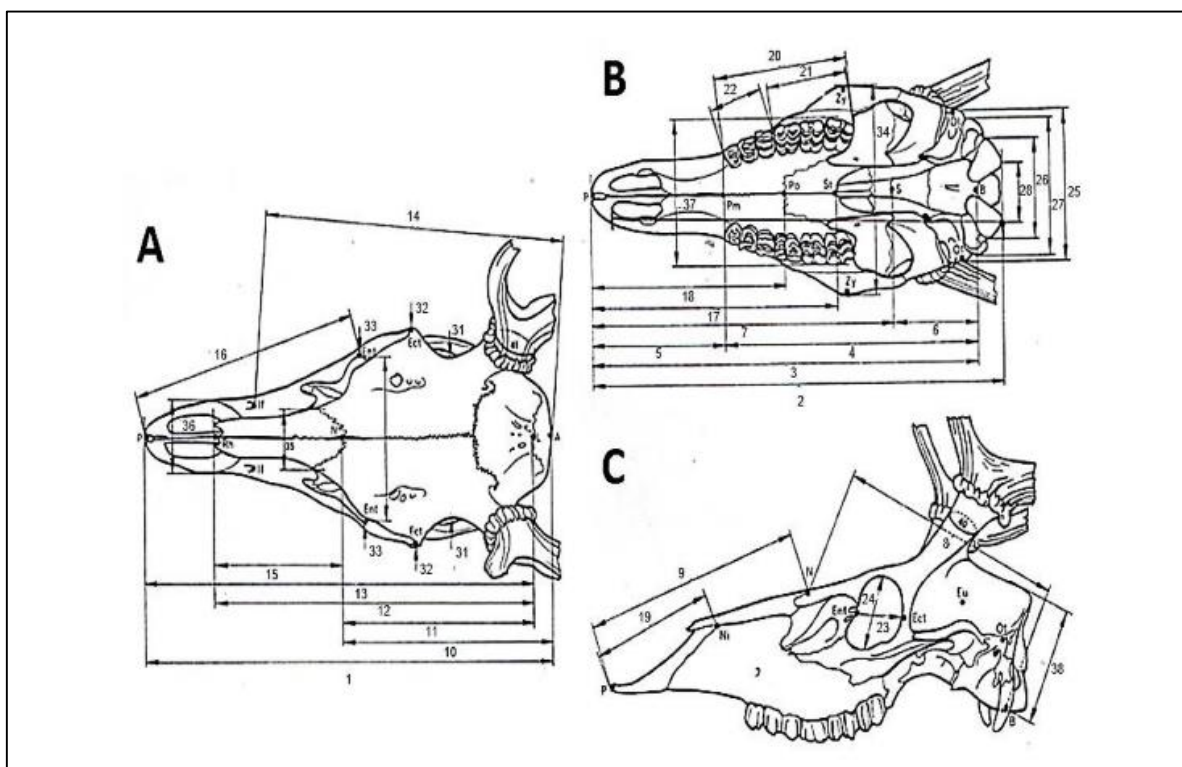


Figura 4. Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vistas dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). A medida 1 representa o comprimento total, 2 comprimento cômulo-basal, 3 comprimento basal, 4 comprimento curto do crânio, 5 pré-molar – prosthion, 6 eixo base-cranial, 7 eixo base-facial, 8 comprimento do neurocrânio, 9 comprimento vicero-craniano, 10 comprimento frontal mediano, 11 lambda – nasal, 12 lambda – região mais distal do osso nasal, 13 lambda – prosthion, 14 acrocânio, 15 maior comprimento dos nasais, 16 comprimento curto facial – lateral, 17 comprimento palatino mediano, 18 comprimento palatal-oral, 19 comprimento lateral do pré-maxilar, 20 distância corrida de dentes, 21 comprimento da linha do 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 cômulo occipitais, 27 maior largura das bases do processo para-occipital, 28 maior largura do forâmên magno, 29 altura do forâmên magno, 30 maior largura neurocraniana, 31 menor largura frontal, 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 do palatal, 38 basion – ponto mais alto da crista nugal (Rees, 1969; Driesch, 1976).

As medidas cranianas do exemplar coletado de *M. chunyi* foram comparadas com outras espécies do gênero *Mazama* disponíveis no Museu do NUPECCE. A partir desses dados foi realizada uma análise de componentes principais e de cluster no programa PAST 3.08 (Hammer et al., 2001), para medir a similaridade entre indivíduos, bem como para discriminar espécies e populações (Sneath e Sokal, 1973). Para isto, foram consideradas 36 medidas cranianas encontradas na maioria dos indivíduos analisados (foram omitidas as medidas 29 e 30 da figura 4).

Para a caracterização morfológica, também foram examinados na pele taxidermizada e nas fotografias, aspectos de coloração geral da pelagem, padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo, comprimento dos pelos nas diferentes regiões do corpo, ocorrência de faixas de pelos anteventidos e de tufo arredondado de pelos na região tarsal, com base nos critérios utilizados por Rossi (2000). Além disso, os campos cromogenéticos da cabeça (faixas orbitais superiores e inferiores, mancha superciliar anterior, regiões auriculares anterobasal e posterobasal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular), e 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), foram analisadas de acordo com a nomenclatura utilizada por Hershkovitz (1982).

7. Análises Citogenéticas

7.1 Cultivo celular

A biópsia de pele foi descongelada em banho-maria a 37°C e colocada em placas de Petri, contendo tampão fosfato (PBS), sendo então divulsionadas mecanicamente e divididas em fragmentos finos. Estes foram transferidos para os frascos de cultivo T25 com 2 mL de meio de cultura DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco), enriquecido com 50% de soro fetal bovino, suplementado com 5 µl de amicacina para cada 1 mL de meio, e levados a estufa a 37°C e 5% de

CO₂. Após a aderência das células no frasco, o meio foi trocado por 2 mL de meio com 30% de soro fetal bovino (Verma e Babu, 1995).

Os cultivos foram supervisionados a intervalos de 24 horas, e o meio foi trocado a cada 48 horas. Quando as células alcançaram o ponto de confluência, da monocamada de células foi realizado o repique, que consistiu em retirar o meio "velho" das garrafas, lavar duas vezes com PBS e adicionar 1 mL de tripsina (8,0g NaCl/L + 0,4g KCl/L + 0,58 g NaHCO₃/L + 1 g glucose/L + 0,005 g vermelho fenol/L + 0,2 g EDTA/L + 0,5 g tripsina/L, pH 7,2-7,4) durante um minuto, sob monitoramento em microscópio invertido para verificar se as células soltaram do fundo do frasco e então, imediatamente, a tripsina foi inativada com 1mL de soro e 2 mL de DMEM. As células foram transferidas para outras garrafas de cultivo dividindo-se o material da garrafa mãe entre as garrafas novas, as quais foram realimentadas da mesma maneira até obter um número suficiente de cultivos secundários.

As células das garrafas com cultivos secundários foram colhidas assim que apresentaram confluência. Um dia antes da colheita realizou-se a pré-tripsinização. Então, 24 horas após foram tratados com 60 µL de Colchicina 0,016% em cada garrafa durante 30 a 60 minutos (incubado em estufa a 5% de CO₂ a 37°C), e uma solução de tripsina no momento da colheita.

O conteúdo do frasco foi transferido para um tubo de centrifuga cônico, centrifugado por 5 minutos a 1200 rpm e o sobrenadante descartado. O sedimento foi ressuspenso em 8mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) e incubado a temperatura de 37,5°C por 20 minutos com pipetagem constante. Após a incubação, foi feita a pré-fixação adicionando-se três gotas de fixador (solução de metanol e ácido acético 3:1). Depois o material passou por centrifugação, o sobrenadante foi descartado novamente e o sedimento foi restituído a 6 mL com solução fixadora. Foi realizado duas vezes o mesmo procedimento com 4 mL e 3 mL de solução fixadora.

Finalmente as células foram fixadas com mais 1 mL de solução fixadora e armazenadas a -5°C para depois preparar as lâminas e submetê-las as diferentes técnicas da citogenética clássica (análise convencional Giemsa, banca C, banda G e coloração Ag-NOR).

7.2 Coloração convencional

Uma vez que as lâminas foram preparadas, estas foram coradas pela metodologia convencional Giemsa (5mL de água destilada, 1mL de tampão fosfato 0,001M e 1mL de corante Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol) para cada uma por 8 minutos). Cinquenta metáfases foram analisadas para se verificar o número diplóide de cromossomos ($2n$) exato do espécime.

7.3 Biometria Cromossômica

Para a classificação cromossômica, foram utilizadas 10 metáfases de cada topótipo coletado. Os cromossomos foram medidos a partir do centrômero até o telômero utilizando o programa computacional "AxioVision", e com base nesses dados, foi estimada a razão entre braços ($r = \text{braço longo} / \text{braço curto}$). De acordo com o valor de r os mesmos foram classificados como metacêntricos ($1 \leq r < 1,7$), submetacêntricos ($1,7 \leq r \leq 3$) ou acrocêntricos ($r > 3$) (Levan et al., 1964). De acordo com o comprimento relativo (CR), os cromossomos autossomos foram classificados como sendo do grupo A (grandes cromossomos de dois braços, com $CR \geq 6\%$), C (pequenos cromossomos de dois braços, com $CR < 6\%$), D (grandes cromossomos acrocêntricos, com $CR \geq 5\%$), E (pequenos cromossomos acrocêntricos, com $CR < 5\%$) e B (micro-cromossomos ou cromossomos B = $CR < 1,5\%$) (Tomazella et al., 2017).

7.5 Bandamento C (Sumner, 1972)

Para a detecção de heterocromatina constitutiva, que estão geralmente localizadas nas regiões centroméricas dos cromossomos, as lâminas foram mergulhadas em solução de HCl (0,02N) por 20 minutos, sendo em seguida lavadas com água corrente, mergulhando-se em solução de $Ba(OH)_2$ (0,07N) a $40^\circ C$ por 20 a 25 minutos e posteriormente lavadas de novo com água corrente e mergulhadas em solução 2 x SSC por 1,5 a 2 horas. Após isso, as lâminas foram coradas com Giemsa a 2% em tampão fosfato (0,01 M), por 25 minutos.

7.6 Coloração Ag-NOR (Howell; Black, 1980)

As regiões organizadoras de nucléolo formam localizadas por meio da impregnação com prata. Em uma lâmina foram pingadas duas gotas de nitrato de

prata a 50% e uma gota de solução coloidal (1 g de gelatina P.A. em 50 mL de água deionizada mais 0,5 mL de ácido fórmico), colocando-se uma lamínula sobre a preparação. A lâmina foi colocada em câmara úmida, sendo aquecida a 56°C em estufa, por 4 a 5 minutos até obter uma cor dourada. Após isso, foi mergulhada em água deionizada para retirada da lamínula, sendo depois lavada com água corrente e analisada ao microscópio.

7.7 Análise das preparações cromossômicas

As lâminas submetidas às técnicas de Bandamento cromossômico foram analisadas e fotografadas em um microscópio Olympus CX31 em objetiva de 100x com uma câmera digital Olympus Camedia C5060 equipado com uma câmera Zeiss AxioCam MRm, por meio do programa AxioVision Release. Todas as imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2.

8. Genética molecular

8.1 Extração de DNA

Os fragmentos de fígado ou músculo foram utilizados para a extração do DNA dos animais amostrados. A extração de DNA genômico a partir das amostras de tecido foi realizada utilizando-se a digestão com proteinase K e extração com fenol/clorofórmio, em um protocolo modificado a partir da metodologia descrita por Sambrook et al., (1989). Por fim, o DNA foi ressuspendido em 50µl de TE-Tween. As amostras foram visualizadas e quantificadas em gel de agarose 1%, sendo em seguida diluídas em uma solução de uso (50ng/µl) e armazenadas em geladeira a 5°C.

8.2 Amplificação e sequenciamento de três genes mitocondriais

Para realizar a caracterização molecular da espécie foram utilizados alguns marcadores de DNA mitocondrial que vem sendo utilizados pelo NUPECCE. Foram amplificados o citocromo b (CIT-B) (Hassanin et al., 1998, Duarte et al., 2008), NADH5 Desidrogenase subunidade 5 (Caparroz et al., 2015) e região controladora (D-LOOP) (Vilà et al., 1999) como exposto na Tabela 2.

Tabela 2. Genes mitocondriais amplificados e os iniciadores (primers) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento.

Gene	Iniciadores (Primers)	Sequências (Forward/Reverse)	Tamanho fragmento (pb)	Tº pareamento	Fonte
CIT-B	L14724 H15149	5'CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTGE3' 5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGTCCTCA3'	480 pb	56°C	Kocher et al., 1989
CIT-B	FARH FARL	5'TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTTCA3' 5'CCATGAGGACAAATATCATTCTGAT3'	660 pb	56°C	Duarte et al., 2008
D-LOOP	ThrL15926 DLH16340	5'GGTTCCTCGGTCTTGTAACCC3' 5'CCTGAAGTAGGAACCAGATG3'	660 pb	55°C	Vila et al., 1999
ND5	Leu11775 ND512427	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3' 5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'	691 pb	55°C	Caparroz et al., 2015
ND5	ND512326 ND512988	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3' 5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'	688 pb	55°C	Caparroz et al., 2015
ND5	ND513167 ND513709	5'AATARTTGGGAAGCCTTTTCG3' 5'TATGATACAGGRGATTCTGG3'	581 pb	55°C	Caparroz et al., 2015

Os fragmentos de DNA para cada iniciador (primer) foram amplificados no termociclador Biorad™ usando uma reação de PCR (“Polymerase Chain Reaction”) padrão, conforme segue: 5,9 µl de H₂O, 3,6 µl de dNTP, 6,0 µl de tampão buffer, 4,8 µl de MgCl₂, 1,5 µl de BSA, 1,5 µl de cada “primer” (“forward e reverse”), 0,2 µl de DNA “Taq polimerase” e 5,0 µl de solução de DNA, para um volume total de 30 µl por amostra. O programa de amplificação utilizado no termociclador foi: ciclo inicial de 4 minutos a 94°C para desnaturar o DNA, 37 ciclos a 94°C por 1 minuto, temperatura de pareamento dos iniciadores (Tabela 2) por 0:30 segundos, 72°C por 0:50 segundos, com uma extensão final de 72°C por 7 minutos. Depois a temperatura foi mantida a 4°C. Em todas as reações foram incluídos controles negativos para verificar a possibilidade de contaminação.

Após a amplificação, os produtos da PCR foram corados com Gel Red™ (Biotium), submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e, sob transiluminador de luz ultravioleta 302 nm (BioAgency), fotodocumentados e analisados para verificação da qualidade do produto amplificado. A purificação dos produtos da PCR foi feita com

o kit Wizard SV gel and PCR Clean-Up System (Promega TM) e enviados para sequenciamento. O DNA foi sequenciado nos dois sentidos (3'-5' e 5'-3') em um sequenciador automático de primeira geração (Método de Sanger) ABI 3730 XL (Applied Biosystems) através de serviço prestado pelo Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO) da FCAV, UNESP.

8.3 Análise filogenética do topótipo de *Mazama chunyi*

Para *M. chunyi* foi feita a amplificação e sequenciamento de três genes mitocondriais (CIT-B, D-LOOP, ND5). As sequências obtidas, correspondentes as fitas senso e antisenso dos fragmentos mitocondriais, foram inspecionadas manualmente mediante o eletroferograma para eliminar falsos polimorfismos e possíveis ambiguidades. Após a revisão de cada um dos eletroferogramas, as duas fitas complementares foram alinhadas para obter a sequência consenso com ajuda do programa Genious Prime (Biomatters Ltd. Auckland, Nova Zelândia, 2018). No caso de CIT-B, em que dois iniciadores foram utilizados (480 e 660 pb), as sequências dos dois fragmentos foram concatenadas e foi feito o mesmo no caso de ND5, em que três iniciadores foram utilizados (691, 688 e 581 pb), e as sequências dos três fragmentos foram concatenadas. Posteriormente, na mesma plataforma do Genious Prime (Biomatters Ltd. Auckland, Nova Zelândia, 2018) foram elaboradas, alinhadas e editadas quatro matrizes: CIT-B (fragmentos analisáveis de 645 pb), D-LOOP (fragmentos analisáveis de 305 pb), ND5 (fragmentos analisáveis de 1172 pb), e outra dos três fragmentos do DNA mitocondrial concatenados; CIT-B, D-LOOP, ND5 (fragmentos analisáveis 2122 pb), as quais eram compostas pelas sequências consenso do topótipo e de outras amostras obtidas do banco de dados do NUPECCE e do GenBank. *Rangifer tarandus* foi utilizado como grupo externo nas análises filogenéticas. Posteriormente, foi determinado o esquema de partição mais adequado e os melhores modelos de evolução molecular para o conjunto de dados dos genes mitocondriais com a anotação de cada gene mediante o programa PartitionFinder2 on XSEDE (Lanfear et al., 2016).

Foram utilizados dois métodos de análise filogenética. A análise de Inferência Bayesiana (IB) foi realizada no programa MrBayes on XSEDE 3.2 (Ronquist et al., 2012) com 25.000.000 de gerações até obter uma variância de <0.01, adotando um

descarte por “burn-in” de 25% das amostras iniciais. Para estimar a distribuição da probabilidade posterior foi utilizado a Metropolis-Coupled MCMC (Markov Chain Monte Carlo) com $nchains=4$, $nruns=2$ e $burnfrac=0,25$ para todos os genes. A Análise de Máxima Verossimilhança (Felsenstein, 1985) foi realizada no programa RAxML 8.0 (Stamatakis, 2014) que disponibiliza os valores de bootstrap dos clados. Todas as análises foram através do portal “online” CIPRES Science Gateway (Miller et al., 2010). As árvores obtidas de todas as análises foram editadas com auxílio do programa FigTree v.1.4.0 (Rambaut, 2012).

As análises foram realizadas para se conseguir uma comparação das sequências obtidas com as sequências já existentes no GenBank e assim obter uma avaliação preliminar da posição do exemplar coletado neste estudo em relação aos demais já avaliados quanto ao posicionamento filogenético.

RESULTADOS

1. Descrição emendada de *Mazama chunyi* Hershkovitz, 1959 (Mammalia, Cervidae): Cor geral do corpo canela a marrom madeira. A região dos flancos é mais avermelhada. Cabeça, pescoço e os quatro membros enegrecidos, o que contrasta com o resto do corpo (Figura 5A). Pelame geral do corpo comprido e bastante denso. Cauda pequena, felpuda, cor marrom madeira na região dorsal, e com um tufo de pelos brancos proeminente na região ventral (Figuras 5A, 7B). Faixas orbitais superior e inferior ausentes. Presença de pequenas manchas brancas na órbita ocular direita. Parte superior do focinho enegrecida, com uma mancha branca no lábio superior e inferior e uma banda mandibular preta cruzando o queixo castanho amarelado, proeminentes no padrão facial (Figura 5B, 7A). As orelhas pequenas, arredondadas e pontiagudas na ponta, dorsalmente enegrecidas como a testa e a coroa, com uma borda branca e face interna também branca com abundantes pelos brancos misturados com pretos. Ausência de pelos antevertidos na nuca (Figuras 5B, 6B). Cascos negros, não contrastando com a pele do pé. Presença de um tufo arredondado de pelos escuros, longos e antevertidos na região tarsal de ambos membros (Figura 6A). Região ventral anterior e posterior; região mandibular, garganta, peito, abdômen e a região inguinal de cor castanho amarelado, mais claro na face interna proximal dos membros posteriores (Figuras 7A, B).

Localização do registro: Sacramento, “Estrada da Morte”, província Nor Yungas do Departamento de La Paz, Bolívia, altitude de 2238 metros.

Coordenadas geográficas do ponto de coleta: 16°15' 51.62"S 67°47' 27.57"W

Depositado em: Museu 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: NPC 151

N. de Registro do banco de amostras: T427

Cariótipo: 2n=54, NF=72 + 3-5Bs.



Figura 5. (A) Vista lateral do topótipo de *M. chunyi* (B) Detalhes da vista lateral da cabeça.

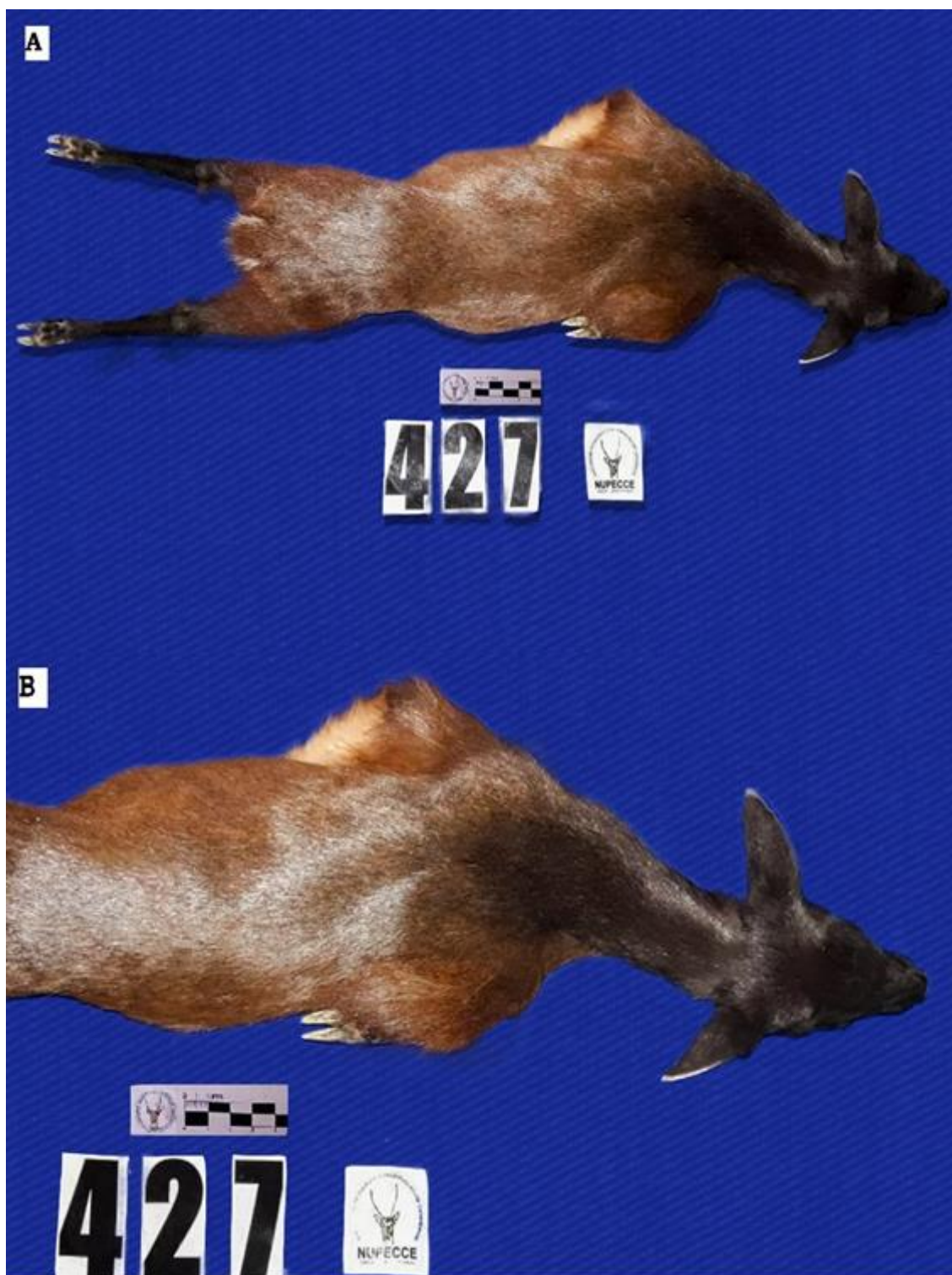


Figura 6. (A) Vista dorsal do topótipo de *M. chunyi* (B) Detalhes da vista dorsal anterior.



Figura 7. (A) Vista ventral anterior do topótipo de *M. chunyi* (B) Vista ventral posterior.

Na figura 8 é apresentada a pele taxidermizada do topótipo estudado. Os dados da biometria corporal são apresentados na tabela 3.

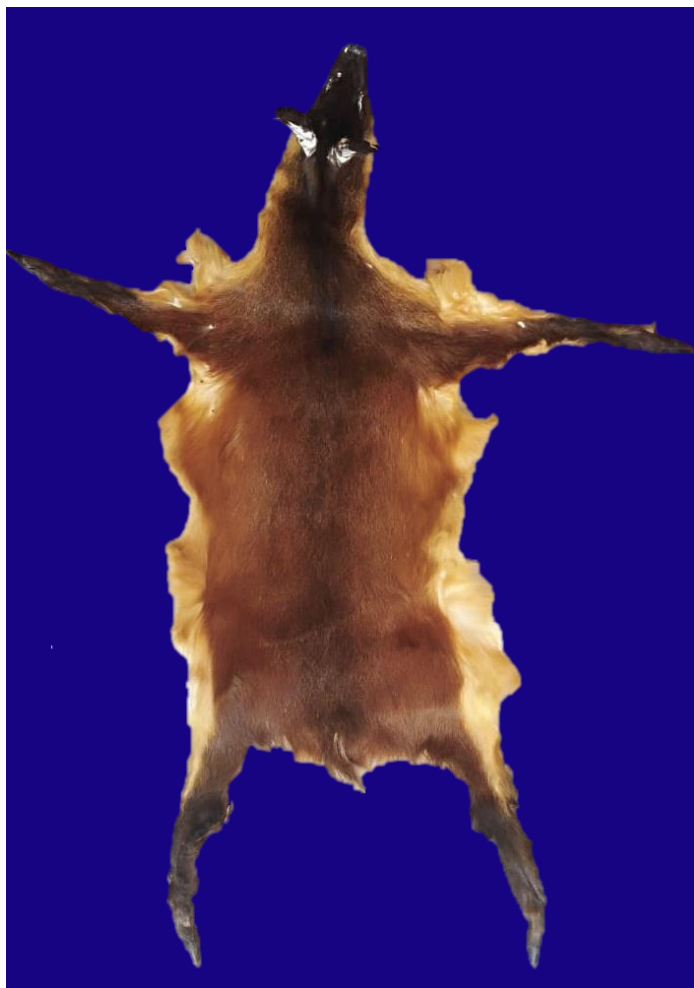


Figura 8. Pele aberta taxidermizada do topótipo de *M. chunyi*.

Tabela 3. Medidas biométricas do topótipo de *M. chunyi* (em cm, massa em kg).

Comprimento da orelha	8,3	Tórax	48,9
Distância entre olhos	4,72	Abdômen	47,3
Comprimento da cabeça	17,8	Comprimento da cauda	7
Largura da cabeça	5,59	Altura	46
Perímetro do pescoço	22,8	Metacarpo	9,5
Mandíbula	5,96	Metatarso	15,5
Comprimento do corpo	60,5	Massa	10,2

O crânio macerado do topótipo de *M. chunyi* é apresentado na figura 9 enquanto suas medidas cranianas são apresentadas na tabela 4.

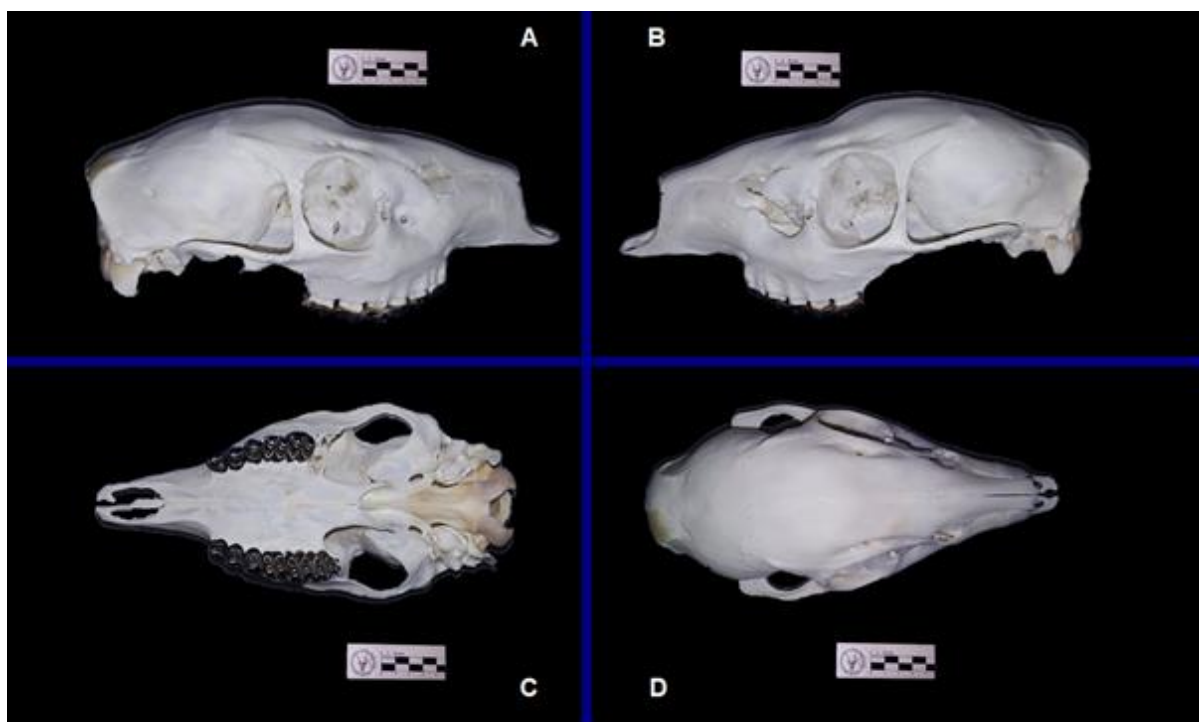


Figura 9. Vista lateral direita (A), lateral esquerda (B), ventral (C) e dorsal (D) do crânio do topótipo de *M. chunyi*. A régua ilustra medida em centímetros.

Tabela 4. Medidas cranianas do topótipo de *M. chunyi* representadas em milímetros (mm) de acordo com Rees (1969); Driesch (1976).

Caráter	mm	Caráter	mm	Caráter	Mm	Caráter	mm
CT	153,75	CFM	98,54	CLP	37,75	MLFM	16,42
CCB	148,46	LN	81,75	DCD	45,31	LFM	40,23
CB	139,47	LR	120,32	CLM	25,05	MLEO	36,01
CCC	93,97	LP	139,72	CLP	21,35	LMEO	28,04
PP	45,58	ACR	110,86	MCIO	25,16	LZ	68,95
EBC	28,57	MCN	40,42	MAIO	27,26	MLEN	19,33
EBF	111,6	CCFL	62,87	MLM	44,64	MLPM	20,1
NCL	90,75	MPL	95,77	MLCO	28,48	MLP	50,25
CVC	74,79	CPO	65,25	MLPP	40,95	BCNS	37,9

Onde: CT= comprimento total, CCB= comprimento condilobasal, CB= comprimento basal, CCC= comprimento curto do crânio, PP= premaxilar – prosthion, EBC= eixo basecranial, EBF= eixo basefacial, NCL= comprimento do neurocrânio, CVC= comprimento vicerocraniano, CFM= comprimento frontal mediano, LN= lambda – nasal, LR= lambda – região mais distal do osso nasal, LP= lambda – prosthion, ACR= acrocrânio, MCN= maior comprimento dos nasais, CCFL= comprimento curto facial – lateral, MPL= comprimento palatino mediano, CPO= comprimento palatal oral, CLP= comprimento lateral do premaxilar, DCD= distância corrida de dentes, CLM= comprimento da linha do molar, CLP= comprimento da linha premaxilar, MCIO= maior comprimento interno da órbita, MAIO= maior altura interna da órbita, MLM= maior largura do mastoide, MLCO= maior largura dos côndilos occipitais, MLPP= maior largura das bases do processo paroccipital, MLFM= maior largura do foramen magno, LFM= largura frontal menor, MLEO= maior largura entre as órbitas, LMEO= largura mínima entre as órbitas, LZ= largura zigomática, MLEN= maior largura entre os nasais, MLPM= maior largura entre o premaxilar, MLP= maior largura do palatal, BCNS= basion – ponto mais alto da crista nuchal.

2. Análises morfológicas de biometria e craniometria

2.1 Análises de biometria corporal

Nas análises de componentes principais das medidas corporais do topótipo de *M. chunyi* e outros indivíduos do gênero *Mazama*, machos e fêmeas foram colocados na mesma matriz (consideraram-se 12 medidas corporais presentes em todos os indivíduos analisados).

O escatograma dos dois primeiros componentes da PCA de 12 medidas biométricas (Figura 10) mostrou um aglomerado principal de pontos para espécies de pequeno porte: *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. temama*, *M. sarae* e o topótipo de *M. chunyi*, e outra aglomeração de pontos para todas as espécies de médio porte: *M. bororo*, *M. rufa*, *M. americana* e mais dois indivíduos de *M. gouazoubira*. Havendo uma mistura dos indivíduos de *M. gouazoubira* entre os grupos.

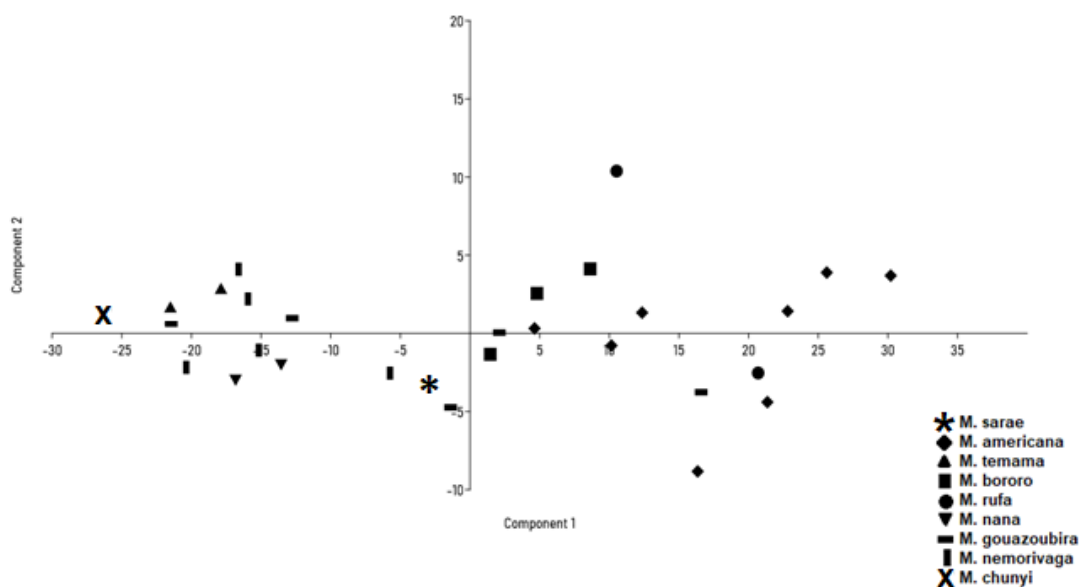


Figura 10. Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas corporais de indivíduos de *Mazama* provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de *M. chunyi* analisado neste estudo. Bootstrap 1000.

Os dois primeiros componentes principais acumularam 94,14% da variância da matriz de dados (Tabela 1, Apêndice F). Pelo fato das cargas do primeiro componente (PC1) terem sido iguais (positivas), o PC1 é interpretado como um eixo que mostrou principalmente as diferenças de tamanho entre os indivíduos. Quatro medidas (CCO, ALT, TX, PP) tiveram as maiores cargas em PC1. Algumas cargas sobre o segundo componente (PC2) são negativas e outras positivas, por esse motivo, o PC2 foi interpretado como um eixo que mostrou principalmente diferenças nas proporções corporais entre os espécimes. Neste componente (PC2), as medidas com cargas maiores foram TX e ALT (cargas positivas) e CCO (carga negativa).

A árvore de distância morfológica feita a partir das medidas corporais dos indivíduos (Figura 11) mostrou a formação dois clados principais. Um grupo representando as espécies de pequeno porte: *M. temama*, *M. nemorivaga*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. sarae* e o topótipo *M. chunyi*, e no segundo clado são agrupadas as espécies de médio porte: *M. americana*, *M. rufa*, *M. bororo* e dois

indivíduos de *M. gouazoubira*. Apesar dos agrupamentos representarem as espécies de pequeno e médio porte, houve uma mistura dos indivíduos de *M. gouazoubira*.

A árvore de distância morfológica mostra claramente uma mistura entre todos os indivíduos que são citogenética e molecularmente distintos, evidenciando assim que a individualização das populações do gênero *Mazama* é impraticável pelos caracteres biométricos.

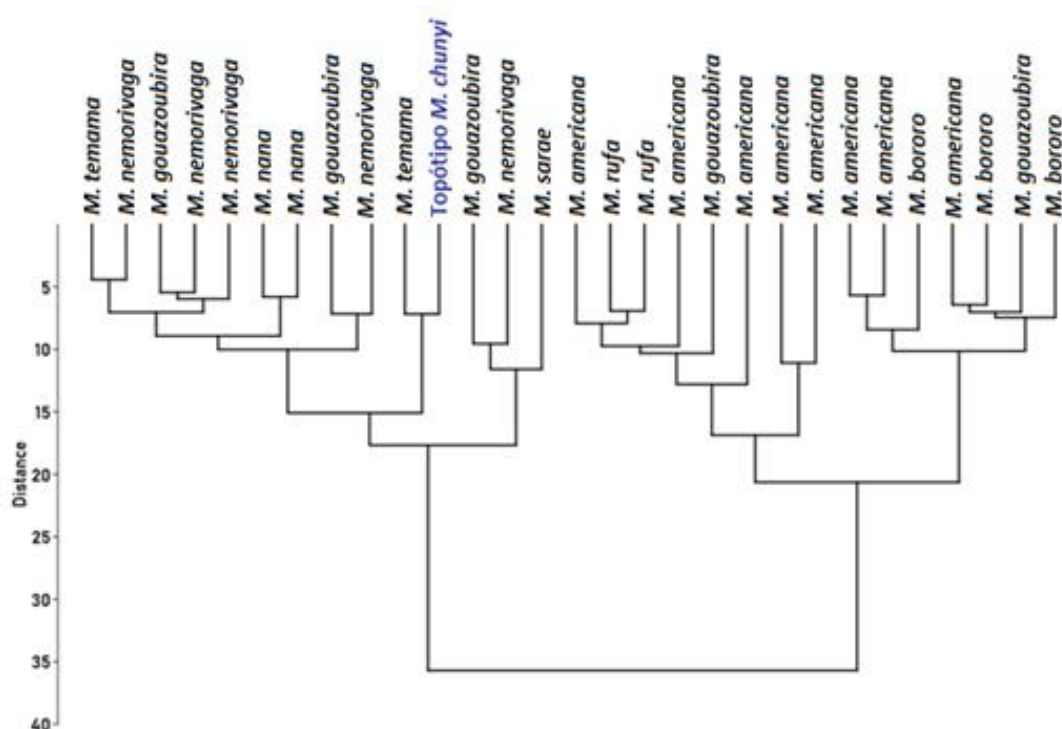


Figura 11. Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 12 medidas biométricas corporais tomadas do topótipo de *M. chunyi*, e de outras espécies do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. temama*, *M. bororo*, *M. rufa*, *M. sarae*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. nana*).

2.2 Análises de craniometria

Nas análises de componentes principais das medidas cranianas do topótipo de *M. sarae* e outros indivíduos do gênero *Mazama*, machos e fêmeas foram colocados na mesma matriz (consideraram-se 36 medidas cranianas presentes em ambos os sexos).

O escatograma dos dois primeiros componentes da PCA de 36 medidas cranianas (Figura 12) mostrou um padrão de aglomeração de pontos para espécies de pequeno porte: *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. temama*, *M. sarae*, o topótipo de *M. chunyi* e três indivíduos de *M. bororo*, e outra aglomeração de pontos para todas as espécies de médio porte: *M. rufa*, *M. americana* e *M. bororo*. Havendo uma mistura dos indivíduos de *M. bororo* entre os grupos.

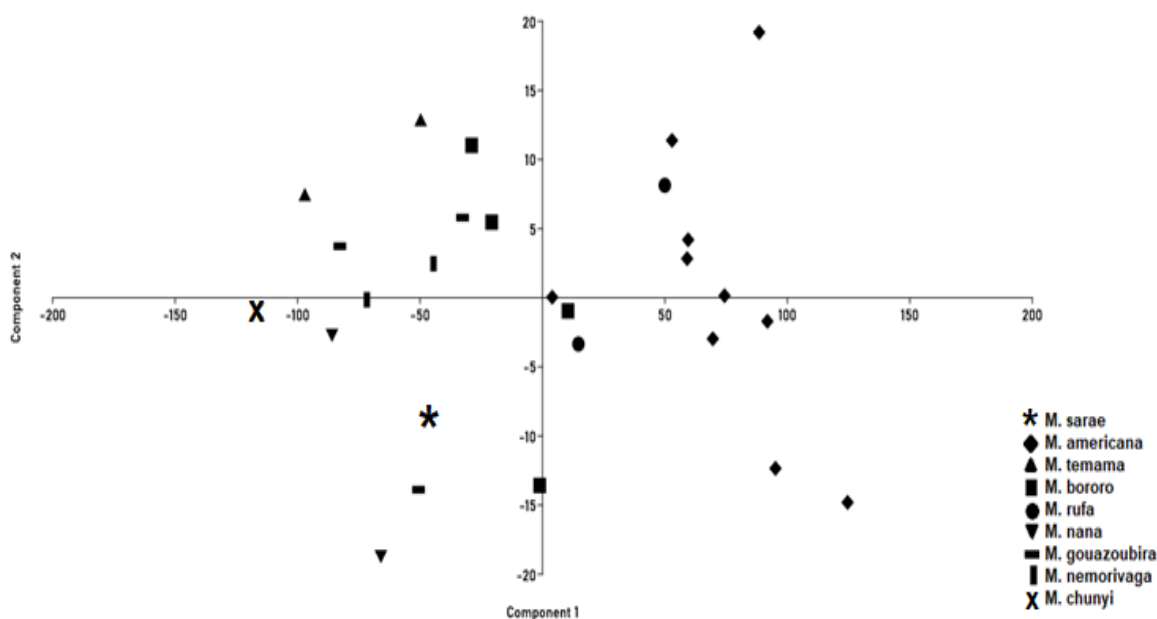


Figura 12. Escatograma dos dois primeiros eixos da análise de componentes principais a partir das medidas cranianas de indivíduos de *Mazama* provenientes de diferentes lugares em relação ao topótipo de *M. chunyi* analisado neste estudo. Bootstrap 1000.

Os dois primeiros componentes principais acumularam 94,87% da variância da matriz de dados (Tabela 2, Apêndice F). As medidas comprimento total (CT) e lambda – prostion (LP) tiveram as maiores cargas no primeiro componente (PC1), sendo que a maior parte da variação entre os indivíduos é devida ao tamanho. A medição com maior carga no segundo componente (PC2) foi o maior comprimento dos nasais (MCN), e como as variáveis dentro desse componente possuíram escores com sinais opostos, o alto contraste está relacionado com a forma.

A árvore de distância (Figura 13), construída pelo método UPGMA utilizando os caracteres cranianos, assim como na PCA, mostrou dois grupos separados, um grupo representando as espécies de pequeno porte: *M. temama*, *M. gouazoubira*, *M. nana*, *M. nemorivaga*, *M. sarae*, o topótipo de *M. chunyi* e alguns indivíduos de *M. bororo*, *M. americana* e *M. rufa*, no outro grupo encontramos o resto de indivíduos das espécies de médio porte: *M. americana* e *M. rufa*. Apesar dos agrupamentos representarem as espécies de pequeno e médio porte, houve uma mistura dos indivíduos de *M. bororo*, *M. americana* e *M. rufa*.

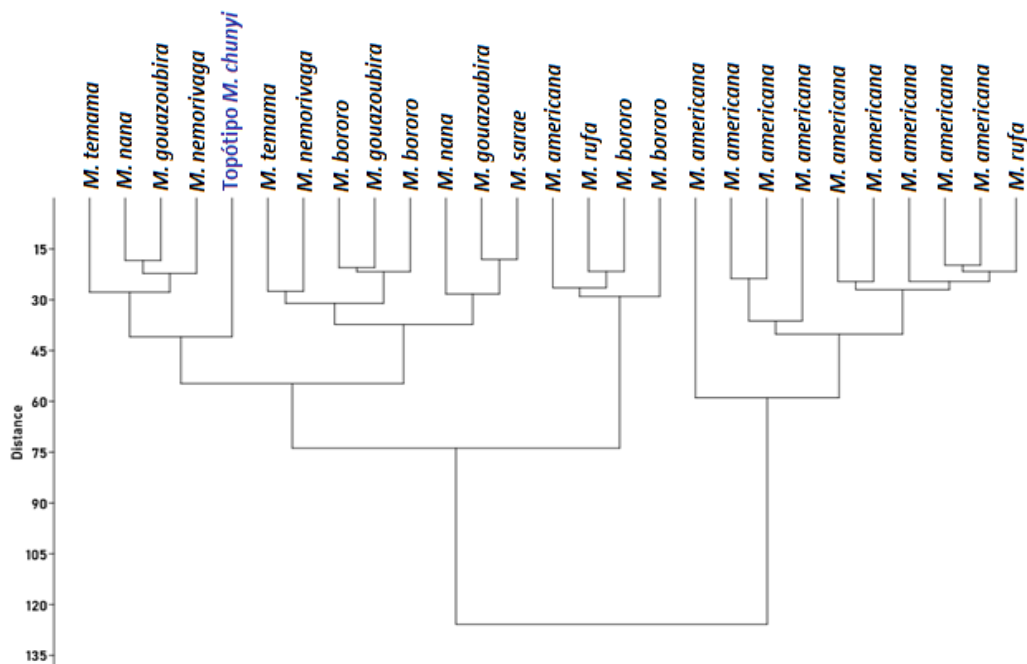


Figura 13. Árvore de distância obtida pelo método UPGMA de 36 medidas cranianas tomadas do topótipo de *M. chunyi*, e de outras espécies do gênero *Mazama* (*M. americana*, *M. temama*, *M. sarae*, *M. bororo*, *M. rufa*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. nana*).

3. Citogenética para o topótipo de *Mazama chunyi*

3.1 Coloração convencional

O topótipo coletado foi uma fêmea e apresentou um cariótipo de $2n=54$, $NF=72$ + 3-5Bs, com 26 pares de cromossomos autossômicos e 1 par correspondente aos cromossomos sexuais "XX" (por definir). A biometria feita sob coloração convencional permitiu classificar os cromossomos de acordo com o seu comprimento relativo de braços (CR), sendo que o grupo A é composto pelos pares 1 a 4, o grupo C pelos pares 5 a 9, o grupo D pelos pares 10 e 11, e o grupo E pelos pares 12 a 27 (Figura 14). A identidade do cromossomo X deverá ser definida pela técnica de FISH com o uso de sondas de pintura cromossômica bovina (*Bos taurus*, BTA).

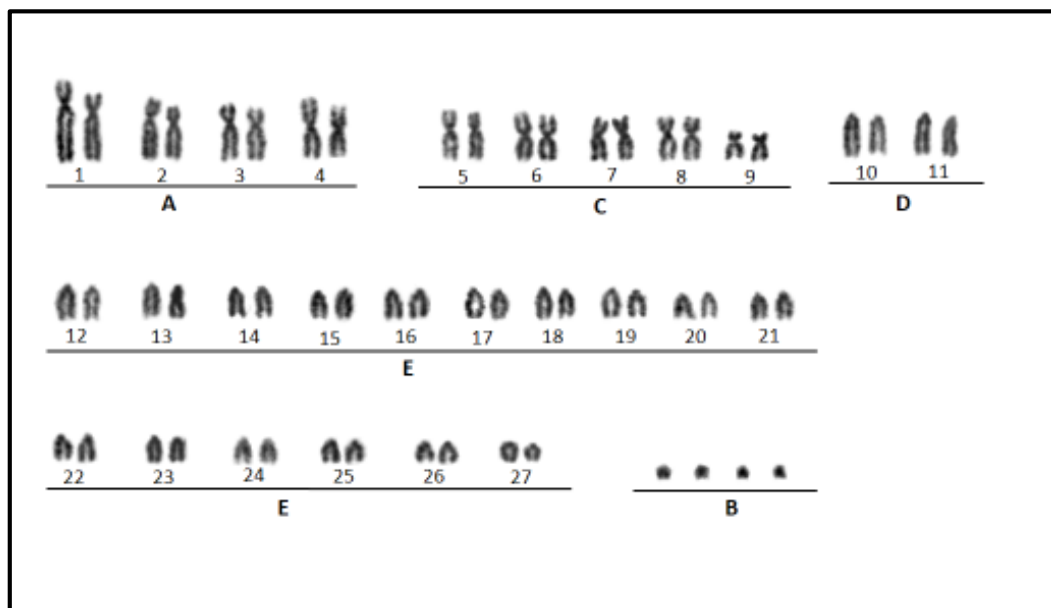


Figura 14. Cariótipo do topótipo fêmea de *M. chunyi* ($2n=54$, $NF=72$ + 4Bs) sob coloração convencional de Giemsa.

3.2 Bandamento C

Foi possível visualizar blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos. Quatro dos cromossomos B apresentaram-se eucromáticos e um heterocromático (Figura 15).

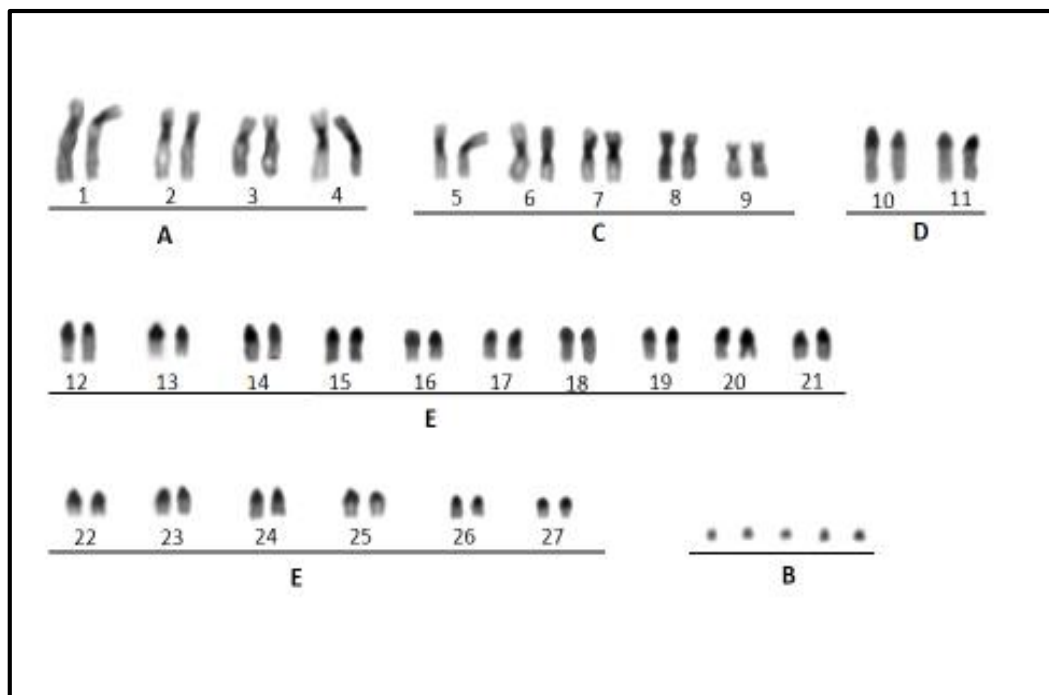


Figura 15. Cariótipo do topótipo fêmea de *M. chunyi* T427 ($2n=54$, $NF=72 + 5Bs$) sob Bandamento C.

3.3 Coloração de Ag-NOR

Todas as metáfases do topótipo apresentaram a região organizadora do nucléolo na região telomérica dos braços longos dos 2 cromossomos do par 2 (Figura 16).

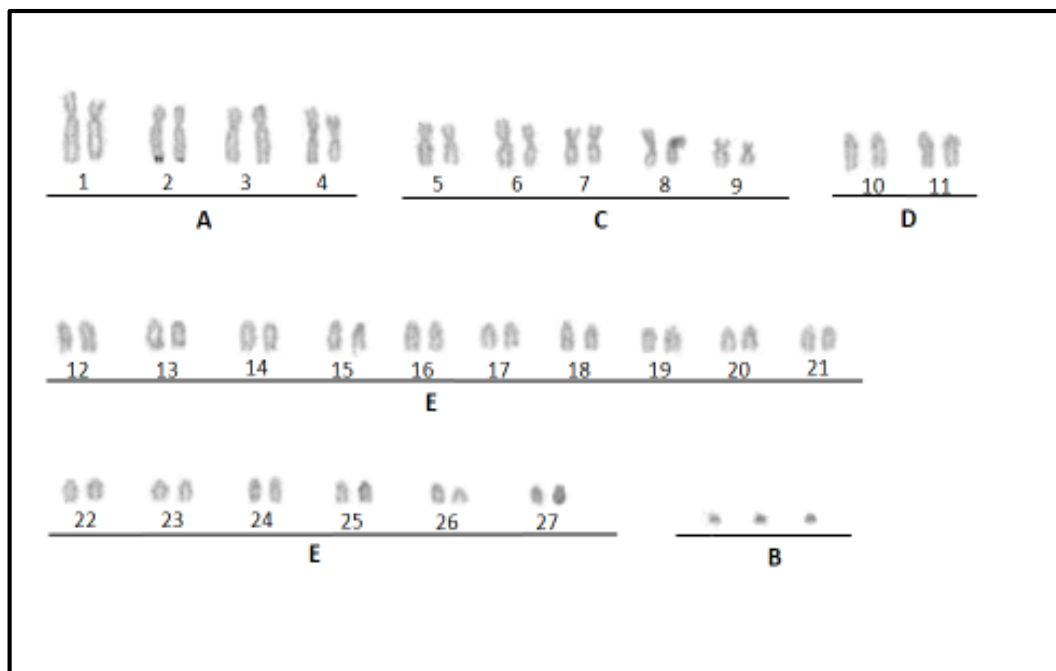


Figura 16. Cariótipo do topótipo fêmea de *M. chunyi* T 427 (2n=54, NF=72 + 3Bs) sob coloração Ag-NOR com dois regiões organizadoras de nucléolo.

4. Análise de três genes mitocondriais

Na análise da Inferência Bayesiana (IB) o esquema de partições gerou 4 subset: HKY+I; Subset1, etc., com parâmetros definidos para cada gene e para a concatenação dos três genes (CIT-B+D-LOOP+ND5). Na análise filogenética de Máxima Verossimilhança (MV), que permite apenas um único modelo de heterogeneidade de taxa em análises particionadas, as partições foram atribuídas ao modelo GTR+G para todos os genes. As topologias obtidas nas análises de Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança a partir de todos os alinhamentos foram congruentes, mas os ramos tiveram maior suporte na IB.

A árvore gerada pela análise do gene mitocondrial CIT-B, evidencia o agrupamento do topótipo de *M. chunyi* dentro da subtribo Blastocerina, formando um grupo monofilético junto aos espécimes de *M. chunyi* extraídos do GenBank (espécimes de museus do Peru), separado do resto das espécies incluídas na subtribo com alta probabilidade posterior e bootstrap, de 91% e 88 %, respectivamente (Figura 17 e 18).

A árvore obtida com o gene D-LOOP evidenciou que o topótipo de *M. chunyi* encontra-se agrupado dentro da subtribo Blastocerina formando um haplogrupo monofilético junto a *H. antisensis* com moderada probabilidade posterior e bootstrap, de 84% e 73 %, respectivamente (Figura 1 e 2, Apêndice G).

A árvore obtida com o gene ND5 evidenciou que o topótipo de *M. chunyi* encontra-se agrupado dentro da subtribo Blastocerina formando um haplogrupo monofilético com o *H. antisensis* com baixa probabilidade posterior e bootstrap, de 55% e 25 %, respectivamente (Figura 3 e 4, Apêndice G).

A árvore concatenada dos genes CIT-B+D-LOOP+ND5 evidenciou que o topótipo de *M. chunyi* encontra-se agrupado dentro da subtribo Blastocerina, e manteve sua posição formando um grupo monofilético próximo ao haplogrupo monofilético conformado pelos indivíduos de *M. gouazoubira* incluídos na subtribo, com alta probabilidade posterior e bootstrap, de 100% e 96 %, respectivamente (Figura 19 e 20).

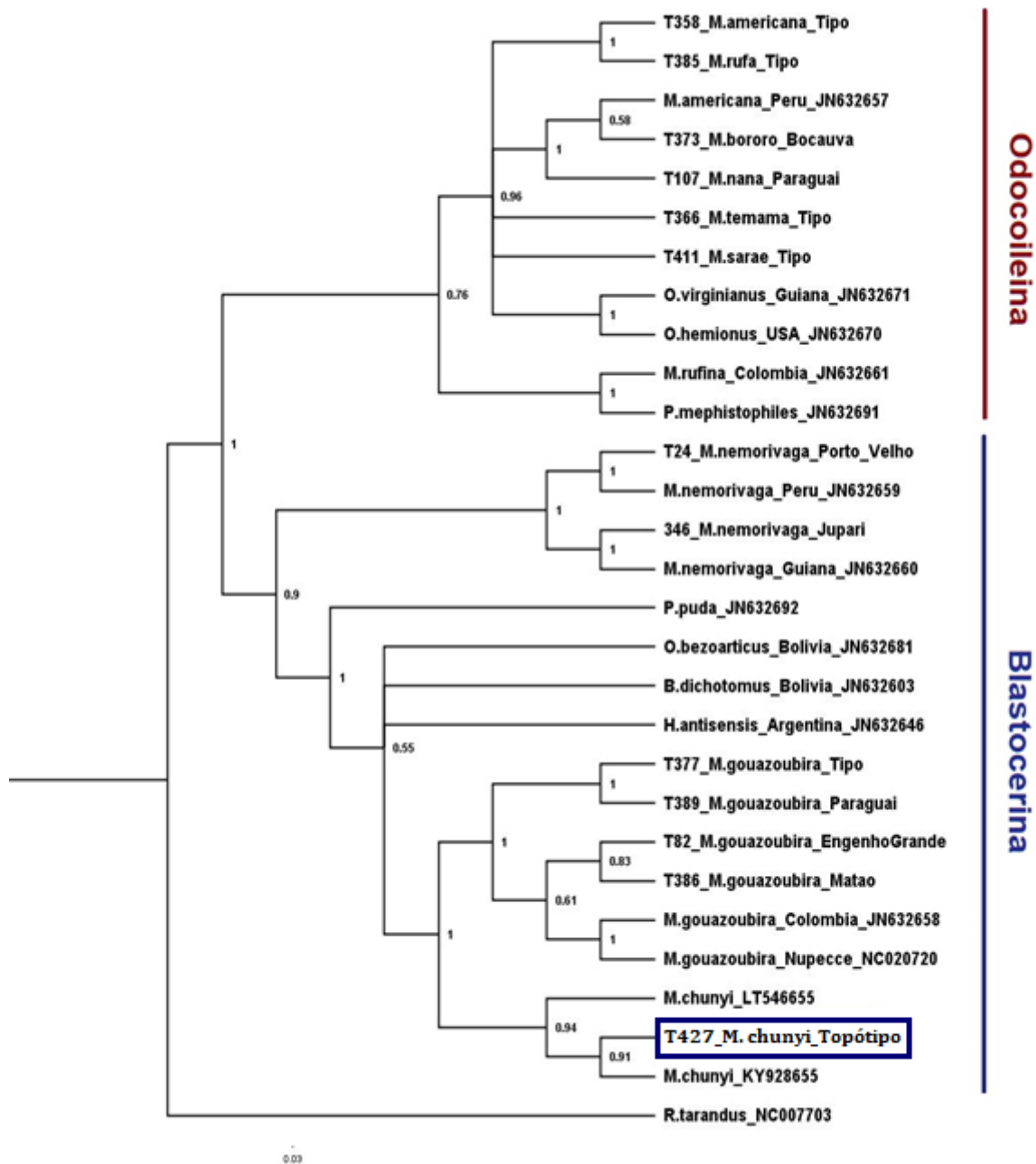


Figura 17. Árvore filogenética do gene CIT-B. Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

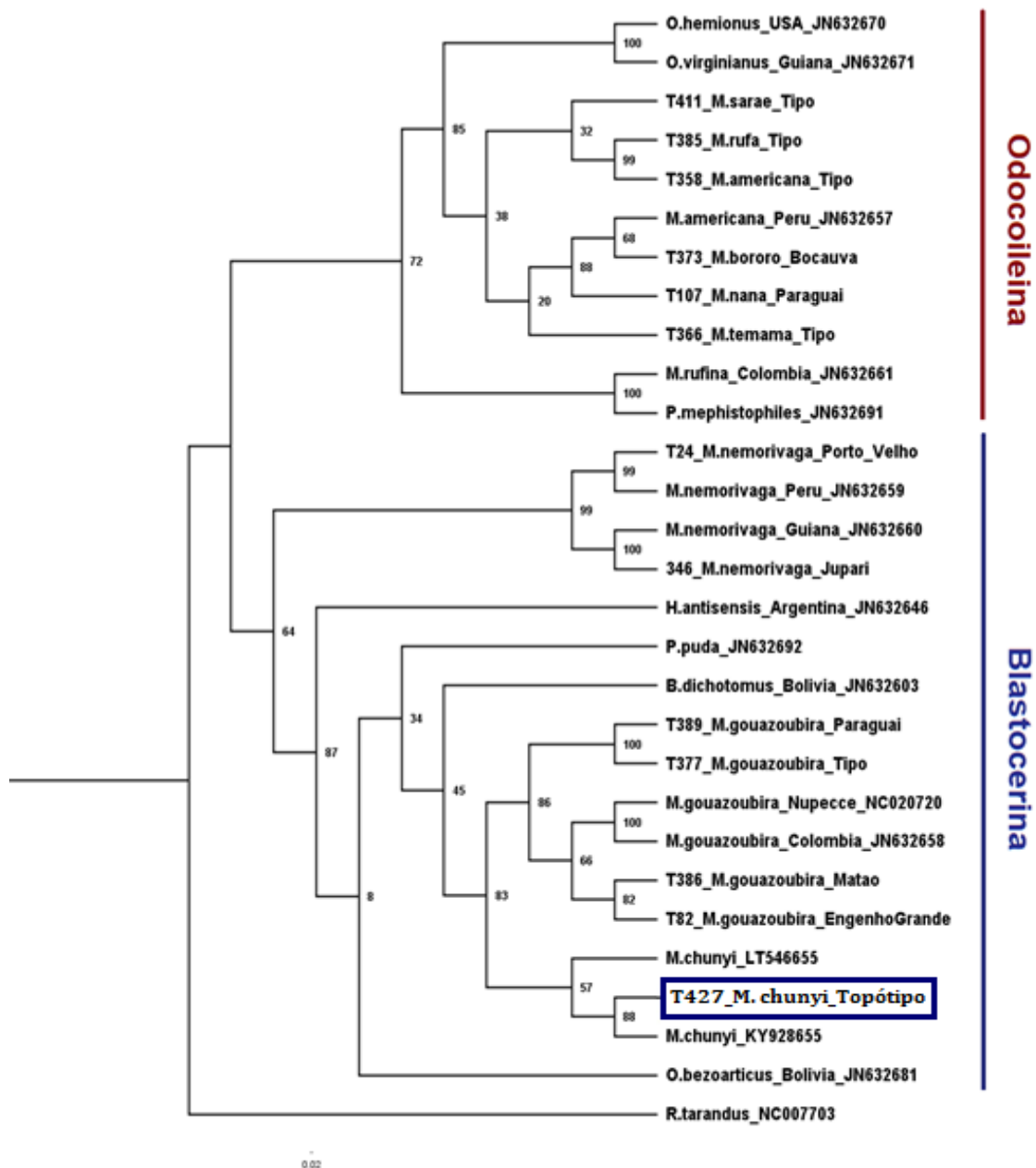


Figura 18. Árvore filogenética do gene CIT-B. Análise de Máxima Verossimilhança (MV). Os valores representam o “bootstrap” da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

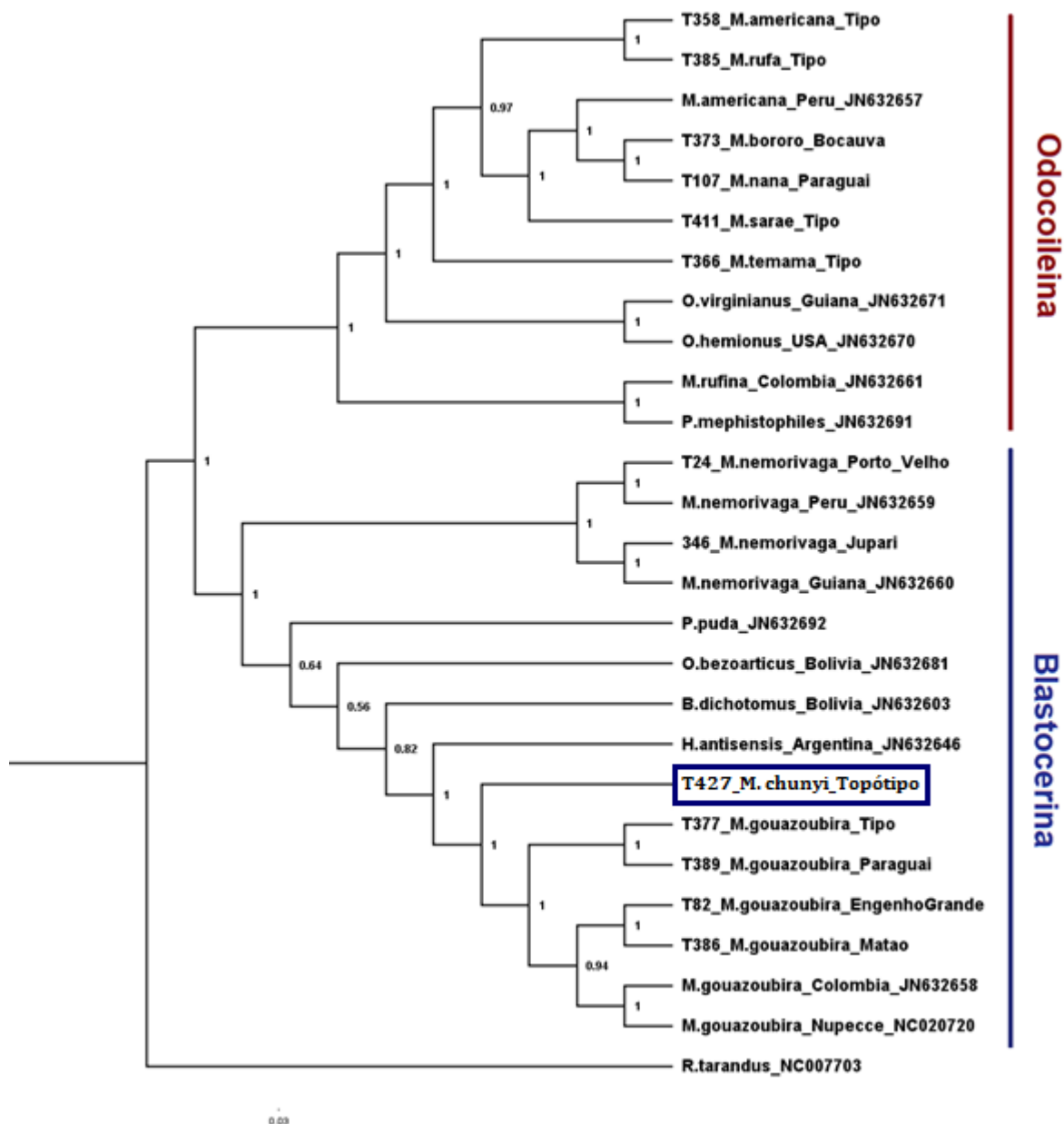


Figura 19. Árvore filogenética da análise concatenada dos três genes mitocondriais (CIT-B+D-LOOP+ND5). Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

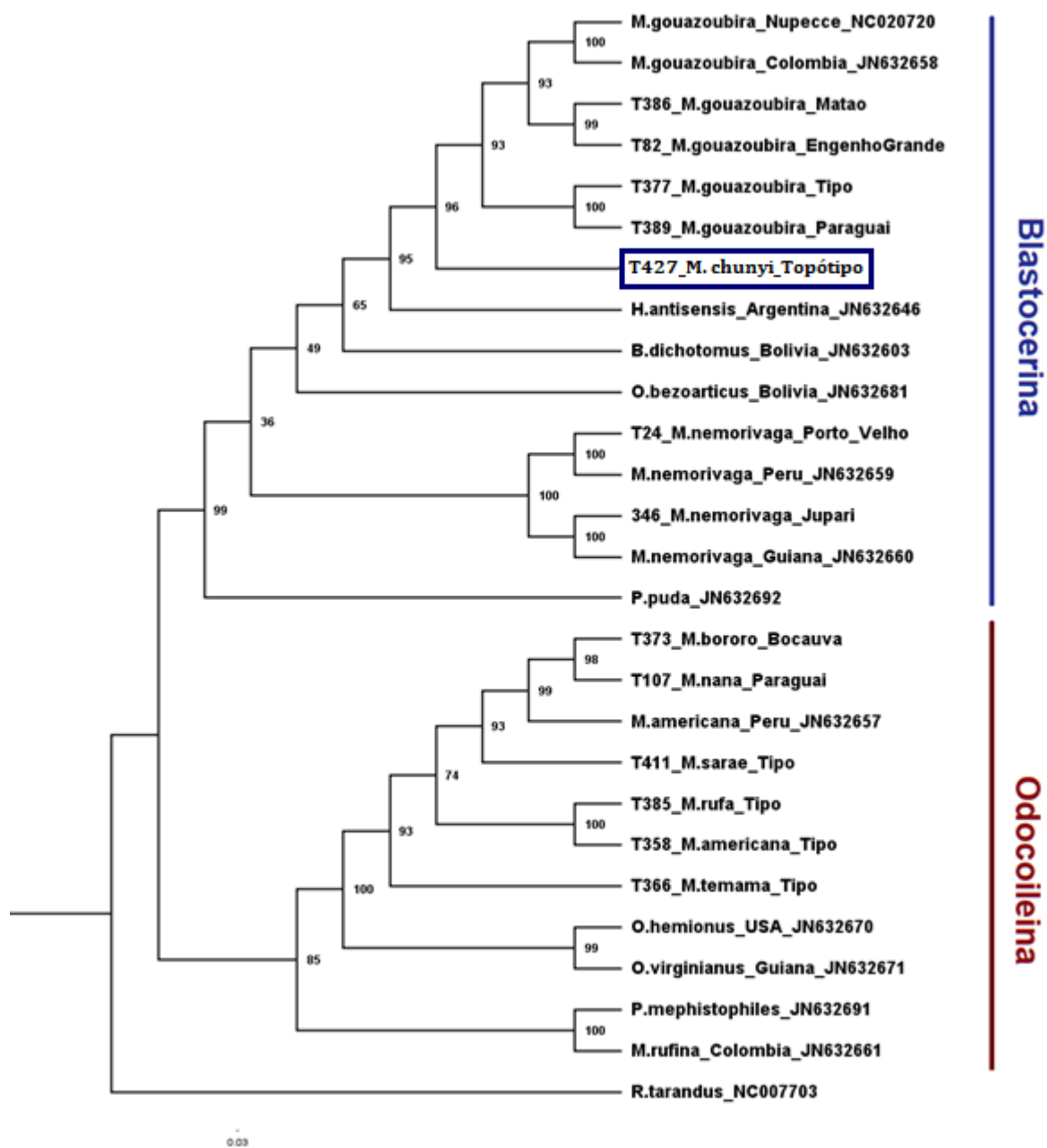


Figura 20. Árvore filogenética da análise concatenada de três genes mitocondriais (CIT-B+D-LOOP+ND5). Análise de Máxima Verossimilhança (MV). Os valores representam o “bootstrap” da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

DISCUSSÃO

1. Análise morfológica

Analisando caracteres morfológicos externos das espécies de *Mazama*, como mencionado por Rossi (2000) e Duarte et al., (2008), percebe-se que as diferentes espécies do gênero *Mazama* tem uma grande similaridade morfológica, tornando-se difícil diferenciar as espécies apenas por estes caracteres.

M. chunyi foi caracterizada por Hershkovitz (1959), como uma espécie extremamente pequena do gênero *Mazama*, baseado em comparações morfológicas de espécimes coletados e avistados de *M. chunyi* e de outras espécies de *Mazama* (*M. gouazoubira*, *M. americana* e *M. rufina*), além de ser considerado o único veado anão que ocorre no sudeste do Peru (Cuzco, Puno e Madre de Dios) e noroeste da Bolívia (La Paz e Cochabamba) (Rumiz e Pardo, 2010).

Na descrição morfológica, com base no padrão de cores e regiões cromogenéticas, o espécime analisado apresentou características semelhantes à espécie *M. chunyi* a partir das descrições dadas pelos diferentes autores (Hershkovitz, 1959; Rumiz e Pardo 2010): cor geral do corpo marrom madeira, mas a cabeça, pescoço, e os quatro membros enegrecidos, pelame geral do corpo comprido e bastante denso, mancha branca no lábio superior e inferior e uma banda mandibular preta cruzando o queixo castanho amarelado, orelhas pequenas, arredondadas e pontiagudas, e presença de um tufo de pelos brancos na região ventral da cauda, e um tufo de pelos antevértidos na região tarsal de ambos membros.

Apesar da existência de descontinuidade geográfica, esta espécie tem sido considerada como subespécie de *M. bricenii*, por Anderson (1997) e mais tarde como subespécie de *M. rufina*, por Mattioli (2011), devido às enormes semelhanças fenotípicas, entre elas: 70-90 cm de comprimento cabeça-corpo e 45-50 cm de altura na cernelha, peso entre 10 e 15 kg, sendo *M. rufina* ligeiramente maior do que *M. bricenii* e *M. chunyi*. No caso de *M. rufina* e *M. bricenii* a cor geral do corpo é avermelhada, muito semelhante a *M. americana* e em *M. chunyi* a cor do corpo é marrom e os flancos avermelhados, sendo a cabeça, pescoço, e os quatro membros enegrecidos nas três espécies (Rumiz et al., 2007; Lizcano et al., 2010a; Lizcano et

al., 2010b), características que também são similares ao morfotipo de *M. bricenii* coletado na Colômbia, por Sarria-Perea, (2012): corpo pequeno e robusto, 47 cm de altura, 12 kg de peso, pelame comprida e densa no corpo inteiro, cor castanha escura no dorso e marrom escura quase preta no pescoço, cabeça, calcanhares e extremo superior da cauda; pequenas manchas brancas no maxilar superior e na região ventral da cauda.

Aqui também podemos presenciar uma incrível convergência morfológica, uma vez que *M. rufina* e *M. briceni* fazem parte da subtribo Odocoileina, enquanto *M. chunyi* pertence à Blastocerina, deixando clara a distância filogenética entre eles, mas uma convergência morfológica para a vida nas grandes altitudes e terrenos íngremes.

No escatograma dos dois primeiros componentes principais (PCA) e na árvore de distância morfológica das análises de biometria corporal e craniometria, o espécime de *M. chunyi* se agrupa no clado dos *Mazama* de menor tamanho, possuindo uma massa de 10,2 kg, altura de 46 cm, comprimento do corpo de 60,5 cm, e comprimento total do crânio de 153,75 mm, sendo as medidas mais representativas.

Neste estudo, avaliando-se medidas cranianas e corporais, não foi possível a discriminação, ou identificação de um padrão morfológico exclusivo e distintivo para *M. chunyi*, considerando que foi analisado só um exemplar da espécie. Por consequência, este tipo de análise apresenta um baixo poder de resolução, não sendo possível a diferenciação da espécie.

2. Análise citogenética

A grande variabilidade cariotípica entre as espécies do gênero *Mazama* tem sido uma das ferramentas para entender a evolução e a taxonomia do gênero. O padrão cariotípico das espécies de *Mazama* é considerado o mais complexo dentro da família Cervidae (Fontana e Rubini, 1990).

O padrão cariotípico apresentado para o topótipo de *M. chunyi* foi de $2n=54$, $NF=72 + 3-5Bs$, difere das espécies de *Mazama* até agora conhecidas.

Em comparação com o cariótipo tipo de *M. bricenii* ($2n=60$ e $NF=62$; Sarria-Perea 2012), que é considerado um veado anão pertencente ao grupo de *Mazama* vermelhos, e com o grupo de espécies de *Mazama* cinzas ou marrons; cariótipo tipo

de *M. gouazoubira* ($2n=70$ e $NF=70$; Neitzel 1979), de *M. nemorivaga* ($2n=69$ e $NF=72+1-3Bs$; Morales-Donoso 2017); o topótipo de *M. chunyi* apresentou um número diploide ($2n$) menor, entretanto há uma aproximação notável no número fundamental de braços cromossômicos (NF) com as espécies de *Mazama cinzas*. Dentro deste contexto, há um complexo número de rearranjos cromossômicos entre *M. chunyi* e as demais espécies de *Mazama*, que os distancia de maneira importante desde o ponto de vista evolutivo. Claramente, *M. chunyi* se mostra uma espécie válida sem nenhuma dúvida se considerarmos os cariótipos conhecidos até o presente no gênero *Mazama*.

O uso das técnicas de Bandamentos cromossômicos (C e Ag-NOR) do topótipo estudado, permitem estabelecer pela primeira vez um padrão cromossômico para *M. chunyi*, a ser considerado em posteriores comparações e estudos citogenéticos. No caso do Bandamento C, o topótipo de *M. chunyi* apresentou blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos, igualmente descrito para as demais espécies de *Mazama*, e no caso do Bandamento Ag-NOR, o topótipo estudado apresentou a marcação da região organizadora do nucléolo na região telomérica dos braços longos dos cromossomos do par dois, semelhante às descrições para *M. gouazoubira* (Duarte, 1992) e *M. nemorivaga* (Fiorillo et al., 2013), que definem um padrão de marcações na região telomérica dos cromossomos do par um e dois.

Contudo, sendo a citogenética determinante para a definição taxonômica do gênero *Mazama*, os resultados obtidos permitem a caracterização e comprovação da validade de *Mazama chunyi* como uma entidade única em nível específico.

3. Análise filogenética

As espécies de *Mazama* formam um grupo polifilético, evidenciado nas reconstruções filogenéticas do genoma mtDNA feitas por Hassanin et al., (2012).

Foram realizadas análises filogenéticas das sequências de três genes mitocondriais gerados para o topótipo de *M. chunyi* e de diferentes espécies de cervídeos neotropicais. Foi obtida uma avaliação preliminar da posição do exemplar coletado neste estudo em relação aos demais já avaliados quanto ao posicionamento filogenético.

As topologias apresentadas em ambas as análises (Inferência Bayesiana e Máxima Verossimilhança) foram semelhantes; mostrando maior robustez na árvore gerada pela análise do gene CIT-B, que evidência o agrupamento do topótipo de *M. chunyi* dentro da subtribo Blastocerina, formando um grupo monofilético junto aos espécimes de *M. chunyi* extraídos do GenBank (espécimes de museus do Peru), separado do resto das espécies incluídas na subtribo com uma alta probabilidade posterior e bootstrap (91% e 88 %) respectivamente. No caso da árvore gerada pela concatenação dos três genes mitocondriais (CIT-B+D-LOOP+ND5), foi evidenciada a sequência do topótipo de *M. chunyi* dentro da subtribo Blastocerina, próximo ao haplogrupo monofilético formado pelos indivíduos de *M. gouazoubira*, com alta probabilidade posterior e bootstrap (100% e 96 %), como já foi observado nas avaliações filogenéticas do estudo de Heckeberg et al., (2016) e de Gutiérrez et al., (2017), em cada caso, com base em uma única sequência de CIT-B. Sendo que em Gutiérrez et al., (2017) é sugerido a mudança de gênero para as espécies *M. gouazoubira* e *M. chunyi*, porque compartilham um ancestral comum mais recente com membros da subtribo Blastocerina e não com o tipo de espécie de *Mazama*, que pertence na subtribo Odocoileina.

CONCLUSÕES

O presente trabalho caracterizou um topótipo da espécie *M. chunyi*, que apresentou características morfológicas compatíveis com a descrição do holótipo de *M. chunyi* Hershkovitz, 1959, e de espécimes de museus e avistamentos na natureza por Rumiz e Pardo (2010). Segundo as análises craniométricas e biométricas, o espécime foi agrupado com as espécies de *Mazama* de menor porte, porém o exemplar não permitiu maiores inferências, uma vez que um só indivíduo da espécie foi avaliado.

Citogeneticamente, *M. chunyi* apresentou um padrão cariotípico diferente de outras espécies do gênero *Mazama* atualmente conhecidas, justificando seu posicionamento como uma entidade única em nível específico.

O topótipo analisado de *M. chunyi* posiciona-se de forma independente nas topologias apresentadas das árvores filogenéticas, pertencente à subtribo Blastocerina e com grande proximidade com a espécie *M. gouazoubira*. Sendo necessário em estudos posteriores, a inclusão de outros indivíduos de *M. chunyi* nas análises filogenéticas para ter um agrupamento mais robusto e consistente.

REFERÊNCIAS

ANDERSON, S. Mammals of Bolivia: taxonomy and distribution. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, v. 231, p. 1-652, 1997.

BIOMATTERS LTD. Genius Prime. Auckland, Nova Zelândia, 2018. Disponível em: <https://www.geneious.com>.

CAPARROZ, R.; MANTELLATTO, A. M. B.; BERTIOLI, D.; FIGUEIREDO, M.; DUARTE, J. M. B. 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**, Ribeirão Preto, SP v.38, n.3, p.338-345, 2015.

DRIESCH, A. A guide to the measurement of animal bones from archaeological sites. Harvard University, **Peabody Museum of Archaeology and Ethnology**, Peabody Museum Bulletin 1, 1976.

DUARTE, J. M. B. **Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 1992.

DUARTE, J. M. B.; RAMALHO, M. F. D. T.; LIMA, V. F. H.; JORGE, W. A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. **Genetics and Molecular Biology**. Ribeirão Preto, v. 22, n.3, p.399-400, 1999.

DUARTE, J. M. B.; GONZÁLEZ, S.; MALDONADO, J. E. The surprising evolutionary history of South American deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 49, n. 1, p. 17–22, out. 2008.

FELSENSTEIN, J. Confidence intervals on phylogenies: an approach using the bootstrap. **Evolution**, Lancaster, v. 39, p. 783-791, 1985.

FIORILLO, B. F.; SARRIA-PEREA, J. A.; ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. Cytogenetic description of the Amazonian brown brocket *Mazama nemorivaga* (Artiodactyla; Cervidae). **Comparative cytogenetics**, v. 7, n. 1, p. 25-31, 2013.

FROHLICH, J.; KUBICKOVA, S.; MUSILOVA, P.; CERNOHORSKA, H.; MUSKOVA, H.; VODICKA, R.; RUBES, J. Karyotype relationships among selected deer species and cattle revealed by bovine FISH probes. **PLoS ONE**, [S. l.], v. 12, n. 11, p. 1–17, 2017.

FRÖHLICH, J.; KUBICKOVA, S.; MUSILOVA, P.; CERNOHORSKA, H.; MUSKOVA, H.; VODICKA, R.; RUBES, J. A Comparative Study of Pygmy Hippopotamus (*Choeropsis liberiensis*) Karyotype by Cross-Species Chromosome Painting. **Journal of Mammalian Evolution**, [S. l.], v. 24, n. 4, p. 465–474, 2017.

GALINDO, D. J.; MARTINS, G. S.; VOZDOVA, M.; CERNOHORSKA, H.; KUBICKOVA, S.; BERNEGOSI, A. M.; KADLCIKOVA, D.; RUBES, J.; DUARTE, J. M. B. Chromosomal Polymorphism and Speciation: The Case of the Genus *Mazama* (Cetartiodactyla; Cervidae). **Genes**, [S. l.], v. 12, n. 2, p. 165, 2021.

GUTIÉRREZ, E. E.; HELGEN, K. M.; MCDONOUGH, M. M.; BAUER, F.; HAWKINS M. T. R.; ESCOBEDOMORALES, L. A.; PATTERSON, B. D.; MALDONADO, J. E. 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, 2017.

HAMMER Φ .; HARPER, D. A. T.; RYAN, P. D. PAST: Paleontological statistics software package for education and data analysis. 4(1): 9pp. Disponível em: <http://palaeo-eletronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm>, **Paleontologia Electronica**, 2001.

HASSANIN, A.; PASQUET, E.; VIGNES, J. D. Systematic relationships within the subfamily Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as determined from cytochrome b sequences. **J. Mammal. Evol.** Paris, França, v. 5, p. 217–236, 1998.

HASSANIN, A.; DELSUC, F.; ROPIQUET, A.; HAMMER, C.; VAN VUUREN, B. J.; MATTHEE, C.; RUIZGARCIA, M.; CATZEFLIS, F.; ARESKOU, V.; NGUYEN, T. T.; COULOUX, A. Pattern and timing of diversification of Cetartiodactyla (Mammalia, Laurasiatheria), as revealed by a comprehensive analysis of mitochondrial genomes. **Comptes Rendus Biologies** 335:32-50, 2012.

HECKEBERG, N. S.; ERPENDBECK, D.; WORDHEIDE, G.; ROSSNER, G. E. Systematic relationships of five newly sequenced cervid espécies. **Peer J**, 4; e 2307, 2016.

HERSHKOVITZ, P. Neotropical deer (Cervidae). Part I. Pudu, genus Pudu Gray. **Fieldiana, Zoology, news series**, v. 11, p. 1-86, 1982.

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

HOWELL, W. M.; BLACK, D. A. Y. Controlled silver staining of nucleolus organizer regions with a protective colloidal developer: a 1 step method. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 36, p. 1014-1015, 1980.

KUBICKOVA, S.; CERNOHORSKA, H.; MUSILOVA, P.; RUBES, J. The use of laser microdissection for the preparation of chromosome-specific painting probes in farm animals. **Chromosome research: an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology**, [S. l.], v. 10, n. 7, p. 571–7, 2002.

LANFEAR, R.; FRANSEN, P. B.; WRIGHT, A. M.; SENFELD, T.; CALCOTT, B. PartitionFinder 2: new methods for selecting partitioned models of evolution for molecular and morphological phylogenetic analyses. **Molecular biology and evolution**, 2016. DOI: [dx.doi.org/10.1093/molbev/msw260](https://doi.org/10.1093/molbev/msw260).

MATTIOLI, S. Family Cervidae (Deer). **Handbook of the mammals of the world**. v. 2, p. 350-443, 2011.

MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; & SCHWARTZ, T. "Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees" in **Proceedings of the Gateway Computing Environments Workshop (GCE)**, 14 Nov. 2010, New Orleans, LA p. 1-8, 2010.

MORALES-DONOSO, J. A. **Caracterização Morfológica, Citogenética e Molecular de Mazama nemorivaga (Cuvier, 1817) a partir de um topótipo atual**. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento Animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2017.

LEVAN, A.; FREDGA, K.; SANDBERG, A. A. Nomenclature for centromeric position of chromosomes. **Hereditas**, v. 52, p. 201-219, 1964.

LIZCANO, D. J.; ÁLVAREZ, S. J.; DELGADO-V, C. A. Dwarf red brocket Mazama rufina (PURCHERAN 1951) – Em: DUARTE, J.M.B.; GONZALEZ S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep, IUCN, p. 177-180, 2010a.

LIZCANO, D. J.; YERENA, E.; ALVAREZ, S. J.; DIETRICH, J. R. Merida Brocket Deer Mazama bricenii (THOMAS 1908) – Em: DUARTE, J. M. B.; GONZALEZ S. **Neotropical Cervidology: Biology and medicine of Latin American deer**. Jaboticabal, Funep, IUCN, p. 181-184, 2010b.

NEITZEL, H. Chromosomenevolution in der Familie der Hirsche (Cervidae). **Bongo**, Berlin, v. 3, p. 27-38, 1979.

PUCHERAN, J. Note sur une espèce nouvelle de Cerf (*Cervus rufinus*). **Revue et Magasin de Zoologie**. t. III, p. 561-565, 1851.

RAMBAULT, A. Figtree v1.3.1. Computer program and documentation, 2012. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/>

REDFORD, K. H.; EISENBERG, J. F. Mammals of the neotropics: **The southern cone**. Chicago, University of Chicago Press, 1992.

REES, J. W. Morphologic variation in the cranium and mandible of the white-tailed deer (*Odocoileus virginianus*): a comparative study of geographical and four biological distances. **Journal of Morphology**, v. 128, p. 95-112, 1969.

RONQUIST, F.; TESLENKO, M.; VAN DER MARK, P.; AYRES, D. L.; DARLING, A.; HÖHNA, S.; LARGET, B.; LIU, L.; SUCHARD, M. A.; HUELSENBECK, J. P. MrBayes 3.2: efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space. **Systematic Biology** 61:539-542, 2012.

ROSSI, R. V. **Taxonomia de Mazama Rafinesque, 1817 do Brasil (Artiodactyla; Cervidae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidade de São Paulo, São Paulo, p. 174, 2000.

RUMIZ, D. I.; PARDO, E.; EULERT, C. F.; ARISPE, R.; WALLACE, R. B.; GÓMEZ, H. New records and a status assessment of a rare dwarf brocket deer from the mountain forests of Bolivia. **Journal of Zoology**, London, v. 271, p. 428-436, 2007.

RUMIZ, D. I.; PARDO, E. Peruvian dwarf brocket deer *Mazama chunyi* (Hershkovitz 1959). In J.M.B. Duarte e S. González (eds.), **Neotropical Cervidology: Biology and Medicine of Latin American Deer**. Jaboticabal, Funep, IUCN, p. 185– 189, 2010.

RUMIZ, D.I.; BARRIO, J. 2016. *Mazama chunyi*. The IUCN Red List of Threatened Species. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T12913A22165860.en>

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. **Cold Spring Harbor Press**, New York, 1989.

SARRIA-PEREA, J. A. **Taxonomia e filogenia de algumas espécies de Mazama (Mammalia; Cervidae) da Colômbia**. Tese (Doutorado em Genética e Melhoramento Animal) Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2012.

SNEATH, P.; SOKAL, R. R. **Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical taxonomy**. San Francisco, W. H. Freeman and Company. USA. 1973.

STAMATAKIS, A. "RAxML Version 8: A tool for Phylogenetic Analysis and Post-Analysis of Large Phylogenies". In **Bioinformatics**, 30:1312–1313, 2014.

SUMNER, A. T. A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. **Experimental Cell Research**, v. 75, p. 304-306, 1972.

TELENIUS, H.; CARTER, N. P.; BEBB, C. E.; NORDENSKJÖLD, M.; PONDER, B. A. J.; TUNNACLIFFE, A. Degenerate oligonucleotide-primed PCR: general amplification of target DNA by a single degenerate primer. **Genomics**, [S. l.], v. 13, n. 3, p. 718–25, 1992.

THOMAS, O. A new deer of the brocket group from Venezuela. **Ann. Mag. Nat. Hist.** 1 v.8. p. 349-350, 1908.

TOMAZELLA, I. M.; ABRIL, V. V.; DUARTE, J. M. B. 2017 Identifying *Mazama gouazoubira* (Artiodactyla; Cervidae) chromosomes involved in rearrangements induced by doxorubicin. **Genet Mol Biol**, 40:460- 467.

VERMA, R. S., BABU, A. **Human chromosomes: principles and techniques**. McGraw Hill, New York, 2. Ed., 1995, 419p.

VILA, C.; MALDONADO, J. E.; WAYNE, R. K. Phylogenetic Relationships, Evolution, and Genetic Diversity of the **Domestic Dog journal of Heredity**, p. 71-76, 1999.

VOZDOVA, M.; KUBICKOVA, S.; CERNOHORSKA, H.; FRÖHLICH, J.; VODICKA, R.; RUBES, J. Comparative Study of the Bush Dog (*Speothos venaticus*) Karyotype and Analysis of Satellite DNA Sequences and Their Chromosome Distribution in Six Species of Canidae. **Cytogenetic and genome research**, [S. l.], v. 159, n. 2, p. 88–96, 2019.

WADA, K.; NAKAMURA, M.; NISHIBORI, M.; YOKOHAMA, M. The complete nucleotide sequence of mitochondrial genome in the rein deer (*Rangifer tarandus*) and red deer (*Cervus elaphus*). **National Center for Biotechnology Information, NIH, Bethesda, USA**. 2010.

WEBER, M.; GONZÁLEZ, S. Latin American deer diversity and conservation: a review of status and distribution. **Ecoscience**, 10, 443-454, 2003.

APÊNDICES

APÉNDICE A

Permissão de coleta

 ESTADO PLURINACIONAL DE BOLIVIA	 Ministerio de Medio Ambiente y Agua
La Paz, 13 de mayo de 2019	
MMAYA/VMABCCGDF/DGBAP/MEG N°0234/2019	
<p>Señora Marisol Toledo Directora Ejecutiva Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado Presente.</p>	
<p>REF.: Aprobación del estudio científico Caracterización taxonómica de dos cérvidos nativos (venadito andino o chufi, <i>Mazama chunyi</i>, y huaso, <i>Mazama americana sarae</i>) en su áreas de descripción original para dilucidar la filogenia de los venados del género <i>Mazama</i> y contribuir a su conservación en el marco del Programa GCP/BOL/052/ITA.</p>	
<p>De mi consideración:</p>	
<p>Mediante la presente y en virtud a la revisión técnica de las propuestas de investigación remitidas a esta dirección por el Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado, se establece que la propuesta cumple con los requisitos establecidos en la Resolución Administrativa R.A. VMABCC N°026/09 y Resolución Administrativa 005/2017 por lo tanto son pertinentes y oportunas en el marco de las políticas estatales de desarrollo económico y social. Así mismo, tratándose de un estudio que se desarrollará en Áreas Protegidas, el mismo cuenta con la Opinión Fundamentada positiva por parte del Servicio Nacional de Áreas Protegidas (SERNAP CAR/DMA N°0364/2019).</p>	
<p>En función a lo cual, se resuelve:</p>	
<ul style="list-style-type: none"> • Autorizar la implementación del estudio Caracterización taxonómica de dos cérvidos nativos (venadito andino o chufi, <i>Mazama chunyi</i>, y huaso, <i>Mazama americana sarae</i>) en su áreas de descripción original para dilucidar la filogenia de los venados del género <i>Mazama</i> y contribuir a su conservación • Recordar al Coordinador del Programa que el mismo es RESPONSABLE DE PRECAUTELAR EL MATERIAL COLECTADO Y SU DESTINO FINAL, cumpliendo de manera estricta con lo determinado en la R.A. VMABCC N° 026/09 art. 17 numerales I y II. Como también cumplir con las responsabilidades establecidas en el Artículo 15 y sus respectivos incisos, asimismo debe coordinar de manera directa con las comunidades y autoridades locales en la zona donde se realiza el proyecto cuando esto sea pertinente. 	



INSTITUTO PARAGUAYO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA

MMaya
 Autoridad de Medio Ambiente y Agua

- Recordar a la Institución Solicitante (MUSEO DE HISTORIA NATURAL NOEL KEMPF MERCADO) que los formularios autorizados constituyen Declaraciones Juradas y que cualquier cambio en las condiciones y compromisos estipulados en los mismos deberá ser puesto a consideración de la AACN para su evaluación.
- Recordar del mismo modo a los responsables operativos que deberán entregar los informes de avance y final acompañados de toda la información biológica generada durante el proyecto convenientemente georreferenciada.

Con este motivo, aprovecho la oportunidad para reiterar las seguridades de mi distinguida consideración.


 Dra. Teresa A. López Chávez
 DIRECTORA GENERAL DE
 BIODIVERSIDAD Y ÁREAS PROTEGIDAS
 MMAYA - VMA

T.M. 001/97
 C.A. 1450-1500.MS.B.G.
 P.4518/14.3098.0003



APÊNDICE B

Carta de Intenções



**CARTA DE INTENCIONES PARA TRABAJO CONJUNTO EN PROYECTO
“CARACTERIZACIÓN TAXONÓMICA DE DOS CÉRVIDOS NATIVOS (VENADITO ANDINO O CHUÑI,
MAZAMA CHUNYI, Y HUASO, MAZAMA AMERICANA SARAÉ) EN SU ÁREA DE DESCRIPCIÓN
ORIGINAL PARA DILUCIDAR LA FILOGENIA DE LOS VENADOS DEL GENERO MAZAMA Y
CONTRIBUIR A SU CONSERVACIÓN”**

La presente carta de intenciones, expresa el compromiso e interés de trabajo entre el **Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE)** da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" (UNESP) y el **Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado (MHNNKM)** Centro de Investigación y Extensión en Biodiversidad dependiente de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la U.A.G.R.M., para ejecutar de manera conjunta la revisión taxonómica del género *Mazama* a través de la caracterización morfológica, citogenética y molecular de topotipos actuales de *Mazama americana sarae* y *Mazama chunyi*; investigación que será realizada por Liz Jiannine Fuentes, Investigadora Asociada del MHNNKM y becaria de Maestría de NUPECCE. El periodo de vigencia del proyecto será de dos años a partir del 1 de marzo de 2019.

NUPECCE, es uno de los principales centros del mundo para la investigación y conservación de ciervos neotropicales. Desarrolla trabajos en las áreas de ecología, reproducción, genética, educación, manejo en cautiverio y vida libre. En el marco del proyecto temático “O uso de topótipos atuais para produção de genótipos e citótipos na revisão taxonômica do gênero Mazama: a base para a conservação das espécies” se compromete a:

- Apoyar a Liz Jiannine Fuentes Rojas, investigadora Asociada del Museo NKM, con una beca para su maestría en Genética y Mejoramiento Animal en la FCAV/UNESP que le permita realizar los cursos, tomar los datos de campo y analizarlos en laboratorio para completar su tesis
- Cumplir con la legislación boliviana y procedimientos administrativos sobre estudios de biodiversidad siguiendo las instrucciones de las autoridades del Museo NKM
- Reconocer el apoyo institucional del Museo NKM en todas las publicaciones resultantes del trabajo conjunto e incluir a sus investigadores en los créditos de coautoría o agradecimientos según la real contribución de cada caso; dando a conocer los trabajos al MHNNKM antes de su publicación.

El **Museo de Historia Natural Noel Kempff Mercado**, como entidad académica del Estado Nacional e Institución Científica Autorizada se compromete a:

- Tramitar los respectivos permisos de colecta, manejo y préstamo de especímenes del estudio ante la autoridad nacional competente.
- Apoyar con contactos institucionales, asesoramiento técnico y proveer dentro de sus posibilidades apoyo logístico para que la becaria pueda realizar el trabajo de campo y colecta de especímenes en las localidades tipo.



- Ser depositario del material biológico colectado en el marco del proyecto.
- Incluir los logotipos institucionales y reconocer explícitamente los aportes de las partes en documentos resultantes de actividades conjuntas o que incluyan y/o utilicen información compartida.

En este marco, ambas instituciones se comprometen a iniciar el proceso de colaboración conjunta. Las partes, también, manifiestan su acuerdo con lo expresado en la presente carta de intenciones, firman al pie de este documento, a los 15 días del mes de marzo de 2019.

Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte
Núcleo de Pesquisa e Conservação
de Cervídeos - NUPECCE
Depto. de Zootecnia - UNESP/Jaboticabal


José Maurício Barbanti Duarte
COORDINADOR
NÚCLEO DE PESQUISA E CONSERVAÇÃO DE
CERVÍDEOS (NUPECCE) DA FACULDADE DE
CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE
MESQUITA FILHO" (UNESP)

Dra. Marisol Toledo
DIRECTORA EJECUTIVA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL NKM
F.C.A. - U.A.G.R.M.

Marisol Toledo
DIRECTORA EJECUTIVA
MUSEO DE HISTORIA NATURAL NOEL KEMPPF MERCADO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRÍCOLAS
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA GABRIEL RENE MORENO

APÊNDICE C

Confirmação da existência do holótipo de *M. sarae*


Data Portal

[Home](#) [Data](#) [Contact](#) [About](#)

[Home](#) > [Data](#) > [Collection specimens](#) > [Specimens](#) > [1925.2.1.77](#) >

Normal view Darwin Core view

View resource Download Contact record curator

1925.2.1.77

Classification

Scientific name: *Mazama sarae* Thomas 1925
Author: Thomas 1925
Kingdom: Animalia
Phylum: Chordata
Class: Mammalia
Order: Artiodactyla
Family: Cervidae
Genus: *Mazama*
Species: *sarae*
Higher classification: Animalia; Chordata; Vertebrata; Mammalia; Artiodactyla; Cervidae

Location

Locality: Carapari, Southern Brazil / Note that the original labels state Bolivia. Thomas (1925) states Carapari, - 1000m about 35 kilometres north of Yaculba, on the way towards Tarija, Bolivia. He continues A low lying valley, with a great deal of vegetation
Minimum elevation(m): 1000.00

Collection event

Recorded by: E Budin
Collection date: 1925

Identification

Type status: HOLOTYPE

Determinations:	Names	Types	FiledAs
	<i>Mazama sarae</i> Thomas 1925		Yes

Specimen

Catalogue number: 1925.2.1.77
Collection code: ZOO (Zoology)
Sub department: LS Mammals
Other catalog numbers: NHMUK:ecatalogue:3627137
Registration code: MA
Individual count: 1
Sex: female
Life stage: adult

APÊNDICE D

Confirmação da existência do holótipo de *M. chunyi*

CATALOG OF RECENT MAMMAL TYPES
IN THE AMERICAN MUSEUM OF
NATURAL HISTORY

MARIE A. LAWRENCE

*Senior Scientific Assistant, Department of Mammalogy
American Museum of Natural History*

Mazama chunyi Hershkovitz

Proc. Biol. Soc. Washington 72: 45, 1959.

HOLOTYPE: 73098. Skin and skull. Juvenile male.

LOCALITY: Bolivia: (La Paz); Cocopunco, 3200 m. March 28, 1926.

COLLECTOR: G. H. H. Tate. Original number 3662.

CONDITION: Skin and skull complete.

APÊNDICE E

Tabela 1E. Relação de espécimes utilizados para comparação nas análises biométricas corporais dos topótipos de *M. sarae* e *M. chunyi*, com o número de identificação do museu, sexo e origem.

Espécie	N° NPC	Origem	Sexo
<i>Mazama americana</i>	NPC 079	Regina-Caiena, Guiana Francesa	Macho
	NPC 022	Comunidade Cipoal-Jarí, Brasil	Macho
	NPC 034	Foz de Iguaçu-PR, Brasil	Fêmea
	NPC 018	Itaituba-PR, Brasil	Macho
	NPC 007	Juína-MT, Brasil	Macho
	NPC 073	Juína-MT, Brasil	Fêmea
	NPC 067	Porto Velho-RO	Fêmea
	NPC 078	Santarém-PA, Brasil	Macho
<i>Mazama sarae</i>	NPC 145	Cañadas-Tarija, Bolívia	Macho
<i>Mazama temama</i>	NPC 094	Songolica-Veracruz, México	Macho
	NPC 095	Campeche, México	Fêmea
<i>Mazama bororo</i>	NPC 001	Campina grande do sul-PR, Brasil	Macho
	NPC 130	Curitiba-PR, Brasil	Fêmea
	NPC 141	Curitiba-PR, Brasil	Macho
<i>Mazama rufa</i>	NPC 117	Foz de Iguaçu-PR, Brasil	Fêmea
	NPC118	Foz de Iguaçu-PR, Brasil	Fêmea
<i>Mazama nana</i>	NPC 131	NUPECCE	Fêmea
	NPC 020		Fêmea
<i>Mazama gouazoubira</i>	NPC 139		Fêmea
	NPC 119	Próximo ao porto Arecutacua, Paraguai	Fêmea
	NPC 113	Próximo a Assunção, Paraguai	Macho
	NPC 106	Próximo a Puerto Pinasco, Paraguai	Fêmea
	NPC 014	Pantanal-MS, Brasil	Macho
<i>Mazama nemorivaga</i>	NPC 137	Villena-RO, Brasil	Macho
	NPC 080	Regina-Caiena, Guiana Francesa	Macho
	NPC 010	Parque nacional do Cabo Orange-AP, Brasil	Fêmea
	NPC 088	Juína-MT, Brasil	Macho
	NPC 064	Jupari-PA, Brasil	Fêmea
<i>Mazama chunyi</i>	NPC 151	Nor Yungas-La Paz, Bolívia	Fêmea

Tabela 2E. Relação de espécimes utilizados para comparação nas análises craniométricas dos topótipos de *M. sarae* e *M. chunyi*, com o número de identificação do museu, sexo e origem.

Espécie	N° NPC	Origem	Sexo
<i>Mazama americana</i>	NPC 079	Regina-Caiena, Guiana Francesa	Macho
	NPC 022	Comunidade Cipoal-Jarí, Brasil	Macho
	NPC 029		
	NPC 034	Foz de Iguaçu-PR, Brasil	Fêmea
	NPC 018	Itaituba-PR, Brasil	Macho
	NPC 007	Juína-MT, Brasil	Macho
	NPC 038	Carajás-AM, Brasil	Fêmea
	NPC 073	Juína-MT, Brasil	Fêmea
	NPC 067	Porto Velho-RO	Fêmea
	NPC 078	Santarém-PA, Brasil	Macho
<i>Mazama sarae</i>	NPC 145	Cañadas-Tarija, Bolívia	Macho
<i>Mazama temama</i>	NPC 094	Songolica-Veracruz, México	Macho
	NPC 095	Campeche, México	Fêmea
<i>Mazama bororo</i>	NPC 001	Campina grande do sul-PR, Brasil	Macho
	NPC 002	PR, Brasil	Fêmea
	MPC 024	Pq. Estadual Intervalos-SP, Brasil	Macho
	NPC 028	Pq. Estadual Intervalos-SP, Brasil	Fêmea
<i>Mazama rufa</i>	NPC 117	Foz de Iguaçu-PR, Brasil	Fêmea
	NPC118	Foz de Iguaçu-PR, Brasil	Fêmea
<i>Mazama nana</i>	NPC 114	Chapecó-SC, Brasil	Macho
	NPC 020		Fêmea
<i>Mazama gouazoubira</i>	NPC 014	Pantanal-MS, Brasil	Macho
	NPC 061	Guariba-SP, Brasil	Macho
	NPC 113	Próximo a Assunção, Paraguai	Macho
<i>Mazama nemorivaga</i>	NPC 062	Santarém-PA, Brasil	Fêmea
	NPC 080	Regina-Caiena, Guiana Francesa	Macho
<i>Mazama chunyi</i>	NPC 151	Nor Yungas-La Paz, Bolívia	Fêmea

APÊNDICE F

Tabela 1F. Resultados da análise de componentes principais com base em medições corporais dos topótipos de *M. sarae* e *M. chunyi* analisado neste estudo e dos indivíduos adultos selecionados do banco de dados do NUPECCE.

Medida	PC 1	PC 2
LC	0.05335	0.074385
CO	0.038247	-0.01328
DEO	0.026802	0.0004461
MTC	0.08687	0.074122
ALT	0.40755	0.37793
CCO	0.66767	-0.72214
CCA	0.12479	0.26719
MTT	0.14	0.12929
PP	0.24838	0.058676
TX	0.50827	0.47679
CCB	0.13801	0.074142
MB	0.036007	-0.010471
%Variância	89.806	4.3322

Componentes 3 - 12 representam um percentual da variância total muito baixo (<4%) e, por conseguinte, são omitidos. A medida LC representa a largura da cabeça, CO comprimento da orelha, DEO distância entre olhos, MTC metacarpo, ALT altura, CCO comprimento do corpo, CCA comprimento da cauda, MTT metatarso, PP perímetro do pescoço, TX tórax, CCB Comprimento da cabeça e MB mandíbula.

Tabela 2F. Resultados da análise de componentes principais com base em medições cranianas dos topótipos de *M. sarae* e *M. chunyi* analisado neste estudo e dos indivíduos adultos selecionados do banco de dados do NUPECCE.

Medidas	PC 1	PC 2
CT	0,39502	0,066182
CCB	0,31448	0,010901
CB	0,28933	-0,086042
CCC	0,15802	-0,013591
PP	0,13808	-0,052945
EBC	0,031692	0,034668
EBF	0,25771	-0,13718
NCL	0,10321	-0,35471
CVC	0,20449	0,37711
CFM	0,11717	-0,41167
LN	0,12412	-0,39705
LR	0,2541	0,059585
LP	0,36811	0,010064
ACR	0,20339	-0,011555
MCN	0,13083	0,46322
CCFL	0,21343	0,082898
MPL	0,22195	-0,23388
CPO	0,19072	-0,022764
CLP	0,12603	0,12142
DCD	0,066522	0,080806
CLM	0,037609	0,039176
CLP	0,023576	0,048347
MCIO	0,035982	0,009171
MAIO	0,04683	0,023791
MLM	0,090246	-0,042056
MLCO	0,051621	0,021406
MLPP	0,085919	-0,018295
MLFM	0,019144	0,015272
LFM	0,061877	0,15559
MLEO	0,046235	0,09261
LMEO	0,03978	0,044999
LZ	0,12504	0,10415
MLEN	0,029025	0,046925
MLPM	0,040933	-0,051456
MLP	0,079527	0,063108
BCNS	0,046825	0,080053
%Variância	93,175	1,6969

Componentes 3 - 26 representam um percentual da variância total muito baixo (<1%) e, por conseguinte, são omitidos. A medida CT representa comprimento total, CCB comprimento condilobasal, CB comprimento basal, CCC comprimento curto do crânio, PP premaxilar – prosthion, EBC eixo basecranial, EBF eixo basefacial, NCL comprimento do neurocrânio, CVC comprimento vicerocraniano, CFM comprimento frontal mediano, LN lambda – nasal, LR lambda – região mais distal do osso nasal, LP lambda – prosthion, ACR acrocrânio, MCN maior comprimento dos nasais, CCFL comprimento curto facial – lateral, CPO comprimento palatal oral, CLP comprimento lateral do premaxilar, DCD distância corrida de dentes, CLM comprimento da linha do molar, CLP comprimento da linha premaxilar, MCIO maior comprimento interno da órbita, MAIO maior altura interna da órbita, MLM maior largura do mastoide, MLCO maior largura dos côndilos oxicipitais, MLPP maior largura das bases do processo paraoccipital, MLFM maior largura do forâmen magno, LFM largura frontal menor, MLEO maior largura entre as órbitas, LMEO largura mínima entre as órbitas, LZ largura zigomática, MLEN maior largura entre os nasais, MLPM maior largura entre o premaxilar, MLP maior largura do palatal, BCNS basion – ponto mais alto da crista nuchal.

APÊNDICE G

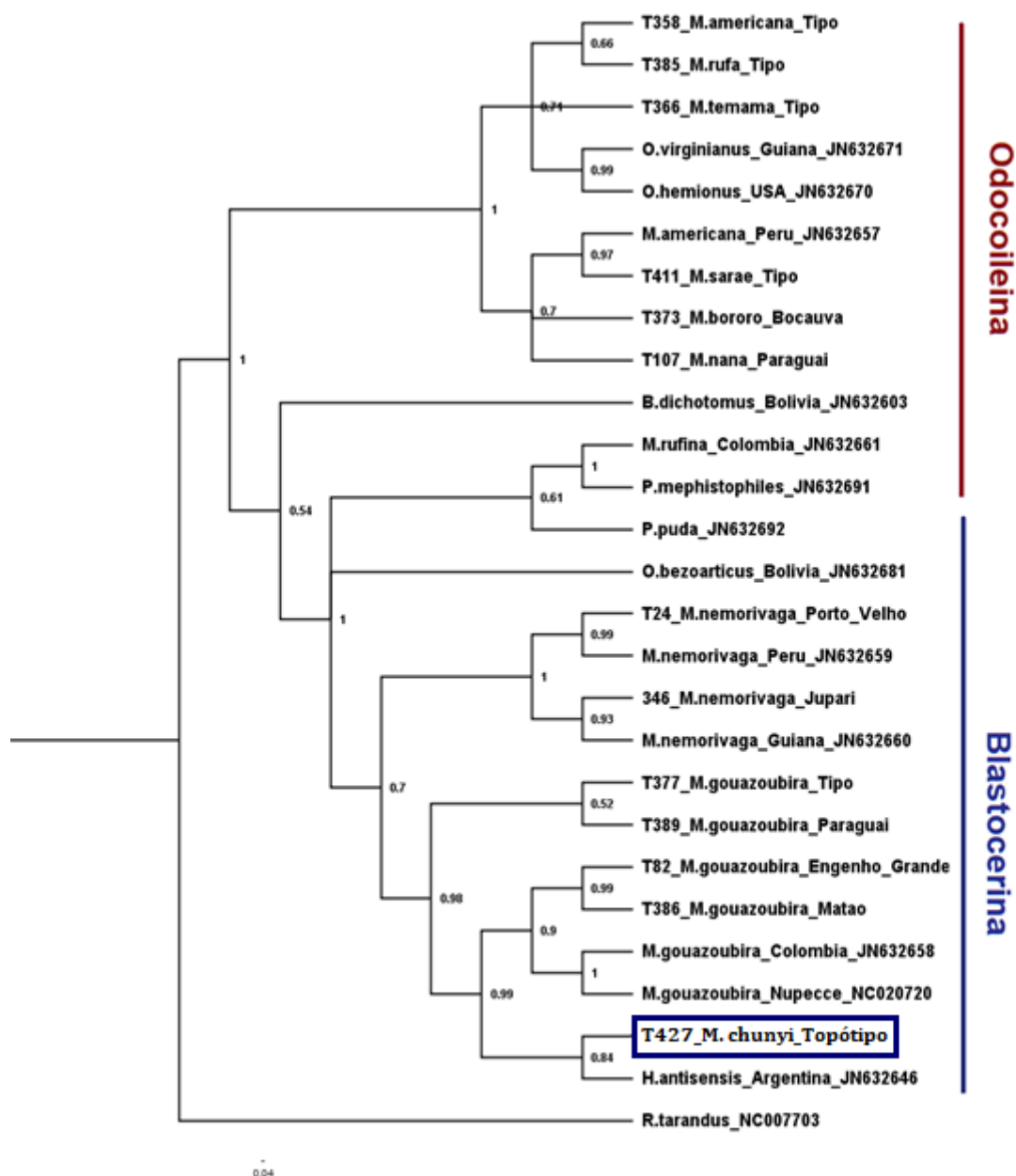


Figura 1G. Árvore filogenética do gene D-LOOP. Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

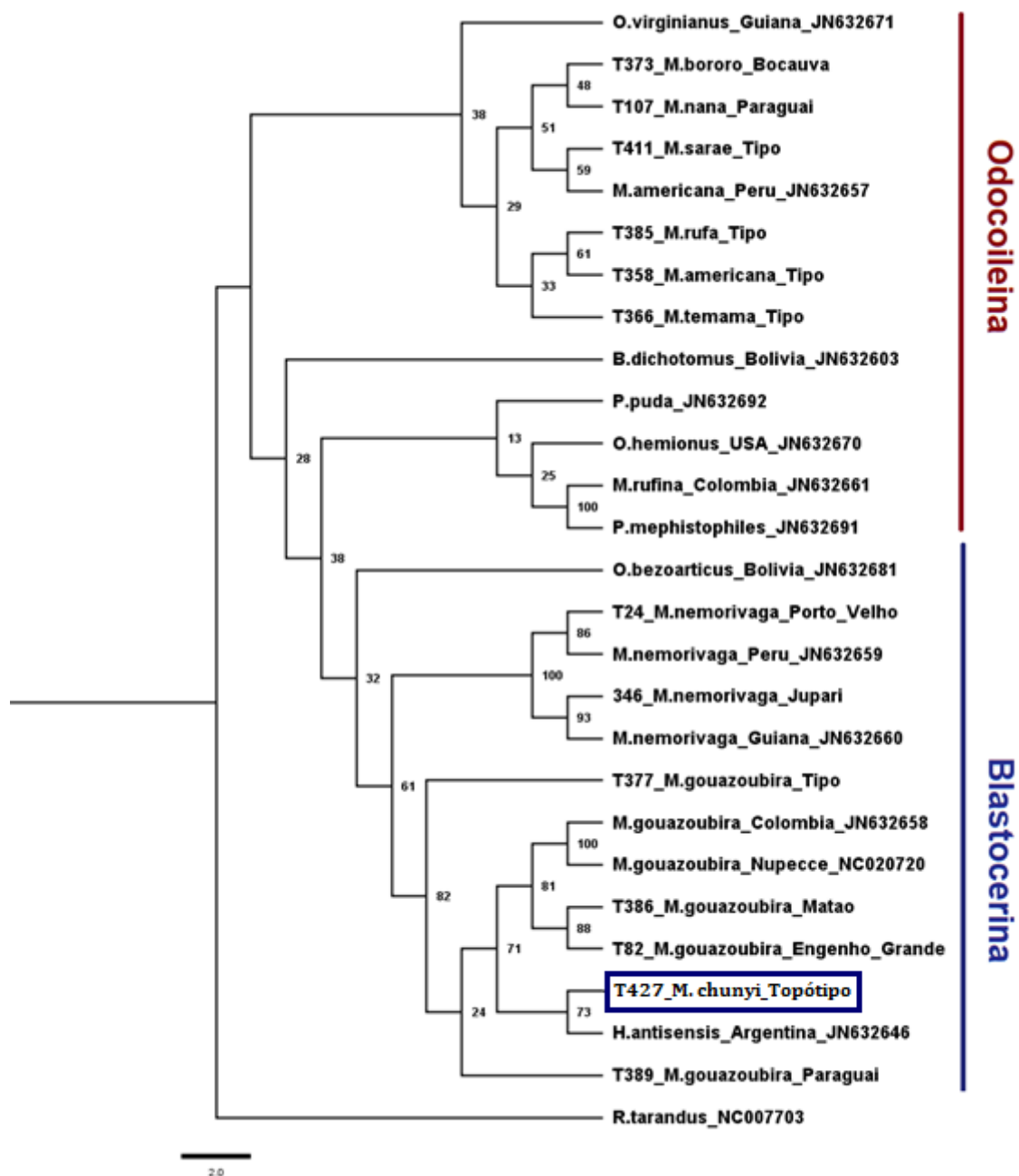


Figura 2G. Árvore filogenética do gene D-LOOP. Análise de Máxima Verossimilhança (MV). Os valores representam o “bootstrap” da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

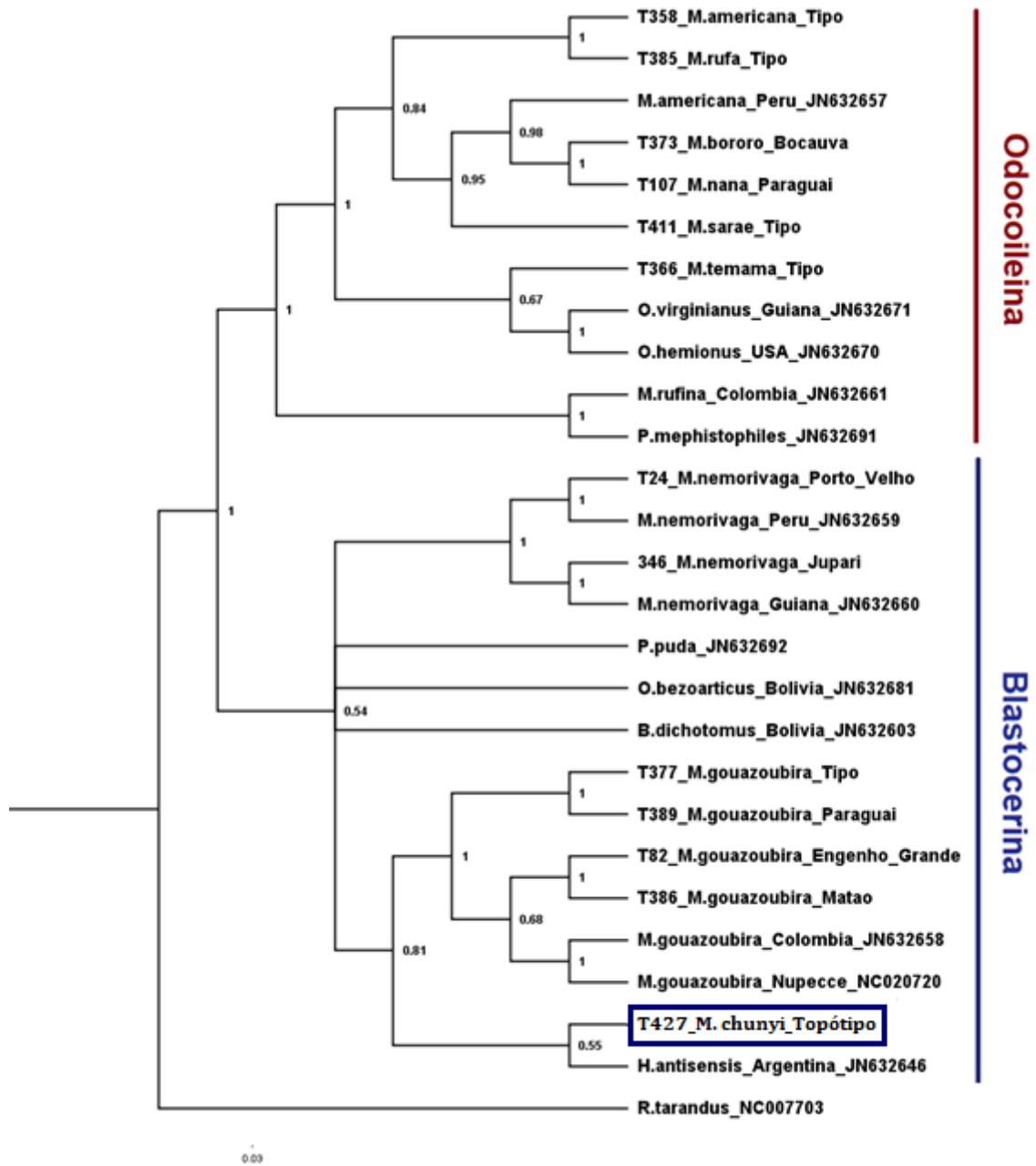


Figura 3G. Árvore filogenética do gene ND5. Análise de Inferência Bayesiana (IB). Os valores representam a probabilidade posterior da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.

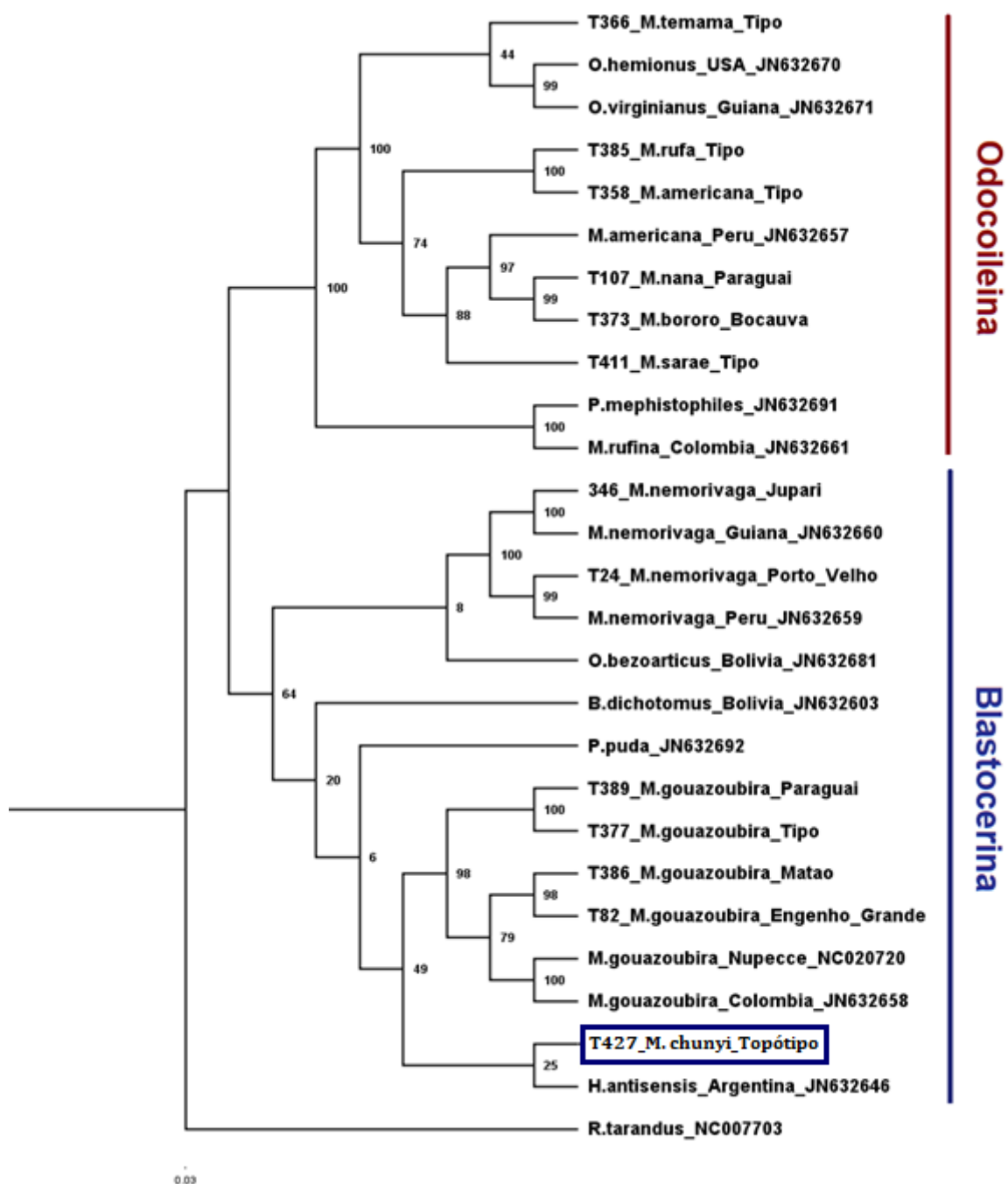


Figura 4G. Árvore filogenética do gene ND5. Análise de Máxima Verossimilhança (MV). Os valores representam o “bootstrap” da análise. Grupo externo: *R. tarandus*.