

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**O STATUS TAXONÔMICO DE *Cervus rufus* Illiger, 1811 E
SUA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA**

**Douglas Jovino Luduvério
Biólogo**

2018

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA - UNESP
CÂMPUS DE JABOTICABAL**

**O STATUS TAXONÔMICO DE *Cervus rufus* Illiger, 1811 E
SUA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA**

Douglas Jovino Luduvério

Orientador: Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte

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

2018

L944s Luduvério, Douglas Jovino
O status taxonômico de cervus rufus illiger, 1811 e sua
caracterização genética e morfológica / Douglas Jovino Luduvério. --
Jaboticabal, 2018
ix, 67 p. : il. ; 29 cm

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, 2018
Orientador: José Mauricio Barbanti Duarte
Banca examinadora: Mario de Vivo, Iara Maluf Tomazella
Bibliografia

1. Taxonomia. 2. DNA mitocondrial. 3. Holótipo. 4. Filogenia. 5.
Citogenética. I. Título. II. Jaboticabal-Faculdade de Ciências Agrárias e
Veterinárias.

CDU 575.8:599.735.34

Ficha catalográfica elaborada pela Seção Técnica de Aquisição e Tratamento da Informação –
Diretoria Técnica de Biblioteca e Documentação - UNESP, Câmpus de Jaboticabal.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: O STATUS TAXONÔMICO DE Cervus rufus Illiger, 1811 E SUA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA

AUTOR: DOUGLAS JOVINO LUDUVERIO

ORIENTADOR: JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE

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



Prof. Dr. JOSÉ MAURICIO BARBANTI DUARTE
Departamento de Zootecnia / FCAV / UNESP - Jaboticabal



Prof. Dr. MARIO DE VIVO
Instituto de Estudos Avançados / Ribeirão Preto/SP



Profa. Dra. IARA MALUF TOMAZELLA
ETEC-Escola Técnica Estadual / Batatais/SP

Jaboticabal, 05 de junho de 2018

DADOS CURRICULARES DO AUTOR

DOUGLAS JOVINO LUDUVÉRIO – Nascido no dia 22 de junho de 1987 em Jaboticabal, SP. Filho de Joaquim Luduvério Filho e Roseli Isildinha Jovino. Em março de 2007 ingressou no Curso de Graduação de Ciências Biológicas, modalidade Licenciatura, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP –Universidade Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal. No decorrer da graduação fez estágios na mesma instituição, nas áreas de genética, zoologia, aquicultura, animais selvagens e ectoparasitas, o último no qual obteve bolsa de Iniciação Científica da Fapesp por um período de um ano e meio. Após o término da graduação foi efetivado em concurso público na área de patologia clínica, no qual permaneceu por um período de 5 anos. Em março de 2016, ingressou no curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento Animal, na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP – Univ. Estadual Paulista, Campus de Jaboticabal, Departamento de Zootecnia, NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos), na linha de taxonomia e conservação sob orientação da Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, sendo bolsista do programa CAPES.

**À minha vó Maria (*in memoriam*) mulher
amável e batalhadora, a quem devo o que
sou hoje, meu exemplo!**

**Mesmo tendo partido a muito tempo não se
distanciou um minuto se quer.**

Dedico

AGRADECIMENTOS

- À minha esposa Gabriela, meu esteio, onde todos os problemas ficam pequenos perto de sua alegria e positividade, sempre de mãos dadas no caminho da vida. Obrigado pela sua valiosa ajuda na produção dos mapas, e por me tornar uma pessoa melhor.
- Ao meu irmão Diego, meu amigo sempre presente mesmo estando longe, por tudo que passamos e crescemos juntos, obrigado pelo seu apoio e torcida incondicional.
- Ao meu Pai Joaquim (Jacó), pelo seu incentivo em seguir meus sonhos, sempre se importando com a minha felicidade, me incentivando em todos os planos que tenho, pai que considero um grande amigo!
- À minha mãe Roseli, por tudo o que já fez por mim.
- À Vanda, por ser sempre prestativa e bondosa, obrigado por todos os almoços e bolos de laranja que fez sempre com um sorriso no rosto.
- Ao programa de genética e melhoramento animal e a CAPES, pela bolsa de Mestrado.
- Ao Prof. Dr. José Maurício Barbanti Duarte, pela sua orientação e conhecimentos passados ao longo do tempo, além da confiança em mim depositada para fazer esse trabalho.
- Aos Alexandre (Geléia) e Marina, casal que conheço a pouco tempo, mas levo para vida com grande estima, pessoas que me ajudaram de coração, sem eles esse trabalho não teria acontecido.
- A Marcela, por sua ajuda na coleta do animal e apoio.
- A todos do Parque Nacional do Iguaçu (PNI) que de uma forma ou de outra me ajudaram na coleta. Sem cada um de vocês tudo seria mais difícil.
- Ao técnico João, por sua ajuda nas análises laboratoriais, além de um bom papo entre uma análise e outra.
- Aos amigos da saudosa BIO07 que participam da minha vida desde a graduação, em especial ao “Quarta-fire”, pelo convívio intenso.

- Aos Pedro, Márcio e Chico, pessoas que conheço a mais de uma década, por todos os momentos de trabalho árduo e muitos campos juntos, além dos nossos inúmeros cafés e debates. Cresci muito com a nossa convivência.
- Ao Guilherme (Power), por ser o nosso estatístico de plantão, sempre pronto para ajudar e promover o conhecimento, além de um ótimo fotógrafo. Um grande amigo que a FCAV me deu.
- A Alê, pela amizade e suas valiosas considerações.
- Ao Jorge, por toda ajuda e companheirismo em todo esse tempo, um grande amigo que a pesquisa me deu.
- A Carol, Lorena e Louise, pela disponibilidade de dados comparativos.
- Aos Pós-docs Iara e Elias (Gafa) pela ajuda nas análises, sempre prestativos.
- A todos os ICs da Ecologia, pela convivência e amizade.
- Ao Rullian, pelos momentos de descontração e frases motivacionais.
- A Mar e Eluzai, por nossas aulas de teatro e alto astral.
- A todos que fazem parte desse grande grupo chamado NUPECCE, que de uma forma ou de outra contribuíram para esse trabalho.
- A Ligia, pelos bons papos acadêmicos e do dia-a-dia, obrigado pela revisão do texto.
- Aos funcionários e professores da UNESP – Jaboticabal pela minha formação acadêmica.
- A todos os professores que me orientaram nos estágios que fiz na graduação: Profa. Eliana, Prof. Bechara, Prof. Danisio, Prof. Peruzzi, Profa. Elizandra, Profa. Cynthia, Profa. Rosemeri, Prof. João e Prof. Wagner, obrigado pelo meu desenvolvimento acadêmico e profissional.
- Aos Luduvério e Jovino, por todos os momentos de descontração e alegria que passamos esses e todos os outros anos, pelos bons papos e altas risadas, muito obrigado, me ajudaram sem nem saber.

- Aos Pina e Ferracine, por abrirem as portas de sua família e me acolher como um de vocês desde o começo, muito carinho por todos vocês.
- Aos Chico, Miguel e Daniel, amigos desde a infância, é inenarrável o sentimento que tenho por vocês.
- Aos amigos que fiz no meu período como funcionário do Hospital Veterinário, muito obrigado cada um de vocês pelo meu crescimento pessoal e profissional.
- Aos Sensei Simone e Sensei Paulo, meus professores de Karatê desde sempre, por contribuírem ativamente na minha formação pessoal, muito dos meus valores vieram de vocês.
- A todos os amigos do Karate que fiz durante todos esses anos, pelos momentos e vitórias que tivemos juntos.

MUITO OBRIGADO!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE TABELAS	XV
RESUMO	XVII
ABSTRACT	XVIII
1.INTRODUÇÃO	1
2.REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	5
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo Geral	17
3.2 Objetivos Específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	18
4.1 Coleta do espécime e comparações.....	18
4.1.1 Obtenção do espécime	18
4.1.2 Parátipos	21
4.1.3 Grupo externo e comparativos	23
4.2 Procedimentos após a Coleta do Exemplar.....	26
4.2.1 Biometria	26
4.2.2 Documentação Fotográfica	26
4.2.3 Biopsia de Pele	26
4.2.4 Retirada e Processamento da Pele Completa	27
4.2.5 Coleta de Fragmentos de Órgãos e Músculo.....	27
4.2.6 Preparação do Crânio e Pós-crânio	28
4.3 Caracterização Morfológica.....	28
4.4 Análises Citogenéticas	29
4.4.1 Cultivo Celular.....	30
4.4.2 Biometria Cromossômica	31
4.4.3 Bandamento G	32
4.4.4 Bandamento C	32

4.4.5 Coloração Ag-RON	33
4.5 Genética Molecular	33
4.5.1 Extração de DNA	33
4.5.2 Amplificação e Sequenciamento de Genes Mitocondriais e Nucleares	34
4.5.3 Análise filogenéticas	36
5. RESULTADOS.....	37
5.1 Descrição do espécime.....	37
5.1.1 <i>Cervus rufus</i> (Illiger, 1811) desc. Emend.	37
5.1.2 Biometria	42
5.1.3 Craniometria.....	43
5.2 Citogenética.....	46
5.3 Análise do DNA mitocondrial	51
6. DISCUSSÃO	56
6.1 Descrição do espécime.....	56
6.2 Citogenética.....	57
6.3 Análise filogenética.....	58
7. CONCLUSÕES.....	60
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	61

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mapa da distribuição geográfica de *M. americana*. (Varela et al., 2010)...**02**
- Figura 2.** Distribuição e padrão dos seis cariótipos de *M. americana* (Rondônia (2n=42 ou 43 e NF=46; 2n=42 e NF=49), Juína (2n= 43, 44 ou 45 e NF=48; 2n=44 e NF=46), Jarí (2n=49; NF=56, Carajás (2n=50 e NF=54), Santarém (2n=51 e NF=56) e Paraná (2n=51,52 ou 53 e NF=56)) encontrados no território brasileiro com congruências geográficas (ABRIL et al., 2010 adaptado).....**07**
- Figura 3.** Árvore filogenética por inferência bayesiana do gene Citocromo B, apresentando a probabilidade posterior e bootstrap, dos cervídeos neotropicais (DUARTE et al., 2008).....**09**
- Figura 4.** Cariótipo básico pertencente ao topótipo de *Mazama americana* de Caiena – Guiana Francesa (2n=45 NF=50 +3Bs) sob coloração convencional Giemsa (RINCÓN, 2016).....**11**
- Figura 5.** Árvore filogenética obtida por inferência bayesiana dos genes D-Loop e Citocromo-B concatenados. Os valores representam a probabilidade posterior, em porcentagem, de cada nó da árvore filogenética (RINCÓN, 2016).....**11**
- Figura 6.** Cariótipo base da descrição de *Mazama temama* (2N= 50 e NF= 70) (Jorge; Bernirschke, 1977).....**12**
- Figura 7.** Topologia resultante de análise por inferência bayesiana apresentando os suportes dos nós como probabilidade posterior e valores de bootstrap respectivamente, localidade de coleta das amostras e seus números de acesso no genBank (GUTTIERREZ et al., 2017).....**13**
- Figura 8.** Trecho do Livro de Azara (1802) com a descrição do guazupita (*M. americana*).....**14**
- Figura 9.** Trecho do Livro de Azara (1802) com a descrição do guazubira (*M. gouazoubira*).....**15**
- Figura 10.** Trecho da revisão de Allen (1915), do gênero *Mazama* comprovando que Illiger tornou seu artigo público na Academia de Ciências de Berlim em 1811 e não em 1815.....**16**
- Figura 11.** Mapa da bacia do rio da Prata, centro sul da América do Sul, localização da descrição pertencente a *Mazama rufa* realizada por Azara (1802).....**18**

- Figura 12.** Mapa de distância entre a localidade da descrição de *Mazama rufa* utilizados como base por Azara, a reserva de Mbaracayú e o parque Nacional do Iguaçu, apresentando a distância em quilômetros.....**20**
- Figura 13.** Mapa evidenciando o ponto de coleta do holótipo em relação à entrada do Parque Nacional do Iguaçu.....**21**
- Figura 14.** Localidade geográfica dos parátipos T104, T245, T257, T268, T270 e NPC117, utilizados na biometria e citogenética (exceto NPC117).....**23**
- Figura 15.** Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vistas dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). A medida 1 representa o comprimento total, 2 comprimento côndilo-basal, 3 comprimento basal, 4 comprimento curto do crânio, 5 pré-molar – prosthion, 6 eixo base-cranial, 7 eixo base-facial, 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, 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 superior (REES, 1969; DRIESCH, 1976).....**28**
- Figura 16.** (A) Tufo de pelos frontais do holótipo de *Mazama rufa* (a) e faixa rostral (b) (B) Vista dorsal (Foto: J. M. B. Duarte).....**38**
- Figura 17.** Vista ventral do holótipo de *Mazama rufa*. Em detalhe, tufo de pelos na região tarsal. (Foto: J. M. B. Duarte).....**38**
- Figura 18.** (A) Vista lateral do holótipo de *Mazama rufa*. (B) Ancas e dorso da cauda. (C) Vista lateral da cabeça (a) mancha nasal. (b) mancha mentoniana. (c) mancha gular.....**39**
- Figura 19.** Vista ventral do holótipo de *Mazama rufa*.....**40**
- Figura 20.** Pele taxidermizada do holótipo de *Mazama rufa*.....**41**
- Figura 21.** Árvore de distância feita a partir das medidas corporais de indivíduos de *M. americana* provenientes de diferentes citótipos do Brasil, juntamente com o

neótipo de *M. americana*, holótipo de *Mazama rufa* e espécies mais distantes biologicamente, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. bororo*.....**43**

Figura 22. Vista superior, inferior e laterais do crânio macerado de *Mazama rufa*...**44**

Figura 23. Árvore de distância feita a partir das medidas craniométrica dos indivíduos de *M. americana* provenientes de diferentes citótipos do Brasil, com o neótipo de *M. americana*, holótipo de *Mazama rufa* e espécies mais distantes biologicamente, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. bororo*.....**46**

Figura 24. Cariótipo básico pertencente ao holótipo de *Mazama rufa*, apresentando $2n= 52$ $NF= 56 + 3-6$ Bs. Em anexo, os cromossomos sexuais X, Y1 e Y2 pertencente ao parátipo T104 para complementar a descrição.....**47**

Figura 25. Cariótipo do holótipo de *Mazama rufa* fêmea sob o Bandamento C.....**48**

Figura 26. Representação esquemática do padrão de bandas C para *Mazama rufa*, com o holótipo e seus parátipos, sendo o primeiro do holótipo e os seguintes dos parátipos para cada par cromossômico.....**48**

Figura 27. Cariótipo do holótipo de *Mazama rufa* fêmea sob coloração ag-RON.....**49**

Figura 28. Cariótipo do holótipo de *Mazama rufa* fêmea sob o Bandamento G.....**50**

Figura 29. Representação esquemática do padrão de banda G para *Mazama rufa*, com o holótipo e seus parátipos, sendo o primeiro do holótipo e os seguintes dos parátipos para cada par cromossômico.....**50**

Figura 30. Árvore filogenética referente ao gene COI, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posterior como suporte.....**52**

Figura 31. Árvore filogenética referente ao gene CytB, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posterior como suporte.....**53**

Figura 32. Árvore filogenética referente ao gene D-Loop, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posteriori como suporte estatístico.....**54**

Figura 33. Árvore filogenética referente ao gene ND5, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posteriori como suporte estatístico.....**55**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Relação dos parátipos utilizados nas análises citogenéticas, biométricas e moleculares com seu número de registro no genBank, NUPECCE e número de brinco; sexo; Estágio de vida; Peso; Origem; Local de coleta e os genes analisados para cada um deles. (COI) Citocromo oxidase I; (CytB) Citocromo B; (D-Loop) região controle; (ND5) NADH desidrogenase subunidade 5.....**22**

Tabela 2. Espécies utilizadas como grupo externo para as análises biométricas, quando necessário, separadas por citótipos e o número de indivíduos que pertencem a cada grupo.....**24**

Tabela 3. Relação de espécies utilizadas como grupo externo para as análises craniométricas, sendo um representante para cada espécie e no caso de *M. americana* um representante por citótipo, com seu número de identificação do NUPECCE, número de identificação do museu, número de brinco, sexo, estágio de vida, origem e Localidade de coleta.....**24**

Tabela 4. Relação dos grupos externos utilizados nas análises moleculares, com seu número de registro no genBank ou NUPECCE e os genes analisados para cada um deles. (COI) Citocromo oxidase I; (CytB) Citocromo B; (D-Loop) região controle; (ND5) NADH desidrogenase subunidade 5, sendo todos os *M. americana* são provenientes da Guiana Francesa.....**25**

Tabela 5. Genes mitocondriais que foram amplificados e os iniciadores (*primers*) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento e sua referência.....**35**

Tabela 6. Medidas biométricas do holótipo de *M. rufa* e seus parátipos (NPC117, T268, T257, T245, T270 e T104). Medidas em milímetros (mm), massa em quilogramas (kg). ($\bar{x}$) = Média e (DP) = Desvio padrão.....**42**

Tabela 7. Medidas cranianas do holótipo de *Cervus rufus* em milímetros (mm), onde a medida 1 representa o comprimento total, 2 comprimento côndilo-basal, 3 comprimento basal, 4 comprimento curto do crânio, 5 pré-molar – prosthion, 6 eixo base-cranial, 7 eixo base-facial, 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, 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 superior (REES, 1969; DRIESCH, 1976).....**45**

Tabela 8. Modelos de substituição nucleotídicas para cada matriz de gene pelo Jmodeltest com padrão definido de nst=6.....**51**

O STATUS TAXONÔMICO DE *Cervus rufus* Illiger, 1811 E SUA CARACTERIZAÇÃO GENÉTICA E MORFOLÓGICA

RESUMO - A espécie *Mazama americana* passou por diferentes classificações taxonômicas não havendo consenso em relação ao número de subespécies e ao desdobramento destas em espécies. Em diferentes espécimes de *M. americana* não foram observadas diferenças a partir de análises morfológicas ao contrário das análises citogenéticas que demonstraram uma grande variação cariotípica com estruturação geográfica. Este resultado, juntamente com o estudo mostrando isolamento reprodutivo pós-zigótico com esterilidade ou subfertilidade dos híbridos entre citótipos distintos, demonstra que este é um complexo de espécies. O presente estudo objetivou a caracterização de *Cervus rufus*, por muitos considerado como sinônimo de *M. americana*, utilizando para isso técnicas integrativas de análise citogenética, genética molecular e morfológica. O padrão morfológico do espécime acompanha o padrão da espécie *M. americana*. Entretanto, citogeneticamente, o exemplar se assemelha ao padrão apresentado pelo citótipo Paraná, muito distinto das espécies descritas anteriormente (*M. americana* e *M. temama*). O padrão molecular também formou com os exemplares do citótipo Paraná um ramo monofilético com forte suporte estatístico. Esses aspectos indicam que *Cervus rufus* seja uma espécie válida e por falta de um holótipo, propõe-se um neótipo, permanecendo o nome *Mazama rufa*. A descrição de uma nova espécie de cervídeo na Mata Atlântica do interior é um fator muito relevante, mesmo porque há indícios de que esta espécie possa estar sob eminente risco de extinção.

Palavras-chave: taxonomia, DNA mitocondrial, neótipo, filogenia, citogenética.

THE TAXONOMICAL STATUS OF *Cervus rufus* Illiger, 1811 AND ITS GENETIC AND MORPHOLOGICAL CHARACTERIZATION

ABSTRACT - The *Mazama americana* species has undergone different taxonomic classifications, without consensus regarding the number of subspecies nor the unfolding of these subspecies into species. In different specimens of *M. americana*, no differences were observed from morphological analyzes, yet cytogenetic analyzes showed a wide karyotypic variation with geographic structuring. This result, along with the reproduction study showing postzygotic reproductive isolation with sterility or subfertility of hybrids between different cytotypes, demonstrates that this is a complex of species. Therefore, the present study aimed at the redescription of *Cervus rufus*, by many considered as synonymous with *M. americana*, using for this purpose, integrated techniques of analysis such as cytogenetics, molecular genetics and morphology. The morphological patterns of the specimen accompanies the pattern of the *M. americana*. However, cytogenetically, the specimen resembles the standard shown by Paraná cytotype very different from the species described above (*M. americana* and *M. temama*). The molecular pattern also formed, with the Paraná cytotype, a phylogenetic clade monophyletic with strong statistical support. These aspects indicate that *Cervus rufus* is a valid species and for lack of a holotype is proposed a holotype for her, remaining *Mazama rufa*. The description of a new species of deer in the Atlantic Forest of the interior is a very relevant fact even though there are indications this species may be in emminet danger of extinction.

Key words: taxonomy, mitochondrial DNA, neotype, phylogeny, cytogenetics.

1.INTRODUÇÃO

O gênero *Mazama* apresenta a maior distribuição entre os cervídeos do novo mundo, ocupando quase todas as regiões entre o centro sul do México e o norte da Argentina (ROSSI, 2000). Sua complexidade pode ser justificada pela grande dispersão e diferenciação (WEBB, 2000; DUARTE et al., 2008) do grupo a qual sugere uma diversificação a partir de 2,4 milhões de anos, após entrada do ancestral na América do Sul pelo estreito do Panamá vindo da América do Norte (DUARTE et al., 2008).

Atualmente, são aceitas dez espécies neste gênero: *M. rufina* Pucheran, 1851; *M. pandora* Merriam, 1901; *M. chunyi* Hershkovitz, 1959; *M. temama* Kerr, 1792; *M. bricenii* Thomas, 1908; *M. gouazoubira* Fisher, 1814; *M. nana* Hensel, 1872; *M. nemorivaga* Cuvier, 1817; *M. americana* Erxleben, 1777 e *M. bororo* Duarte, 1996. Cinco destas são reconhecidas no Brasil: *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga*, *M. bororo* e *M. americana* (FONTANA; RUBINI, 1990; DUARTE; MERINO, 1997; WEMMER, 1998; DUARTE; JORGE, 2003; ABRIL et al. 2010).

As espécies pertencentes ao gênero *Mazama* demonstram características morfológicas muito semelhantes como os membros anteriores mais curtos que os posteriores, chifres curtos e não ramificados (ROSSI, 2000). Esta semelhança ocorre somente nas características morfológicas, pois análises citogenéticas e moleculares revelam grandes diferenças e características particulares de cada espécie, demonstrando assim, a distância evolutiva interespecífica. A semelhança morfológica pode ser explicada pela convergência morfológica imposta pelo ambiente em que os cervídeos do gênero *Mazama* habitam: áreas de densa vegetação, arbustiva e fechada (DUARTE et al 2008).

A espécie conhecida hoje como *Mazama americana* (ERXLEBEN, 1777) exemplifica toda a incerteza taxonômica que ocorre no gênero, sendo a maior espécie pertencente ao gênero, com uma altura entre 58 a 80 cm e comprimento de 90 a 145 cm (DUARTE, 1996; REID, 1997; EMMONS; FEER, 1999; JULIÁ; RICHARD 2001). Sua massa varia consideravelmente ao longo de sua área de

distribuição entre 12 e 65 kg (BRANAN; MARCHINTON, 1987; EMMONS; FEER, 1997; EISEMBERG; REDFORD, 1999; DUARTE et al, 2001; JULIÁ; RICHARD, 2001), com média de 30 Kg (DUARTE, 1996). A cor dominante na maioria das regiões do corpo é marrom avermelhada, já o pescoço e o rosto são geralmente cinzas. A parte interna dos membros traseiros e cauda, região submandibular, ponta do maxilar superior e a borda interior das orelhas são brancas, membros posteriores são pretos na parte traseira tornando-se marrom escuro na parte da frente (DUARTE, 1996).

Apresenta uma ampla distribuição latitudinal, que se estende do norte da Argentina até o norte da Venezuela e nordeste da Colômbia, além de estar presente em quase todo o território brasileiro, ausente somente no Chile e Uruguai (DUARTE et al., 2010) (Figura 1).

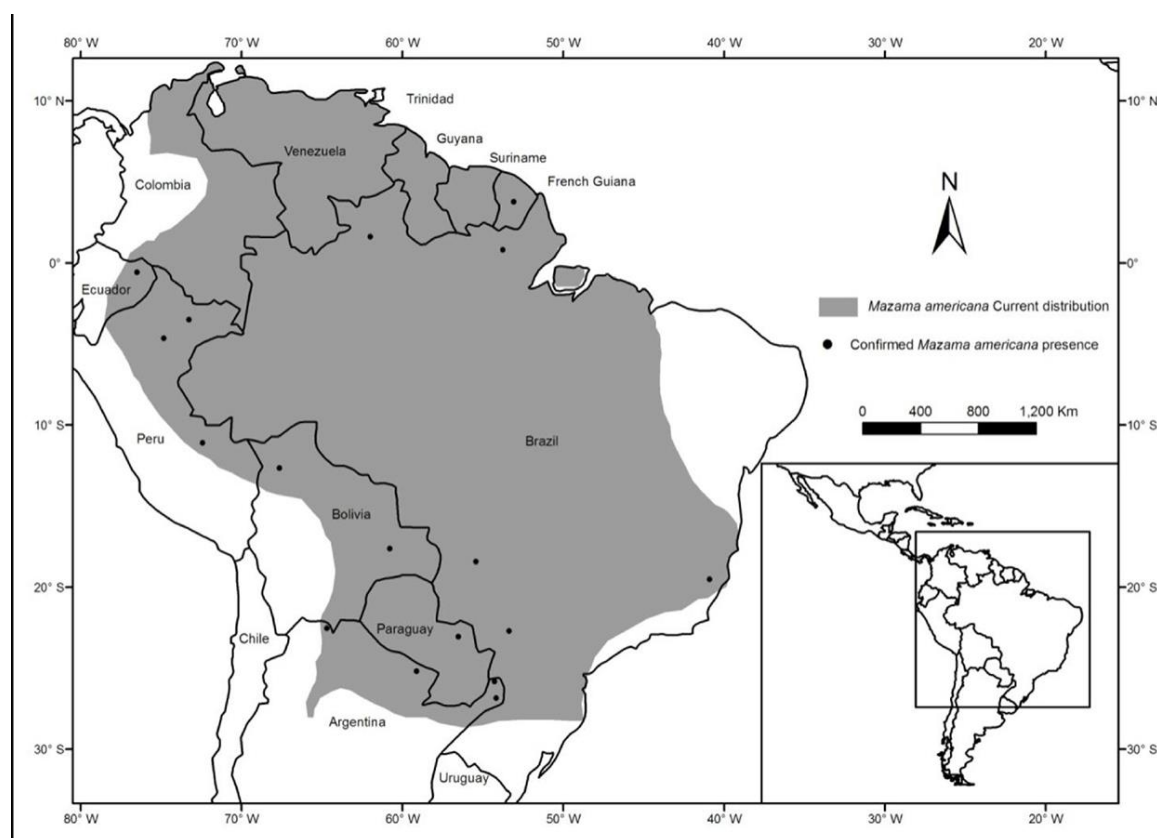


Figura 1. Mapa da distribuição geográfica de *M. americana*. (Varela et al., 2010)

Habita florestas tropicais e sub-tropicais da América do Sul, sendo sua ocorrência preferencialmente em densas florestas úmidas (DUARTE et al., 2010),

porém há registros em floresta estacional semidecidual de araucária, florestas de montanhas até 2000 metros de altitude e áreas de transição, estas sempre relacionadas a densa vegetação e corpos d'água (DUARTE et al., 2010). Usam com frequência riachos para se locomover nas florestas, sendo essa uma estratégia anti-predatória da espécie não deixando rastros (VOGLIOTTI, 2003).

O veado-mateiro (*M. americana*) foi avaliado, de acordo com os critérios da IUCN (2018), como dados insuficientes (DD). Essa caracterização para o táxon se deve às novas informações citogenéticas da espécie, que revelaram uma inconsistência cromossômica, sugerindo a existência de unidades evolutivamente distintas com implicações taxonômicas desconhecidas aos níveis sub-específico e específico (DUARTE et al., 2008; ABRIL et al., 2010) de modo que a avaliação pelo protocolo da IUCN não seria possível.

No ano de 2000, Rossi não observou diferenças significativas entre espécimes de *M. americana* de todo território brasileiro a partir de análises morfológicas. O oposto ocorreu com as análises citogenéticas que demonstraram uma grande variação cariotípica, mantendo correlação com a origem geográfica dos animais (ABRIL et al., 2010). Na mesma linha, a genética molecular também fornece ferramentas de grande importância, capazes de reconstruir parte da história evolutiva e conhecer melhor o grau de diferenciação entre os citótipos, mas não atinge a resolução fornecida pela citogenética (DUARTE et al., 2008; ABRIL, et al. 2010; MARAN, 2016).

Duarte e colaboradores (2008), por meio de análise filogenética baseada no DNA mitocondrial (Citocromo-B), sugeriram que as espécies pertencentes ao gênero *Mazama* possuem origem polifilética com base nos altos índices de divergência molecular e citogenética encontrados. De acordo com esses critérios, um estudo com variantes cromossômicas de *M. americana* revelou que fêmeas produzidas de cruzamentos entre linhagens cromossômicas distintas são inférteis ou sub-férteis, corroborando com a hipótese de que existem distintas espécies dentro do que hoje é considerada *M. americana* (CURSINO et al., 2014). Este resultado também foi obtido no estudo com machos híbridos entre casais de diferentes variantes cromossômicas,

nas quais, os citótipos com maior amplitude do número de cromossomos apresentou maior barreira reprodutiva (SALVIANO et al., 2017).

Com a finalidade de solucionar as incertezas taxonômicas de *M. americana* tornou-se necessário realizar uma revisão nomenclatural, mantendo a ordem cronológica das descrições de subespécies e sinonímias.

A primeira descrição de *M. americana* foi realizada por Erxleben no ano de 1777, sendo sua localidade tipo Caiena – Guiana Francesa. Rincón (2016), a partir de um indivíduo coletado próximo à localidade tipo, analisou características moleculares, citogenéticas e morfológicas, propondo um neótipo para *M. americana*. O neótipo coletado não pertence a nenhum dos citótipos descritos, além dos dados moleculares demonstrarem a separação de *M. americana* em relação aos citótipos brasileiros, conclui-se que todos os cervídeos definidos como *M. americana* no território brasileiro seriam possivelmente espécies distintas (RINCÓN, 2016).

A segunda descrição foi de *Mazama americana temama* (KERR, 1792) considerada como sub-espécie, descrita como localidade tipo Veracruz – México. Esta subespécie apresentou um padrão cariotípico diferente do apresentado para *M. americana* além das análises moleculares demonstrarem uma separação do clado de *M. a. temama* em relação ao de *M. americana* (GUTIERREZ et al., 2017). Perante o exposto, a subespécie teve seu status elevado ao nível de espécie, *Mazama temama* (GROVES; GRUBB, 1987).

A terceira descrição foi de *Cervus rufus* (ILLIGER, 1811) como localidade tipo Assunção – Paraguai, objetivo do presente trabalho. A qual será caracterizada com o auxílio de técnicas integrativas como citogenética, genética molecular e morfologia, além de apresentar análises filogenéticas dos resultados moleculares, comparando com espécies do gênero *Mazama*. Se os padrões apresentados pelo espécime forem diferentes dos dois padrões descritos anteriormente, será definido a existência de *Cervus rufus*, validando-a como espécie e criado um neótipo.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Historicamente a espécie *M. americana* passou por diferentes classificações taxonômicas, entretanto, esta taxonomia ainda é incerta em relação ao número de subespécies, até quanto ao desdobramento destas subespécies em espécies.

Thomas (1913) elevou ao nível de espécie duas subespécies pertencentes a *M. americana*: *M. zetta* e *M. sheila*, confirmadas posteriormente por Allen (1915), que além destas, cita como espécies *Mazama trinitatis*, *M. rufa*, *M. sartorii*, *M. gualea*, *M. fuscata* e *M. zamora*. Em 1960, Cabrera citou nove subespécies de *M. americana* (*M. americana gualea*, *M. a. jucunda*, *M. a. rosii*, *M. a. rufa*, *M. a. sarae*, *M. a. sheila*, *M. a. whitelyi*, *M. a. zamora* e *M. a. zetta*), e em 1987, Czernay completou esta lista com mais seis subespécies pertencentes a mesma espécie (*M. a. temama*, *M. a. cerasina*, *M. a. reperticia*, *M. a. americana*, *M. a. trinitatis* e *M. a. carrikeri*). Já em 2005 Grubb, em um novo estudo taxonômico da espécie, reconheceu 11 subespécies: *M. a. carrikeri*, *M. a. gualea*, *M. a. jucunda*, *M. a. rosii*, *M. a. rufa*, *M. a. sarae*, *M. a. sheila*, *M. a. trinitatis*, *M. a. whitelyi*, *M. a. zamora* e *M. a. zetta*.

Com a taxonomia ainda não esclarecida, permeiam-se dúvidas específicas sobre a quantificação de subespécies e a reclassificação destas para espécie. Como exemplo disso, pode ser citado o trabalho de Rossi (2000) que não observou diferenças estatisticamente significativas a partir de análises morfológicas entre os espécimes de *M. americana* presentes em museus provenientes de diferentes regiões do Brasil. O mesmo autor cita que a população de *M. americana* da faixa litorânea desde Santa Catarina até o sul de São Paulo apresenta-se parcialmente diferenciada da população do interior. Tais diferenças podem constituir outras espécies, sendo primordial a inclusão de análises complementares, uma vez que caracteres morfológicos, como coloração da pele e craniometria, são incapazes de determinar a especiação (ROSSI, 2000). Posteriormente, por meio de análises complementares à morfologia, como a citogenética e a genética molecular, Duarte e Jorge (2003) confirmaram que a população citada por Rossi (2000) era realmente

diferenciada, elevando-a ao nível de espécie, que recebeu o nome de *M. bororo* (DUARTE; JORGE, 2003).

Análises citogenéticas de *M. americana* foram realizadas por Taylor et al. (1969), que relataram $2n = 68$ e $NF = 74$. Jorge e Bernirschke (1977) analisaram três espécimes de *M. a. temama* e descreveram o cariótipo básico como $2n = 50$ e $NF = 70$. As grandes diferenças entre os animais analisados pelos autores evidenciaram as dúvidas sobre a classificação desta espécie por apresentar uma variação de 18 cromossomos, extremamente ampla para ser caracterizada como uma variação intraespecífica.

Neitzel (1987) analisou uma fêmea proveniente do Paraguai e descreveu um outro padrão cromossômico para a espécie com $2n = 52$, $NF = 56$ e de 4 a 5 cromossomos B. Esses resultados aumentaram as dúvidas quanto ao padrão cariotípico desta espécie. Duarte (1992) ao analisar quatro espécimes brasileiros obteve resultados conflitantes quanto ao número diplóide que variaram entre 48, 50, 52 e 54, e $NF = 54$, 54, 56 e 56, respectivamente. Estes resultados foram parcialmente semelhantes aos obtidos por Neitzel (1987).

De acordo com Duarte e Merino (1997) este polimorfismo pode indicar a existência de várias espécies dentro dos veados vermelhos, apresentando *Mazama americana* como superespécie composta por um grupo de espécies crípticas. Em outro estudo, Duarte e Jorge (1998) analisaram 33 animais e encontraram extensa variabilidade cariotípica, com número diploide variando entre 42 e 53 cromossomos e número fundamental de braços entre 48 e 57, excluindo cromossomos B. Essa variação cromossômica teve correlação com a origem geográfica dos animais, ou seja, alguns cariótipos foram característicos de algumas regiões do Brasil (ABRIL et al., 2010) (Figura 2).

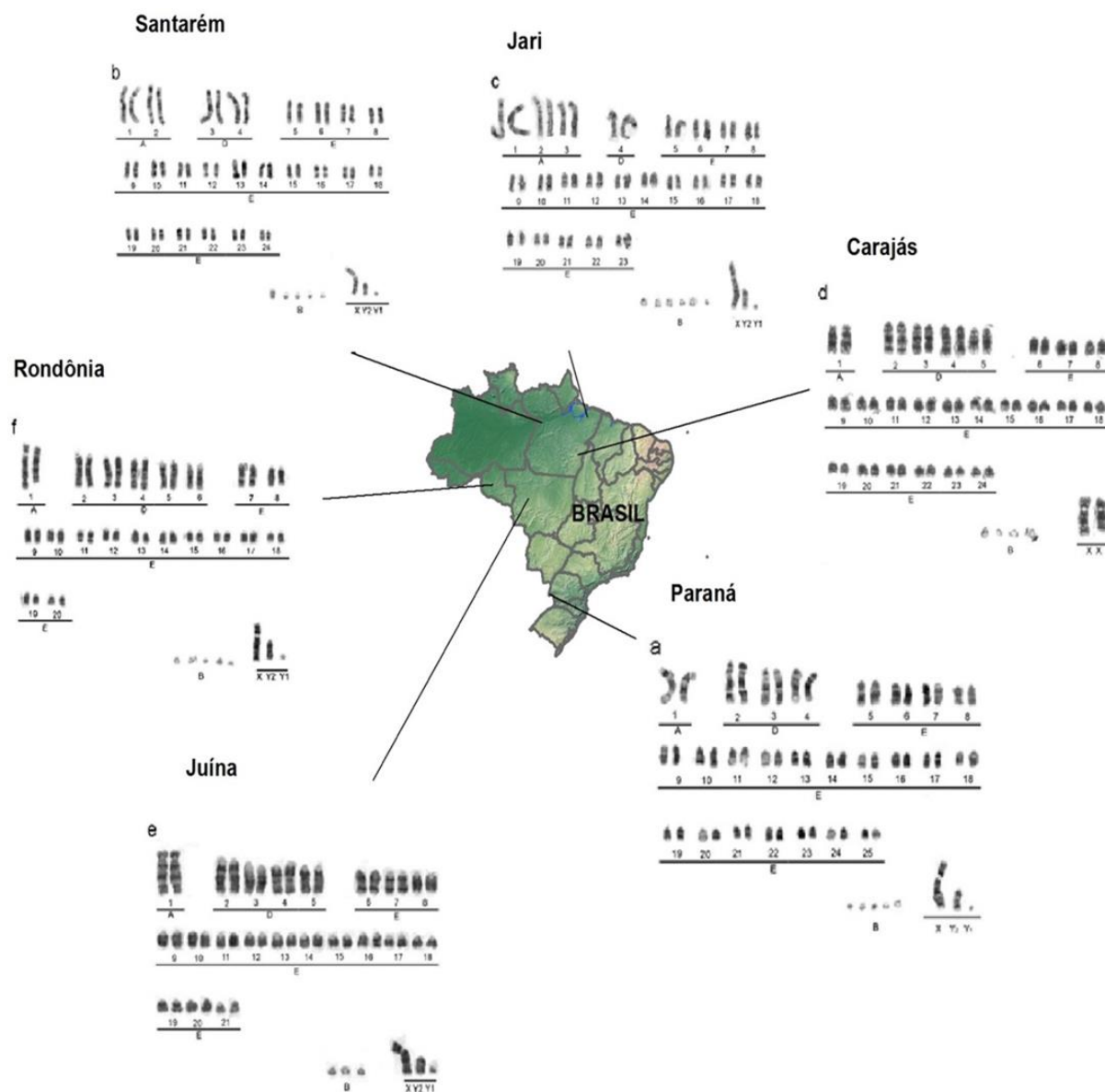


Figura 2. Distribuição e padrão dos seis cariótipos de *M. americana* (Rondônia ($2n=42$ ou 43 e $NF=46$; $2n=42$ e $NF=49$), Juína ($2n=43, 44$ ou 45 e $NF=48$; $2n=44$ e $NF=46$), Jari ($2n=49$; $NF=56$, Carajás ($2n=50$ e $NF=54$), Santarém ($2n=51$ e $NF=56$) e Paraná ($2n=51, 52$ ou 53 e $NF=56$)) encontrados no território brasileiro com congruências geográficas (ABRIL et al., 2010 adaptado)

A citogenética tem sido indicada como importante ferramenta no estudo taxonômico da família Cervidae. Desde os primeiros trabalhos publicados foi observada grande variação do número diploide, sendo as fusões cromossômicas um dos principais mecanismos de diferenciação cariotípica entre as espécies

(GUSTAVSSON; SUNDT, 1969; TAYLOR et al., 1969; CHANDRA et al., 1967; JORGE; BENIRSCHKE, 1977; NEITZEL, 1987) fator que apresenta a importância da citogenética como uma ferramenta na solução dos problemas taxonômicos do gênero *Mazama* (DUARTE; JORGE, 2003).

Da mesma maneira, a genética molecular fornece ferramentas importantes capazes de reconstruir parte da história evolutiva e, conseqüentemente, permite conhecer melhor o grau de diferenciação entre os citótipos (DUARTE et al., 2008). A ausência de registros fósseis de cervídeos na América Central, durante o Plioceno, representa uma lacuna no conhecimento da família Cervidae e da espécie *M. americana*, o que dificulta as análises sobre a história evolutiva destes animais (WEBB, 2000).

Os escassos registros fósseis na América do Norte apontaram para dois possíveis ramos de cervídeos no Novo Mundo que teriam se diversificado paralelamente na Ásia e se estabeleceram na América do Norte no final do Plioceno. A grande migração dos mamíferos terrestres, ocorrida no final do Plioceno há aproximadamente 2,4 milhões de anos da América do Norte para a América do Sul, proporcionou um intercâmbio da fauna entre os continentes, o que favoreceu a maior diversificação genética nos mamíferos da América do Sul em relação aos da América do Norte, em um curto espaço de tempo (WEBB, 2000).

Duarte et al., (2008), estudando a história evolutiva dos cervídeos sul americanos do gênero *Mazama*, sugeriram a existência de uma relação polifilética dentro deste gênero devido aos altos índices de divergência molecular e citogenética encontrados entre os grupos que são morfologicamente similares. A análise filogenética baseada no DNA mitocondrial (Citocromo B), feita pelos mesmos autores, indicou que os veados vermelhos (*M. americana*, *M. nana* e *M. bororo*) não se agrupam no mesmo clado que os veados cinzas (*M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*) e que estes últimos deveriam ser considerados gêneros distintos de *Mazama*, o qual tem como espécie tipo *M. americana*.

Devido à sua grande variabilidade de cariótipos e de caracteres moleculares, *M. americana* deve ser considerada como um complexo de espécies (complexo *M. americana*) (Figura 3). Portanto, estudos futuros podem separá-lo em várias

espécies modificando sua área de distribuição atual (DUARTE, 1996; DUARTE; MERINO, 1997; ABRIL et al., 2010;)

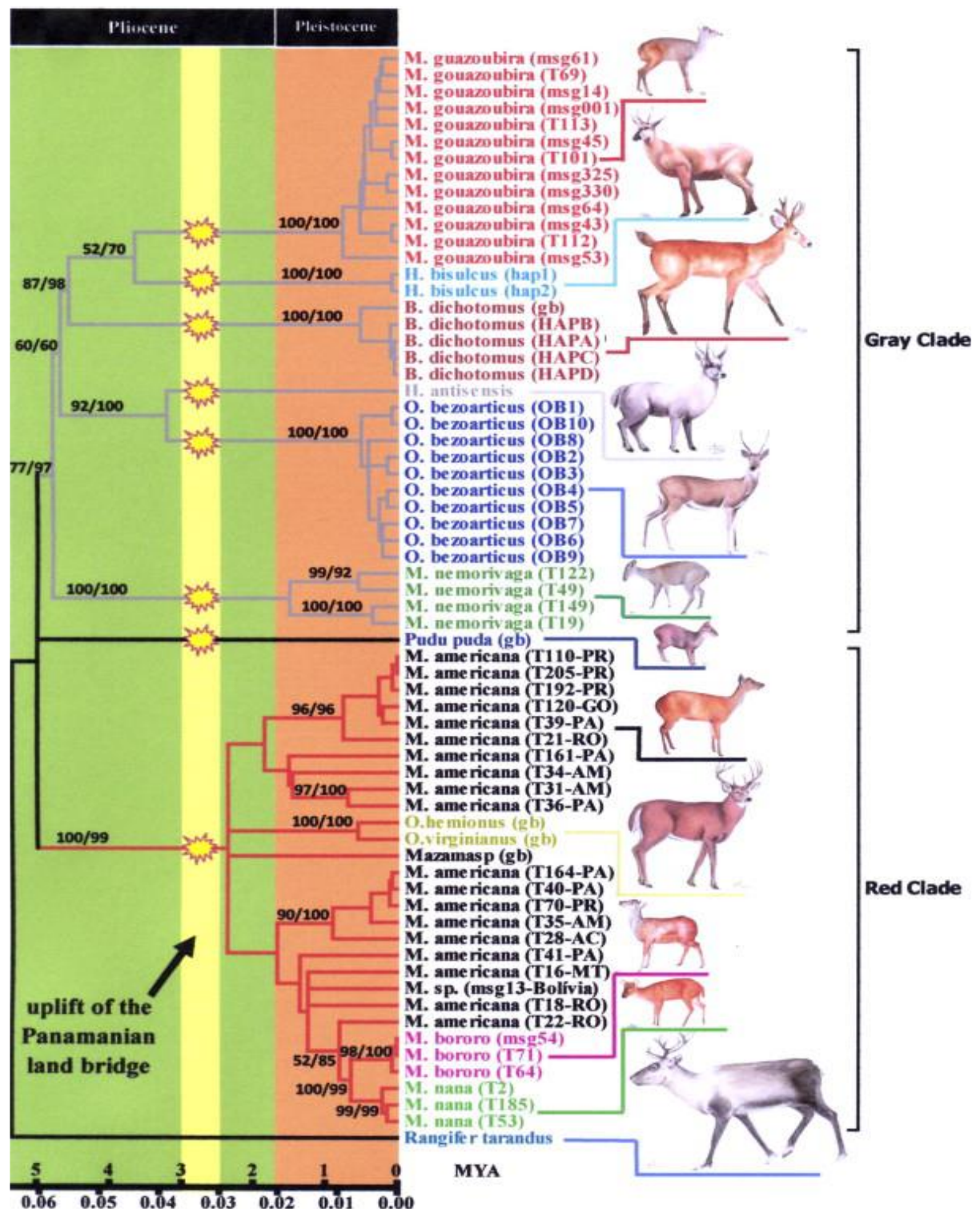


Figura 3. Árvore filogenética por inferência bayesiana do gene Citocromo B, apresentando a probabilidade posterior e bootstrap, dos cervídeos neotropicais (DUARTE et al., 2008).

Um estudo com variantes cromossômicas de *M. americana* revelou que fêmeas produzidas de cruzamentos entre linhagens cromossômicas distintas (Citótipos) são inférteis ou sub-férteis, corroborando a hipótese de que existem distintas espécies dentro do que hoje é considerada *M. americana* (CURSINO et al., 2014). Assim, sugere-se que os animais pertencentes à bacia do Rio Paraná, classificados como citótipo Paraná, não pertençam à mesma espécie dos citótipos Juína, Rondônia, Acre e Carajás. Este resultado também foi obtido no estudo com machos híbridos de casais apresentando diferentes variantes cromossômicas, o qual demonstra que quanto mais distante o cariótipo estudado mais impactante a barreira reprodutiva (SALVIANO et al., 2017).

Carranza e colaboradores (2017) analisaram a existência de barreiras pré-zigóticas entre os citótipos conhecidos, não sendo encontrada entre nenhum dos citótipos de *M. americana*, fato esse que apresenta um risco pelo surgimento de híbridos inférteis ou sub-férteis prejudicando a conservação de populações de *M. americana* com certo grau de simpatria.

Perante o exposto, foi necessário rever todos os nomes disponíveis para a espécie no sentido de reclassificá-la. A ordem cronológica das descrições de *M. americana*, suas subespécies e sinonímias fornecerá a base para esta nova nomenclatura, sendo comparados os padrões apresentados e, quando diferentes dos anteriores, propor uma reclassificação da população estudada.

A primeira descrição de *M. americana* foi realizada por Erxleben no ano de 1777, tendo sua localidade tipo Caiena. Um neótipo proposto por Rincón em 2016 foi caracterizado geneticamente e morfolologicamente, apresentando padrões cromossômicos distintos dos padrões existentes no território brasileiro (Figura 4).

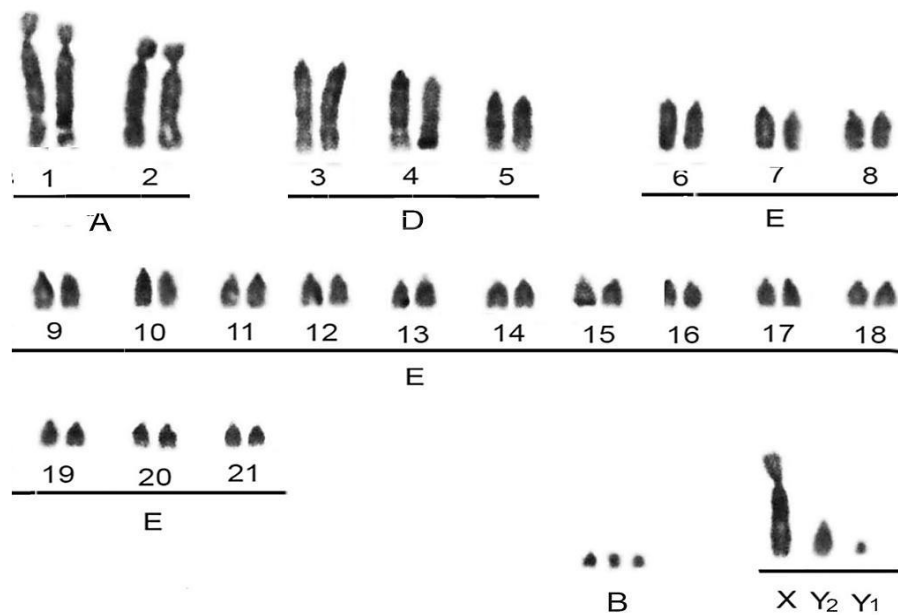


Figura 4. Cariótipo básico pertencente ao topótipo de *Mazama americana* de Caiena – Guiana Francesa ($2n=45$ NF=50 +3Bs) sob coloração convencional Giemsa (RINCÓN, 2016).

As análises moleculares foram realizadas com os genes D-Loop e Citocromo-B concatenados, que demonstraram suporte para separação entre *M. americana* e citótipos brasileiros, utilizando-se a inferência bayesiana (Figura 5).

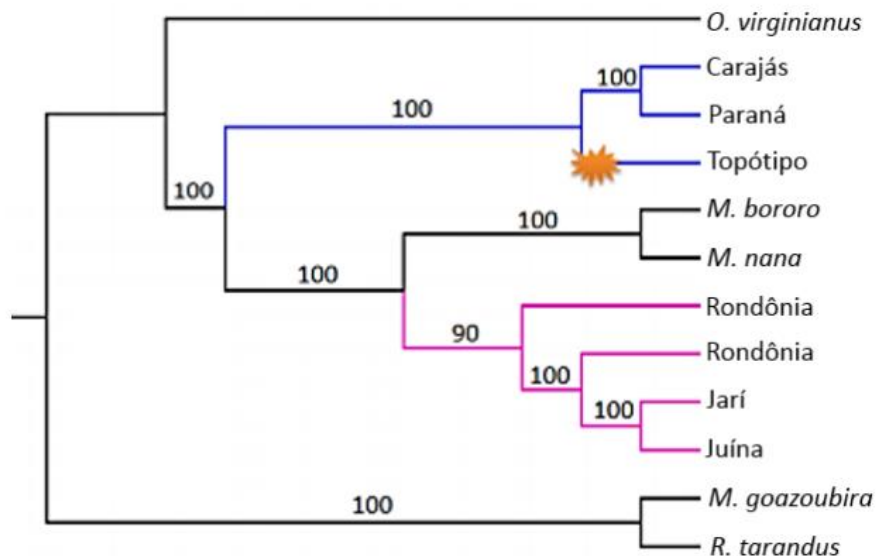


Figura 5. Árvore filogenética das linhagens de *M. americana* obtida por inferência bayesiana dos genes D-Loop e Citocromo-B concatenados. Os valores representam a probabilidade posterior, em porcentagem, de cada nó da árvore filogenética (RINCÓN, 2016).

A segunda descrição foi de *M. a. temama*, que por muito tempo foi considerada subespécie de *M. americana* - descrita por Kerr em 1792 com a localidade tipo Vera Cruz - México – foi apresentado por Jorge e Bernirschke (1977) seu cariótipo de $2n= 50$ e $NF= 70$, padrão cariotípico diferente do apresentado por *M. americana* – Caiena (Figura 6).

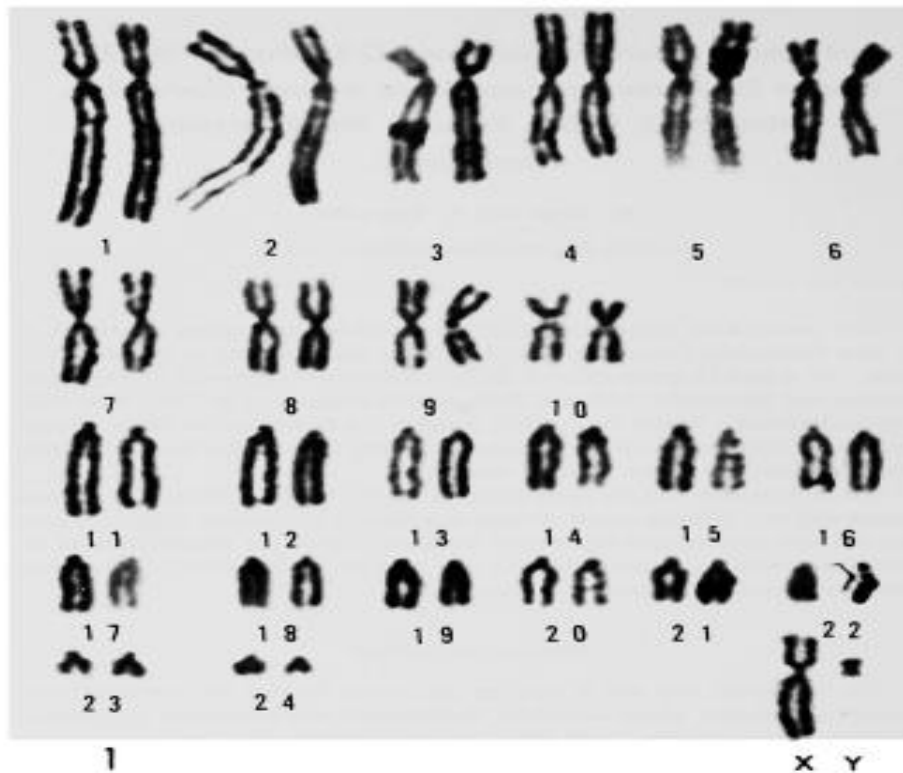


Figura 6. Cariótipo base da descrição de *Mazama temama* ($2n= 50$ e $NF= 70$) (Jorge; Bernirschke, 1977).

Análises filogenéticas mais recentes, realizadas por Gutierrez et al., (2017) baseadas no gene Citocromo-B, demonstraram uma distância genética com suporte para os clados de *M. temama* e *M. americana*. Evidenciando assim, a separação molecular entre *M. temama* e *M. americana*, além da origem polifilética como apresentado por Duarte et al., (2008) (Figura 7).

Atualmente *M. temama* teve seu status elevado ao nível de espécie (GROVES; GRUBB, 1987), e apresenta uma distribuição geográfica na América Central.

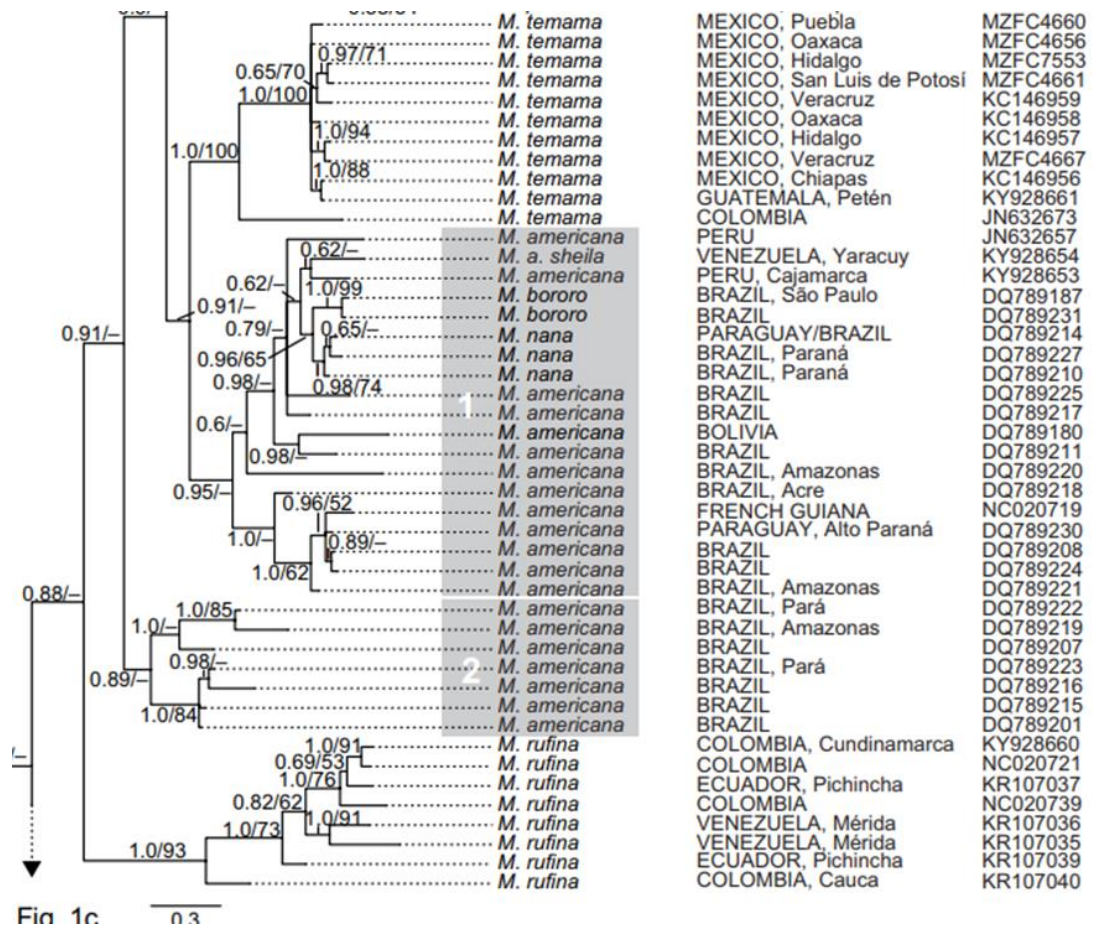


Figura 7. Topologia resultante de análise por inferência bayesiana apresentando os suportes dos nós como probabilidade posterior e valores de bootstrap respectivamente, localidade de coleta das amostras e seus números de acesso no genBank (GUTTIERREZ et al., 2017).

A terceira descrição foi de *Cervus rufus* (Illiger, 1811) considerada atualmente uma sinonímia de *Mazama americana* (CABRERA, 1960; CZERNAY, 1987; GRUBB, 2005), com localidade tipo Assunção – Paraguai.

Faz-se necessária a apresentação de Don Felix de Azara, que em 1780 veio para o vice-reino do Rio da Prata, o qual atualmente compreende o norte da Argentina, Bolívia, Paraguai, Uruguai e o sul do Brasil, para se fazer cumprir o tratado de Tordesilhas, demarcando a fronteira entre colônias portuguesas e espanholas, para interromper o avanço do território português. Por interesses próprios, a coroa portuguesa protelou ao máximo a presença de seus representantes fazendo com que Azara ficasse alguns anos nessa espera (PEREIRA, 2013).

Naturalista e observador da biodiversidade existente na colônia, começou a descrever inúmeras espécies com uma riqueza de detalhes e conhecimento biológico impressionantes (AZARA, 1802). Entre as centenas de descrições feitas por Azara, em sua publicação intitulada "*Apuntamientos para la historia natural de los cuadrúpedos del paraguay y rio de la plata*", estão duas espécies de cervídeos pequenos que habitam a região, sob os nomes de gouazoupita (*M. americana*) (Figura 8) e gouazoubira (*M. gouazoubira*) (Figura 9).

Os nomes propostos por Azara (1802) para os cervídeos tem relação com o seu comportamento e morfologia. A tradução do Guaraní de Guazupita é "veado vermelho" que o diferencia do outro cervídeo que apresenta uma coloração cinza. A tradução de Guazubira é "veado bobo", por sair mais das matas para forrageamento do que o outro cervídeo, sendo assim mais fácil sua visualização e captura.

PARA LA HISTORIA NATURAL. 5 I



NÚM. VI.

DEL GÜAZÚ-PITÁ.

Significa *Cierbo roxo*, y le llaman así porque lo es. Solo habita los bosques muy espesos del Paraguay, porque no sé que pase de los 32 grados. Al ponerse el Sol, y de madrugada van los cazadores costeano los bosques espaciosamente, porque á esas horas suele salir á las orillas, y al ver al cazador, se detiene á mirarle, dando lugar á que le tire. Entra en las Quintas ó Chacras inmediatas al bosque á comer judías y otras legumbres, que le gustan mucho; y suelen esperarle con escopeta las noches de Luna. Tambien le villan

Figura 8. Trecho do Livro de Azara (1802) com a descrição do guazupita (*M. americana*).

NÚM. VII.

DEL GÜAZÚ-BIRÁ.

Así le llaman todos, y aprecian mucho su piel por excelente para antes. Al contrario la del precedente, por ser la mas gruesa, y de textura tan firme que no dá de sí. No sé que llegue al Rio de la Plata, y se parece en lo demas al precedente en el modo de cazarlo, en su habitacion, costumbres, prevalecer el sexô femenino, y en la librea de los recién nacidos. Pare por enero en el Paragüay.

Figura 9. Trecho do Livro de Azara (1802) com a descrição do guazubira (*M. gouazoubira*).

Além dessas descrições, Azara (1802) apresenta algumas diferenças morfológicas como o tamanho da orelha, maior em guazubira; além de dados da Biologia dos animais como a visualização mais fácil do guazupita no crepúsculo, que hoje sabemos ser o início do período de atividade da espécie conhecida hoje como *Mazama americana* (OLIVEIRA et al., 2016).

Como Azara (1802) nomeou os animais sem se importar com a terminologia científica, seus nomes não puderam ser utilizados por não apresentarem a nomenclatura Linneana. Então, Illiger (1811) finalmente, nomeou os animais descritos por Azara (1802) dentro da nomenclatura Linneana, dando ao "guazupita" de Azara o nome de *Cervus rufus*, enquanto "gouazoubira" tornou-se *Cervus simplicicornis*. Publicações subsequentes posicionaram *Cervus rufus* como sinonímia (Rossi 2000) ou subespécie de *M. americana* (Cabrera, 1960; Grubb,

2005). Como o gênero *Cervus* não está disponível para esta espécie, a partir desse momento consideraremos *Cervus rufus* como *Mazama rufa* Illiger 1811..

É indispensável uma justificativa para o fato da publicação de Illiger (1811) ter sido aceita na data de 1811 e não em 1815, data da publicação do livro no qual seu artigo constava. No início do século XIX a velocidade e facilidade de publicações eram mínimas, demorando anos para que fosse publicada, o que dificultava a definição da ordem cronológica das descrições.

A revisão bibliográfica do gênero *Mazama* feita por Allen (1915) traz essa problemática. Tais documentos comprovaram que Illiger no ano de 1811 fez público seu *paper* na Academia de Ciências de Berlim fato que, para a época, contava como uma publicação (Figura 10).

indeterminable. Azara, in his 'Quadrupeds du Paraguay,' published in 1801, was the first author to whom we can turn for any intelligent descriptions of these small deer; he having described in great detail and with accuracy the two species which inhabit Paraguay, under the names, respectively, *Gouazoupita* and *Gouazoubira*. His attempt to identify with his species the corresponding animals of Mexico, Guiana, and Brazil mentioned by previous authors does not in the least detract from the value and usefulness of his excellent descriptions of the Paraguay animals from actual specimens. These names fortunately became the *sole basis* of systematic names 1915.] Allen, *American Deer of the Genus Mazama*. 523

proposed by Illiger, in a paper¹ read before the Berlin Academy of Sciences early in the year 1811, but which was not published till 1815. In this paper Azara's "Gouazoupita" was named *Cervus rufus* and his "Gouazoubira," *Cervus simplicicornis*, the first being the red and the other the brown brocket of Paraguay, which country is of course the type locality of both species. Thus Illiger's names, dating from 1815 and based on Azara's descriptions, form the point of departure in the consideration of the systematic names of the species of the modern genus *Mazama*.

Figura 10. Trecho da revisão de Allen (1915), do gênero *Mazama* comprovando que Illiger tornou seu artigo público na Academia de Ciências de Berlim em 1811 e não em 1815.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Definir as características morfológicas e genéticas de *Mazama rufa* e avaliar sua validação como espécie, propondo um neótipo.

3.2 Objetivos Específicos

- Descrever morfológicamente um topótipo de *Mazama rufa*.
- Apresentar os padrões citogenéticos do topotipo e de alguns parátipos de *Mazama rufa*, comparando-os com *M. americana* e *M. temama*.
- Descrever as sequências de fragmentos dos genes ND5, CytB, D-Loop e COI do topotipo e alguns parátipos de *Mazama rufa*, comparando-os com outras espécies.
- Gerar hipóteses filogenéticas a partir de dados moleculares gerados para *Mazama rufa* e compará-los com os padrões apresentados por espécies do gênero *Mazama*.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do espécime e comparações

4.1.1 Obtenção do espécime

Atualmente, não se encontra nenhum animal enviado por Azara no “*Museo Nacional de Ciencias Naturales de Madrid*” (antigo Real Gabinete). A descrição válida para a espécie de Illiger (1811) foi embasada no relato de Azara e por isso, não foi estabelecido um tipo. O levantamento bibliográfico sugere a publicação de Azara (1802) como base para a descrição de *Mazama rufa*. Este estudo, portanto, teve como área de abrangência o Paraguai e o Rio da Prata, formado principalmente pelos Rios Paraná e Paraguai (Figura 11), sendo a localidade da espécie em questão.

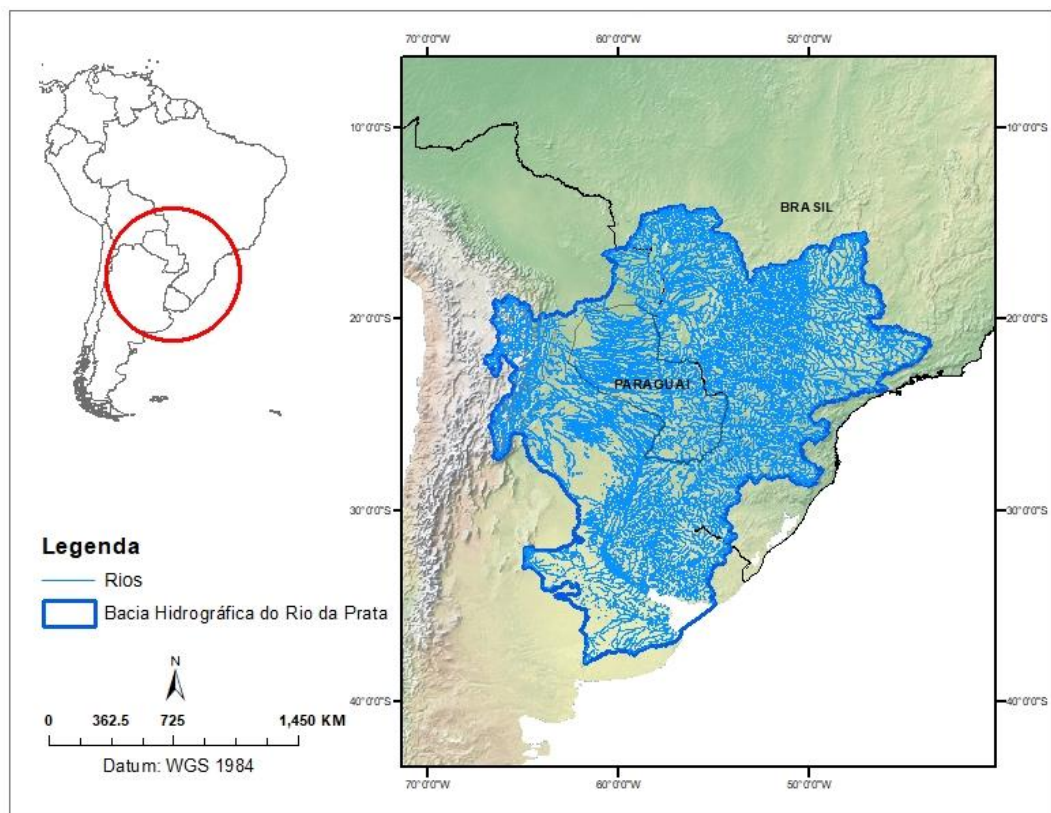


Figura 11. Mapa da bacia do rio da Prata, centro sul da América do Sul, localização da descrição pertencente a *Mazama rufa* realizada por Azara (1802).

No início do século XIX não existiam equipamentos de localização geográfica de precisão e, por isso, normalmente se utilizava como referência de coleta as grandes cidades mais próximas ao local de captura, que podiam estar a centenas de quilômetros de distância. Portanto, para o estudo em questão foi dada como localidade da descrição feita por Azara (1802) a cidade de Assunção, capital do Paraguai.

Foram realizadas duas expedições científicas para Assunção, em março e dezembro de 2016, com duração de 20 dias e 13 dias, respectivamente. Os possíveis sítios de localização do animal se estenderam em um raio de 30 a 300 km de distância da capital, ainda dentro do território paraguaio, uma vez que a cidade e seu entorno se encontram altamente urbanizadas. Infelizmente, mesmo com o contato realizado com vaqueiros e caçadores locais, indígenas, militares da região e com o presidente do clube de tiro nacional, não houve sucesso na coleta do holótipo de *Mazama rufa*. Segundo todos os contatos em território paraguaio, não existem relatos sobre a presença deste animal na região há anos.

Foram analisadas as áreas mais distantes de Assunção respeitando as características necessárias para a ocorrência da espécie, sempre atentando para que não houvesse nenhuma possível barreira geográfica entre Assunção e a localidade viável de coleta. Neste contexto, obtiveram-se como áreas propícias para a ocorrência de *Mazama rufa*: a reserva natural do bosque Mbaracayú, localizada no departamento de Canindeyú, em território paraguaio, e o Parque Nacional do Iguaçu (PNI), no estado do Paraná, no território brasileiro, como áreas ideais para a obtenção do animal alvo.

A autorização de coleta em território paraguaio não abrangia reservas federais, impossibilitando assim a possível captura do animal dentro da reserva Mbaracayú. Assim, os esforços foram voltados para o Parque Nacional do Iguaçu - PNI (Figura 12).

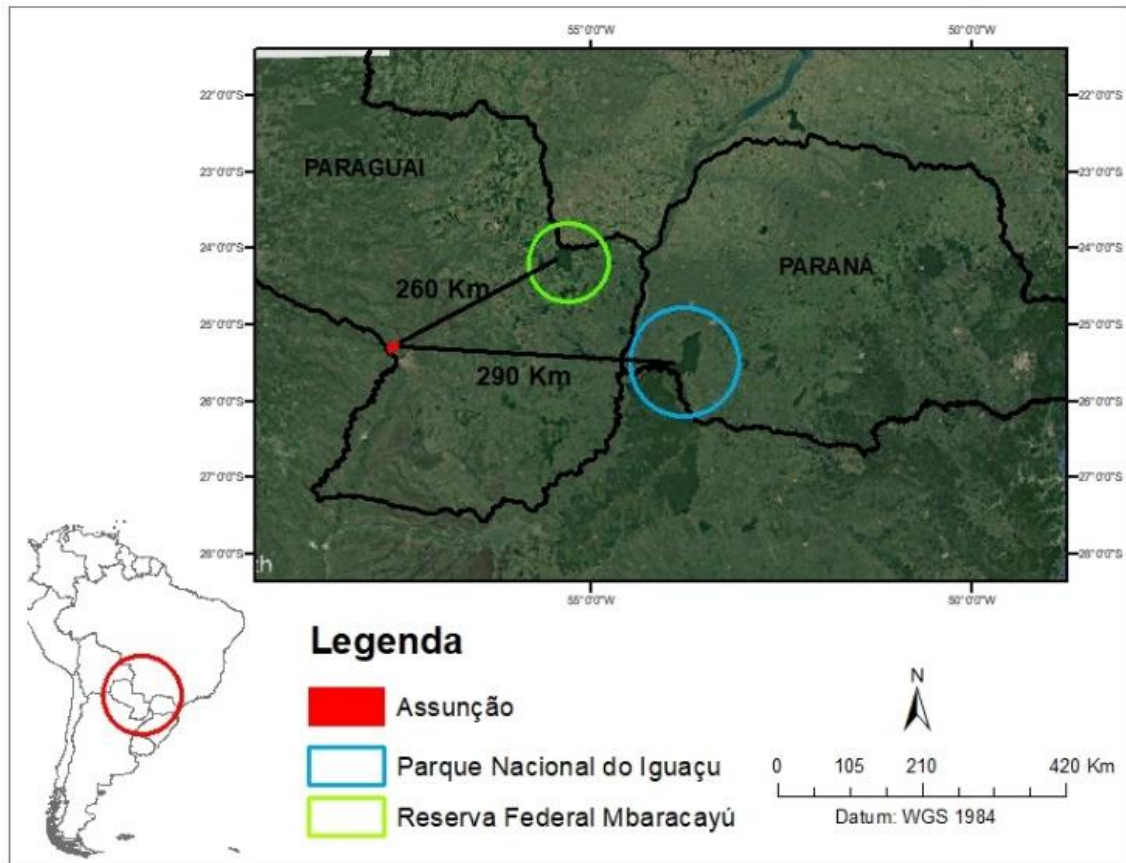


Figura 12. Mapa de distância entre a localidade da descrição de *Mazama rufa* utilizados como base por Azara, a reserva de Mbaracayú e o parque Nacional do Iguaçu, apresentando a distância em quilômetros.

O PNI tem uma área total de 185.262,2 ha e fica a aproximadamente 290 km de Assunção. Na região, a espécie é abundante e frequentemente vista às margens da rodovia que cruza o parque próximo às Cataratas do Iguaçu.

Na tentativa de obtenção de um exemplar da região, organizou-se uma expedição de coleta para o PNI em outubro de 2017. Entretanto, a autorização de coleta para a área interna do PNI não foi obtida devido à discordância da equipe do parque em relação à coleta científica. Uma vez que a equipe do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) possui permissão de coleta permanente em todo o território nacional, os contatos foram direcionados para as propriedades vizinhas ao PNI. Coincidentemente, quando a equipe estava em busca dos animais, uma fêmea adulta foi atropelada na estrada parque, no dia 4 de outubro, a poucos quilômetros da entrada do PNI (Figura 13). Quando a equipe chegou ao local, o animal ainda estava vivo e pôde ser aproveitado para a coleta de todo o material

necessário para as análises genéticas. O animal não resistiu aos ferimentos do acidente e veio a óbito podendo também ser usado para obtenção de material para análises morfológicas (crânio, pós-crânio e pele).

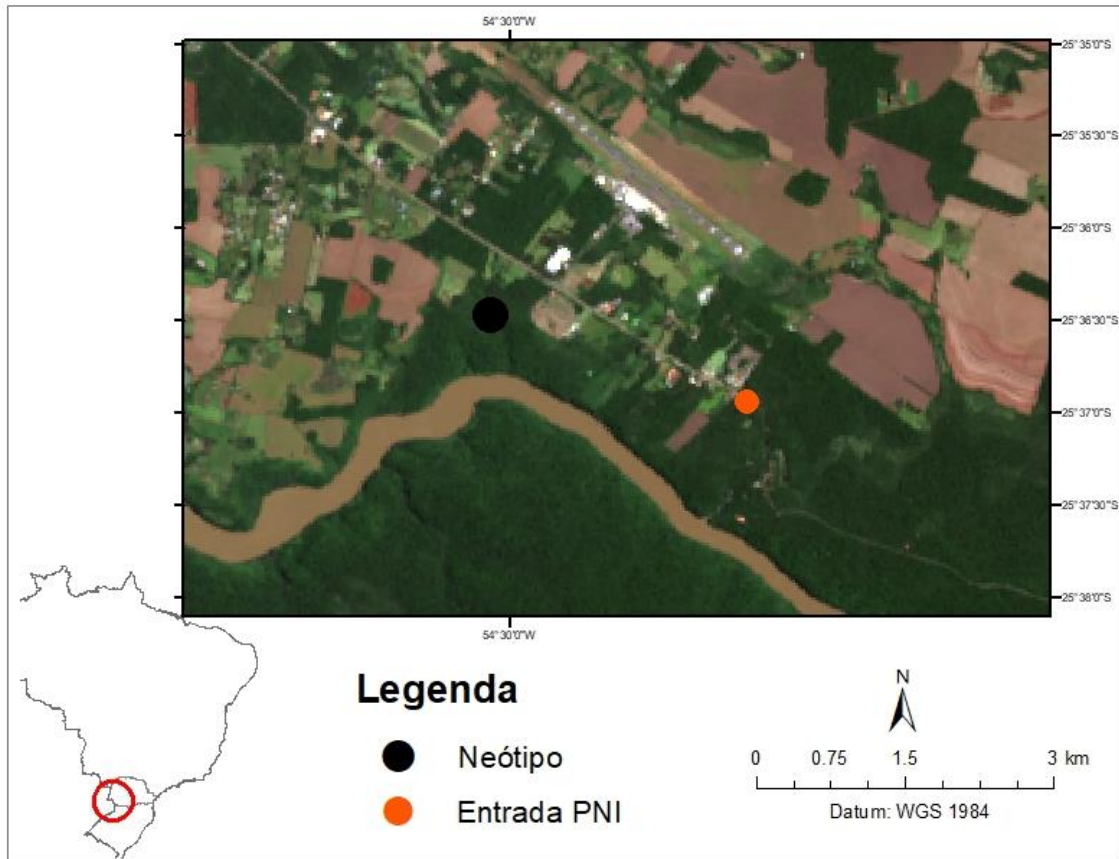


Figura 13. Mapa evidenciando o ponto de coleta do holótipo em relação à entrada do Parque Nacional do Iguaçu.

4.1.2 Parátipos

Faz-se necessária a apresentação de parátipos para que a descrição seja embasada em um grupo de indivíduos, e não apenas no neótipo coletado, minimizando assim possíveis erros de descrições dos padrões.

Foram escolhidos como parátipos aqueles espécimes/amostras coletados próximo ao ponto de coleta do topotipo que, certamente pertenceriam à mesma população. No caso das análises craniométricas, os animais elegíveis são aqueles que chegaram à idade adulta em vida livre e não passaram nenhum

período de sua vida em cativeiro, evitando assim a interferência do processo de criação na análise. Já para as análises cromossômicas, biométricas e moleculares foram escolhidas amostras de animais nascidos em vida livre, mesmo que tenham passado parte de suas vidas em cativeiro.

Respeitando os critérios descritos acima e dependendo da disponibilidade de material, podemos observar na Tabela 1 a relação de parátipos utilizados nas análises moleculares, biométrico e citogenético, na Figura 14 apresenta a localização geográfica dos animais utilizados como parátipos das análises biométricas. No caso da análise craniométrica não foram apresentados parátipos por não ter disponível crânios dentro da premissa apresentada acima.

Tabela 1. Relação dos parátipos utilizados nas análises citogenéticas, biométricas e moleculares com seu número de registro no genBank, NUPECCE e número de brinco; sexo; estágio de vida; Peso; Origem; Local de coleta e os genes analisados para cada um deles. (COI) Citocromo oxidase I; (CytB) Citocromo B; (D-Loop) região controle; (ND5) NADH desidrogenase subunidade 5.

IDENTIFICAÇÃO	NUPECCE	Museu	Brinco	Sexo	Estágio de vida	Peso (kg)	Origem	Local de coleta	Molecular			Citogenética	Biométrica
									COI	CytB	D-Loop	ND5	
<i>M. rufa</i> 2		NPC117		Fêmea	Adulta		Foz do Iguaçu	Parque nacional do Iguaçu	X	X	X	X	X
<i>M. rufa</i> 3				Fêmea	Feto		Foz do Iguaçu	Parque nacional do Iguaçu	X	X	X	X	
<i>M. americana - Paraná 1</i>	T104			Macho	Adulto	39,5	Hernandarias - PY	Refugio biológico Bela vista	X		X	X	X
<i>M. americana - Paraná 2</i>	T110		BR amarelo 0835 OD	Macho	Adulto	32	Terra boa - PR			X			
<i>M. americana - Paraná 3</i>	T205		BR azul 218 OD	Macho	Adulto	30	Cativeiro	Itaipu binacional		X			
<i>M. americana - Paraná 4</i>	T257		BR branco 0064 OE	Fêmea	Adulta	42	Criadouro	Cascavel - PR			X	X	X
<i>M. americana - Paraná 5</i>	T268		BR 75 OE	Fêmea	Adulta	33	Foz do Iguaçu	Parque nacional do Iguaçu			X		X
<i>M. americana - Paraná 6</i>	T270			Fêmea	Adulta	37	Foz do Iguaçu	Parque nacional do Iguaçu			X	X	X
<i>M. americana - Paraná 7</i>	T220			Fêmea	Adulta	42	Criadouro	Foz do Iguaçu		X			
<i>M. americana - Paraná 8</i>	T245		BR amarelo 0086 OD	Fêmea	Adulta	38,5	Itaipu binacional					X	X

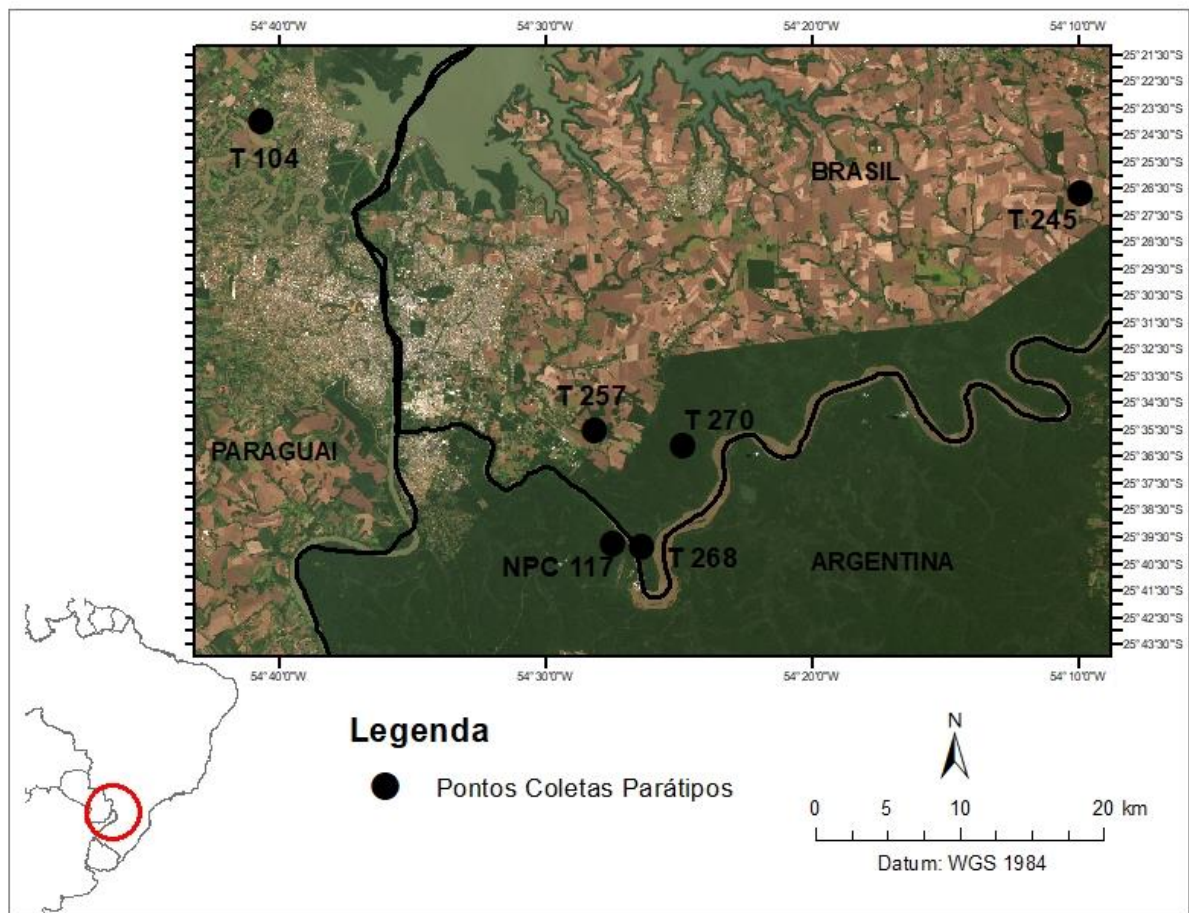


Figura 14. Localidade geográfica dos parátipos T104, T245, T257, T268, T270 e NPC117, utilizados na biometria e citogenética (exceto NPC117).

4.1.3 Grupo externo e comparativos

Para todas as análises que geraram árvores (biometria, craniometria e análise molecular), foram eleitos alguns espécimes de outros citótipos de *M. americana*, bem como outras espécies para servirem como grupo externo ou como base para comparação intraespecífica, tendo como premissa para a escolha dos indivíduos animais adultos (Tabelas 2, 3 e 4).

Tabela 2. Espécies utilizadas como grupo externo para as análises biométricas, quando necessário, separadas por citótipos e o número de indivíduos que pertencem a cada grupo.

ESPÉCIE	CITÓTIPO	NÚMERO DE INDIVÍDUOS
<i>M. americana</i>	Carajás	15
<i>M. americana</i>	Rondônia	6
<i>M. americana</i>	Manaus	3
<i>M. americana</i>	Acre	4
<i>M. americana</i>	Alto rio negro	1
<i>M. americana</i>	Neótipo - Caiena	1
<i>M. nemorivaga</i>	-----	1
<i>M. bororo</i>	-----	1
<i>M. gouazoubira</i>	-----	1
<i>M. nana</i>	-----	1

Tabela 3. Relação de espécies utilizadas como grupo externo para as análises craniométricas, sendo um representante para cada espécie e no caso de *M. americana* um representante por citótipo, com seu número de identificação do NUPECCE, número de identificação do museu, número de brinco, sexo, estágio de vida, origem e Localidade de coleta.

IDENTIFICAÇÃO	NUPECCE	Museu	Brinco	Sexo	Estágio de vida	Origem	Local de coleta
<i>M. americana jari</i>	T258	NPC022	OE azul1/ OD branco 66	Macho	Adulto	Jari	Comunidade Cipoal
<i>M. americana rondonia</i>	T021	NPC055	BR 0530	Macho	Adulto	Rondônia	Ariquemes - RO
<i>M. americana juina</i>		NPC036		Fêmea	Adulta	Juina	
<i>M. americana carajas</i>	T254	NPC016	BR 225 OE (azul)	Fêmea	Adulta	Imperatriz - MA	Mosteiro em Imperatriz - MA
<i>M. americana santarem</i>	T259	NPC078	BR 67	Macho	Adulto	Santarem - PA	
<i>M. Americana</i>	T358	NPC079		Macho	Adulto	Guiana Francesa	Regina
<i>M. Nana</i>		NPC020		Fêmea	Adulta		
<i>M. Nemorivaga</i>	T321	NPC010	BR branco 95 OE	Fêmea	Adulta	CETAS - Macapá	Parque Nacional Cabo Orange
<i>M. Gouazoubira</i>	T319	NPC014	029 BR MB OD	Macho	Adulto	Fazenda Nhimirim	Pantanal da Nhecolândia
<i>M. Bororo</i>	T340	NPC001	BR 0034D	Macho	Adulto	CETAS - PUC curitiba	Campina grande do Sul - PR

Tabela 4. Relação dos grupos externos utilizados nas análises moleculares, com seu número de registro no genBank ou NUPECCE e os genes analisados para cada um deles. (COI) Citocromo oxidase I; (CytB) Citocromo B; (D-Loop) região controle; (ND5) NADH desidrogenase subunidade 5, sendo todos os *M. americana* provenientes da Guiana Francesa.

ESPÉCIE	GenBank	NUPECCE	COI	CytB	D-Loop	ND5
<i>Mazama americana</i> 1	JF459195		X			
<i>Mazama americana</i> 2	JF459196		X			
<i>Mazama americana</i> 3	JF459197		X			
<i>Mazama americana</i> 4	JN632656		X	X	X	X
<i>Mazama americana</i>		T358 (Neótipo)	X	X	X	X
<i>Mazama gouazoubira</i> 1	KJ772514	T314	X	X	X	X
<i>Mazama gouazoubira</i> 2	JN632658		X	X	X	X
<i>Rangifer tarandus</i> 1	JF443498		X			
<i>Rangifer tarandus</i> 2	JF443497		X			
<i>Rangifer tarandus</i> 3	DQ673135			X		
<i>Rangifer tarandus</i> 4	DQ673134			X		
<i>Mazama nana</i> 1	DQ789227			X		
<i>Mazama nana</i> 2	DQ789214			X		
<i>Mazama bororo</i> 1	DQ789231			X		
<i>Mazama bororo</i> 2	DQ789228			X		
<i>Mazama temama</i> 1	KP954721			X		
<i>Mazama temama</i> 2	KP954720			X		
<i>Mazama temama</i> 3	KP954715				X	
<i>Blastoceros dichotomus</i>	JN632603				X	
<i>Mazama rufina</i> 1	JN632661					X
<i>Mazama rufina</i> 2	NC_020721					X
<i>Mazama nemorivaga</i> 1	JN632660					X
<i>Mazama nemorivaga</i> 2	JN632659					X

4.2 Procedimentos após a Coleta do Exemplar

4.2.1 Biometria

O animal inteiro foi avaliado morfológicamente pelas seguintes medidas corporais: massa, comprimento de cabeça, largura de cabeça, tamanho da orelha, distância entre olhos, largura da mandíbula à base, comprimento do metacarpo, comprimento do metatarso, altura, comprimento do corpo, comprimento da cauda, perímetro de pescoço e perímetro torácico. Estas medidas foram tomadas por balança pendular, fita métrica e paquímetro. Isso permitiu comparações com o banco de dados biométricos do NUPECCE (Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos), tomado de animais anestesiados.

4.2.2 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) *Close* lateral da cabeça.

4.2.3 Biopsia de Pele

Após tricotomia e antissepsia da região interna da coxa esquerda foi excisado um fragmento de 5 cm por 2 cm de pele que foi depositado em um tubo contendo meio de transporte Mc Coy's + 500mg/Lt de gentamicina + 20mg/Lt de anfotericina B, segundo Duarte et al. 1999. Permaneceu sob refrigeração até a chegada ao laboratório de campo e posteriormente foi dividido em 10 fragmentos que foram depositados em tubos criogênicos contendo meio de congelamento de pele (200mL de Mc Coy's + 40mL de soro equino + 12mL de Dimetil Sulfóxido + 24g de polyvinil + 10mL de antibiótico (sulfato de Gentamicina + Anfotericina), segundo o protocolo

descrito por Duarte et al. (1999). Esse material permaneceu por 4 horas sob refrigeração e por 30 minutos no vapor do Nitrogênio Líquido; depois desse período foi estocado em imersão no Nitrogênio Líquido (-196 °C). Estas células, que permanecem vivas nessa condição, foram utilizadas para cultivos de fibroblastos para estudos citogenéticos.

4.2.4 Retirada e Processamento da Pele Completa

A pele, na sua íntegra, foi retirada e limpa de restos musculares, gordura e fâscias, sendo então mergulhada em solução de limpeza a (25mL de ácido acético glacial + 3Lt de água), onde permaneceu por 50 minutos. Posteriormente, a pele foi mergulhada em solução de curtume para dessecação do material (500gr de sulfato de alumínio comercial + 500gr de cloreto de sódio + 3Lt de água), permanecendo por 3 dias. A mesma foi esticada na sombra para secar, esticada periodicamente para manter a flexibilidade. Depois de totalmente seca e flexível, a superfície interna foi lixada. Em princípio, a pele foi depositada no Museu do NUPECCE que mantém a mais importante coleção de cervídeos do gênero *Mazama* do mundo, com peles, crânios e pós-crânios de mais de 100 espécimes.

4.2.5 Coleta de Fragmentos de Órgãos e Músculo

Durante o processamento da carcaça foram coletadas amostras de tecido (músculo, fígado, rim e baço) para estudos moleculares. Fragmentos de 1 cm³ destes tecidos foram mergulhados em tubos com etanol absoluto, permanecendo à temperatura ambiente para as análises moleculares.

4.2.6 Preparação do Crânio e Pós-crânio

O esqueleto completo (crânio e pós-crânio) foi limpo de todo resto muscular no local da coleta do animal e o material foi acondicionado em caixas plásticas sob temperatura ambiente.

4.3 Caracterização Morfológica

O crânio foi fotografado em todos os ângulos com o uso de uma câmera digital. Foram tomadas medidas padrão do crânio segundo Rees (1969) e Driesch (1976), como apresentado na Figura 15, totalizando 37 medidas do crânio, utilizando um paquímetro digital de 0,01 mm de precisão.

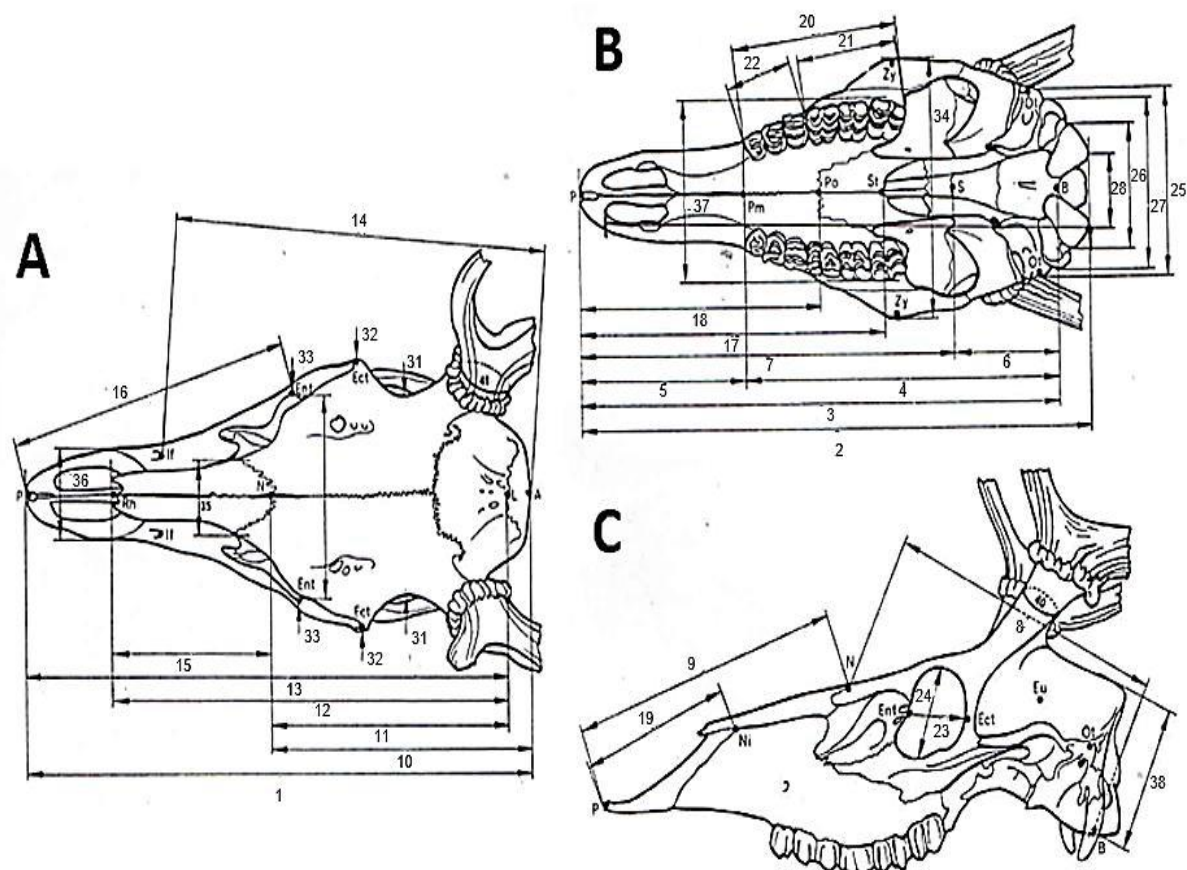


Figura 15. Padrão de medições cranianas de cervídeos. Vistas dorsal (A), ventral (B) e lateral esquerda (C). A medida 1 representa o comprimento total, 2 comprimento côndilo-basal, 3 comprimento basal, 4 comprimento curto do

crânio, 5 pré-molar – prosthion, 6 eixo base-cranial, 7 eixo base-facial, 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, 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 superior (REES, 1969; DRIESCH, 1976).

Foram realizados exames na pele taxidermizada e nas fotos sob seguintes aspectos: coloração geral da pelagem; campos cromogénéticos da cabeça: faixas orbitais superior e inferior, mancha superciliar anterior, regiões auriculares anterobasal e posterobasal, faixa rostral, região nasal, região mentoniana, mancha mandibular, região bucal e região gular; campos cromogénéticos do corpo: região da cabeça e pescoço, linha mediana dorsal do corpo, dorso da cauda, região dorsal posterior do corpo, região ventral do corpo, ventre da cauda e região distal dos membros; padrão de faixas de pigmentos nos pelos das diferentes regiões do corpo; comprimento dos pelos nas diferentes regiões do corpo; ocorrência de faixas de pelos antevertidos; ocorrência de tufo arredondado de pelos na região tarsal.

Para a análise de dissimilaridade entre os indivíduos caracterizados morfológicamente por sua biometria e craniometria, foi realizada análise de cluster, as quais foram feitas no software R.

4.4 Análises Citogenéticas

O presente estudo analisou a estrutura e organização dos cromossomos de um espécime de *Mazama rufa* (ILLIGER, 1811) e avaliou as diferenças existentes

entre as variantes que já foram ou serão estudadas auxiliando na identificação de novas espécies.

4.4.1 Cultivo Celular

Uma vez no laboratório de citogenética do NUPECCE - FCAV UNESP, Jaboticabal SP, as amostras de pele foram descongeladas completamente em banho-maria a 37 °C e colocadas em placas de Petri contendo tampão fosfato (PBS), sendo então divulsionadas mecanicamente e divididas em pequenos fragmentos. Estes foram transferidos para os frascos de cultivo com 1 ml de meio de cultura DMEM (Meio Essencial Mínimo Modificado de Dulbecco – Cutilab + 1L de água Milli Q + 3,7g de bicarbonato de sódio + 110mg de piruvato + 5mL de antibiótico (sulfato de Gentamicina + Anfotericina)) enriquecido com 50% de soro fetal bovino (SFB –Cutilab), e levadas a estufa a 37°C e 5% de CO₂. Após a aderência das células no frasco o meio foi trocado por 4ml de meio com 10% de soro fetal bovino.

Os cultivos foram supervisionados a intervalos de 24 horas e o meio foi trocado a cada dois dias. Quando o crescimento da monocamada foi realizado o repique, que consistiu em retirar o meio das garrafas, lavar as células duas vezes com PBS, tratadas com 2 ml de solução de tripsina durante 2 minutos na estufa a 37 °C, sob monitoramento em microscópio invertido para verificação se as células soltaram completamente da garrafa. A tripsina foi neutralizada com 200µL de soro fetal bovino e 1,8mL de meio. Então, as células foram transpassadas para outras garrafas de cultivo (colocando 1mL em cada garrafa nova) onde foram realimentadas da mesma maneira até obter um número suficiente de cultivos secundários. Dessas garrafas, foi selecionada a que tinha maior crescimento celular e foi realizado o congelamento de fibroblastos em 5 microtubos e armazenados em Nitrogênio Líquido no banco de células vivas do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE). Os demais cultivos secundários que apresentavam ótimo crescimento celular, foram “pré-tripsinizados” um dia antes da colheita.

No dia da colheita, foram adicionados 60µL de colchicina em cada garrafa e incubadas a 37°C durante 30 minutos. Após a incubação foi realizada a tripsinização para que as células se dissociassem das garrafas. Em seguida, o conteúdo de cada garrafa foi transferido para tubos de centrifuga cônicos e centrifugados por 5 minutos a 2000 rpm, e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em 8mL de solução hipotônica (2,78g de KCL em 500mL de água destilada) e incubadas no banho maria a uma temperatura de 37°C durante 20 minutos. Posteriormente, foi feita a pré-fixação, com a adição de 3 gotas de fixador (solução de metanol e ácido acético 3:1 respectivamente), misturado e centrifugado novamente por 5 minutos a 2000 rpm e o sobrenadante descartado. Foi realizado três vezes o mesmo procedimento com 6mL, 4mL e 3mL de solução fixadora.

Finalmente as células foram fixadas com mais 1mL 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).

4.4.2 Biometria Cromossômica

Para a classificação cromossômica, foram utilizadas 10 metáfases do animal coletado em coloração 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). As medidas foram feitas a partir do centrômero até a extremidade do cromossomo (telômero) utilizando o software Axiovision Release 4.8, de acordo com a razão de braços (RB), foram classificados como metacêntricos, submetacêntricos, subtelocêntricos ou acrocêntricos (LEVAN et al., 1964).

O comprimento relativo (CR) permitiu a divisão dos pares cromossômicos em grupos: grupo A (grandes cromossomos de dois braços, $CR \geq 6\%$), grupo C (pequenos cromossomos de dois braços, $CR < 6\%$), grupo D (grandes cromossomos

de um braço, $CR \geq 5\%$), grupo E (pequenos cromossomos de um braço, $CR < 5\%$) e grupo B (cromossomos B, $CR < 1,5\%$).

4.4.3 Bandamento G

No procedimento da Banda G, as lâminas foram previamente envelhecidas a 60°C —overnightll e mais um dia e meio na geladeira. Após o envelhecimento, estas foram mergulhadas em solução de tripsina (0,5%) a 37°C no banho maria durante 1, 2 ou 3 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 (0,06M pH 6,8) (2:1) durante 12 minutos.

4.4.4 Bandamento C

As lâminas, após 5 dias de preparação e envelhecidas a 37°C , foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico, HCL, (16,6mL de HCL / 1L de água destilada) por vinte minutos a temperatura ambiente, em seguida foram lavadas com água destilada. Depois foram colocadas em solução de hidróxido de bário (1g de Ba (OH)₂ em 20mL de água destilada) a 40°C no banho maria durante 12 minutos e lavadas novamente com água destilada. Posteriormente, foram incubadas na solução 2 x SSC (17,53g de NaCl + 8,82g de Na₃C₆ H₅O₇ – 2H₂O + 500mL de água destilada) por 1.5 horas a 56°C . Finalmente, as lâminas foram lavadas novamente com água destilada e coradas com Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol) a 10% em tampão fosfato (0,01M-ph:6,8) por 25 minutos.

4.4.5 Coloração Ag-RON

As lâminas, após 5 dias de preparação e envelhecidas a 37°C, foram mergulhadas em solução de ácido clorídrico, HCL, (16,6mL de HCL / 1L de água destilada) por vinte minutos a temperatura ambiente, em seguida foram lavadas com água destilada. Depois foram colocadas em solução de hidróxido de bário (1g de Ba (OH)₂ em 20mL de água destilada) a 40°C no banho maria durante 12 minutos e lavadas novamente com água destilada. Posteriormente, foram incubadas na solução 2 x SSC (17,53g de NaCl + 8,82g de Na₃C₆ H₅O₇ – 2H₂O + 500mL de água destilada) por 1.5 horas a 56°C. Finalmente, as lâminas foram lavadas novamente com água destilada e coradas com Giemsa (2g de Giemsa + 108mL de glicerina + 168mL de metanol) a 10% em tampão fosfato (0,01M-ph:6,8) por 25 minutos.

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. Todas as imagens foram editadas com o auxílio do programa Adobe Photoshop CS2.

4.5 Genética Molecular

4.5.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído a partir de amostras de músculo. Primeiro foi cortado o tecido com material estéril e colocado em um tubo de microcentrífuga (1.5 mL), em seguida, foi adicionado 500 µl de TE-Tween seguido de incubação no banho-maria a 65°C por 1,5 horas com agitação periódica. O próximo passo foi adicionar 5µl de proteinase K, seguido de incubação a 55°C durante 6 horas com agitação periódica. Após as 6 horas, a temperatura foi reduzida para 37°C, permanecendo sob incubação “overnight”. Em seguida, foi feito o processo de extração – precipitação

do DNA pelo método do fenol: clorofórmio: álcool isoamílico (25:24:1), conforme segue:

Foi adicionado um volume de PCL (fenol-clorofórmio-álcool isoamílico) na mesma quantidade da amostra, agitando-se vigorosamente no vórtex por 10seg, seguido de centrifugação por 10 min, então o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. A precipitação do DNA consistiu em adicionar 1/10 do volume da amostra de acetato de sódio 0.3M (aproximadamente 300 µl), a qual foi misturada cuidadosamente e, em seguida, o volume foi completado com etanol absoluto gelado (2,5 x o volume da amostra), misturado por inversão e colocado em freezer - 20°C durante 2 horas. Após este período, realizou-se a centrifugação a 4°C por 20 minutos a 2000 rpm, sendo que o sobrenadante foi desprezado e o pellet, completamente seco. Por fim, o DNA foi ressuspendido em 100µl de TE-Tween.

As amostras foram quantificadas por espectrofotometria e por análise em gel de agarose 1%, sendo em seguida diluídas em uma solução de uso (50ng/µl) para sua amplificação e armazenamento em geladeira a 5°C.

4.5.2 Amplificação e Sequenciamento de Genes Mitocondriais e Nucleares

As amostras foram submetidas à técnica de PCR (MULLIS, 1983) em termociclador convencional —Biometra T1 Thermocycler” para amplificação do DNA. Para caracterização molecular, foram utilizados marcadores de DNA mitocondrial. No genoma mitocondrial foram amplificados o gene do Citocromo B (CytB) (HASSANIN et al., 1998; DUARTE et al., 2008), a subunidade I da Citocromo Oxidase (COI) (FOLMER et al., 1994; HASSANIN; ROPIQUET, 2005), NADH5 Desidrogenase subunidade 5 (CAPARROZ et al., 2015) e região controladora mitocondrial (D-loop) (VILÀ et al., 1999) (Tabela 5).

Tabela 5. Genes mitocondriais que foram amplificados e os iniciadores (*primers*) utilizados com suas respectivas sequências, tamanho dos fragmentos amplificados em pares de bases (pb) e temperatura de pareamento e sua referência.

Genes	Iniciadores (primers)	Sequências (Forward/Reverse)	Tamanho fragmento (pb)	Temperatura pareamento	Referência
CytB	L14724	5'CGAAGCTTGATATGAAAAACCATCGTTG3'	480	54°C	KOCHER et al., 1989
	H15149	5'AAACTGCAGCCCCTCAGAATGATATTTGCCTCA3'			
CytB	FARH	5'TCCAATAGTAATAAAGGGGTGTTCA3'	660	54°C	DUARTE et al., 2008
	FARL	5'CCATGAGGACAAATATCATTCTGAT3'			
COI	LCO1490	5'GGTCAACAAATCATAAAGATATTGG3'	658	54°C	FOLMER et al., 1994
	HCO2198	5'TAAACTTCAGGGTGACCAAAAAATCA3'			
D-loop	Thr115926	5'GAATTCCTCCGGTCTTGTAACCC3'	660	54°C	VILA et al., 1999
	DLH16340	5'CCTGAAGTAGGAACCGATG3'			
ND5	Leu11775	5'GGTGCAACTCCAATAAAAG3'	691	58°C	CAPARROZ et al., 2015
	ND512427	5'TTTTCCRGTTGCAGCTARTG3'			
ND5	ND512326	5'TCTAGCAATAGCATGATTYC3'	688	58°C	CAPARROZ et al., 2015
	ND512988	5'TGTTATTAGGAGGGCTCAGG3'			
ND5	ND513167	5'AATARTTGGAAGCCTTTTCG3'	581	58°C	CAPARROZ et al., 2015
	ND513709	5'TATGATACAGGRGATTCTGG3'			

Os fragmentos de DNA foram amplificados utilizando uma reação de PCR ("Polymerase Chain Restriction") que continha: 12, 0 µl de H₂O, 1,0 µl de dNTP, 2,0µl de tampão de reação, 0,6 µl de MgCl₂, 0,5 µl de cada "primer" ("forward e reverse"), 0,4 µl de DNA "Taq polimerase" e 3,0 µl de DNA, para um volume total de 20 µl por amostra. O programa de amplificação utilizado no termociclador foi: ciclo inicial de 5 minutos a 94°C para desnaturar o DNA, 35 ciclos a 94°C por 1 minuto, temperatura de pareamento dos iniciadores (Tabela 7) por 1 minuto e por 10 minutos com temperatura a 72°C para extensão final, depois mantido a 4°C. Em todas as reações foram incluídos controles negativos para verificar a existência ou ausência de contaminação.

Após a PCR, o produto de amplificação foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% para verificação da qualidade do produto amplificado, sendo então purificado utilizando-se o produto comercial QIAquick PCR Purification kit (Qiagen). Os produtos de PCR foram sequenciados utilizando-se o kit ABI Prism Big Dye Terminator (Applied Biosystems), analisando-se o produto final no sequenciador automático ABI Prism 377 (Applied Biosystems).

4.5.3 Análise filogenéticas

Foi analisada a necessidade de inserir máscaras nas bases nucleotídicas manualmente, quando necessário foi adicionado com o BioEdit (HALL,1999) caso ocorresse pico inespecíficos e/ou sobrepostos. As mesmas foram alinhadas pelo programa SATé (LIU et al., 2009). A partir das sequências obtidas foram realizadas análises filogenéticas utilizando de análise Bayesiana através de programas Beaufit e Beast (BOUCKAERT et al.,2014), os quais foram alimentados com o melhor modelo evolutivo proposto pelo JModelTest para cada matriz analisada, gerado na plataforma digital CIPRES. Após análise bayesiana, foi realizado um *burnin* de 25% das árvores obtidas pelo programa LogCombiner e então concatenadas em uma árvore pelo programa TreeAnnotator, todos dentro do pacote Beast. O suporte estatístico dos agrupamentos filogenéticos foi estimado através do método de probabilidade posterior. Não foram realizadas análises de genes concatenados por não existir disponível sequências de um mesmo indivíduo para todos os genes, como podemos observar na Tabela 1 e 4.

Para se permitir uma comparação das sequências obtidas, seus parátipos, com as sequências já existentes no Genbank, utilizados como grupo externo para uma avaliação preliminar da posição deste animal em relação aos demais já avaliados molecularmente conforme Tabela 4.

Os dados obtidos foram finalmente analisados dentro dos conceitos de espécie filogenética (CRACRAFT, 1983) que consiste no menor conjunto de organismos que compartilham um ancestral e podem ser distinguidos de outros grupos de organismos, ou seja, grupo monofilético. Também, foi analisado o conceito de coesão das espécies (TEMPLETON, 1989; 2001) definido como “a mais inclusiva população de indivíduos que têm o potencial para a coesão através de intercâmbios genéticos e intercâmbios demográficos” (TEMPLETON, 1989). Foi também considerado o princípio da concordância genealógica (AVISE; BALL, 1990), que seria uma variante do conceito filogenético de espécie baseado no consenso de muitas genealogias (filogenias de gene único), estimadas de diferentes genes.

Todo o material deste espécime permanecerá à disposição da comunidade científica para novas caracterizações, junto ao Museu Cervidológico do Núcleo de Pesquisa e Conservação de Cervídeos (NUPECCE) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), Campus de Jaboticabal, São Paulo, com o número de coleção NPC118.

5. RESULTADOS

5.1 Descrição do espécime

5.1.1 *Mazama rufa* (Illiger, 1811) desc. Emend.: faixa de pelos antevertidos na nuca, salpicado de castanho (Figura 16.a). Faixa rostral larga, castanha enegrecida em direção posterior, como toda linha lombar, mais escura que a coloração predominante, castanho avermelhado (Figura 16.b). Tufo de pelo tarsal presente (Figura 17). Laterais da cabeça com coloração parda. Região gular pardo claro (Figura 18.C). Mancha nasal presente. Mancha mentoniana branca (Figura 18.C). Faixas orbitais superior e inferior ausentes. Mancha superciliar ausente. Orelhas pequenas e anguladas, borda interna castanho, com pelagem branca na borda lateral inferior e nas pregas, parte externa castanho enegrecido (Figura 18.C). Pelos mais compridos na região basal da orelha e próximo a região inguinal. Flancos acinzentados, mantendo essa coloração até o início do tórax (Figura 18.A). Pescoço castanho claro na região ventral (Figura 18.A). Região anterior das ancas com coloração igual ao dorso (Figura 18.B). Parte final do tórax, castanho escuro. Região ventral branca, assim como a região inguinal. Região posterior das ancas e dorso da cauda de coloração marrom avermelhada (Figura 19). Região ventral da cauda branca. Ventre da cabeça pardo clara. Cor da área proximal e distal dos membros bem definidas (Figura 20), sendo a proximal externa da cor dos flancos e na parte distal castanho escuro como na linha dorsal e área rostral (Figura 18.A).

Ponto de coleta: Avenida das Cataratas, número 2264. BR 469

Coordenadas geográficas do ponto de coleta: 25°36'22.66"S e 54°29'54.50"O

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. Com o número de tombo, NPC 118.

Sinonímias: Serão consideradas sinonímias somente nomes baseados na descrição de Azara, que são: *Mazama pita* (Rafinesque, 1817); *Mazama rufiz* (Fisher, 1814).



Figura 16. (A) Tufo de pelos frontais do holótipo de *Mazama rufa* (a) e faixa rostral (b) (B) Vista dorsal (Foto: J. M. B. Duarte).



Figura 17. Vista ventral do holótipo de *Mazama rufa*. Em detalhe, tufo de pelos na região tarsal. (Foto: J. M. B. Duarte).

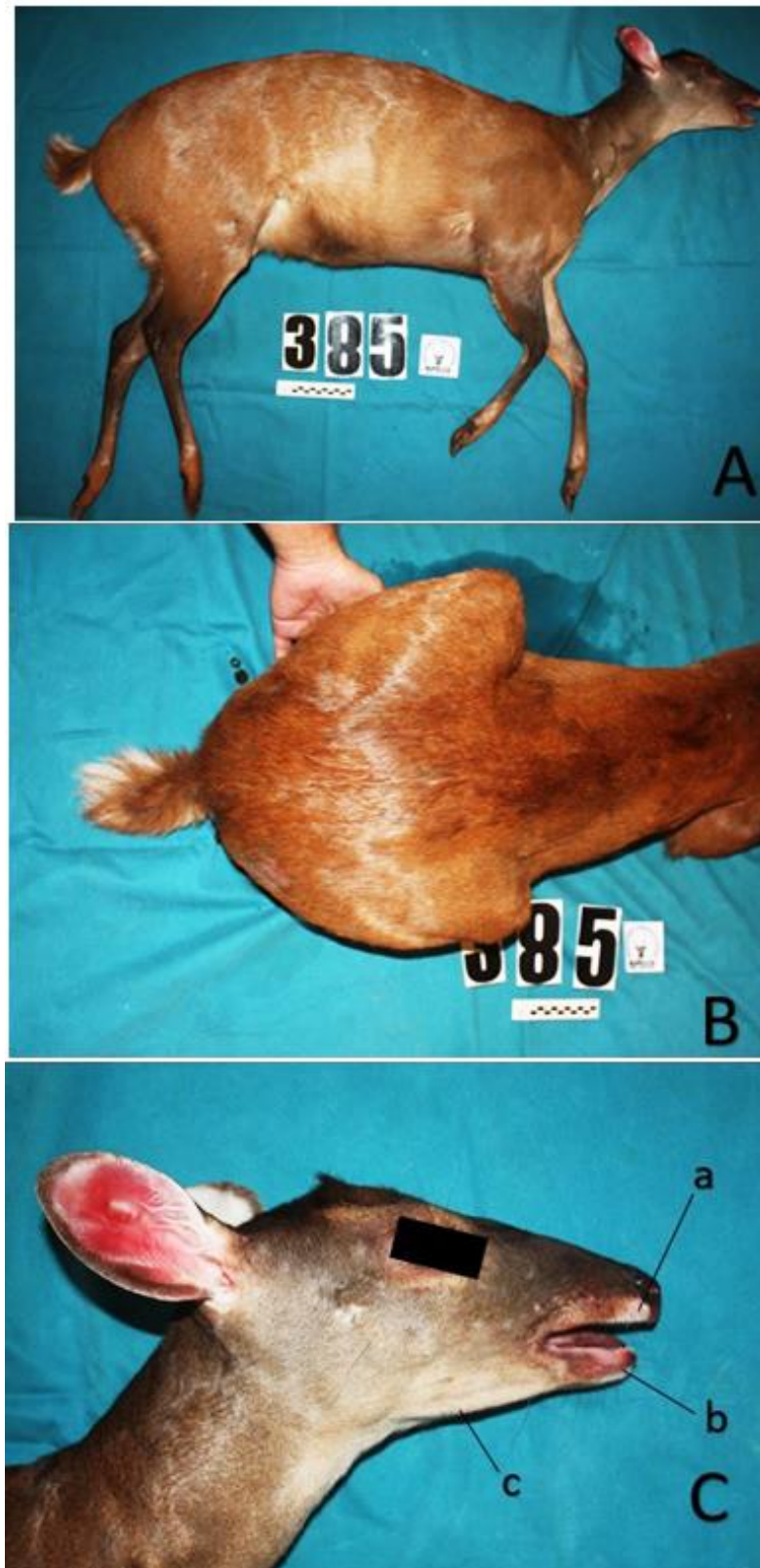


Figura 18. (A) Vista lateral do holótipo de *Mazama rufa*. (B) Ancas e dorso da cauda. (C) Vista lateral da cabeça (a) mancha nasal. (b) mancha mentoniana. (c) mancha gular.



Figura 19. Vista ventral do holótipo de *Mazama rufa*.



Figura 20. Pele taxidermizada do holótipo de *Mazama rufa*.

5.1.2 Biometria

As medidas obtidas na biometria corporal do neótipo estão apresentadas na Tabela 6, juntamente com os parátipos obtidos na região da coleta, os quais pertencem ao banco de dados do NUPECCE. Visando maior robustez e suporte para as descrições dos dados apresentados, os dados foram tratados como um grupo e não apenas como um animal (Tabela 6).

Tabela 6. Medidas biométricas do holótipo de *Mazama rufa* e seus parátipos (NPC117, T268, T257, T245, T270 e T104). Medidas em milímetros (mm), massa em quilogramas (kg). ($\bar{x}$) = Média e (DP) = Desvio padrão.

	HOLÓTIPO	NPC117	T268	T257	T245	T270	T104	$\bar{x}$	DP
Peso	33,7	33,05	33	42	37,7	37	39,5	36,56	3,23
Comprimento chifre esq	-----	-----	-----	-----	-----	-----	47	47,00	-----
Comprimento chifre dir	-----	-----	-----	-----	-----	-----	100	100,00	-----
Diametro chifre esq	-----	-----	-----	-----	-----	-----	32	32,00	-----
Diametro chifre dir	-----	-----	-----	-----	-----	-----	18	18,00	-----
Diametro testículo esq	-----	-----	-----	-----	-----	-----	27	27,00	-----
Diametro testículo dir	-----	-----	-----	-----	-----	-----	25	25,00	-----
Comprimento testículo esq	-----	-----	-----	-----	-----	-----	72	72,00	-----
Comprimento testículo dir	-----	-----	-----	-----	-----	-----	66	66,00	-----
Comprimento cabeça	226	240	250	255	240	235	245	241,57	8,89
Largura cabeça	90,5	98	95	103,5	99	99,9	99	97,84	3,80
Orelha	103	103	95	100	105	120	105	104,43	7,13
Entre olhos	52,5	57,5	61,5	56	54	57,5	59,5	56,93	2,86
Entre chifres	65	-----	-----	68	64	-----	23	55,00	18,53
Mandíbula	76,5	68	73	80	86	76	91,5	78,71	7,35
Metacarpo	163	155	145	160	160	145	150	154,00	6,89
Altura	645	690	640	675	645	610	665	652,86	24,33
Corpo	952	-----	970	960	970	950	900	950,33	23,82
Cauda	153	165	125	155	115	115	140	138,29	18,80
Metatarso	257	245	235	250	250	230	230	242,43	9,98
Pescoço per	305	270	280	340	310	310	380	313,57	34,30
Tórax	690	680	705	770	705	720	750	717,14	29,98
Abdômen	843	-----	790	890	790	850	780	823,83	40,08

Relacionando os dados obtidos do grupo de indivíduos considerados *Mazama rufa* (holótipo + parátipos) com o grupo externo das análises biométricas, foi possível

realizar uma análise de cluster (Figura 21). Como resultado não foi possível obter um cluster específico para cada uma das espécies e variações citogenéticas (citótipos), demonstrando apenas uma distância significativa de espécies distantes biologicamente, como *M. nana*, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.

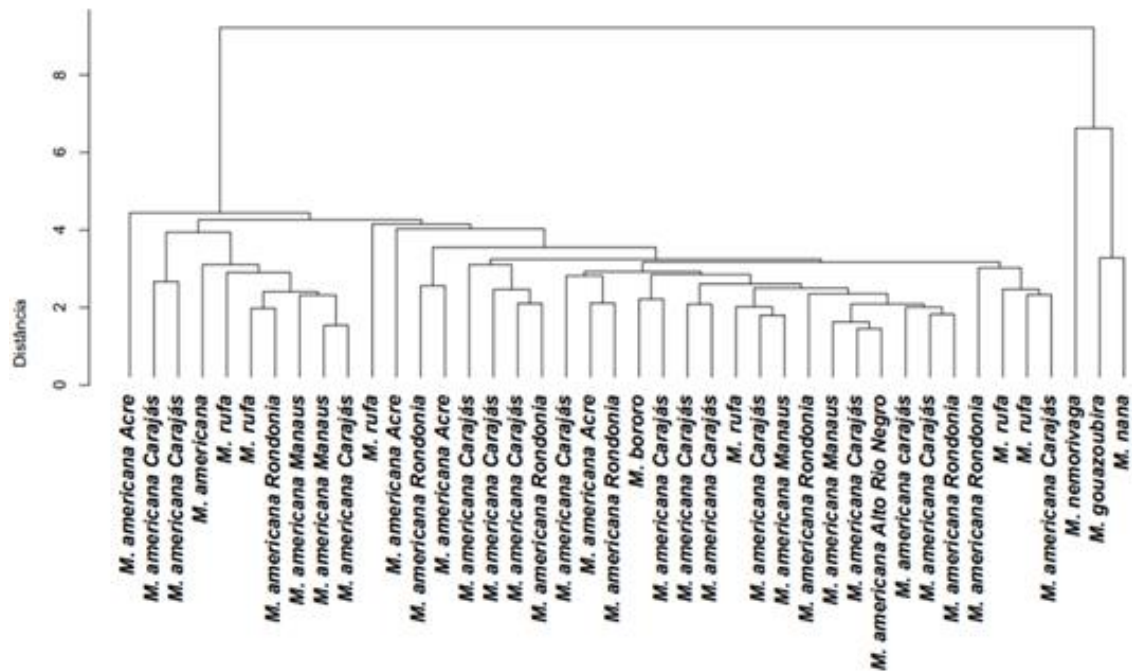


Figura 21. Árvore de distância feita a partir das medidas corporais de indivíduos de *M. americana* provenientes de diferentes citótipos do Brasil, juntamente com o neótipo de *M. americana*, holótipo de *Mazama rufa* e espécies mais distantes biologicamente, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. bororo*

5.1.3 Craniometria

A seguir é apresentado o crânio macerado do holótipo de *Mazama rufa* (Figura 22) e suas medidas cranianas (Tabela 7), medidas nas quais são utilizadas na caracterização do neótipo, definindo assim o padrão craniométrico da espécie, podendo posteriormente realizar um comparativo com demais espécies.



Figura 22. Vista superior, inferior e laterais do crânio macerado de *Mazama rufa*.

Tabela 7. Medidas cranianas do holótipo de *Mazama rufa* em milímetros (mm), onde a medida 1 representa o comprimento total, 2 comprimento côndilo-basal, 3 comprimento basal, 4 comprimento curto do crânio, 5 pré-molar – prosthion, 6 eixo base-cranial, 7 eixo base-facial, 9 comprimento vicero-craniano, 10 comprimento frontal mediano, 11 lambda – nasal, 12 lambda – região mais distal do osso nasal, 13 lambda – prosthion, 14 acrocrânio, 15 maior comprimento dos nasais, 16 comprimento curto facial – lateral, 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 superior (REES, 1969; DRIESCH, 1976).

Medidas	Holótipo	Medidas	Holótipo	Medidas	Holótipo
1	200,63	14	139,78	26	41,55
2	189,37	15	59,19	27	55,6
3	174,46	16	96,88	28	20,54
4	112,72	17	121,87	29	20,03
5	62,39	18	89,66	30	58,98
6	43,28	19	51,33	31	56,6
7	133,43	20	53,2	32	61,82
9	97,64	21	32,17	33	44,22
10	118,45	22	28,73	34	88,9
11	105,15	23	33,58	35	22,94
12	163,18	24	32,55	36	25,47
13	190,53	25	60,91	37	61,02
				38	47,53

Relacionando os dados obtidos do espécime de *Mazama rufa* com o grupo externo das análises craniométricas, foi possível realizar uma análise de cluster (Figura 23). Como resultado não foi possível obter um cluster específico para cada uma das espécies e variações citogenéticas (citótipos) demonstrando apenas uma dissimilaridade parcial de espécies distantes biologicamente, como *M. nana*, *M. gouazoubira* e *M. nemorivaga*.

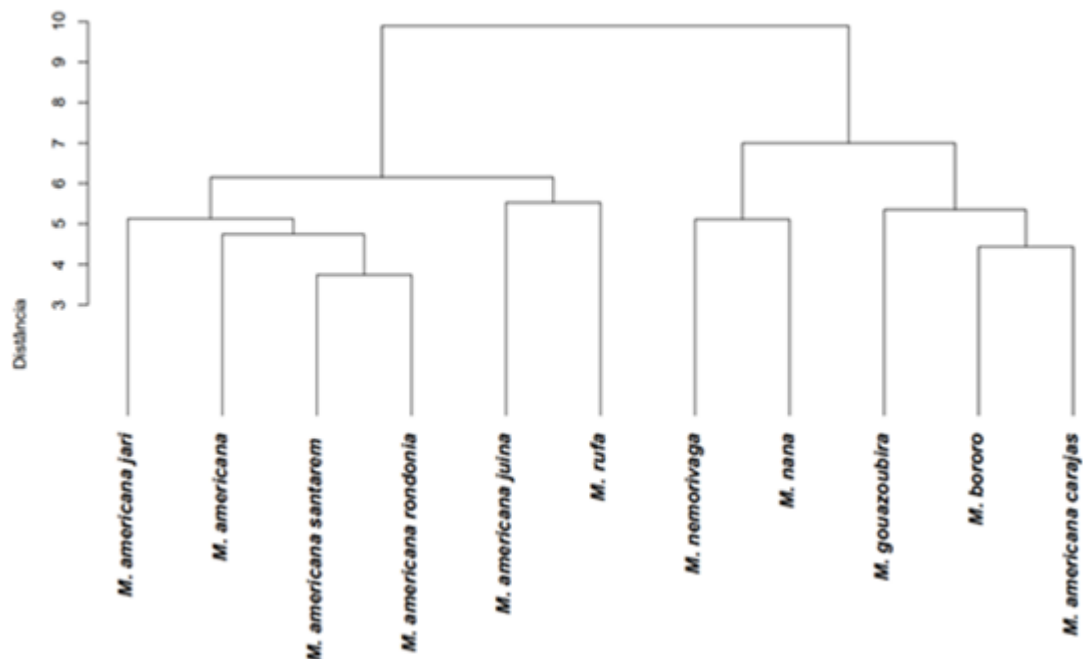


Figura 23. Árvore de distância feita a partir das medidas craniométrica dos indivíduos de *M. americana* provenientes de diferentes citótipos do Brasil, com o neótipo de *M. americana*, holótipo de *Mazama rufa* e espécies mais distantes biologicamente, *M. nana*, *M. gouazoubira*, *M. nemorivaga* e *M. bororo*.

5.2 Citogenética

O cariótipo base do espécime foi obtido por meio da coloração convencional Giemsa. Os cromossomos foram classificados pelo comprimento relativo (CR) sendo o Grupo A composto somente pelo par 1, o grupo D é constituído pelos pares 2, 3 e 4, e dos pares 5 ao par 25 foram agrupados no grupo E. Os cromossomos B apresentaram uma variação de 3 a 6 cromossomos por cariótipo (Figura 24). O

mesmo padrão foi encontrado para os parátipos, sendo que uma banda C positiva no braço longo do cromossomo X coincide com o ponto de fusão em tandem entre este e o autossomo ancestral, homólogo ao Y2. O cromossomo Y1 é o menor do lote, com morfologia metacêntrica, totalmente eucromático.

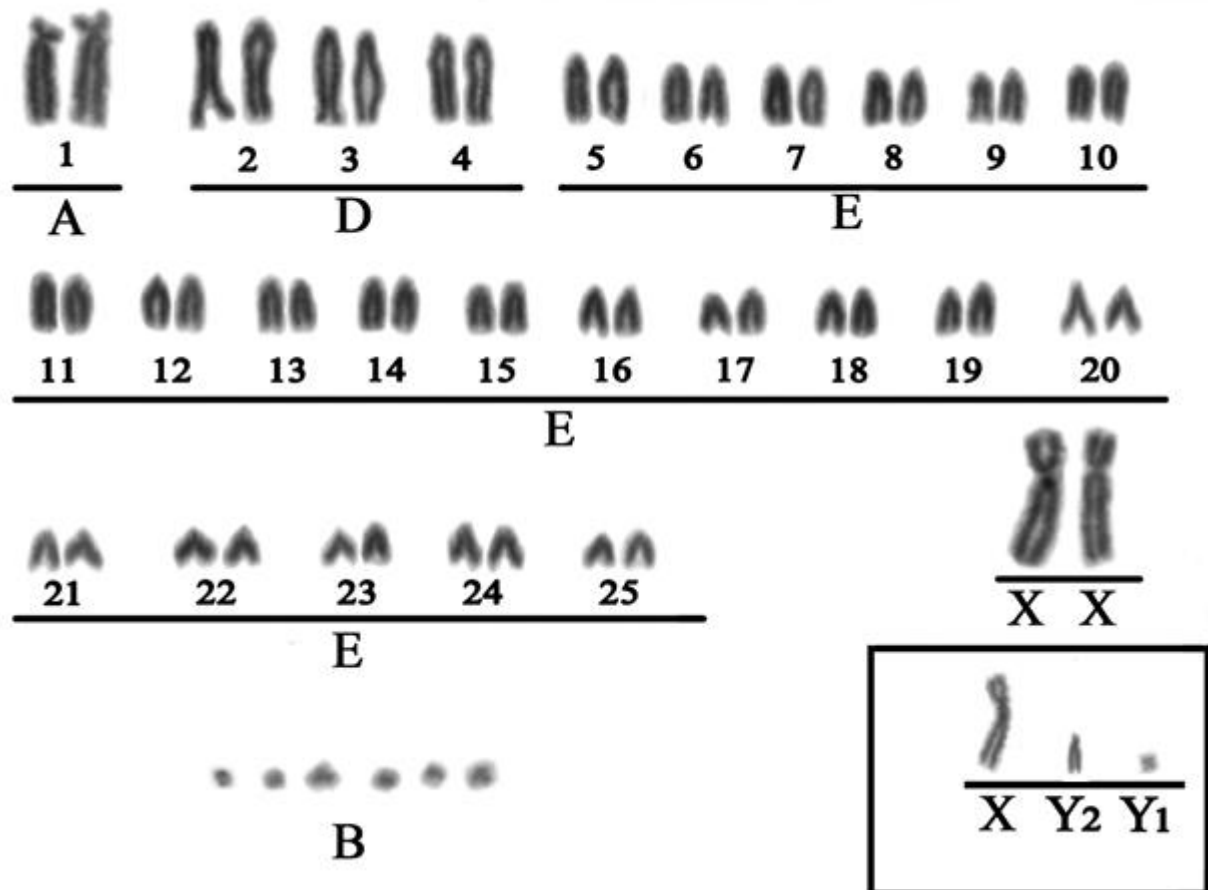


Figura 24. Cariótipo básico pertencente ao holótipo de *Mazama rufa*, apresentando $2n = 52$ NF = $56 + 3-6$ Bs. Em anexo, os cromossomos sexuais X, Y1 e Y2 pertencente ao parátipo T104 para complementar a descrição.

No bandamento C (Figura 25) observou-se blocos de heterocromatina constitutiva na região pericentromérica de todos os cromossomos autossômicos. Além disso, foram visualizadas duas bandas heterocromáticas intersticiais nos braços longos dos pares cromossomos um e três e três bandas nos cromossomos do par dois. O cromossomo X apresentou um grande bloco heterocromático na região intersticial do braço longo. As características apresentadas no bandamento C do holótipo foram comparadas com os resultados produzidos pelos parátipos, confirmando assim o padrão apresentado (Figura 26).

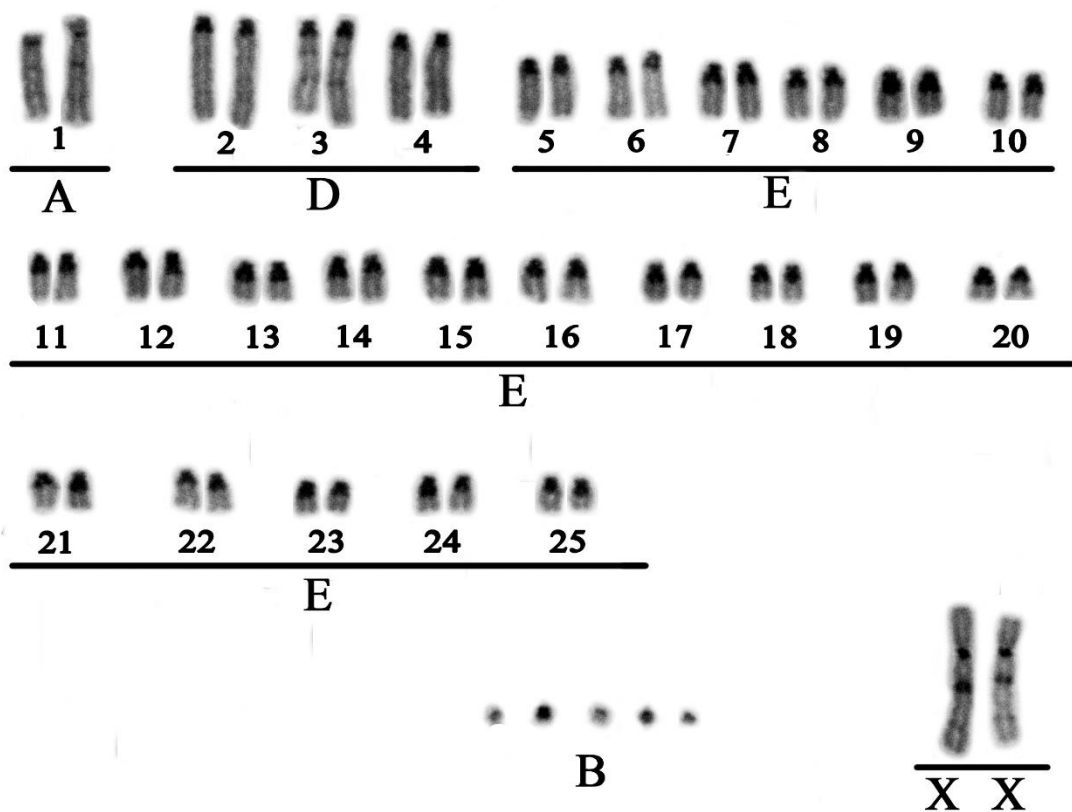


Figura 25. Cariótipo do holótipo de *Mazama rufa* fêmea sob o Bandamento C

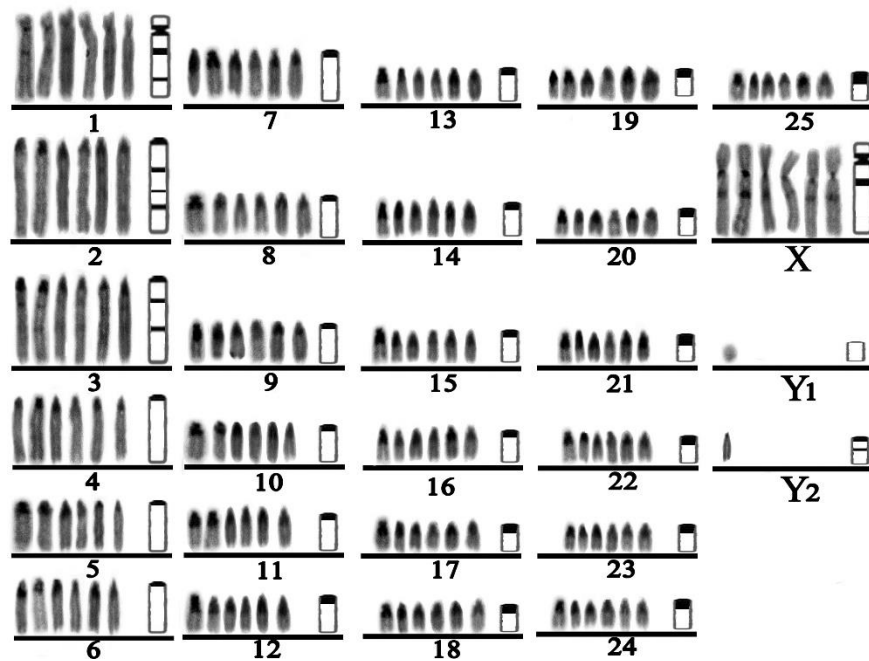


Figura 26. Representação esquemática do padrão de bandas C para *Mazama rufa*, com o holótipo e seus parátipos, sendo o primeiro do holótipo e os seguintes dos parátipos para cada par cromossômico.

Com a coloração Ag-NOR foi possível observar que a região organizadora do nucléolo está localizada na região telomérica de 4 cromossomos, nos pares 5 e 6 (Figura 27).

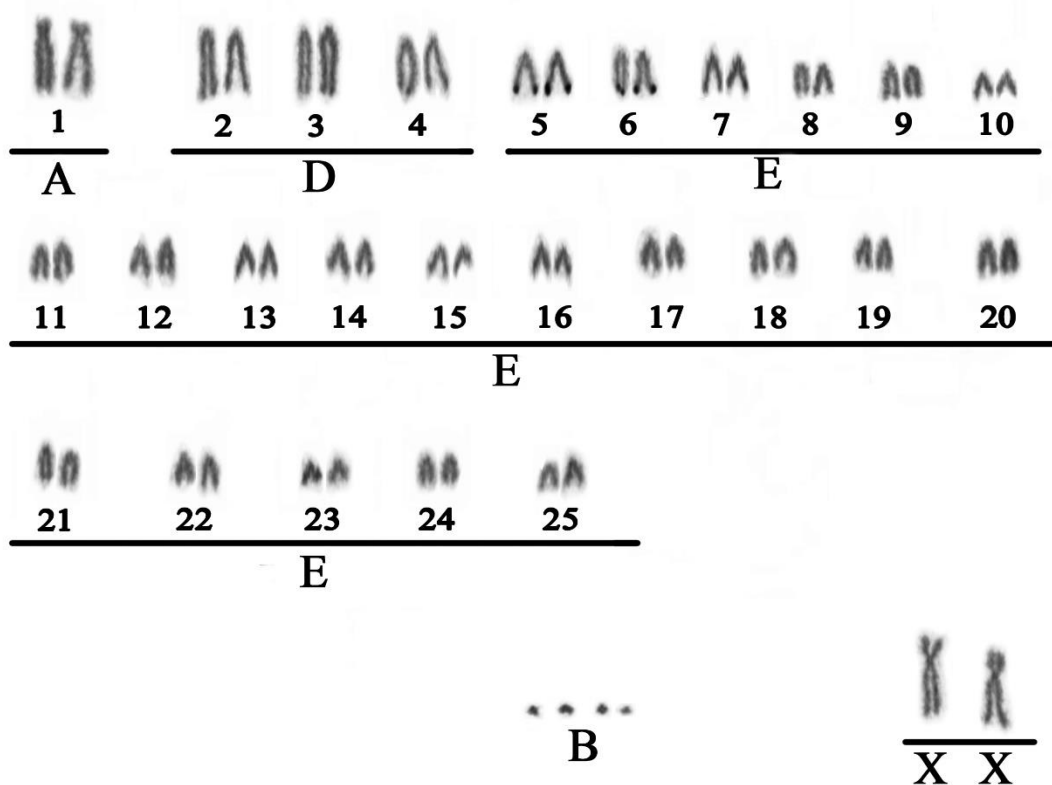


Figura 27. Cariótipo do holótipo de *Mazama rufa* fêmea sob coloração ag-NOR.

Na coloração ag-NOR houve completa similaridade do neótipo com todos os parátipos, comprovando o padrão apresentado na figura 27.

O Bandamento G permitiu o pareamento correto dos cromossomos e a possibilidade de averiguar possíveis translocações e fusões, fatos que não ocorreram no estudo em questão (Figura 28). As características apresentadas no bandamento G do neótipo foram comparadas com os parátipos, confirmando assim o padrão apresentado e definindo assim o idiograma para o bandamento G (figura 29).

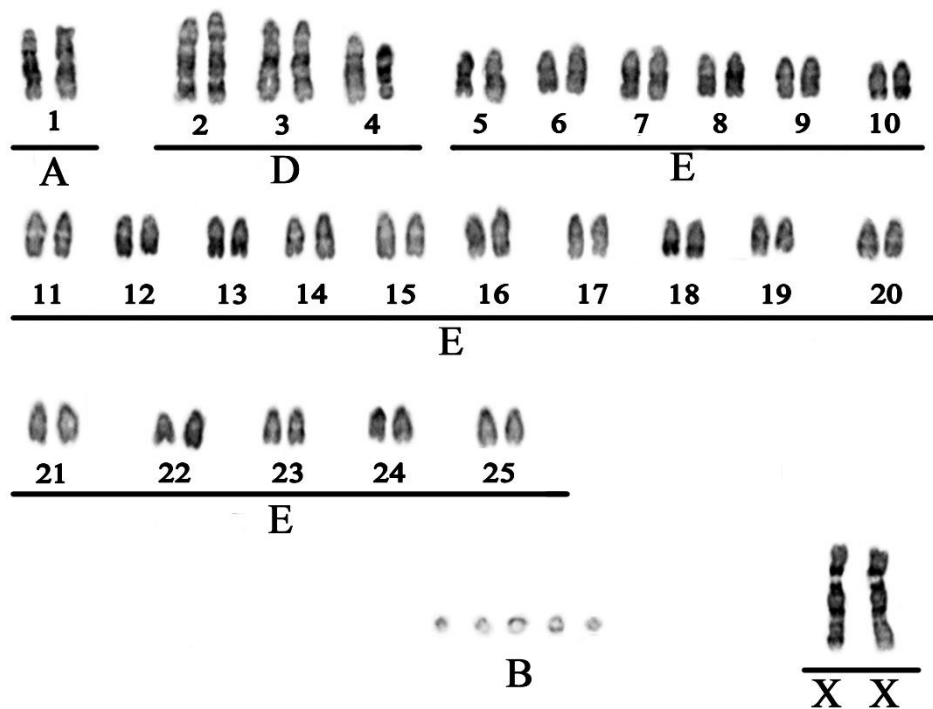


Figura 28. Cariótipo do holótipo de *Mazama rufa* fêmea sob o Bandamento G.

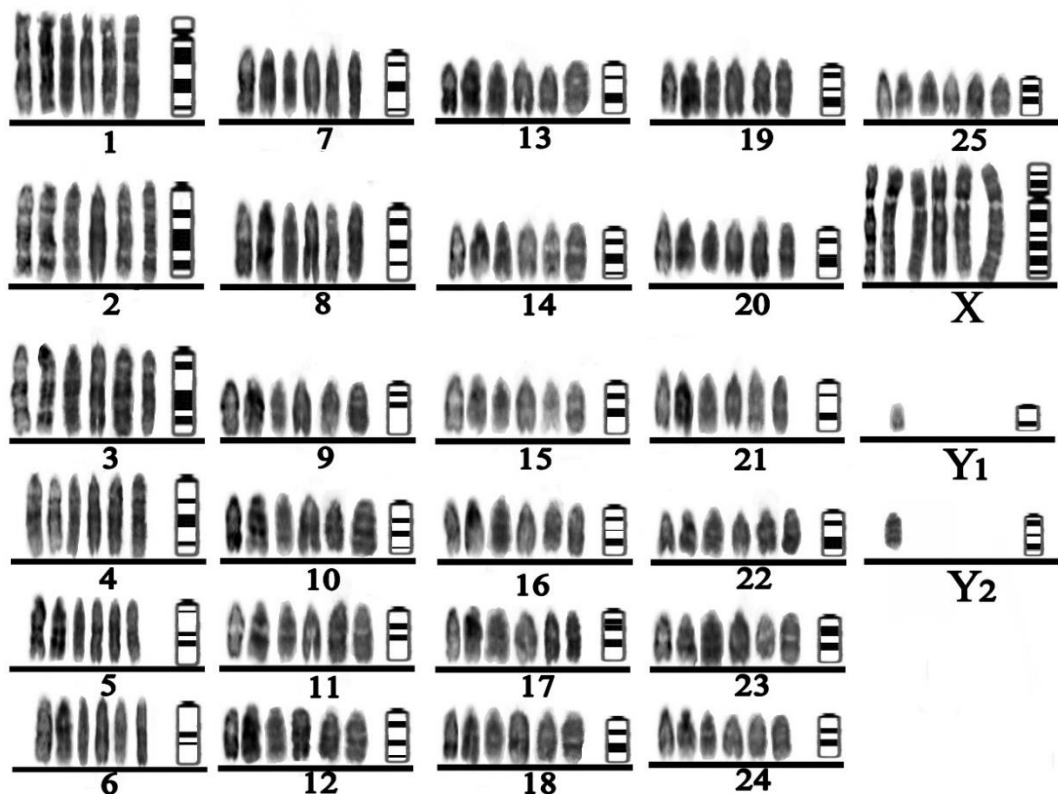


Figura 29. Representação esquemática do padrão de banda G para *Mazama rufa*, com o holótipo e seus parátipos, sendo o primeiro do holótipo e os seguintes dos parátipos para cada par cromossômico.

5.3 Análise do DNA mitocondrial

A amplificação e alinhamento dos quatro genes mitocondriais estudados geraram fragmentos analisáveis de 687 pb para o gene Citocromo Oxidase I (COI), 1178 pb para o gene Citocromo B (CytB), 664 pb para a região controle (D-loop) e 1831 pb para o gene NADH desidrogenase subunidade 5 (ND5). Na matriz de cada gene foi adicionado sempre mais de um indivíduo pertencente a *M. americana* (Citótipo Paraná) e o topotipo de *M. americana*, além de sequências de *M. temama* para os genes CytB e D-Loop, por serem os únicos genes sequenciados disponíveis para o estudo, justamente para comprovar se as diferenças citogenéticas que foram evidenciadas estejam também demonstradas nas análises moleculares. Ainda não foi construída uma árvore produto dos quatro genes concatenados pela falta de sequências de um mesmo indivíduo para os quatro genes. O resultado do melhor modelo evolutivo para cada gene separadamente pode ser observado na Tabela 8.

Tabela 8. Modelos de substituição nucleotídicas para cada matriz de gene pelo Jmodeltest com padrão definido de nst=6.

Gene	Jmodeltest
COI	GTR + I
CytB	TrN + I
D-loop	TrN + G
ND5	TIM3 + G

A árvore filogenética gerada pelo gene COI apresentou um grupo monofilético composto pelo holótipo de *Mazama rufa* e de animais provenientes da mesma região, mas não apresentou um suporte de probabilidade posteriori robusto, tendo apenas 0,49 para o grupo. No caso dos animais que compõe o grupo *M. americana*, coletados na Guiana Francesa, juntamente com o topótipo da espécie, foi observada

probabilidade posterior de 0,88, fato que corrobora com a sua origem monofilética (Figura 30).

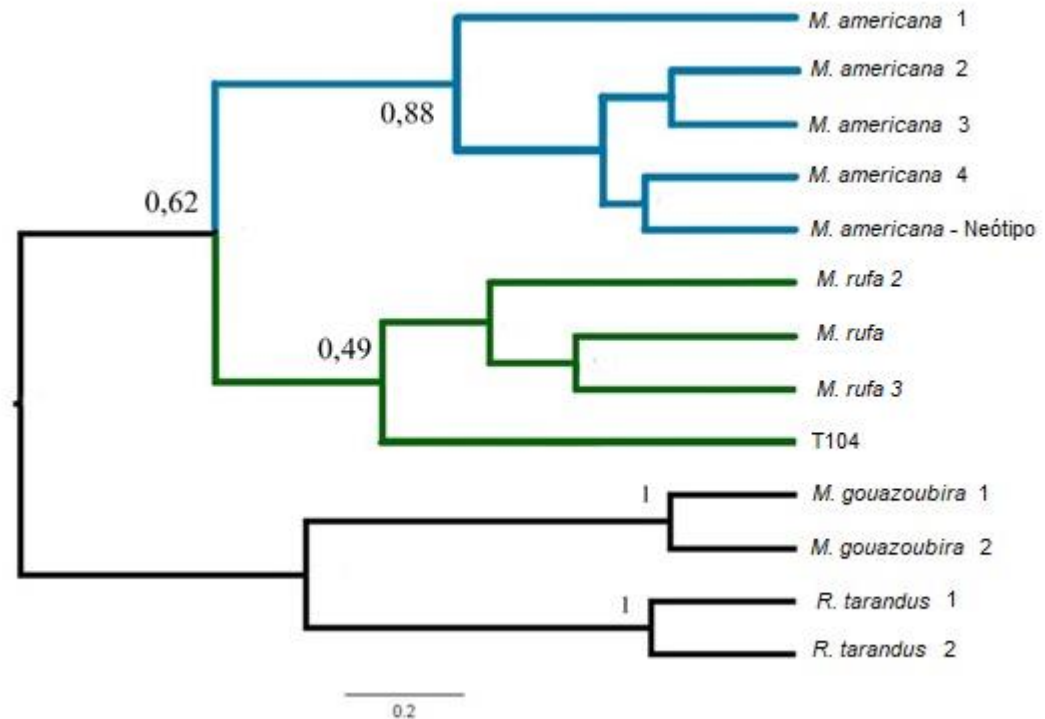


Figura 30. Árvore filogenética referente ao gene COI, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posterior como suporte.

A árvore filogenética gerada pelo gene CytB também apresentou um grupo monofilético composto pelo holótipo de *Mazama rufa* e de animais provenientes do citótipo Paraná, com um suporte de probabilidade posterior maior do que o obtido no gene COI (0,59). Formou-se um grupo monofilético com os *M. americana* coletados na Guiana Francesa, juntamente com o topótipo da espécie, com probabilidade posterior de 1,0. As sequências disponíveis de *M. temama* para o gene também formaram um grupo monofilético distinto de *M. americana* e *M. rufa*, com probabilidade posterior de 1,0 (Figura 31).

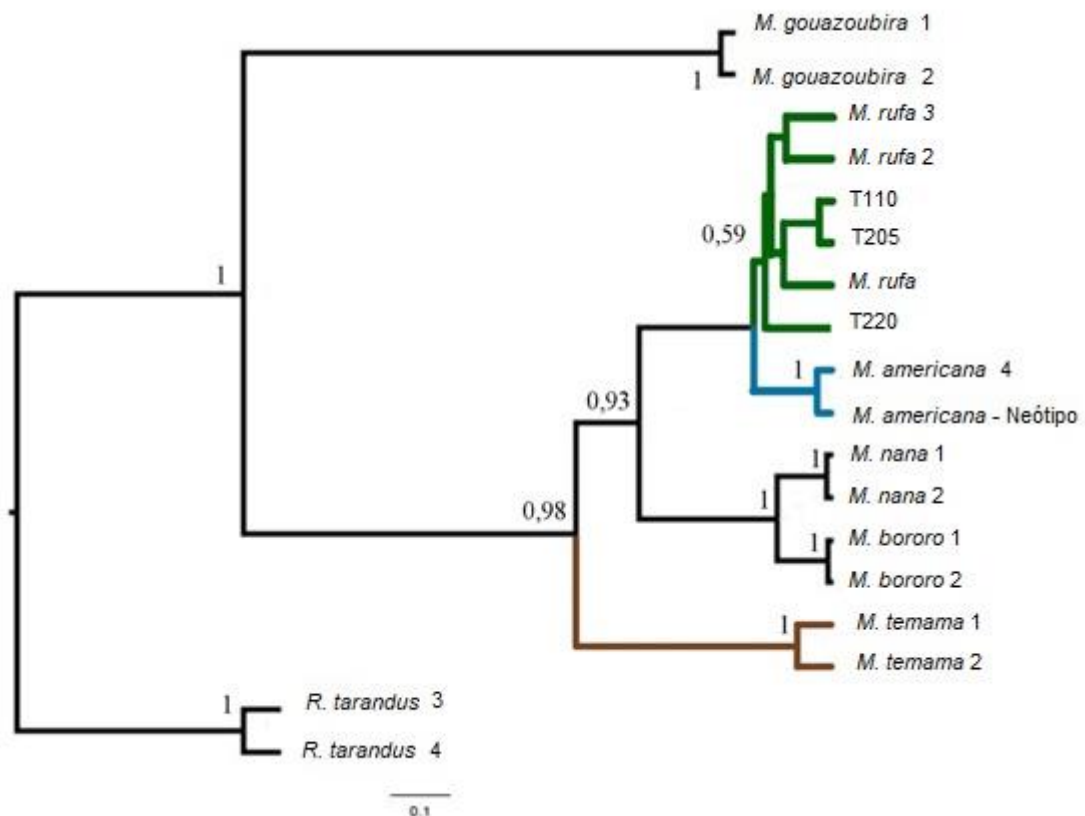


Figura 31. Árvore filogenética referente ao gene CytB, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posterior como suporte.

A árvore filogenética gerada pelos genes D-Loop e ND5 foram as que apresentaram melhores suportes estatísticos para o grupo monofilético composto pelo holótipo de *M. rufa* e de animais provenientes da mesma região geográfica, com um suporte de probabilidade posterior de 1,0. Também apresentou probabilidade posterior de 1,0 o grupo de animais que compõe o grupo monofilético de *M. americana* da Guiana Francesa. A única sequência de *M. temama* acessível para o gene D-Loop mostrou-se distante geneticamente de *M. americana* e *M. rufa* formando um ramo basal isolado na árvore. Em relação ao gene ND5, não conseguimos confirmar o posicionamento de *M. temama* por não existir sequências disponíveis para o gene (Figura 33).

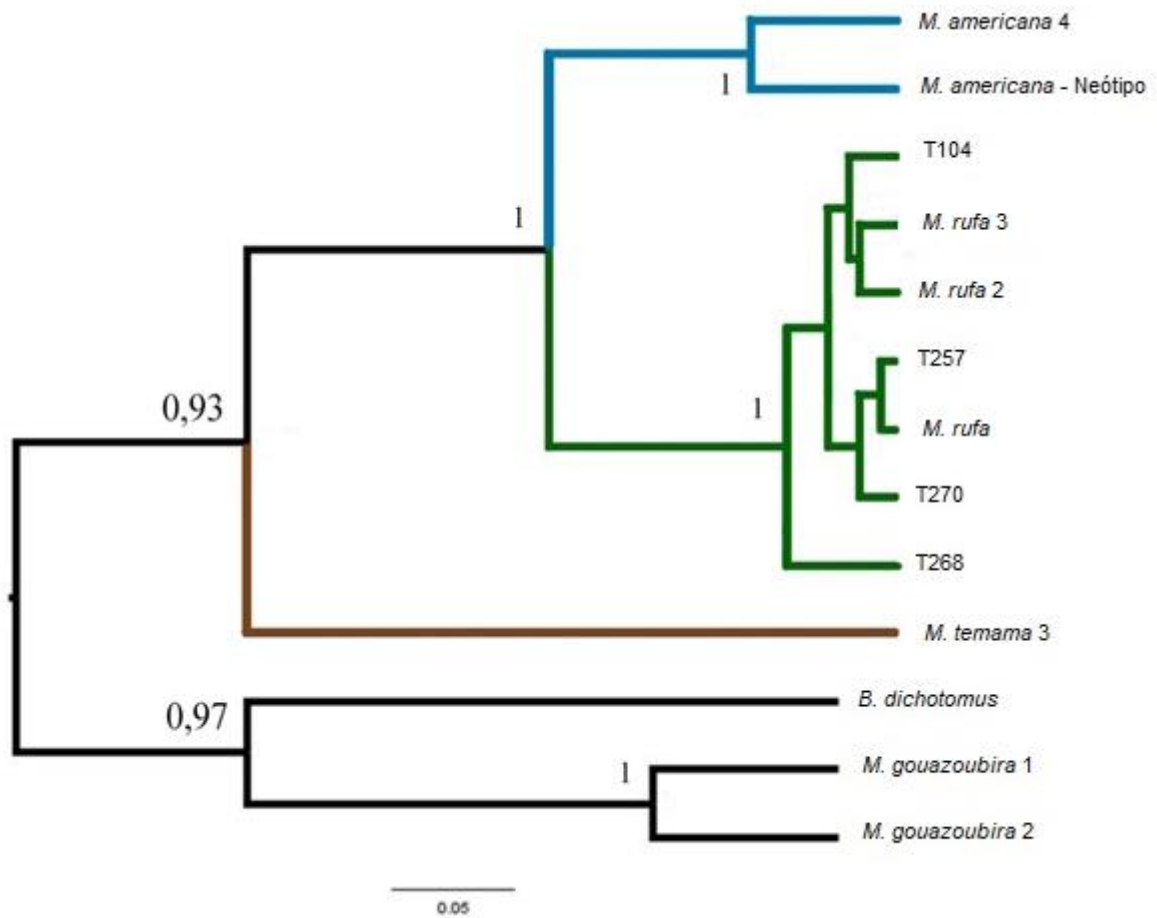


Figura 32. Árvore filogenética referente ao gene D-Loop, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posterior como suporte estatístico.

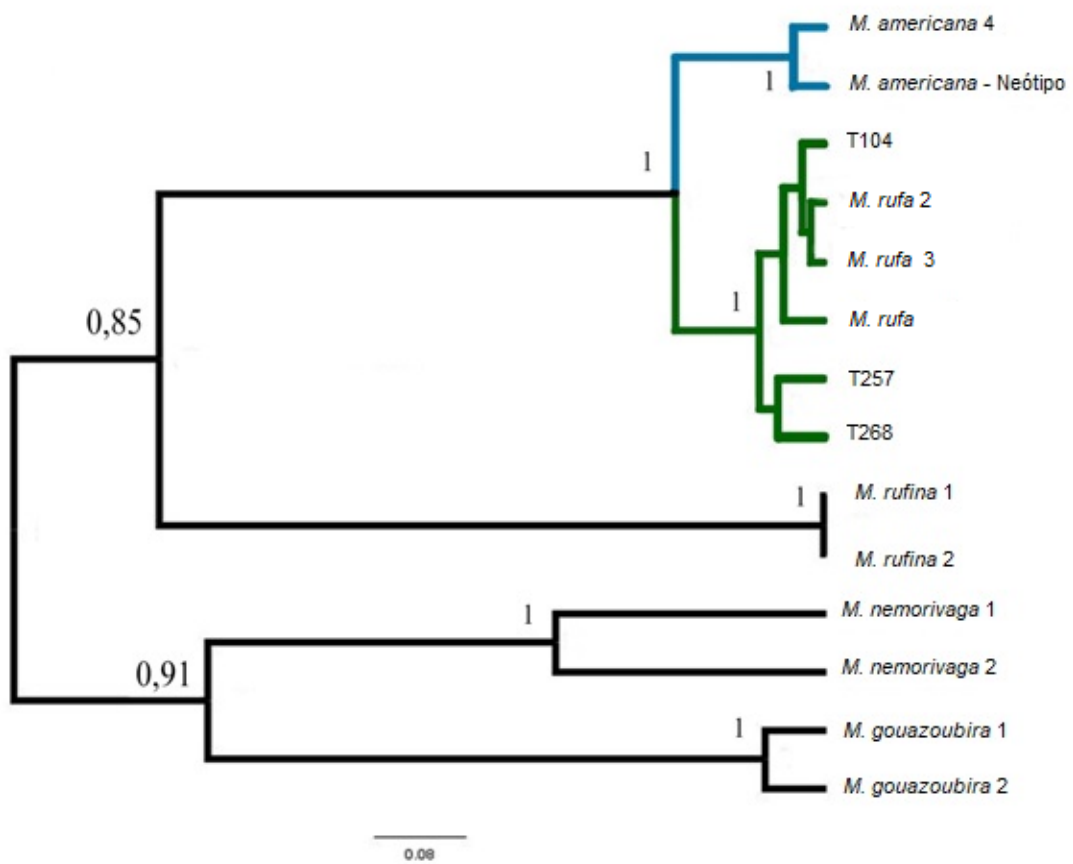


Figura 33. Árvore filogenética referente ao gene ND5, obtida por análise Bayesiana, apresentando probabilidade posteriori como suporte estatístico.

6. DISCUSSÃO

6.1 Descrição do espécime

Mazama americana é considerada uma superespécie formada por um grande número de espécies crípticas (SALVIANO et al., 2017) com diferenças morfológicas imperceptíveis (ROSSI, 2000) mas com alta variabilidade cariotípica (ABRIL et al., 2010). A ausência de diferenças morfológicas significativas entre as espécies que compõe esta superespécie deve-se a recente especiação dentro do complexo *Mazama americana* (DUARTE et al., 2008).

Na descrição morfológica, com base no padrão de cores e regiões cromogenéticas, o espécime analisado apresentou algumas características semelhantes com as descritas por Rossi (2000): tufo de pelos na região tarsal; faixa de pelos antevértidos na linha mediana dorsal do pescoço; mancha superciliar; mancha nasal e mentoniana presentes.

O espécime analisado apresenta características que não foram observadas pelo mesmo autor, como faixas orbitais, faixa rostral larga e distinta além da região distal externa dos membros posteriores e anteriores bem definidas. A descrição morfológica de Rincón (2016), apresentou as mesmas características descritas por Rossi (2000). Vale ressaltar que essas distinções podem ser características individuais do espécime e não características de *Mazama rufa*, sendo necessária uma análise populacional.

No que tange a alguns dados biométricos de *M. americana*, Rossi (2000) encontrou altura de 650 mm para *M. americana*, similar ao neótipo analisado e seus parátipos ($652,86 \pm 24,33$; $n=7$); a massa apresentada por Duarte (1996) foi de 30kg, com uma variação de 20 a 45kg, dentro da faixa encontrada no presente estudo ($36,56 \pm 3,23$; $n=7$). O comprimento de orelha apresentado por Rossi (2000) foi de 105 a 110 mm, resultado compatível com o encontrado em *Mazama rufa* ($104,43 \pm 7,13$; $n=7$).

Na craniometria, analisando os resultados obtidos por distância (cluster), podemos constatar que estas medidas apresentadas não proporcionam um agrupamento para diferenciação entre variáveis cromossômicas dentro de *M. americana*. Entretanto as medidas craniométricas apresentaram uma dissimilaridade maior entre a superespécie *M. americana* e espécies distintas biologicamente, como *M. gouazoubira*, *M. nana* e *M. nemorivaga*.

As análises morfológicas, como já citado em trabalhos anteriores (ROSSI, 2000), não mostraram ser um fator discriminatório entre as diferentes variantes de *M. americana*. Entretanto, isso pode ter sido provocado pela amostragem pequena, que influencia na análise.

6.2 Citogenética

O padrão cariotípico de *M. americana* apresentado por Abril et al., (2010) demonstra uma amplitude no número diploide ($2n$) de onze cromossomos, sendo a espécie do gênero *Mazama* com maior variação intraespecífica de seu cariótipo. Diferenças bem menores que esta separam espécies bem distintas como *M. gouazoubira* ($2n=70+0-3B$; $FN=70$) e *M. nemorivaga* ($2n=67-70+2-8B$; $FN=69-72$). Assim, torna-se muito provável a existência de mais de uma espécie no que se define como *M. americana* (DUARTE et al, 2008; GUTTIERREZ et al., 2017). A origem desta amplitude cariotípica pode ser explicada pela fragilidade cromossômica presente no grupo (VARGAS-MUNAR et al., 2010; TOMAZELLA et al., 2017).

O padrão cariotípico mostrado pelo holótipo de *M. rufa* foi de $2n=52$ e $NF=56+4-6Bs$, mesmo padrão encontrado para *M. americana* citótipo Paraná, diferente do apresentado por Rincón (2016) para o neótipo de *M. americana* ($2n=45$ $NF=50+3Bs$) (JORGE; BENIRSCHKE, 1977). Sendo esses dois ainda diferentes do padrão cariotípico de *M. temama* ($2n=50$ e $NF=70$).

Essa diferença do número diplóide, certamente proporciona uma barreira pós-zigótica entre *M. americana* e *M. rufa* e entre *M. rufa* 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.

Houve correspondência dos padrões de bandamentos C, G e coloração ag-RON do holótipo com seus parátipos, demonstrando a estabilidade do padrão de banda dentro de *M. rufa*.

A variação cromossômica do holótipo de *M. rufa* com o topótipo de *Mazama americana* pode ser explicada por fusões em tandem e fusões cêntricas que ocorreram entre eles (RINCÓN, 2016). *Mazama rufa*, por apresentar o maior número diplóide, é considerado o padrão cariotípico mais próximo do ancestral hipotético de *M. americana* ($2n=52/53$; $NF=54$) havendo apenas uma inversão pericêntrica discriminante entre eles (ABRIL et al., 2010). Assim sendo, a citogenética é determinante para a taxonomia do gênero *Mazama* e eleva *Mazama rufa* ao nível de espécie.

6.3 Análise filogenética

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

Foram analisados quatro genes mitocondriais com o objetivo de entender o processo evolutivo que ocorreu com *M. rufa* (COI, Citocromo-B, D-loop e ND5). As topologias apresentadas por esses quatro genes foram semelhantes, apesar de não terem sido analisados os mesmos indivíduos para todas as sequências.

A topologia apresentada para o gene COI mostrou que o neótipo de *M. americana* e outros indivíduos provenientes da Guiana Francesa se agruparam em um clado monofilético. Em relação ao holótipo de *M. rufa*, seus parátipos e animais geograficamente próximos, formaram um outro grupo monofilético (Figura 30).

Para o Citocromo-B apresentaram-se cinco clados monofiléticos distintos para *Mazama*, representados por *M. americana*, *M. rufa*, *M. bororo*, *M. nana* e *M. temama* (Figura 31). Estas seriam, portanto, cinco espécies distintas sustentadas por alto suporte estatístico.

As árvores filogenéticas apresentadas pelos genes D-Loop e ND5 apresentaram topologias semelhantes, separando claramente *M. rufa*, com seus parátipos de *M. americana* e *M. temama* com alto suporte estatístico (probabilidade posterior 1 para a maioria dos nós, Figuras 32 e 33). Estes genes também comprovam a diferença destes três táxons em nível específico, corroborando a validade de *Mazama rufa*.

Portanto, como as quatro topologias apresentadas são semelhantes, apenas com diferença no suporte estatístico para cada clado, podemos assumir a consistência deste resultado. Perante o exposto, em todas as análises *M. rufa* e seus parátipos ficaram no mesmo clado monofilético. Portanto, reconhece-se claramente a validade da espécie *Mazama rufa*, corroborando os resultados apresentados pelas análises citogenéticas.

7. CONCLUSÕES

As análises morfológicas de craniometria e biometria se mostraram incapazes de separar *M. rufa* de *M. americana* e dos outros citótipos presentes no território brasileiro, estando as medidas do neótipo dentro da variação descrita para o complexo *M. americana*.

Citogeneticamente, *M. rufa* apresentou o mesmo padrão citogenético do citótipo Paraná, e um padrão citogenético diferente do apresentado por *M. americana* e *M. temama*.

Os resultados filogenéticos, principalmente dos genes D-loop e ND5, demonstram claramente a distância filogenética entre *M. rufa* e as descrições anteriores, de *M. americana* e *M. temama*.

Este estudo deixa claro que *Cervus rufus*, classificado como subespécie e posteriormente como sinonímia de *M. americana* deve ser elevado ao nível de espécie, sob o nome de *Mazama rufa*, tornando válida a descrição de Illiger (1811).

É proposto um holótipo para a espécie *Mazama rufa*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRIL, V.V.; CARNELOSSI, E.A.G.; GONZÁLEZ, S.; DUARTE, J.M.B. Elucidating the Evolution of the Red Brocket Deer *Mazama americana* Complex (Artiodactyla; Cervidae). **Cytogenetic and 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.

AVISE, J.C.; BALL, R.M.JR. Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. **Oxford Surveys in Evolutionary Biology** v.7, p.45-67, 1990.

AZARA, F.; Apuntamientos para la historia natural de los quadrúpedos del paraguay y rio de laplata, **en la imprenta de la viuda de ibarra**. TomoPrimeiro, 1802.

BELLO-GUTIÉRREZ, J.; REYNA-HURTADO, R.; JORGE, W. Central American Red Brocket Deer *Mazama temama* (Kerr 1792). In: Duarte, J.N.B>; González, S. (eds): **Neotropical Cervidology Biology and Medicine of Latin American Deer**, 2010, Jaboticabal, Brazil: Funep and Gland, Switzerland, IUCN. 393p.

BOUCKAERT, R., HELED, J., KÜHNERT, D., VAUGHAN, T., WU, C-H., XIE, D., SUCHARD, M. A.; RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, 10(4), e1003537. doi:10.1371/journal.pcbi.1003537. 2014.

BRANAN, W.V.; MARCHINTON, R.L. Reproductive ecology of white-tailed and red brocked deer in Suriname. In: **Biology and management of the Cervidae (C. Weemer, ed.)**. Smithsonian Inst. Press, Washington, DC, United Stated, p.344-351, 1987.

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

CARRANZA, J.; ROLDÁN, M.; DUARTE, J. M. B. Lack of mate selectivity for genetic compatibility within the red brocket deer *Mazama americana* complex, **Mammalian Biology**, Volume 88, Pages 168-175, ISSN 1616-5047. <https://doi.org/10.1016/j.mambio.2017.09.006>. 2017.

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.

CHANDRA, H. S.; HUGENFORD, D. A.; WAGNER, J. Chromosomes of five artiodactyls mammals. **Chromosoma**, Berlin, v.2, p. 211-220, 1967.

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

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, 40p, 2014.

CZERNAY, Siegfried. Spiesshirsche und Pudus. **Ziemsen**, 1987.

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

DUARTE, J. M.B. *Aspectos taxonômicos e citogenéticos de algumas espécies de cervídeos brasileiros*. Dissertação de mestrado, Universidade estadual paulista “Júlio de Mesquita filho”, 1992.

DUARTE, J.M.B. Guia de Identificação de Cervídeos Brasileiros. Jaboticabal: **Funep**, 14p, 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. & JORGE, W. Análise citotaxonômica dos *Mazama* cinzas do Brasil (*Mazama gouazoubira* e *Mazama rondoni*). In: Duarte, J.M.B. (Org.). Análise citogenética e taxonômica do gênero *Mazama* (Cervidae; Artiodactyla) no Brasil. Tese (Doutorado em Genética). Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. p.45, 1998.

DUARTE, J.M.B.; RAMALHO, M.F.P. Di T.; LIMA, V.F.H; JORGE, W.; A leukocyte cryopreservation technique for cytogenetic studies. **Genet. Mol. Biol.** 1999, vol.22, n.3, pp. 399-400. ISSN 1678-4685 17.

DUARTE, J. M. B.; MERINO, M.L.; GONZÁLES, S.; NUNES, A.L.V.; GARCIA, J.M.; SZABO, M.P.J.; PANDOLFI, J.R.; ARANTES, I.G.; NASCIMENTO, A.A.; MACHADO, R.Z.; ARAÚJO, JR. J.P.; CATÃO-DIAS, J.L.; MATUSHIMA. Order Artiodactyla, Family Cervidae (deer). In: Fowler, M.E. & Cubas, Z.S. **Biology, Medicine, and Surgery of South American Wild Animals**. Iowa State University Press, Ames, p.402-422, 2001.

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.; GONZALEZ, S.; MALDONADO, J.E.The Surprising Evolutionary History of South American Deer. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Orlando, v.49, p.17-22, 2008.

EISEMBERG, J.F.; REDFORD, K.M. Mammals of the Neotropics: The Central Neotropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil. **The University of Chicago Press**, v.3, 609p, 1999.

EMMONS, L.H.; FEER, F. Neotropical rainforest mammals: A field guide. **The University of Chicago Press**, 281p, 1997.

ERXLEBEN, J. C. P. Systema regni animalis per classes, ordines, genera, species, varietates cum synonymia et historia Animalium. Classis I. Mammalia. **Imprensus Weigandianis**, Lipsiae. 1777.

FOLMER, O.; BLACK, M.; HOEH.W.; LUTZ, R.; VRIJENHOEK, R. DNA primers for amplification of mitochondrial cytochrome c oxidase subunit I from diverse metazoan invertebrates. **Molecular Marine Biology and Biotechnology**, v3, p.294–299, 1994.

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

GROVES, C. P.; GRUBB, P. Relationships of living deer, C. M. Wemmer (Ed), Biology and Management of the Cervidae, **Smithsonian institution Press**, Washington (1987), pp. 21-59.

GRUBB, P. Order Artiodactyla. In: Mammal species of the World. A taxonomic and Geographic reference (D.E. Wilson and D.M. Reeder, eds) **The Jonhs Hopkins University Press**, Baltimore, Maryland. USA, v.2, p.637-722, 2005.

GUSTAVSSON, I.; SUNDT, C.O. Three polymorphic chromosome systems of centric fusion type in a population of Manchurian sika deer (*Cervus nippon hortulorum* Swinhoe). **Chromosoma**, v. 28, n. 2, p. 245-254, 1969.

GUTIÉRREZ, E.E.; HELGEN, K.M.; MCDONOUGH, M.M.; BAUER, F.; HAWKINS, M.T.R.; ESCOBEDO-MORALES, 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. <https://doi.org/10.3897/zookeys.697.15124>, 2017.

HALL, T.A.B ioedit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for windows 95/98/NT. Version 6.0.7, 1999.

HASSANIN A.; PASQUET, E.; VIGNE J.D. Molecular Systematics of the Subfamily Caprinae (Artiodactyla, Bovidae) as Determined from Cytochrome *b* Sequences. **Journal of Mammalian Evolution**, Volume 5, Issue 3, pp 217-236, 1998.

HASSANIN, A.; ROPIQUET, A. Molecular phylogeny of the tribe Bovini (*Bovinae*, *Bovini*) and the taxonomic status of the kouprey, Bossauveli Urbain, 1937. **Mol. Phylogenet**, v.36, p.154-168, 2004.

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.; BENIRSCHKE, K. Centromeric heterochromatin and G-banding of the red brocket deer *Mazama americana temana* (Cervidae; Artiodactyla) with probable non- Robertsonian translocation. **Cytologia**, v.42, p.711-721, 1977.

JULIÁ, J.P.; RICHARD, E. La corzuela colorada. Pp: 27 – 34. In: **Dellafiori, C. y N. Maceira (Eds.) LOS CIERVOS AUTÓCTONOS DE LA ARGENTINA Y LA ACCIÓN DEL HOMBRE**. Secretaría de Desarrollo Sustentable y Política Ambiental. Ministerio de Desarrollo Social y Medio Ambiente. Buenos Aires, Argentina. 95 pp.ISBN 987-97830-6-9. 2001.

KERR, R.The animal Kingdom, or zoological system of the celebrate Sir Charles Linnaeus. Class I. Mammalia and class II. Birds. Being a translation of that part of the Systema Naturae, as lately published with great improvements by Professor Gmelin, together with numerous additions from more recent zoological writers and illustrated with copperplates, p. 241. **J. Murray**, London, England. 1792.

LEVAN, A.; FREDGA, K; SANDBERG, A; A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes. **Hereditas**, v. 52, n. 2, p. 201-220, 1964.

LIU K.; RAGHAVAN S.; NELESEN S.; LINDER C. R.; WARNOW T. Rapid and Accurate large-scale coestimation of sequence alignments and phylogenetic trees, **Science**, 19 jun 2009 : 1561-1564.

MARAN, L. H. M. **Filogenia molecular de Mazama americana (ARTIODACTYLA: CERVIDAE) como auxilio na resolução das incertezas taxonômicas**. 2016. 55 f. Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

NEITZEL, H. Chromosome evolution of Cervidae: karyotypic and molecular aspects. **Cytogenetics**, p. 90-112, 1987.

OLIVEIRA, M. L.; PERES, P. H. F.; VOGLIOTTI, A.; GROTTA-NETO, F.; DE AZEVEDO, A. D. K.; CERVEIRA, J. F.; DO NASCIMENTO, G. B.; PERUZZI, N. J.; CARRANZA, J.; DUARTE, J. M. B.; Phylogenetic signal in the circadian rhythm of morphologically convergent species of Neotropical deer. **Mammalian Biology (Print)**, v. 81, p. 281-289, 2016.

PEREIRA, M. R. M. "Las cosas singulares de piedras, animales, plantas": la formación y el funcionamiento de la red imperial española de remesas científicas em el Virreinato del Río de la Plata. **An. mus. paul.**, São Paulo , v. 21, n. 1, p. 91- 138, 2013.

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.

REID, F.A. A field guide to the mammals of central America and Southeast México. **Oxford University Press**, 335p, 1997.

RINCÓN, A. C. **Caracterização morfológica, citogenética e molecular de *Mazama americana* (artiodactyla: cervidae) a partir de um topótipo atual**. 2016. 118f.Dissertação (Mestrado em genética e melhoramento animal) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Jaboticabal, 2016.

ROPIQUET, A.; HASSANIN, A. Molecular evidence for the polyphyly of the genus *Hemitragus* (Mammalia, Bovidae). **Mol. Phylogenet. Evol**, v.36 p.154–168, 2005.

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

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**, Volume 96, Issue 6, 1 June 2017, Pages 1279-1287, <https://doi.org/10.1093/biolre/iox041>

SAMBROOK J.; FRITSCH, E.; MANIATS, T. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. **Cold Spring Harbor Press**, New York, v.2, p.18-47, 1989.

TAYLOR, K.M.; HUNGERFORD, D.A.; SNYDER, R.L. Artiodactyla Mammals: their Chromosome Cytology in Relation to Patters of Evolution. In: **Benirschke, K. Comparative Mammalian Evolution**. Berlin: Springer Verlag, p.346-356, 1969.

TEMPLETON, A.R. The meaning of species and speciation: A genetic perspective. In: Otte, D. and Endler, J.A. Speciation and its Consequences, **Sinauer Associates**, Sunderland, M.A, p.3-27, 1989.

TEMPLETON, A.R. Using phylogeographic analyses of gene trees to test species status and processes. **Molecular Ecology**, v.10, p.9-779, 2001.

THOMAS, O; On certain of the smaller South American Cervidae. **Annals and Magazine of Natural History**, London, v.11, p.585-589, 1913.

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

VARGAS-MUNAR, D.S.F.; SARRIA- PEREA, J.A.; DUARTE, J.M.B.; Different responses to doxorubicin-induced chromosome aberrations in Brazilian deer species. **Genet Mol Res** 9:1545- 1549, 2010.

VILÀ, C.; AMORIM I. R.; LEONARD, J. A.; POSADA, D.; CASTROVIEJO, J.; PETRUCCI-FONSECA, F.; CRANDALL, K. A.; ELLEGREN, H.; WAYNE, R. K. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. **Molecular Ecology**, Oxford, v. 8, n. 12, p. 2089-2103, 1999.

VOGLIOTTI, A.; **História natural de *Mazama bororo* (Artiodactyla; Cervidae) através de etnozootologia, monitoramento fotográfico e rádio-telemetria**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ecologia de Agroecossistemas) - Ecologia de Agroecossistemas, University of São Paulo, Piracicaba. doi:10.11606/D.91.2004.tde-29072004-161012.

WEBB, S.D. Evolutionary history of new world deer. In: Antilopes, deer and relatives. Fossil record, behavioral ecology, systematics, and conservation. **Eds Vrba and Shaller. Yale University Press**, New haven and London, p.38-64, 2000.

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