

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO DE UMA ZONA HÍBRIDA ENTRE DOIS FELÍDEOS  
NEOTROPICAIS UTILIZANDO MÚLTIPLOS LOCOS NUCLEARES**

**Alexsandra Schneider**  
**Orientador: Dr. Eduardo Eizirik**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**  
**PORTO ALEGRE – RS – BRASIL**

**2009**

*"A compaixão para com os animais é das mais nobres virtudes da natureza humana."*

*Charles Darwin*



**Dedico com todo o carinho aos meus pais**

## AGRADECIMENTOS

Muitas pessoas contribuíram para a realização deste trabalho. Agradeço a todas, mas especialmente

Ao meu orientador Eduardo Eizirik, pela oportunidade e confiança depositada em meu trabalho, pelo acompanhamento, estímulo e pelo grande aprendizado, além da compreensão, apoio e amizade.

À Tatiane C. Trigo, co-orientadora e amiga, por toda paciência, pelos ensinamentos e acompanhamento durante várias etapas do trabalho, me auxiliando a entender essa área tão complicada que é a hibridação, contribuindo imensamente para a realização deste projeto.

A todos os meus colegas do Genoma, em especial, Taiana, Manoel, Fê Pedone, Cristine, Mirian, Ana Lúcia, Flávia, Marcelo, Talita, Anelise, Lucas, Ricardo e Thomaz pelo companheirismo e por tornarem o laboratório um ambiente tão agradável e descontraído para trabalhar. Obrigada pela atenção e ajuda prestada sempre que necessário e, acima de tudo, pela amizade.

À Cladi, pela sua paciência e disponibilidade em sempre ajudar qualquer que fosse a dúvida, facilitando nosso trabalho.

Ao Manoel, amigo e colega, pela paciência ao me ensinar as regras básicas de funcionamento do Genoma e pela ajuda sempre que solicitado.

Ao Ricardo, Nelson e Alice pela atenção e ajuda ao solucionar os problemas no uso do PHASE e de outros programas computacionais.

A todos os colaboradores e instituições que contribuíram com o projeto através do envio de amostras.

Aos meus pais Anor e Gladis, a base do que sou hoje. Obrigada por todo amor, dedicação e confiança prestados durante toda minha vida e por darem oportunidades para que eu pudesse crescer como pessoa e como profissional. Ao meu irmão Cassius, pelo carinho e acolhimento em Porto Alegre, pela atenção, compreensão e ajuda na resolução de problemas do dia a dia e à Lisiane, sempre muito prestativa me dando força com palavras de carinho e incentivo.

À CAPES pela bolsa de estudo concedida no último ano de mestrado.

E, finalmente, aos felinos selvagens, seres tão fofos e fascinantes que despertaram meu interesse e minha vontade de contribuir de alguma forma para a sua preservação.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VI
ABSTRACT .....	VII
APRESENTAÇÃO .....	VIII
ARTIGO: Análise evolutiva de uma zona híbrida utilizando sequências de genes nucleares... 1	
Resumo.....	2
Introdução.....	3
Material e Métodos.....	6
Resultados .....	11
Discussão.....	22
Conclusão .....	25
Tabelas .....	28
Legenda das Figuras .....	48
Figuras .....	49
Referências Bibliográficas .....	54
Apêndice.....	59

## RESUMO

A hibridação natural entre espécies selvagens é atualmente reconhecida como um processo bastante comum, que pode apresentar relevância significativa na trajetória evolutiva das espécies envolvidas. Este processo pode consistir de eventos esporádicos entre espécies simpátricas, ou da formação de zonas híbridas estreitas entre táxons com distribuição parapátrica, ou até mesmo de um intenso processo de miscigenação entre as populações parentais. *Leopardus tigrinus* e *L. geoffroyi* são duas espécies de pequenos felinos proximamente relacionados, com distribuições basicamente alopátricas na Região Neotropical. No Estado do Rio Grande do Sul (RS), as duas espécies apresentam uma zona de contato geográfico onde foi verificada a existência de um complexo e extenso padrão de hibridação. Este estudo tem como objetivo caracterizar novos marcadores nucleares a serem utilizados na investigação genética desta zona híbrida a fim de quantificar o processo de hibridação e ampliar os conhecimentos existentes sobre a magnitude e direcionalidade deste fenômeno. Para a realização deste trabalho foram utilizadas sequências de cinco locos localizados no cromossomo X e dois locos autossômicos, além de onze locos de microssatélites, em uma amostra total de 68 indivíduos, incluindo prováveis puros e híbridos. Além das amostras de *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, seis amostras de *L. colocolo* foram incluídas para fins de comparação. Através da construção de redes de haplótipos e de análises Bayesianas de alocação populacional dos indivíduos, foi possível identificar 48 híbridos, a maioria deles com procedência do RS. No entanto, a amplitude geográfica do gradiente genético entre as duas espécies parece indicar uma extensão da zona híbrida para além do estado do RS. Os resultados corroboram estudos recentes documentando a existência de um processo atual de hibridação entre estas espécies, e indicam a ocorrência de um padrão de introgessão genômica bidirecional e provavelmente assimétrico.

## ABSTRACT

Characterization of a hybrid zone between two Neotropical cats utilizing multiple nuclear loci

Natural hybridization among wild species is currently recognized as a sufficiently common process that it can present significant relevance in the evolutionary trajectory of the involved species. This process can be characterized by the occurrence of sporadic events between sympatric species, by the formation of narrow hybrid zones among taxa with parapatric distribution, or even by an extensive process of admixture between parental populations. *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi* are two closely related species of small felids with essentially allopatric distributions in Neotropical Region. In the State of Rio Grande do Sul (RS), in southern Brazil, the two species present a geographic contact zone where we have previously identified the existence of a complex and extensive pattern of hybridization. To better understand the dynamics of this process, it is critical to combine the use of multiple approaches, including the assessment of different types of molecular markers, whose different sensitivity to demographic processes may illuminate the forces shaping this hybrid zone. The objective of this study was to develop new sequence-based nuclear markers that are informative for the investigation of this hybrid zone, aiming to characterize the ongoing admixture and to expand the knowledge on the magnitude and directionality of this process. Our final data set includes DNA sequences of seven different segments (five of them located on the X chromosome, and two on autosomes), which were analyzed along with 11 microsatellite loci in a sample of 68 individuals of both pure and hybrid origin. In addition to the *L. tigrinus* and *L. geoffroyi* samples, six *L. colocolo* samples were included for comparison. Through the use of haplotype networks and Bayesian admixture analyses it was possible to identify 48 hybrids, most of them originating from RS state. Nevertheless, the geographic breadth of the genetic gradient between the two species appears to indicate that the hybrid zone extends beyond RS state. Our results corroborate recent studies that reported the existence of ongoing hybridization between these species, and suggest a pattern of bidirectional and likely asymmetric genomic introgression.

## APRESENTAÇÃO

O presente trabalho, intitulado “Caracterização de uma zona híbrida entre dois felídeos Neotropicais utilizando múltiplos locos nucleares”, foi desenvolvido como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre junto ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

O propósito deste trabalho foi aprofundar a caracterização genética de uma zona híbrida entre *Leopardus tigrinus* e *Leopardus geoffroyi* no Estado do Rio Grande do Sul, com o uso de diferentes tipos de marcadores moleculares (sequências de segmentos do cromossomo X ligados entre si, bem como sequências autossômicas) relacionando os resultados obtidos com informações já disponíveis sobre estas espécies, aprimorando a compreensão da dinâmica evolutiva deste processo de hibridação a fim de contribuir para a elaboração de estratégias adequadas de manejo e conservação das mesmas.

A dissertação é apresentada no formato de um artigo científico a ser submetido ao periódico *Molecular Biology and Evolution*.

**Análise evolutiva de uma zona híbrida utilizando  
sequências de genes nucleares**

**Alexsandra Schneider, Tatiane Campos Trigo e Eduardo Eizirik**

A ser adaptado e traduzido para a língua inglesa e posteriormente submetido ao periódico  
"Molecular Biology and Evolution"



# Análise evolutiva de uma zona híbrida utilizando sequências de genes nucleares

Alexsandra Schneider<sup>1</sup>, Tatiane Campos Trigo<sup>2</sup> e Eduardo Eizirik<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brasil

<sup>2</sup> Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brasil

<sup>3</sup> Instituto Pró-Carnívoros, Brasil

Título resumido: Uso de genes nucleares para estudar uma zona híbrida

Endereço para correspondência:

Dr. Eduardo Eizirik

Faculdade de Biociências, PUCRS

Av. Ipiranga 6681, CEP 90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil

Telefone: 55 (51) 3320.3500 ramal 4727

Fax: 55 (51) 3320.3612

Email: [eduardo.eizirik@pucrs.br](mailto:eduardo.eizirik@pucrs.br)

Palavras-chave: hibridação, introgressão, marcadores ligados, genes nucleares, *Leopardus tigrinus*, *Leopardus geoffroyi*

## Resumo

A identificação de indivíduos híbridos é frequentemente um assunto de grande importância para a elaboração de estratégias adequadas de manejo e conservação, mas pode ser dificultada quando as espécies hibridizantes são proximamente relacionadas e não possuem marcadores moleculares diagnósticos. Métodos para inferir proporções de miscigenação geralmente utilizam sequências do DNA mitocondrial e locos não ligados. Porém, os valores para o desequilíbrio de ligação e de Hardy-Weinberg entre marcadores independentes declina rapidamente com o tempo de miscigenação e os sinais de mistura podem ser perdidos em poucas gerações, subestimando o grau da hibridação e introgressão. Estudou-se a eficácia do uso combinado de marcadores nucleares ligados (localizado em uma região de baixa recombinação do cromossomo X) e não ligados em melhorar a detectabilidade de indivíduos híbridos, quantificar o processo de hibridação e caracterizar sua direcionalidade e simetria. A variabilidade de cinco locos localizados no cromossomo X, dois autossômicos e onze locos de microsatélites foi caracterizada em três espécies de felinos neotropicais, *Leopardus tigrinus*, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*. Foram identificados ao menos 48 indivíduos, a maioria deles com procedência do Rio Grande do Sul (RS) onde a zona de contato geográfico entre *Leopardus tigrinus* e *L. geoffroyi* foi previamente detectada, apresentando sinais de introgressão genômica interespecífica. No entanto, a amplitude geográfica do gradiente genético entre as duas espécies parece indicar uma extensão da zona híbrida para além do Estado do RS. Os dados corroboram estudos recentes documentando a existência de eventos atuais de hibridação e de um padrão de introgressão genética bidirecional provavelmente assimétrica.

## Introdução

A hibridação natural entre espécies é atualmente considerada um processo evolutivo com uma relevância significativa para a adaptação e especiação de organismos (Arnold 1992, Harrison 1993, Allendorf *et al.* 2001, Barton 2001). Este processo pode caracterizar-se pela ocorrência de eventos esporádicos entre espécies simpátricas, pela formação de zonas híbridas estreitas entre táxons com distribuição parapátrica, ou até mesmo por um intenso processo de miscigenação entre as populações parentais (Harrison 1993). Basicamente, dois cenários são sugeridos para explicar a origem de zonas híbridas. O primeiro sugere a formação dessas entre populações que divergiram em simpatria ou parapatria pela seleção ambiental diferenciada, enquanto que o segundo indica as zonas híbridas como resultado de um contato secundário entre populações que se diferenciaram em alopatria e que se encontram devido à expansão demográfica causada em resposta a mudanças climáticas ou de habitat (Barton and Hewitt 1985, Harrison 1993).

Várias zonas híbridas têm sido recentemente registradas em vertebrados, desde casos nos quais poucos indivíduos híbridos foram detectados (Schwartz *et al.* 2004) até zonas intensamente introgridas levando à formação de um “enxame híbrido” (*hybrid swarm* – com predominância de formas genéticas recombinantes) (Nolte *et al.* 2006), este sugerido como possível responsável pela formação de novas espécies (Roy *et al.* 1994, Reich *et al.* 1999). Tentativas para identificar e caracterizar padrões de introgressão em diferentes táxons animais constitui um importante componente da investigação da história evolutiva de espécies hibridizantes.

Grande parte dos estudos atuais sobre hibridação tem envolvido principalmente a análise de sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) e locos de microssatélites nucleares não ligados (Randi *et al.* 2001, Frankham *et al.* 2002, Lancaster *et al.* 2006, Gay *et al.* 2007, Trigo *et al.* 2008). Desta forma, há um crescente interesse na incorporação adicional de sequências de genes nucleares, tanto autossômicos quanto localizados nos cromossomos sexuais, pois a análise de múltiplos locos de diferentes formas de herança é extremamente necessária para que possa ser realizada uma inferência abrangente sobre processos complexos atuando sobre o genoma, como os decorrentes de eventos de hibridação e introgressão (Eizirik *et al.* 2006).

Nesse sentido, introns nucleares podem ser eficientes marcadores espécie-específicos para estudos de hibridação, especialmente para espécies próximas (Pacheco *et al.* 2002), devido à sua taxa de substituição relativamente rápida (levando a um maior nível de variação)

quando comparada à de exons, bem como seu estado diplóide e herança biparental. Boa parte da variação presente em segmentos nucleares se apresenta sob a forma de SNPs (*single nucleotide polymorphisms* - polimorfismos de nucleotídeo único), os quais têm sido um alvo crescente de estudos evolutivos em diversos organismos (Congdon *et al.* 2000, Shi *et al.* 2001, Hare *et al.* 2002). O uso de SNPs como marcadores em estudos populacionais ainda é recente, porém já demonstra sua vantagem para inferir eventos demográficos, tais como expansão populacional e miscigenação (Brumfield *et al.* 2003). Diferente dos microssatélites, os SNPs têm taxas de mutação mais lentas, o que reduz a incidência de homoplasia e permite com maior facilidade a identificação de monofilia recíproca entre espécies e alelos diagnósticos de cada uma delas (Slatkin 1995; Culver *et al.* 2001; Hare 2001). A vantagem dos locos de microssatélites em estudos de hibridação reside no fato de que esses marcadores genéticos biparentais apresentam-se altamente polimórficos (Schlötterer 1998), sendo variáveis o suficiente para permitir a identificação inequívoca de todos os espécimes amostrados e a realização de análises estatísticas de associação dos indivíduos às suas populações de origem (Hansen *et al.* 2000). Porém, esses marcadores geralmente estão sujeitos à ocorrência de homoplasia, que pode dificultar a identificação de alelos diagnósticos de cada uma das populações. Assim, a associação desses dois diferentes tipos de marcadores é interessante para o estudo de aspectos complexos das relações evolutivas entre espécies.

Uma limitação usualmente compartilhada por SNPs e microssatélites é a dificuldade de distinguir casos de alelos compartilhados por introgressão daqueles decorrentes de um polimorfismo ancestral, que precede o evento de especiação entre os táxons envolvidos no processo de hibridação. Esta questão é fundamental para que se possa avaliar de forma detalhada os eventos subjacentes à hibridação, incluindo uma avaliação da magnitude e antiguidade do processo. Se por um lado os SNPs reduzem o problema da homoplasia como uma fonte de ambiguidade, eles podem estar ainda mais propensos do que os microssatélites a sofrerem com este problema da persistência de polimorfismos ancestrais, devido justamente às suas taxas mais lentas de substituição. Uma forma de potencialmente resolver este problema é a utilização de múltiplos segmentos nucleares ligados, incorporando vários SNPs em haplótipos integrados, que podem conter uma quantidade e qualidade de informação suficientes para distinguir compartilhamentos ancestrais de outros que sejam secundários. Desta forma, o uso de locos ligados ao longo do cromossomo permite distinguir entre introgressão e retenção de polimorfismo ancestral. Esta estratégia se aplica também a locos ligados de microssatélites, bem como a haplótipos conjuntos dos dois tipos de marcadores.

Estudos recentes sugerem que marcadores ligados entre si, em conjunto com análises estatísticas sofisticadas que modelam a dinâmica genômica da miscigenação podem significativamente aumentar a detecção de indivíduos híbridos, quantificar o processo de hibridação, e caracterizar sua simetria e direcionalidade (Lecis *et al.* 2006, Verardi *et al.* 2006). Em populações humanas, esta metodologia tem sido utilizada para estimar o desequilíbrio de ligação e proporções de miscigenação (Seldin *et al.* 2004); no entanto, seu uso em outras espécies é ainda incipiente. Isto porque, na maior parte dos casos, o conhecimento sobre o genoma de espécies não-modelo é ainda extremamente precário, impedindo que estes marcadores sejam desenvolvidos de forma eficiente, a fim de que possam ser aplicados em populações naturais. Os primeiros exemplos de uso destas abordagens em carnívoros foram publicados recentemente (focando em gatos-selvagens-europeus [*Felis silvestris* - Lecis *et al.* 2006] e lobos cinza da Europa [*Canis lupus*; Verardi *et al.* 2006]), valendo-se de marcadores disponibilizados por estudos genômicos do gato doméstico e do cão doméstico, respectivamente.

A identificação de híbridos pode ser dificultada quando as espécies hibridizantes apresentam uma relação evolutiva próxima e não possuem marcadores genéticos claramente diagnósticos. Porém, a combinação de diferentes marcadores moleculares (ligados e não ligados) com diferentes propriedades mutacionais e demográficas (p.ex. microssatélites, sequências de autossomos e de cromossomos sexuais) possibilita dissecar as diferentes variáveis que afetam os padrões genéticos resultantes deste fenômeno.

A evidência de hibridação entre duas espécies de pequenos felídeos neotropicais, *Leopardus tigrinus* e *Leopardus geoffroyi*, foi documentada pela análise de mtDNA, microssatélites e introns do cromossomo X e Y (Trigo *et al.* 2008, Trigo *et al.*, em preparação). Os dados moleculares confirmaram a origem híbrida de indivíduos provenientes da região central do estado do Rio Grande do Sul, no sul do Brasil, onde Eizirik *et al.* (2006) previamente registraram o contato geográfico entre as espécies (fig. 1) e a existência de indivíduos morfologicamente ambíguos (porte de *L. geoffroyi* ou de *L. tigrinus* com padrões intermediários na formação das pintas características de cada espécie). Diversas combinações genéticas dos diferentes marcadores foram encontradas em ambas as espécies, sugerindo a existência de uma intensa hibridação atual ou recente, que resulta em uma introgressão bidirecional e parcialmente assimétrica. Da mesma maneira, análises de distribuição, associação com habitats e nicho trófico no Estado sugerem a existência de uma segregação ecológica entre estes dois felídeos nesta região. Segundo este mesmo estudo molecular, a ocorrência de hibridação foi também documentada entre *L. tigrinus* e um terceiro felídeo

neotropical proximamente relacionado, *L. colocolo*. A hibridação, neste caso, parece restrita às regiões do centro e nordeste do Brasil, onde não há registros da ocorrência de *L. geoffroyi*. A formação dessas zonas híbridas pode ter sido propiciada por uma expansão demográfica das populações de *L. tigrinus* que teria levado ao contato secundário com *L. geoffroyi* e *L. colocolo* e favorecido, assim, a ocorrência dos cruzamentos interespecíficos. Os dados indicam que a hibridação de *L. tigrinus* com *L. colocolo* parece ser antiga e esporádica, com poucos indivíduos identificados como híbridos, e revelando um padrão de introgressão de mtDNA basicamente unidirecional de *L. colocolo* para *L. tigrinus*.

Neste contexto, o presente trabalho envolve um conjunto de marcadores composto de sequências nucleares localizadas no cromossomo X e em autossomos, que junto a dados de microssatélites foram utilizados na investigação dos padrões de hibridação e introgressão entre as espécies *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*. Análises específicas foram realizadas para estes marcadores com os seguintes objetivos: (1) estimar as proporções individuais de miscigenação e determinar a probabilidade de que cada um dos genótipos multilocos (e haplótipos inferidos) pertençam exclusivamente à sua espécie de origem (no caso de nenhuma mistura), ou a ambas as populações parentais (no caso de mistura); (2) identificar eventos de recombinação e inferir a origem de cada haplótipo cromossômico, reconstruindo sua evolução ao longo do processo de hibridação; (3) comparar as proporções de miscigenação individual com inferências anteriores (Trigo *et al.* 2008) e verificar se os marcadores nucleares baseados em sequências corroboram análises prévias; (4) realizar inferências sobre a magnitude, direcionalidade e simetria deste fenômeno no que tange às espécies envolvidas.

## **Material e Métodos**

### **Amostragem**

As amostras de *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* utilizadas neste estudo foram primeiramente analisadas por Trigo *et al.* (2008) e Trigo *et al.* (em preparação). A partir destes estudos, que identificaram indivíduos como sendo de origem pura ou híbrida através da avaliação combinada de marcadores moleculares (microssatélites, mtDNA e introns dos cromossomos X e Y) e características morfológicas, realizou-se uma seleção de amostras a serem empregadas nestas análises. Foram selecionados 36 espécimes morfolologicamente associados a *L. tigrinus*, sendo 16 considerados como possivelmente puros e então representantes da população pura de *L. tigrinus*, e 20 indivíduos com evidências de uma origem híbrida com base nos marcadores moleculares previamente analisados. Para a população

morfologicamente associada a *L. geoffroyi*, foram selecionadas 32 amostras, sendo 14 de origem presumivelmente pura e 18 de origem híbrida. Todos os indivíduos híbridos selecionados foram procedentes da zona de contato geográfico entre as espécies, localizada no Rio Grande do Sul, enquanto que os indivíduos puros foram provenientes de áreas próximas ao contato (no estado do RS) ou de áreas mais distantes (fora do estado do RS). Além das amostras de *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*, seis amostras de *L. colocolo* foram também incluídas para fins de comparação (tabela 1).

As amostras utilizadas provieram de tecido sanguíneo e muscular, obtidas a partir de animais mantidos em cativeiro de procedência geográfica conhecida, animais encontrados mortos em estradas (vítimas de atropelamentos), animais capturados em campo por diversos colaboradores e outros capturados por fazendeiros. A extração de DNA genômico destas amostras foi realizada através do protocolo padrão de fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.* 1989).

#### Marcadores nucleares

Uma vez que espécies evolutivamente próximas podem compartilhar haplótipos devido à ancestralidade comum ou através da introgressão gênica resultante de hibridação, foram selecionados marcadores que se encontram demonstravelmente ligados entre si, pois estes permitem analisar um maior número de sítios polimórficos em um mesmo bloco haplotípico, permitindo testar a hipótese de que os compartilhamentos decorrem da hibridação. Como um estudo de caso desta abordagem, foram selecionados segmentos fisicamente próximos entre si, e contidos em uma região do cromossomo X que apresenta baixas taxas de recombinação no gato doméstico (Schmidt-Kuntzel *et al.*, no prelo). A fim de identificar SNPs potencialmente informativos para este estudo, os seguintes segmentos foram testados: 1) exons 3 e 4 do gene *ATPase, Cu<sup>++</sup> transporting alpha polypeptide (ATP7A)*, utilizando os *primers* descritos por Eizirik *et al.* (2001) para o exon 4, e os seguintes *primers* para o exon 3: ATP7A-F3 (5'-AAAAATGCAACTATTATTTATGACCCTA-3') e ATP7A-R3 (5'-TAATTCGCTGAACACCTTGC-3'); 2) intron 16 do gene *Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase (BTK)*, com *primers* descritos por Lyons *et al.* (1997); e 3) intron 5 do *Proteolipid Protein 1 (PLP1)* usando os *primers* PLP1-I5-F1 (5'-CTGTCCATTTGCAAAACAGC-3') e PLP1-I5-R1 (5'-ACAGGTGGAAGGTCATTTGG-3'). O segundo intron do gene *PLP1 (PLP1-I2)* foi amplificado e sequenciado em um estudo anterior (Trigo *et al.*, em preparação) utilizando os *primers* descritos por Murphy *et al.*

(1999), e foi selecionado para integrar os dados deste estudo tendo em vista seus altos níveis de variação e sua localização na mesma região do cromossomo X. Como comparação com os padrões observados nestes locos (presumivelmente ligados entre si), foi investigado também o intron 3 do gene *Biglycan* (*BGN*), localizado em uma região mais distante do cromossomo X, empregando *primers* descritos por Lyons *et al.* (1997).

A localização física (em Mb) para cada um dos marcadores do cromossomo X foi baseada no mapa genômico do gato doméstico (*Garfield browser*; Pontius and O'Brien 2007; <http://lgd.abcc.ncifcrf.gov/cgi-bin/gbrowse/cat>) (fig. 2), sendo que neste estudo assumimos que as mesmas características se aplicam às espécies neotropicals em questão. Tal premissa encontra apoio na sabida conservação cariotípica observada na família Felidae (Wurster-Hill and Centerwall 1982), na qual se verifica poucos rearranjos cromossômicos, e no padrão de conservação observado de forma mais geral no cromossomo X de mamíferos (Murphy *et al.* 1999).

Além dos segmentos localizados no cromossomo X, fragmentos dos seguintes genes autossômicos foram também testados: 1) *precursor 1 of cholinergic receptor nicotinic alpha polypeptide* (*CHRNA1*) usando *primers* descritos por Lyons *et al.* (1997); 2) *Silver* (*SILV*), com *primers* descritos por Johnson *et al.* (2006); 3) *Cytochrome P450 1A* (*CYP1A*) com *primers* descritos por Lindblad-Toh *et al.* (2005) e 4) *Feline sarcoma protooncogene* (*FES*) usando *primers* descritos por Venta *et al.* (1996).

Para identificar os sítios variáveis nesses segmentos dentro ou entre as populações de *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*, inicialmente foram amplificados e sequenciados de cinco a dez indivíduos para cada uma das espécies. Visto que as duas espécies têm uma relação evolutiva relativamente próxima e que introns são segmentos de baixa variabilidade, era esperado encontrar pouca ou nenhuma variação. Assim, focamos nossos esforços somente nos segmentos apresentando algum nível de variação nesta amostragem inicial (exon 3 do *ATP7A*, *BTK*, *BGN*, e introns 2 e 5 do gene *PLP1*, totalizando ca. 3000 pb no cromossomo X; e *CHRNA1* e *SILV*, totalizando aproximadamente 800 pb de sequências autossômicas). Além dos marcadores de sequência, 11 locos de microssatélites genotipados previamente por nosso grupo de pesquisa (Trigo *et al.* 2008, Trigo *et al.*, em preparação) foram incluídos no presente estudo para permitir a comparação dos resultados obtidos com os diferentes tipos de marcadores.

Todos os segmentos nucleares foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*; Palumbi 1996) utilizando *primers* já descritos ou desenhados ao longo deste estudo. Neste último caso, um *primer* reverso interno (5'-TTCAGGCTCTGAGCTGTCAG-3') foi



desenhado para o sequenciamento do intron 5 do gene *PLP1* utilizando o programa Primer3 (Rozen and Skaletsky 2000; <http://frodo.wi.mit.edu>). As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20µL contendo tampão de PCR 1X, 2.0 – 2.5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM de dNTPs, 0.5 U de Taq Platinum (Invitrogen), 0.2 µM de cada *primer* e 10-50 ng de DNA. As condições de amplificação para os segmentos *ATP7A*, *BTK*, *PLP1-I2*, *CHRNA1* e *SILV* foram as mesmas, e as dos segmentos *PLP1-I5* e *BGN* diferiram daquelas pelas temperaturas de anelamento e pelo número de ciclos de *touchdown* (tabela 2). A adição de Betaína (1M) na reação de PCR foi utilizada para eliminar bandas espúrias nos segmentos *ATP7A*, *PLP1-I5* e *BGN*, resultando em uma maior eficiência e especificidade da reação.

Os produtos de PCR obtidos foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1%, corado com GelRed 10.000X em DMSO (Biotium, Inc.) e visualizado em transiluminador de luz ultravioleta. Depois de quantificados por comparação com o marcador de peso molecular “*Low DNA Mass Ladder*” (Invitrogen) foi realizada a purificação enzimática dos produtos de PCR usando as enzimas Exonuclease I (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). Os produtos de PCR purificados foram sequenciados com o *DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit* (GE Healthcare), e lidos com sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). As sequências geradas foram analisadas com os programas *Phred*, *Phrap*, *Consed* na plataforma Linux (Gordon *et al.* 1998). As sequências consenso foram alinhadas utilizando o algoritmo CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994) executado no programa MEGA 4.0 (Tamura *et al.* 2007) e o alinhamento de cada um dos segmentos foi verificado e editado manualmente quando necessário.

#### Análise das sequências de DNA

A primeira fase da análise das sequências de DNA obtidas envolveu a identificação de sítios heterozigóticos e a definição das fases gaméticas. Os sítios heterozigóticos nos segmentos nucleares foram identificados quando dois diferentes nucleotídeos estavam presentes na mesma posição nos eletroferogramas de ambas as fitas (*forward* e *reverse*) com o pico mais fraco alcançando no mínimo 25% do pico mais forte. Para os segmentos ligados ao X, quando dois ou mais sítios heterozigóticos foram identificados em sequências de fêmeas, a fase gamética foi determinada usando o programa PHASE 2.1 (Stephens *et al.* 2001). No caso dos segmentos autossômicos, a fase gamética foi estimada tanto para fêmeas quanto para machos, devido seu estado diplóide em ambos os sexos. Para todos os segmentos, a análise foi

realizada para dados bialélicos, com exceção do segmento *CHRNA1* que se mostrou extremamente variável apresentando sítios multialélicos.

Os haplótipos definidos com o programa PHASE foram então utilizados para múltiplas análises. Primeiramente, foram calculadas medidas de diversidade genética (diversidade nucleotídica e haplotípica) com o programa DnaSP 4.20.2 (Rozas *et al.* 2003) para cada um dos segmentos nucleares nas três espécies amostradas (tabela 3). Posteriormente, foi realizada a construção de redes de haplótipos estimadas através do método *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999) com o auxílio do programa NETWORK 4.5.0.0 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). Foram construídas redes de haplótipos para cada um dos segmentos separadamente e outra rede de haplótipos com os segmentos do cromossomo X concatenados, tendo em vista a ligação entre os locos. Os haplótipos dos locos ligados ao X foram também estimados com o programa ARLEQUIN 2.1 (Schneider *et al.* 2000) e, em seguida, foi construída uma planilha no Excel para análise visual do compartilhamento dos haplótipos entre os indivíduos.

O método Bayesiano implementado no programa STRUCTURE 2.2 (Pritchard *et al.* 2000) foi utilizado para associar os indivíduos à sua população fonte e testar sua ancestralidade em outra população. O método assume Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) para cada loco e Equilíbrio de Ligação (EL) entre os locos dentro de cada população, sendo que a existência de desvios do equilíbrio leva a população a ser dividida em subpopulações, às quais os indivíduos são alocados. Considerando as observações de Trigo *et al.* (em preparação) da provável ocorrência de uma população geneticamente diferenciada de *L. tigrinus* na região centro-nordeste brasileiro (CNE), foi assumido que a amostra total apresenta quatro populações ( $K = 4$ ; *L. tigrinus* do sul e sudeste (SSE), *L. tigrinus* CNE, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*) e cada um dos indivíduos foi associado probabilisticamente a uma dessas populações ou simultaneamente a mais de uma população caso seus haplótipos indicassem miscigenação. Três diferentes análises foram realizadas a fim de comparar a eficiência dos diferentes marcadores em identificar híbridos: primeiro utilizando somente os dados de sequências dos segmentos do cromossomo X e autossomos; segundo, somente dados dos 11 locos de microssatélites não ligados, e, por último, o conjunto total de marcadores (sequências do X, sequências de autossomos e microssatélites). Em cada um dos casos, as análises foram realizadas usando o modelo de ligação, exceto no segundo caso (modelo de miscigenação "Admixture Model"), modelo de frequências alélicas correlacionadas (Falush *et al.* 2003), e a opção de nenhuma informação prévia de fenótipo, além de uma Cadeia de

Markov Monte Carlo (MCMC) de 500.000 iterações realizadas após um período de *burn-in* de 200.000 iterações.

Finalmente, o programa LAMARC (Kuhner 2006) foi utilizado para estimar parâmetros populacionais como theta ( $\theta$ ) e taxas de migração e recombinação. Tais parâmetros foram calculados independente e simultaneamente para todos os locos nucleares analisados em nível de sequência, assumindo tamanhos de amostras diferentes para cada segmento e ajustando o tamanho populacional efetivo para cada região genômica (ligada ao X e autossômicos). O número de migrantes por geração foi calculado a partir do parâmetro “M” multiplicado pelo valor médio de  $\theta$  da população recipiente. Foram realizadas oito análises no programa LAMARC, das quais quatro incluíram três populações (*L. tigrinus*, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*) e as demais consideraram quatro populações (*L. tigrinus* SSE, *L. tigrinus* CNE, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*). Ambas as corridas utilizaram o método Bayesiano, incluindo quatro replicatas, cada uma com uma cadeia final de 1.600.000 passos com um intervalo entre as amostras de 80 passos resultando em 40.000 amostras, das quais as primeiras 4.000 foram descartadas como *burn-in*. No segundo conjunto de análises (considerando quatro populações) as buscas foram iniciadas com valor inicial de  $\theta$  baseado na fórmula de Watterson (1975).

## Resultados

### Diversidade nas sequências nucleares

Os sete segmentos nucleares analisados apresentaram níveis de variabilidade relativamente baixos. As diversidades haplotípica e nucleotídica foram maiores no segmento do gene *BGN*, estando relacionadas ao seu maior número de haplótipos e de sítios polimórficos. Os segmentos apresentando menor variabilidade foram o segundo intron do gene *PLP1* e o segmento *SILV* (tabela 3).

### Caracterização dos haplótipos nucleares e inferências de eventos de introgressão

#### *ATP7A*

Foram sequenciados 385 pares de base (pb) do terceiro exon do gene *ATP7A* a partir de 30 *L. geoffroyi* [8 fêmeas (F) e 22 machos (M)], 35 *L. tigrinus* (11F e 24M) e 6 *L. colocolo* (1F e 5M) compreendendo quatro haplótipos definidos por três sítios polimórficos (tabela 3). Foram amostradas três fêmeas heterozigotas (2 *L. tigrinus* [bLti 59, 79]; 1 *L. geoffroyi*

[bLge10]). Dentre os haplótipos, três deles (H1, H2, H3) apresentaram compartilhamento, sendo o primeiro destes compartilhado pelas três espécies, possivelmente representando um haplótipo ancestral neste grupo. Os outros dois haplótipos foram compartilhados entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, resultando em oito indivíduos (oito cromossomos) de *L. geoffroyi* apresentando haplótipos mais frequentes em *L. tigrinus*, sendo todos eles previamente identificados (com base em outros marcadores moleculares) como híbridos provenientes do estado do RS. Todos os *L. tigrinus* da região centro e nordeste do Brasil (CNE) apresentaram um mesmo haplótipo (H4) distinto daqueles presentes nas demais amostras (fig. 3A, tabela 4).

### *BTK*

A rede de haplótipos do segmento *BTK* (baseada em um alinhamento de 599 pb) incluiu 30 *L. geoffroyi* (7F e 23M), 36 *L. tigrinus* (11F e 25M) e 6 *L. colocolo* (1F e 5M) representando um total de 91 cromossomos distribuídos entre seis haplótipos (fig. 3B, tabela 4). Somente uma fêmea heterozigota foi identificada. Desses haplótipos, dois (H5, H6) foram exclusivos de *L. colocolo*, um (H3) exclusivo de dois indivíduos de *L. tigrinus* puros provenientes da região sudeste do Brasil, um (H4) exclusivo dos indivíduos de *L. tigrinus* amostrados na região CNE e outros dois haplótipos (H1 e H2) compartilhados por *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*. Neste último caso, alguns indivíduos de *L. tigrinus* apresentaram o haplótipo H1 (mais frequente em *L. geoffroyi*) enquanto alguns indivíduos de *L. geoffroyi* apresentaram o haplótipo H2 (mais frequente em *L. tigrinus*). Interessantemente, todos estes indivíduos que apresentaram haplótipos atípicos no âmbito de seu grupo fenotípico foram provenientes do estado do RS e apresentaram indícios de hibridação em trabalhos anteriores (Trigo *et al.* 2008; Trigo *et al.*, em preparação). Esta evidência sugere que o compartilhamento observado possivelmente esteja associado à ocorrência de introgressão em ambas as direções.

### Intron 2 do *PLP1*

Sessenta e sete indivíduos (31 *L. geoffroyi* [8F e 23M], 33 *L. tigrinus* [11F e 22M] e 3 *L. colocolo* [1F e 2M], em um total de 87 cromossomos) foram sequenciados para os 808 pb do segundo intron do gene *PLP1*. A maioria das sequências amostradas para este gene são provenientes de um estudo prévio (Trigo *et al.*, em preparação) e foram reanalisadas aqui em conjunto com os demais segmentos (ver tabela 1). Foram amostradas quatro fêmeas heterozigotas para esse segmento (3 *L. tigrinus* [bLti 09,59,79]; 1 *L. geoffroyi* [bLge 62]). Na rede de haplótipos (fig. 3C; ver também tabela 4) podem ser visualizados os oito haplótipos

definidos para este segmento por nove sítios polimórficos. Deste total, três haplótipos (H6, H7, H8) foram encontrados exclusivamente em *L. colocolo* com ao menos três passos mutacionais do haplótipo encontrado predominantemente em *L. geoffroyi* (H1), confirmando a divergência mais antiga dessa espécie. Um haplótipo (H4) foi encontrado em espécimes de *L. geoffroyi* do sul do Brasil e da Bolívia e três haplótipos (H1, H2, H3) apresentaram compartilhamento por *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*. Neste caso, o haplótipo H1, mais frequente em *L. geoffroyi*, foi também detectado em indivíduos de *L. tigrinus*, assim como os haplótipos H2 e H3, mais frequentes em espécimes de *L. tigrinus* provenientes do sul e sudeste brasileiros (SSE), foram também registrados em indivíduos de *L. geoffroyi*. Estes indivíduos, com haplótipos aparentemente não originais de seu grupo fenotípico, são os mesmos detectados no padrão de compartilhamento nas análises dos genes *ATP7A* e *BTK*. Como verificado nos outros marcadores, este padrão sugere que o compartilhamento observado possa estar associado à ocorrência de introgressão gerada por um fluxo gênico bidirecional e assimétrico, com maiores proporções de haplótipos introgridos de *L. tigrinus* em *L. geoffroyi* do que o oposto. Novamente, como observado nos segmentos descritos anteriormente, todos os indivíduos de *L. tigrinus* provenientes do CNE demonstraram ser geneticamente diferenciados apresentando um haplótipo (H5) distinto e sem compartilhamento.

#### Intron 5 do *PLP1*

Foram sequenciados 590 pb do quinto intron do gene *PLP1* para 31 *L. geoffroyi* (8F e 23M), 35 *L. tigrinus* (11F e 24M) e 6 *L. colocolo* (1F e 5M) totalizando 92 cromossomos sendo que nenhuma fêmea heterozigota foi identificada. A rede de haplótipos construída (fig. 3D) foi semelhante às demais, com cinco haplótipos definidos por oito sítios polimórficos, sendo os haplótipos pertencentes a *L. colocolo* (H4, H5) os mais divergentes. O compartilhamento de haplótipos por diferentes espécies foi verificado entre as populações de *L. geoffroyi* e *L. tigrinus* do sul e sudeste brasileiro (H1, H2). Corroborando as evidências anteriores, os mesmos indivíduos identificados pelos marcadores dos genes *ATP7A*, *BTK* e *PLP1* I2 como contendo haplótipos atípicos para o seu grupo fenotípico, foram também identificados por este segmento com o mesmo padrão, com exceção de uma fêmea (bLti 79), que neste caso não apresentou haplótipo ligado a *L. geoffroyi* como nos casos anteriores. Considerando-se que este compartilhamento possa estar relacionado à existência de introgressão, novamente, o presente marcador reforça a possibilidade da bidirecionalidade e

assimetria do fluxo gênico. E, finalmente, como demonstrado nos marcadores acima, temos a população de *L. tigrinus* da região CNE apresentando um haplótipo exclusivo (H3).

### *BGN*

Sessenta e sete indivíduos (27 *L. geoffroyi* [8F e 19M], 34 *L. tigrinus* [11F e 23M] e 6 *L. colocolo* [1F e 5M]), representando 87 cromossomos foram sequenciados para os 595 pb de um segmento do gene *BGN*, o qual se mostrou altamente polimórfico, determinando 15 haplótipos através de 12 sítios variáveis (fig. 3E). A partir da análise do *network*, dois haplótipos foram relacionados a *L. colocolo* (H14 e H15), cinco a *L. tigrinus* (H2, H8, H11, H12 e H13) e oito a *L. geoffroyi* (H1, H3, H4, H5, H6, H7, H9 e H10). Ao contrário do observado até então, a população de *L. tigrinus* das regiões CNE não apresentou um haplótipo exclusivo, sendo o haplótipo (H11) registrado nesta população, também encontrado em três cromossomos de *L. tigrinus* considerados previamente como híbridos. Além do compartilhamento de haplótipo por indivíduos de *L. tigrinus* do SSE e CNE, quatro outros haplótipos foram compartilhados por *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*. No primeiro caso, os dois haplótipos mais frequentes, aparentemente associados a *L. geoffroyi* (H3, H4), foram também registrados em seis cromossomos, correspondentes a indivíduos considerados híbridos, com exceção de apenas uma amostra considerada previamente como pura no RS (bLti 46). No segundo caso, os haplótipos H2 e H8, aparentemente associados a *L. tigrinus*, foram também registrados em indivíduos de *L. geoffroyi*, sendo estes, em sua maioria, considerados previamente como híbridos, exceto por um indivíduo do RS previamente considerado como puro (bLge 41, ver tabela 4).

### Segmentos do cromossomo X concatenados

Análises adicionais foram realizadas a partir da concatenação dos cinco segmentos do cromossomo X, o que pode ser justificado *a priori* tendo em vista a ligação gênica entre os mesmos. Análises posteriores deste conjunto (ver abaixo) visaram a testar a hipótese de que realmente consistem de um mesmo bloco haplotípico, ou se devem ser subdivididos em regiões distintas dentro das quais não haja evidência de recombinação. O segmento total resultou em 2977 pb analisados em 26 *L. geoffroyi* (7F e 19M), 32 *L. tigrinus* (11F e 21M) e 3 *L. colocolo* (1F e 2M), representando 80 cromossomos distribuídos em 29 haplótipos definidos através de 37 sítios polimórficos. Foram removidos da análise todos os sítios com informação faltante ou ambígua (fig. 3F). Uma avaliação detalhada do *network* revelou *L.*

*colocolo* como o grupo mais divergente com ao menos 13 passos mutacionais separando-o das outras duas espécies, sendo congruente com estudos filogenéticos atuais (Johnson *et al.* 2006). Embora pareçam existir dois grupos em nível de espécie, referentes a *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*, estes não puderam ser definidos claramente, pois não há uma separação bem nítida entre eles, visto que a maioria dos ramos apresenta apenas um passo mutacional. Além disso, as relações entre alguns haplótipos permaneceram ambíguas pela formação de reticulações, que são sugestivas da ocorrência de eventos de recombinação nesses sítios, o que é corroborado por análises de taxas de recombinação descritas a seguir. Quatro haplótipos (H2, H3, H6, H7) foram compartilhados entre as duas espécies, e ao menos outros três aparentam ter sido alvo de uma “troca” (H4, H12, H21 - isso porque não se sabe ao certo se H17 e H23 pertencem originalmente a *L. tigrinus* ou *L. geoffroyi*, ou se eram realmente compartilhados por ancestralidade entre ambos, pois estão posicionados em uma região intermediária do que supostamente seria a delimitação entre os clados), isto é, foram amostrados na espécie que não corresponde ao seu agrupamento fenotípico original.

Os indivíduos morfológicamente identificados como *L. geoffroyi* que estavam inseridos no “clado de *L. tigrinus*” eram os mesmos que apresentaram evidência de introgressão nos marcadores quando analisados separadamente, ou seja, híbridos com procedência do RS. Do mesmo modo como demonstrado nos locos individuais, esta rede de haplótipos corrobora as evidências de um fluxo gênico bidirecional. E, finalmente, a inferência de que a população de *L. tigrinus* da região CNE seja geneticamente distinta foi, novamente, confirmada pela presença de um único haplótipo exclusivo nesta região (H24). Uma observação interessante que emerge a partir da concatenação dos dados é a maior proximidade do haplótipo encontrado na região CNE a haplótipos relacionados ao grupo *L. geoffroyi* do que a *L. tigrinus*. Apesar de a rede indicar uma maior proximidade do haplótipo H24 a um haplótipo encontrado em um indivíduo morfológicamente classificado como *L. tigrinus* (bLti68; H21), evidências anteriores em todos marcadores analisados independentemente demonstram sempre a presença de haplótipos aparentemente ligados a *L. geoffroyi* neste indivíduo. Interessantemente, estes dados reforçam a interpretação de uma história de hibridação entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* associada à evidência de uma população de *L. tigrinus* geneticamente distinta na região CNE do Brasil.

## *SILV*

Este segmento autossômico com 326 pb foi sequenciado em 32 *L. geoffroyi* (8F e 24M), 36 *L. tigrinus* (11F e 25M) e 6 *L. colocolo* (1F e 5M) correspondendo a 148 cromossomos. Destes indivíduos, 17 eram heterozigotos. Devido às baixas taxas de diversidade nucleotídica e haplotípica (tabela 3), a rede de haplótipos (fig. 3G) apresentou somente três haplótipos definidos por dois sítios polimórficos. Um haplótipo foi encontrado somente em indivíduos de *L. colocolo*, enquanto que os outros dois foram compartilhados entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*. O primeiro haplótipo (H1) foi verificado predominantemente em *L. geoffroyi*, sendo também encontrado em sete cromossomos de indivíduos morfológicamente *L. tigrinus* considerados (com base em outros marcadores) como híbridos e em dois cromossomos considerados como puros. Por outro lado, o segundo haplótipo (H2) foi registrado predominantemente em indivíduos de *L. tigrinus*, incluindo tanto a população do sul e sudeste brasileiro, quanto do CNE. No entanto, este haplótipo foi também detectado em indivíduos morfológicamente *L. geoffroyi*, sendo a maioria previamente identificada como sendo de origem híbrida.

## *CHRNA1*

Setenta e quatro indivíduos, (32 *L. geoffroyi* [8F e 24M], 36 *L. tigrinus* [11F e 25M] e 6 *L. colocolo* [1F e 5M]), que correspondem a 148 cromossomos, foram sequenciados para os 344 pb deste gene autossômico. A presença de várias reticulações confundiu as relações entre os haplótipos (fig. 3H), provavelmente devido à ocorrência de sítios multialélicos, altas taxas de mutação e recombinação (como demonstrado a seguir, ver tabela 6) sendo impossível delimitar haplótipos pertencentes a uma determinada espécie. No entanto, a ocorrência de haplótipos exclusivos para *L. colocolo* (H11, H12, H13) foi verificada para este segmento, assim como para a maioria dos marcadores analisados neste trabalho, com exceção do *ATP7A*. Para o *CHRNA1*, assim como para o *SILV*, foi identificado o compartilhamento de haplótipos pelas duas populações de *L. tigrinus* (SSE e CNE) assim como pelas espécies *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*. O compartilhamento observado entre estas últimas parece estar associado a um fluxo gênico secundário entre estas espécies, como já foi evidenciado nos demais segmentos.



## Origem de cada haplótipo cromossômico e eventos de recombinação

Através da análise realizada com o programa ARLEQUIN para os locos ligados ao X foram definidos 34 haplótipos (um número menor de haplótipos é mostrado na tabela 3, porque a análise do NETWORK não considera sítios com informação faltante; ver fig. 4, tabela 5), os quais foram distribuídos entre quatro populações (*L. tigrinus* SSE, *L. tigrinus* CNE, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*). Para esta análise só foram incluídos os indivíduos que foram sequenciados para os cinco segmentos nucleares, totalizando 80 cromossomos (26 *L. geoffroyi* [7F e 19M], 32 *L. tigrinus* [11F e 21M] e 3 *L. colocolo* [1F e 2M]). Uma análise detalhada (ver tabela 5) revelou alguns indivíduos ‘trocados’ entre os prováveis clados formados, ou seja, dentro do clado de *L. tigrinus* foram encontrados oito indivíduos de *L. geoffroyi* (bLge 02,04,05,08,10,13,32,42), os quais eram essencialmente os mesmos que haviam apresentado evidências de haplótipos introgrididos nas análises independentes dos segmentos contidos neste bloco. Por outro lado, apenas dois representantes de *L. tigrinus* (bLti 68,79) ficaram inseridos no clado correspondente a *L. geoffroyi*, exatamente os mesmos indivíduos com evidências de introgressão pela análise independente dos segmentos. Isto corrobora resultados de trabalhos anteriores (Trigo *et al.* 2008, Trigo *et al.*, em preparação) indicando uma introgressão bidirecional e assimétrica entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*. Além disso, a população de *L. tigrinus* amostrada na região CNE constituiu uma população distinta, apresentando um haplótipo único e exclusivo (H29).

Através da análise da Figura 4 se identificou ao menos quatro possíveis eventos de recombinação ao longo do cromossomo X, os quais foram inferidos com o programa DnaSP. A maior incidência destes eventos ocorreu na porção final do segmento, mais precisamente no marcador *BGN*, que está situado numa região de alta recombinação do cromossomo X do gato doméstico (Schmidt-Kuntzel *et al.*, no prelo). Além disso, as análises realizadas com o programa LAMARC confirmaram ser este o segmento com as maiores taxas de recombinação (tabela 6). Por outro lado, como esperado, as taxas de recombinação nos demais locos foram extremamente baixas, praticamente nulas, exceto para o segmento autossômico *CHRNA1*, que apresentou um valor ligeiramente maior.

## Análises de miscigenação

Para estimar a contribuição genética das espécies parentais aos genótipos multilocos e haplótipos inferidos de cada indivíduo, ou seja, estimar as proporções individuais de miscigenação, os dados de sequência e de microssatélites foram analisados conjuntamente

utilizando o método Bayesiano implementado no programa STRUCTURE. A primeira análise envolveu todas as amostras de *L. tigrinus* (n=36), *L. geoffroyi* (n=32) e *L. colocolo* (n=6) utilizando os marcadores de sequência ligados ao X e autossômicos e o modelo de locos ligados (Falush *et al.* 2003). Assumindo  $K = 4$ , devido às evidências de uma população de *L. tigrinus* do CNE geneticamente distinta, observamos que cada espécie foi associada predominantemente a um dos quatro *clusters*, apresentando valores de associação relativamente altos. Enquanto a população de *L. colocolo* foi atribuída ao *cluster* 2 com uma proporção de alocação maior do que 0.90 ( $Q_2 = 0.980$ ), as populações de *L. tigrinus* SSE e *L. geoffroyi* foram designadas aos *clusters* 3 e 4 com proporções de  $Q_3 = 0.890$  e  $Q_4 = 0.708$ , respectivamente. Além do *cluster* 4, a população de *L. geoffroyi* foi também associada ao *cluster* 3 (*L. tigrinus* SSE) com uma proporção relativamente alta de  $Q_3 = 0.256$ , porém, a população de *L. tigrinus* SSE foi apenas levemente associada ao *cluster* 4 (*L. geoffroyi*) com  $Q_4 = 0.061$ . Finalmente, todos os espécimes de *L. tigrinus* da região CNE foram associados ao *cluster* 1 ( $Q_1 = 0.973$ ), referente à sua população de origem, sugerindo que esses indivíduos realmente são geneticamente distintos dos animais das regiões SSE, como já havia sido observado nas redes de haplótipos.

Na análise em nível de indivíduo, dezenove exemplares de *L. geoffroyi* foram atribuídos ao *cluster* 4 (grupo de *L. geoffroyi*) com  $q_4 \geq 0.90$  (tabela 7). Desses, seis (bLge 01, 31, 33, 35, 74, 90) eram previamente considerados como sendo híbridos (com base em outros marcadores); no entanto, esses segmentos nucleares os identificaram como indivíduos puros. Dentre os indivíduos morfológicamente identificados como *L. geoffroyi*, cinco (bLge 02, 04, 10, 13, 42) cujas análises de *network* indicaram introgressão genética apresentaram altos valores de associação ao grupo de *L. tigrinus* SSE com proporção de  $q_3 > 0.90$  indicando uma ancestralidade nesta população. Além destes, dois (bLge 05, 08) apresentaram ainda valores altos de  $q$  na população de *L. tigrinus* SSE, no entanto, menores que 0.90 ( $q_3 = 0.897$  e  $0.858$ ) e seis foram associados com valores intermediários ao grupo de *L. geoffroyi* ( $q_4$  entre 0.235 e 0.893). Assumindo um valor  $q$  de 0.90 como o limite aceitável para distinguir indivíduos puros de híbridos, como tem sido proposto em estudos similares de hibridação (Flamand *et al.* 2003, Lancaster *et al.* 2006, Vähä and Primmer 2006) podemos considerar, segundo os marcadores utilizados, um total de 13 *L. geoffroyi* híbridos em nossa amostra, todos procedentes do estado do RS.

Avaliando as associações de *L. tigrinus* SSE, foram observados 24 indivíduos com valor de  $q_3 \geq 0.90$  (tabela 7), sendo que 10 deles haviam sido identificados previamente como híbridos. Dos indivíduos com  $q < 0.90$ , quatro (bLti 46, 80, 106, 121) apresentaram

proporções consideravelmente altas de associação ao grupo de *L. tigrinus* (com  $q_3$  variando de 0.898 a 0.835) e dois indivíduos (bLti 68, 79) apresentaram maior associação ao *cluster* 4 (*L. geoffroyi*), que correspondem a indivíduos que já indicaram apresentar introgressão em análises anteriores. De acordo com esses resultados, foi possível identificar cerca de 30.6% (19/62) da amostra total de *L. geoffroyi* e *L. tigrinus* como híbridos entre essas duas espécies.

A análise seguinte foi realizada com os 11 locos de microssatélites não ligados já analisados previamente por Trigo *et al.* (em preparação), a fim de comparar os valores de associação obtidos para estes marcadores com os valores obtidos para os marcadores descritos no presente trabalho e assim, avaliar o poder de cada conjunto de marcadores em identificar indivíduos híbridos independentemente. Como resultado desta primeira análise utilizando  $K = 4$ , pudemos verificar que os locos de microssatélite foram muito menos eficientes do que os demais marcadores analisados aqui na associação dos indivíduos, onde nenhuma das amostras foi fortemente associada a nenhum dos quatro *clusters* inferidos, com exceção da população de *L. colocolo* que apresentou um valor médio de  $Q_4 = 0.900$ . Segundo Pritchard *et al.* 2007, se uma população é muito divergente das demais, a associação dos indivíduos pode ser imprecisa e a análise pode ser melhorada removendo aquela população. Dessa forma, todos os indivíduos de *L. colocolo* e *L. tigrinus* CNE foram excluídos e cada espécie foi associada a um *cluster* com proporções relativamente altas (*L. geoffroyi*  $Q_1 = 0.745$  e *L. tigrinus* SSE  $Q_2 = 0.753$ ). Com  $K = 2$  e utilizando o modelo de locos não ligados, 16 indivíduos de *L. geoffroyi* apresentaram  $q_1 \geq 0.90$ , tendo 13 destes apresentado também valores  $> 0.90$  na análise anterior com os segmentos do cromossomo X e autossomos e o modelo de locos ligados (tabela 7). Dentre os indivíduos com probabilidade  $< 0.90$ , 87.5% (14/16) eram provenientes do estado do RS.

Em relação às associações de *L. tigrinus* SSE, foram observados 13 indivíduos com  $q_2 \geq 0.90$  e 17 com  $q_2 < 0.90$ , sendo que, neste último caso, um deles (o híbrido bLti 121) foi altamente associado ao grupo de *L. geoffroyi* ( $q_1 = 0.909$ ). Do total de indivíduos morfologicamente *L. tigrinus* e associados a esta população com valores  $< 0.90$ , apenas três (bLti 87, 89, 96) corresponderam a indivíduos procedentes dos estados de São Paulo, Paraná e Espírito Santo, respectivamente, enquanto o restante (14/17; 82.3%) foram provenientes do estado do RS.

Comparando-se as duas diferentes análises realizadas com o programa STRUCTURE com diferentes conjuntos de marcadores moleculares, podemos verificar vários casos de congruência na detecção de híbridos (ver tabela 7). A maioria dos indivíduos identificados através dos marcadores de sequência foi também identificada por meio da análise utilizando

os locos de microssatélites, no entanto, estes últimos detectaram um número levemente maior de híbridos.

O próximo passo das análises foi investigar se a combinação dos diferentes marcadores moleculares poderia melhorar a identificação de prováveis híbridos. Sendo assim, os marcadores de sequência foram combinados aos microssatélites envolvendo todos os indivíduos ( $n = 74$ ) em uma análise no programa STRUCTURE com o modelo de locos ligados. Nesta análise, as três espécies foram predominantemente associadas a um dos quatro *clusters*, com proporções consideravelmente altas [*L. geoffroyi*: *cluster 1* ( $Q1 = 0.612$ ), *L. colocolo*: *cluster 3* ( $Q3 = 0.938$ ), *L. tigrinus* SSE: *cluster 4* ( $Q4 = 0.775$ )] e *L. tigrinus* CNE: *cluster 2* ( $Q2 = 0.862$ ). Além do *cluster 1*, *L. geoffroyi* foi associado ao *cluster 4* (*L. tigrinus* SSE) com uma proporção de  $Q4 = 0.255$ , enquanto a população de *L. tigrinus* SSE também foi associada ao *cluster 1*, com  $Q1 = 0.120$ . Dentre as 32 amostras de *L. geoffroyi*, somente cinco apresentaram  $q1 \geq 0.90$  (tabela 8) das quais três eram provenientes de áreas distantes do estado do RS. Dezoito indivíduos com  $q < 0.90$  para qualquer grupo apresentaram valores de  $q$  intermediários entre os *clusters 1* (*L. geoffroyi*) e *4* (*L. tigrinus* SSE), sendo 17 de origem gaúcha, e outros sete *L. geoffroyi* revelaram associação com os *L. tigrinus* do CNE. Curiosamente, um indivíduo (bLge 52) da Argentina teve parte do seu genoma associado à população de *L. colocolo*. Dos 30 *L. tigrinus* do SSE, nove foram associados ao *cluster 4* (*L. tigrinus* SSE) com  $q4 \geq 0.90$ , e 21 apresentaram valores  $< 0.90$  de associação à sua população fonte. Destes, apesar dos valores menores que 0.90, dez apresentaram ainda altas probabilidades de pertencer ao *cluster* de *L. tigrinus* SSE com  $q$  variando de 0.899 a 0.805 e quatro apresentaram o segundo maior valor de associação à população de *L. tigrinus* do CNE. Do total de indivíduos morfologicamente *L. tigrinus* com associação menor que 0.90 a qualquer grupo, cerca de 81% (17/21) eram procedentes do estado do RS. Considerando-se as duas outras populações remanescentes, todos os indivíduos de *L. colocolo* foram associados ao *cluster 3* com  $q3 \geq 0.90$  e, dentre os *L. tigrinus* CNE, três mostraram  $q2 \geq 0.90$  de associação à sua população fonte e os três restantes apresentaram valores  $< 0.9$ , mas sem alta associação com qualquer outro *cluster*.

Embora *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* sejam consideradas duas espécies distintas, foi detectado um alto nível de miscigenação entre elas, com cerca de 77.4% (48/62) dos indivíduos apresentando uma origem híbrida. Em sua maioria a origem geográfica destas amostras foi concordante com a área de contato entre as duas espécies. Além disso, a combinação dos diferentes tipos de marcadores moleculares utilizados parece aumentar a

capacidade de detecção de híbridos, pois alguns indivíduos apresentaram evidência de hibridação apenas na análise conjunta dos dados.

### Taxas de migração

Estimativas da taxa de migração entre populações e entre locos foram calculadas com o programa LAMARC para os locos ligados ao X e autossomos. As médias entre as múltiplas análises Bayesianas foram usadas para gerar as estimativas finais. Uma primeira análise foi realizada para as três espécies revelando um padrão de fluxo gênico bidirecional e assimétrico entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* em todos os marcadores quando analisados independentemente; entretanto, as taxas de migração para o conjunto total de marcadores demonstraram uma tendência à simetria entre as espécies. Visto que os *L. tigrinus* do CNE foram identificados como sendo geneticamente distintos, uma segunda análise foi realizada incluindo estes animais como uma quarta população (*L. tigrinus* SSE, *L. tigrinus* CNE, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*) a fim de verificar se esta subdivisão afetaria os resultados das análises de fluxo gênico, especialmente no que tange à simetria do processo de introgressão no sul do Brasil. Os resultados foram semelhantes ao primeiro conjunto de análises no que se refere ao fluxo gênico entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, e permitiram algumas inferências adicionais. Portanto, são apresentados aqui sob a forma de tabela somente os resultados da segunda série, que inclui as quatro populações distintas. As maiores taxas de migração foram detectadas entre *L. tigrinus* SSE e *L. geoffroyi* revelando um fluxo gênico assimétrico entre as espécies para vários dos marcadores quando analisados individualmente. Observou-se também considerável heterogeneidade nas estimativas de fluxo gênico entre os marcadores, sendo consistentemente maior para o segmento *CHRNA1* (tabela 9). A direção da introgressão de *L. tigrinus* para *L. geoffroyi* foi inferida na maioria dos marcadores como visualizado nas análises de *network*, com exceção do *BTK* e *BGN* que mostraram maiores valores de introgressão na direção oposta e do intron 5 do *PLP1* que revelou valores simétricos. Apesar desta tendência observada em algumas análises, um fluxo gênico essencialmente simétrico foi indicado pela aplicação combinada dos marcadores (ver tabela 9 coluna "ALL"). A estimativa mínima (de 0,19 migrantes por geração) foi constatada no quinto intron do *PLP1* e os intervalos de confiança, bastante amplos, se sobrepuseram entre os segmentos. Para os demais pares de populações, as taxas de migração foram baixas a nulas, sugerindo que a ocorrência de fluxo gênico detectada por estes marcadores está restrita ao par *L. tigrinus* SSE e *L. geoffroyi*, em consenso com resultados prévios (Trigo *et al.*, em preparação). Uma observação

adicional e interessante foi que o fluxo gênico entre as populações SSE e CNE de *L. tigrinus* foi também extremamente baixo, sugerindo que a conectividade genética entre estes conjuntos de indivíduos seja também essencialmente nula.

## **Discussão**

### Padrões de hibridação e introgressão entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*

Este estudo apresenta uma das primeiras utilizações de múltiplos locos nucleares ligados ao cromossomo X, associados a microssatélites e introns autossômicos para investigar eventos de hibridação na natureza. A combinação desses marcadores (com diferentes propriedades mutacionais e demográficas) auxiliou na caracterização dos complexos padrões de hibridação e de introgressão entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* na sua região de contato geográfico no Estado do Rio Grande do Sul.

Uma limitação da utilização desses marcadores nucleares é a dificuldade de se inferir se o compartilhamento de haplótipos é ancestral ou devido à hibridação. Apesar de os SNPs reduzirem o problema da homoplasia geralmente verificado em microssatélites, os haplótipos inferidos incorporando vários SNPs apresentaram pouquíssimas diferenças entre si, o que dificulta inferir se são realmente haplótipos espécie-específicos.

Apesar da dificuldade em se estabelecer a ancestralidade dos haplótipos de forma definitiva, a estrutura dos *networks* sugere que o compartilhamento de sequências entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* em grande parte dos marcadores analisados está principalmente associado a um fluxo gênico secundário, ou seja, posterior ao evento de divergência entre as espécies. Em um cenário onde duas espécies que divergiram isoladamente acabem entrando em contato secundário e, posteriormente, consigam estabelecer cruzamentos interespecíficos (como se acredita atualmente ser o caso de *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*), a ocorrência de compartilhamento apenas, ou predominantemente, nas áreas próximas ao contato seria esperada. Por outro lado, um compartilhamento por ancestralidade seria esperado ao longo de toda a distribuição das espécies em questão. Dessa maneira, o compartilhamento detectado aqui, predominantemente, registrado nas populações de ambas as espécies provenientes da região de contato no estado do RS constitui uma forte evidência do resultado de eventos de hibridação e introgressão entre estas espécies.

Considerando esta hipótese como a mais plausível, a introgressão de segmentos genômicos foi detectada em ambas as espécies para todos os marcadores, confirmando a bidirecionalidade do fluxo gênico entre elas. Além disso, as taxas de introgressão foram

consideravelmente maiores de *L. tigrinus* para *L. geoffroyi* do que na direção oposta, sugerindo uma assimetria na magnitude da introgressão, o que pode ser verificado pelo maior número de indivíduos fenotipicamente identificados como *L. geoffroyi* mostrando alguma evidência de hibridação com *L. tigrinus* do que o inverso (fig. 3 A-H e tabelas 4 e 5). Porém, as estimativas das taxas de migração realizadas com o programa LAMARC não indicaram exatamente o mesmo padrão. Enquanto uma assimetria foi demonstrada para a maioria das regiões genômicas separadamente, com exceção do intron 5 do gene *PLP1*, um fluxo gênico bastante simétrico foi sugerido pela análise conjunta dos marcadores. Este resultado foi bastante inesperado, uma vez que a análise foi realizada basicamente com marcadores ligados entre si, com exceção dos dois locos autossômicos. Considerando que marcadores proximamente ligados representam uma única unidade cromossômica, as pressões de seleção atuam nesta região como um todo (Zhang and Hewitt 2003). Assim, esperar-se-ia que os padrões de introgressão observados individualmente para cada um dos locos fossem semelhantes aos locos quando conjuntamente analisados, o que não foi o caso. Um padrão similar pode ser observado em estudos prévios (Trigo *et al.*, em preparação) baseado no segundo intron do *PLP1*, o mesmo aqui utilizado. Ao comparar-se a proporção de indivíduos com introgressão de haplótipos através de análises de *network* com as estimativas das taxas de migração inferidas com o programa LAMARC (ver tabela 1 em Apêndice), a mesma discrepância é observada, ou seja, a rede de haplótipos claramente revela uma assimetria no fluxo gênico entre as espécies, ao passo que valores próximos da simetria são demonstrados através da análise do LAMARC. Ao mesmo tempo, observa-se que os intervalos de credibilidade obtidos foram extremamente amplos, de forma que não é possível inferir de forma conclusiva com relação ao padrão de simetria deste processo empregando estes dados e esta abordagem probabilística. Análises adicionais empregando o programa LAMARC, em que diferentes parâmetros da busca sejam variados, e possivelmente requerendo uma quantidade maior de dados, serão necessárias para caracterizar de forma mais definitiva a simetria do fluxo gênico nesta zona híbrida.

Quanto à identificação de indivíduos híbridos pelos marcadores analisados, tivemos todos os possíveis híbridos apresentando introgressão de haplótipos para locos ligados corroborados pela análise combinada de marcadores com valores de “q” intermediários ou com maior associação ao *cluster* não representativo da sua população. Porém, esta última análise detectou um número notavelmente maior, confirmando o maior poder de múltiplos locos ligados e não-ligados em estimar níveis de miscigenação individual principalmente no caso de eventos mais antigos. Esta abordagem é dificultada em estudos de hibridação

utilizando apenas marcadores não-ligados, pois se espera que o desequilíbrio de ligação entre estes decline rapidamente, levando os sinais de miscigenação a desaparecer em poucas gerações (Falush *et al.* 2003). Em populações intensamente hibridizantes de gatos selvagens e domésticos na Hungria, por exemplo, um conjunto de 27 locos ligados e não-ligados demonstrou uma maior eficiência na identificação de híbridos quando comparada às análises realizadas somente com locos ligados (Lecis *et al.* 2006).

Considerando a evidência combinada de marcadores, 48 indivíduos puderam ser identificados como possíveis híbridos entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* (assumindo  $q = 0.9$  como limite), dos quais 38 eram provenientes do Estado do RS. Todos os indivíduos assumidos previamente como sendo híbridos e selecionados como tal para inclusão neste estudo (ver tabela 1) compreendem os mesmos híbridos detectados nesta análise, com exceção de apenas dois *L. geoffroyi* (bLge31 e bLge33; ver tabela 7 e 8) confirmando a origem híbrida destes indivíduos identificada paralelamente por outros marcadores moleculares (Trigo *et al.*, em preparação). No entanto, a indicação de que esses dois indivíduos apresentam uma origem pura não deve ser descartada, uma vez que segmentos do mtDNA e introns do cromossomo X e Y utilizados naquele estudo revelaram igualmente uma origem pura, sendo a ancestralidade híbrida inferida somente através dos locos de microssatélites (ver tabela 2 em Apêndice). Segundo simulações, existe uma probabilidade de erro nas associações dos microssatélites, o que poderia justificar esta identificação equívoca. Além disso, alguns indivíduos supostamente puros procedentes do RS como também de procedência mais distante foram identificados como híbridos através dos locos nucleares fornecendo a evidência de que a hibridação entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* parece ser realmente intensa e pode não estar restrita ao RS como previamente se deduzia. É possível que nenhuma ou reduzida força seletiva esteja atuando sobre esta zona híbrida promovendo sua expansão para além da estreita faixa na região central do RS. Porém, a inclusão de novos marcadores e uma amostragem mais representativa das duas espécies e da distribuição mais ao sul de *L. geoffroyi* poderá auxiliar em futuras análises para a elucidação da existência ou não de pressões seletivas.

Finalmente, nenhuma evidência clara de hibridação entre *L. geoffroyi* e *L. colocolo* foi documentada. Embora um único caso (bLge52) tenha apresentado associação parcial e simultânea a *L. geoffroyi* e *L. colocolo* de acordo com a análise conjunta de marcadores com o programa STRUCTURE (ver tabela 8), esta observação parece não apresentar muito suporte para a indicação de um possível evento de hibridação entre estas. Das três espécies analisadas neste estudo, *L. colocolo* é a mais basal, divergindo aproximadamente há 2.4 Ma a partir do ancestral comum com *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* (Johnson *et al.* 2006). Essa observação é



corroborada pelos locos nucleares ligados ao X; possivelmente, *L. geoffroyi* e *L. colocolo* desenvolveram mecanismos de isolamento reprodutivo totalmente efetivos no sentido de evitar a hibridação, dado este amplo tempo de divergência quando comparado a *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, separadas há cerca de 1 Ma (Johnson *et al.* 2006). Assim, este caso isolado provavelmente represente um artefato da análise dos microssatélites, visto que na análise dos marcadores ligados ao X e autossomos (tabela 7), este indivíduo apresentou alta associação ( $q \geq 0.9$ ) à sua respectiva população.

#### Padrões genéticos de *L. tigrinus* da região centro-nordeste do Brasil

O padrão detectado para os *L. tigrinus* provenientes da região central e nordeste do Brasil é muito interessante. As análises revelam que esses indivíduos representam, aparentemente, uma população geneticamente diferenciada dentro de nossa amostragem total, com haplótipos exclusivos para os espécimes desta região. A análise dos locos ligados ao cromossomo X (fig. 3F) demonstrou que estes indivíduos, apesar de morfologicamente serem mais relacionados a *L. tigrinus*, apresentam uma maior proximidade com *L. geoffroyi* do que com os próprios *L. tigrinus* da região SSE. Esta descoberta tem suporte em resultados prévios (Trigo *et al.*, em preparação) que demonstram, através de análises de diferenciação entre populações usando os índices de  $F_{st}$  e  $R_{st}$  com dados de microssatélites, que um menor valor de diferenciação genética foi constatado entre *L. geoffroyi* e *L. tigrinus* do CNE do que entre as duas subpopulações de *L. tigrinus* (CNE vs SSE; ver tabela 3 em Apêndice). Outra evidência dessa proximidade pode ser verificada em sete indivíduos de *L. geoffroyi* apresentando valores intermediários de associação com a população de *L. tigrinus* do CNE na análise realizada com o programa STRUCTURE (ver tabela 8). Assim, nossos dados corroboram a existência de uma população geneticamente distinta de *L. tigrinus* na região CNE. No entanto, ressalta-se a necessidade da condução de estudos mais detalhados com múltiplos marcadores moleculares e com uma amostra mais representativa de ambas as espécies, principalmente para fins de comparação das populações de *L. tigrinus* CNE com *L. geoffroyi* e populações de *L. tigrinus* do sul e sudeste brasileiros, a fim de se avaliar mais precisamente a magnitude e significado do isolamento desta população.

#### Conclusão

Os introns de genes autossômicos e do cromossomo X têm sido ainda pouco utilizados em estudos de hibridação, mas apresentam-se como importantes candidatos para futuros

projetos, como demonstram nossos resultados. A análise com múltiplos locos nucleares com suas diferentes características permitiu uma melhor compreensão de aspectos complexos das relações evolutivas entre espécies e contribuiu significativamente na identificação de híbridos e dos padrões de introgressão entre esses dois felídeos Neotropicais, podendo ser úteis também em estudos similares de outros carnívoros.

Sugere-se, baseado no conjunto de marcadores aqui estudados, que o processo de hibridação entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* é recente ou, mais provavelmente, atual. Os altos níveis de hibridação/introgressão detectados, com cerca de 78% da população total amostrada apresentando uma origem híbrida, sugerem ser esta uma das mais extensas zonas híbridas detectadas até o momento em carnívoros (Gotelli *et al.* 1994, Vilà and Wayne 1999, Beaumont *et al.* 2001, Randi *et al.* 2001, Lecis *et al.* 2006, Verardi *et al.* 2006). Desta forma, é fundamental que se dê continuidade ao estudo genético deste fenômeno, a fim de que se possa compreender de forma mais completa a origem histórica e as implicações evolutivas deste processo.

#### Implicações para a conservação

Os processos de hibridação são de especial interesse se eles envolvem populações ameaçadas e têm implicações para sua proteção legal (O' Brien & Mayr 1991). Determinar se as causas da hibridação são naturais ou antropogênicas é crucial para o manejo e conservação das espécies. Em geral, têm-se recomendado que para híbridos procedentes de causas naturais seja dado o *status* de proteção quando necessário (Allendorf *et al.* 2001). Por outro lado, híbridos causados por processos antropogênicos devem ser monitorados como uma potencial ameaça à integridade de biotas locais.

Atualmente, *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* constam em inúmeras listas internacionais, nacionais e regionais de espécies selvagens ameaçadas de extinção (IUCN/SSC Cat Specialist Group 2002, IBAMA 2003 e Marques *et al.* 2002). Estudos abordando aspectos da biologia, ecologia, genética e história natural são extremamente importantes, uma vez que proporcionam uma quantidade de informações suficientes para a elaboração de estratégias adequadas de manejo e conservação destas espécies. Os resultados obtidos neste estudo apresentam contribuições relevantes neste sentido, ao caracterizar populações geneticamente diferenciadas em *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, que devem ser consideradas em eventos de introdução, translocação ou reprodução em cativeiro. Essas unidades genéticas devem ser consideradas do ponto de vista de manejo, de modo a manter a estrutura genética observada

na natureza sendo, assim, condizente com as histórias evolutivas das espécies envolvidas. Neste contexto, a reprodução de indivíduos provenientes de áreas onde a hibridação tem sido detectada com indivíduos de áreas mais distantes pode acentuar os efeitos de hibridação e introgressão podendo provocar a erosão da integridade genética. Da mesma forma, os indivíduos de *L. tigrinus* do CNE devem ser protegidos e manejados independentemente por serem considerados uma população geneticamente diferenciada das demais regiões do Brasil, como sugerem as análises.

Nesta perspectiva, os resultados obtidos podem servir de embasamento para o correto monitoramento, manejo e proteção das espécies envolvidas em processos de hibridação.

### **Agradecimentos**

Agradecemos a todas as instituições listadas na Tabela 1, que forneceram as amostras biológicas usadas neste estudo; a Paulo Bomfim Chaves e William J. Murphy por fornecerem alguns dos *primers* empregados nas análises; e ao Fundo Nacional do Meio Ambiente (FNMA), CAPES e CNPq pelo suporte financeiro provido a este projeto.

Tabela 1. Lista dos indivíduos analisados no presente estudo. As identificações de puro e híbrido utilizadas são de Trigo *et al.* (em preparação) com base na análise conjunta de locos de microssatélite, mtDNA e introns do cromossomo X e Y.

	Amostra	Sexo	Procedência geográfica		Instituição/coletor
			Estado/País	Município	
<b><i>L. geoffroyi</i></b>					
PUROS	bLge 28	M	RS – Brasil	Camaquã	Animal atropelado
	bLge 36	F	RS – Brasil	Taim	Animal atropelado
	bLge 37	F	RS – Brasil	São Lourenço do Sul	Animal atropelado
	bLge 41	M	RS – Brasil	Itaqui	FZB-RS
	bLge 71	F	RS – Brasil	Pelotas	Animal atropelado
	bLge 09	F	Argentina	-	Zôo Córdoba
	bLge 52	M	Argentina	Prov. Catamarca	Zôo Córdoba
	bLge 20	M	Uruguai	-	Museo de Cienc. Nat. Montevideo
	bLge 62	F	Bolívia	-	Zôo de Santa Cruz
	bLge 64	M	Bolívia	Dept. Santa Cruz	Zôo de Santa Cruz
	bLge 82	M	Bolívia	-	-
	bLge 85	M	Bolívia	-	-
	bLge 86	M	Bolívia	-	-
	bLge 87	M	Bolívia	-	-
HÍBRIDOS	bLge 01	M	RS - Brasil	Santa Cruz do Sul	Zôo Sapucaia do Sul
	bLge 02	M	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Zôo Cachoeira do Sul
	bLge 04	M	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Zôo Cachoeira do Sul
	bLge 05	M	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Zôo Cachoeira do Sul
	bLge 08	M	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Animal atropelado
	bLge 10	F	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Animal atropelado
	bLge 11	M	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Animal atropelado
	bLge 13	M	RS - Brasil	Eldorado do Sul	Animal atropelado
	bLge 31	M	RS - Brasil	Quaraí	Zôo Sapucaia do Sul
	bLge 32	M	RS - Brasil	Pântano Grande	Capturado por fazendeiros
	bLge 33	M	RS - Brasil	Rosário do Sul/Alegrete	Animal atropelado
	bLge 35	M	RS - Brasil	Taim	Animal atropelado
	bLge 38	F	RS - Brasil	Santa Maria/São Sepé	Animal atropelado
	bLge 42	M	RS - Brasil	Barra do Ribeiro	Animal atropelado
	bLge 46	M	RS - Brasil	Canela	Zôo Sapucaia do Sul
	bLge 74	F	RS - Brasil	Pinheiro Machado	Animal atropelado
	bLge 76	M	RS - Brasil	Arroio Grande	Morto por fazendeiros
	bLge 90	M	RS - Brasil	São Gabriel	Animal atropelado
	<b><i>L. tigrinus</i></b>				
PUROS	bLti 46	M	RS - Brasil	Garibaldi	Zôo Particular M. Forestier
	bLti 94	M	RS - Brasil	Ibarama	Abatido por caçadores
	bLti 106	M	RS - Brasil	Santa Cruz do Sul	Criadouro Morro Reuter
	bLti 124	M	RS - Brasil	Arroio do Meio	Animal atropelado
	bLti 132	M	RS - Brasil	Rolante	Animal atropelado
	bLti 56	M	São Paulo - Brasil	Piracicaba	Zôo de Piracicaba
	bLti 59	F	São Paulo - Brasil	Mogi Guaçú	Zôo de São Bernardo do Campo
	bLti 61	M	São Paulo - Brasil	São Carlos	Associação Mata Ciliar
	bLti 62	M	São Paulo - Brasil	Campinas	Associação Mata Ciliar
	bLti 71	M	São Paulo - Brasil	Sorocaba	Zôo de Sorocaba
	bLti 75	F	São Paulo - Brasil	-	Zôo de Bauru
	bLti 76	M	São Paulo - Brasil	Pedreira	Zôo de Pedreira
	bLti 87	M	São Paulo - Brasil	Mogi Mirim	Associação Mata Ciliar

HÍBRIDOS	bLti 89	M	Paraná - Brasil	Pato Branco	Zôo de Cascavel
	bLti 96	M	Goiás - Brasil	Água Boa	Animal atropelado
	bLti 97	M	Espírito Santo - Brasil	Domingos Martins	Associação Pró-Carnívoros
	bLti 01	F	RS - Brasil	Triunfo	Animal atropelado
	bLti 09	F	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Zôo Sapucaia do Sul
	bLti 49	F	RS - Brasil	Guaíba	Animal atropelado
	bLti 68	M	RS - Brasil	Montenegro	Animal atropelado
	bLti 79	F	RS - Brasil	Eldorado do Sul	Animal atropelado
	bLti 80	M	RS - Brasil	Glorinha	Animal atropelado
	bLti 98	F	RS - Brasil	Restinga Seca	Animal atropelado
	bLti 102	F	RS - Brasil	Erechim	Zôo Sapucaia do Sul
	bLti 108	M	RS - Brasil	Santa Maria	Criadouro Morro Reuter
	bLti 113	M	RS - Brasil	Getúlio Vargas	Capturado por fazendeiros
	bLti 119	M	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Zôo Cachoeira do Sul
	bLti 120	M	RS - Brasil	Cachoeira do Sul	Zôo Cachoeira do Sul
	bLti 121	M	RS - Brasil	Triunfo	Zôo Sapucaia do Sul
	bLti 135	F	RS - Brasil	Estância Velha	Zôo Sapucaia do Sul
	bLti 85	M	Goiás - Brasil	Goiânia	Zôo de Goiânia
	bLti 107	F	Piauí - Brasil	-	Criadouro Morro Reuter
	bLti 118	F	Piauí - Brasil	-	Associação Pró-Carnívoros
	bLti 130	M	Piauí - Brasil	-	Animal atropelado
	bLti 152	M	Piauí - Brasil	-	Associação Pró-Carnívoros
	bLti 151	M	Ceará - Brasil	-	Associação Pró-Carnívoros
<b><i>L. colocolo</i></b>					
PUROS	Lco 07	M	Argentina	-	NCI-USA
	Lco 09	F	Uruguai	-	NCI-USA
	Lco 13	M	Goiás - Brasil	-	NCI-USA
	bLco 303*	M	Goiás - Brasil	Parque Nacional das Emas	Leandro Silveira/Anah Jacomo
	bLco 310*	M	Goiás - Brasil	Parque Nacional das Emas	Leandro Silveira/Anah Jacomo
bLco 317*	M	Goiás - Brasil	Parque Nacional das Emas	Leandro Silveira/Anah Jacomo	

O asterisco (\*) indica as amostras não incluídas em estudos prévios.

Tabela 2. Condições de amplificação de PCR para cada um dos segmentos utilizados no estudo.

Segmento	Desnat. Inicial	Desnat.	Anelamento	Extensão	Nº ciclos	Extensão Final
<i>ATP7A, BTK, PLP1 I2, SILV, CHRNA1</i>	94° por 3'	94° por 45"	60° - 50° por 45"	72° por 1'30"	10	
		94° por 45"	50° por 45"	72° por 1'30"	30	72° por 15'
<i>PLP1 I5</i>	94° por 3'	94° por 45"	60° - 55° por 45"	72° por 2'	5	
		94° por 45"	55° por 45"	72° por 2'	35	72° por 15'
<i>BGN</i>	94° por 3'	94° por 45"	65° - 55° por 45"	72° por 1'30"	10	
		94° por 45"	55° por 45"	72° por 1'30"	30	72° por 15'

Tabela 3. Diversidade gênica (haplotípica) e nucleotídica estimada para cada um dos segmentos nucleares analisados nas amostras das três espécies *Leopardus tigrinus*, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*.

Segmento	N*	Nº Hap	Nº Sítios Polimórficos	Divers. Gênica	Divers. Nucleotídica
<i>ATP7A</i>	91	4	3	0.620	0.00238
<i>BTK</i>	91	6	5	0.653	0.00214
<i>PLP1 I2</i>	87	8	9	0.749	0.00189
<i>PLP1 I5</i>	92	5	8	0.631	0.00356
<i>BGN</i>	87	15	12	0.811	0.00694
X concatenado	80	29	37	0.921	0.00300
<i>CHRNA1</i>	148	13	9	0.712	0.00430
<i>SILV</i>	148	3	2	0.554	0.00206

N\*: Número de cromossomos analisados em cada segmento nuclear para as três espécies.

Tabela 4. Cromossomos encontrados em cada um dos haplótipos analisados com o programa NETWORK para cada segmento nuclear caracterizado, com sua respectiva origem geográfica. Os indivíduos heterozigóticos foram sublinhados e os indivíduos híbridos estão em negrito.

Haplótipos	Cromossomos	Origem geográfica
<b><i>ATP7A</i></b>		
H1	bLge28, bLge36, bLge37, bLge41, bLge71, <b>bLge 01, bLge11, bLge31, bLge33, bLge35, bLge38, bLge74, bLge76, bLge90, bLti68, <u>bLti79</u></b> bLge09, bLge20, bLge52, bLge62, bLge64, bLge85, bLge86, bLge87 Lco07, Lco09, Lco13, bLco303, bLco310, bLco317	RS ARG/BOL/URU GO/ARG/URU
H2	<b>bLti 01, bLti09, bLti49, <u>bLti79</u>, bLti80, bLti98, bLti102, bLti108, bLti113, bLti120, bLti121, bLti135,</b> bLti46, bLti94, bLti106, bLti124, bLti132, <b>bLge 02, bLge04, bLge05, bLge08, <u>bLge10</u>, bLge13, bLge32, bLge42</b> bLti56, <u>bLti59</u> , bLti62, bLti71, bLti75, bLti76, bLti87, bLti89, bLti97	RS SP/PR/ES/
H3	<b><u>bLge10</u></b> <u>bLti59</u> , bLti61, bLti96	RS SP/GO
H4	bLti85, bLti107, bLti118, bLti130, bLti151, bLti152	GO/CE/PI
<b><i>BTK</i></b>		
H1	<b>bLge 01, bLge11, bLge31, bLge33, bLge35, bLge38, bLge46, bLge74, bLge76, bLge90, bLge28, bLge36, bLge37,</b> bLge41, bLge71, <b>bLti68, <u>bLti79</u></b> bLge09, bLge20, bLge52, bLge64, bLge85, bLge86, bLge87	RS ARG/BOL/URU
H2	<b>bLti01, bLti09, bLti49, <u>bLti79</u>, bLti80, bLti98, bLti102, bLti108, bLti113, bLti119, bLti120, bLti121, bLti135</b> bLti46, bLti94, bLti106, bLti124, bLti132, <b>bLge02, bLge04, bLge05, bLge08, bLge10, bLge13, bLge32, bLge42</b> bLti56, bLti59, bLti62, bLti71, bLti75, bLti76, bLti87, bLti89, bLti96	RS SP/PR/GO
H3	bLti61, bLti97	SP/ES
H4	bLti85, bLti107, bLti118, bLti130, bLti151, bLti152	GO/CE/PI
H5	Lco07, Lco13, bLco303, bLco310, bLco317	GO/ARG
H6	Lco09	URU



**PLPI I2**

H1	<b>bLge01, bLge11, bLge31, bLge33, bLge35, bLge38, bLge74, bLge76, bLge90, bLge36, bLge37, bLge41, bLge71</b> <b>bLti 68, bLti79</b> bLge09, bLge20, bLge52, <u>bLge62</u> , bLge64, bLge85, bLge86, bLge87	RS ARG/BOL/URU
H2	<b>bLti01, <u>bLti09</u>, bLti49, bLti80, bLti98, bLti102, bLti108, bLti113, bLti120</b> , bLti 46, bLti94, bLti106, bLti124, bLti132 <b>bLge02, bLge04, bLge05, bLge08, bLge13, bLge32, bLge42</b> <u>bLti59</u> , bLti71, bLti76	RS SP
H3	<b><u>bLti09</u>, <u>bLti79</u>, bLti121, bLti135, bLge10</b> bLti56, <u>bLti59</u> , bLti61, bLti62, bLti75, bLti87, bLti89, bLti96, bLti97	RS SP/PR/ES/GO
H4	bLge28, <b>bLge46</b> <u>bLge62</u>	RS BOL
H5	bLti85, bLti107, bLti118, bLti130	GO/PI
H6	Lco07	ARG
H7	Lco09	URU
H8	Lco13	GO

**PLPI I5**

H1	<b>bLge01, bLge11, bLge31, bLge33, bLge35, bLge38, bLge46, bLge74, bLge76, bLge90, bLge28, bLge36, bLge37,</b> bLge41, bLge71, <b>bLti68</b> bLge09, bLge20, bLge52, bLge62, bLge64, bLge85, bLge86, bLge87	RS ARG/BOL/URU
H2	<b>bLti01, bLti09, bLti49, bLti79, bLti80, bLti98, bLti102, bLti108, bLti113, bLti120, bLti121, bLti135, bLti46,</b> bLti94, bLti106, bLti124, bLti132, <b>bLge02, bLge04, bLge05, bLge08, bLge10, bLge13, bLge32, bLge42</b> bLti56, bLti59, bLti61, bLti62, bLti71, bLti75, bLti76, bLti87, bLti89, bLti96, bLti97	RS SP/PR/ES/GO
H3	bLti85, bLti107, bLti118, bLti130, bLti151, bLti152	GO/CE/PI
H4	Lco07	ARG
H5	Lco09, Lco13, bLco303, bLco310, bLco317	URU/GO

**BGN**

H1	<b>bLge01</b>	RS
H2	<b>bLti01, bLti98, bLti102, bLti108, bLti120, bLti135, bLti94, bLti106, bLti124, bLti132, bLge02, bLge08, bLge10, bLge13, bLge41</b> bLti56, bLti59, bLti61, bLti62, bLti71, bLti75, bLti87, bLti89, bLti96	RS SP/PR/GO
H3	<b>bLge04, bLge11, bLge32, bLge35, <u>bLge74</u>, bLge76, bLge28, bLge37, bLti46, <u>bLti09</u>, <u>bLti49</u>, bLti79</b>	RS
H4	<b>bLge05, bLge31, bLge38, bLge36, bLti121</b> bLge09, bLge20, bLge52, bLge62	RS ARG/BOL/URU
H5	<b>bLge33, <u>bLge71</u></b>	RS
H6	<b>bLge42</b>	RS
H7	<u>bLge71</u>	RS
H8	<b><u>bLge74</u>, <u>bLti09</u></b>	RS
H9	bLge85	BOL
H10	bLge87	BOL
H11	bLti85, bLti107, bLti118, bLti130, bLti151, bLti152, <b><u>bLti49</u>, bLti68, bLti113</b>	RS/GO/CE/PI
H12	bLti76	SP
H13	bLti97	ES
H14	Lco07, Lco09, Lco13, bLco303, bLco310	GO/ARG/URU
H15	bLco317	GO

**X concatenado**

H1	<b>bLge01</b>	RS
H2	<b>bLti 01, bLti98, bLti102, bLti108, bLti120, bLti94, bLti106, bLti124, bLti132, bLge02, bLge08, bLge13</b> <u>bLti59, bLti71</u>	RS SP
H3	<b>bLge04, bLge32, bLti46, <u>bLti49</u></b>	RS
H4	<b>bLge05</b>	RS
H5	bLge09, bLge20, bLge36, bLge52, <b>bLge31, bLge38</b>	RS/ARG/URU
H6	<b><u>bLge10</u>, bLti135</b>	RS

	bLti56, bLti62, bLti75, bLti87, bLti89	SP/PR
H7	<b><u>bLge10</u></b> , <u>bLti59</u> , bLti96	RS/SP/GO
H8	<b>bLge11, bLge35, bLge37, <u>bLge74</u>, bLge76</b>	RS
H9	bLge28	RS
H10	<b>bLge33, bLge71</b>	RS
H11	bLge41	RS
H12	<b>bLge42</b>	RS
H13	<u>bLge71</u>	RS
H14	<b><u>bLge74</u></b>	RS
H15	bLge85	BOL
H16	bLge87	BOL
H17	<b><u>bLti09, bLti79</u></b>	RS
H18	<b><u>bLti09</u></b>	RS
H19	<b><u>bLti49, bLti113</u></b>	RS
H20	bLti61	SP
H21	<b>bLti68</b>	RS
H22	bLti76	SP
H23	<b><u>bLti79</u></b>	RS
H24	bLti85, bLti107, bLti118, bLti130	GO/PI
H25	bLti97	ES
H26	<b>bLti121</b>	RS
H27	Lco07	ARG
H28	Lco09	URU
H29	Lco13	GO
 <i>SILV</i>		
H1	<b>bLge01, <u>bLge02</u>, <u>bLge04</u>, <u>bLge05</u>, <u>bLge10</u>, bLge31, bLge32, bLge33, bLge35, <u>bLge42</u>, <u>bLge46</u>, bLge74, bLge90</b> <u>bLge 28, bLge36, bLge37, bLge41, bLge71, <u>bLti09</u>, <u>bLti49</u>, <u>bLti68</u>, bLti79, <u>bLti120</u>, <u>bLti121</u>, <u>bLti106</u></u>	RS

	bLge09, bLge20, bLge52, bLge62, bLge64, bLge82, bLge85, bLge86, bLge87, <u>bLti76</u>	SP/ARG/URU/BOL
H2	<b><u>bLti01</u></b> , <b><u>bLti09</u></b> , <b><u>bLti49</u></b> , <b><u>bLti68</u></b> , <b><u>bLti80</u></b> , <b><u>bLti98</u></b> , <b><u>bLti102</u></b> , <b><u>bLti108</u></b> , <b><u>bLti113</u></b> , <b><u>bLti119</u></b> , <b><u>bLti120</u></b> , <b><u>bLti121</u></b> , <b><u>bLti135</u></b> , bLti46, bLti94, <u>bLti106</u> , bLti124, bLti132, <b><u>bLge02</u></b> , <b><u>bLge04</u></b> , <b><u>bLge05</u></b> , bLge08, <b><u>bLge10</u></b> , <b><u>bLge11</u></b> , <b><u>bLge13</u></b> , <b><u>bLge38</u></b> , <b><u>bLge42</u></b> , <b><u>bLge46</u></b> , <b><u>bLge76</u></b> , <u>bLge28</u> , <u>bLge36</u> , <u>bLge37</u> , <u>bLge41</u>	RS
	bLti56, bLti59, bLti61, bLti62, bLti71, bLti75, <u>bLti76</u> , bLti87, bLti89, bLti96, bLti97	SP/PR/ES/GO
	bLti85, bLti107, bLti118, bLti130, bLti151, bLti152	GO/CE/PI
H3	Lco07, Lco09, Lco13, bLco303, bLco310, bLco317	GO/ARG/URU

**CHRNAI**

H1	<b><u>bLge01</u></b> , <b><u>bLge05</u></b> , <b><u>bLge08</u></b> , <b><u>bLge11</u></b> , <b><u>bLge13</u></b> , <b><u>bLge42</u></b> , <b><u>bLge46</u></b> , <b><u>bLge90</u></b> , bLge36, <u>bLge37</u> , <u>bLge41</u> , bLge71, <b><u>bLti01</u></b> , <b><u>bLti09</u></b> , bLti46, <b><u>bLti49</u></b> , <b><u>bLti68</u></b> , <b><u>bLti79</u></b> , <b><u>bLti80</u></b> , <u>bLti94</u> , bLti106, <b><u>bLti119</u></b> , <u>bLti124</u> , <u>bLti132</u> <u>bLge52</u> , <u>bLge64</u> , <u>bLge82</u> <u>bLti61</u> , <u>bLti62</u> , <u>bLti75</u> , <u>bLti76</u> , <u>bLti96</u> bLti85, bLti107, bLti118, bLti130, bLti151, bLti152	RS ARG/BOL SP/GO GO/CE/PI
H2	<b><u>bLge02</u></b> , <b><u>bLge04</u></b> , <b><u>bLge10</u></b> , <b><u>bLge11</u></b> , <b><u>bLge13</u></b> , <u>bLge28</u> , <b><u>bLge31</u></b> , <b><u>bLge32</u></b> , <b><u>bLge33</u></b> , <b><u>bLge35</u></b> , <u>bLge37</u> , <b><u>bLge38</u></b> , <u>bLge41</u> <b><u>bLge42</u></b> , <b><u>bLge74</u></b> , <b><u>bLge76</u></b> , <b><u>bLti01</u></b> , <b><u>bLti09</u></b> , <b><u>bLti49</u></b> , <b><u>bLti98</u></b> , <b><u>bLti102</u></b> , <b><u>bLti108</u></b> , <b><u>bLti113</u></b> , <b><u>bLti119</u></b> , <b><u>bLti120</u></b> , <b><u>bLti121</u></b> , <u>bLti124</u> , <u>bLti132</u> , <b><u>bLti135</u></b> bLge09, bLge20, <u>bLge52</u> , bLge62, <u>bLge64</u> , <u>bLge82</u> , <u>bLge85</u> , bLge86, <u>bLge87</u> bLti56, <u>bLti59</u> , <u>bLti62</u> , <u>bLti71</u> , <u>bLti76</u> , <u>bLti89</u> , <u>bLti97</u>	RS ARG/BOL/URU SP/PR/ES
H3	<b><u>bLge04</u></b>	RS
H4	<b><u>bLge05</u></b> , <b><u>bLge10</u></b> , bLti94 <u>bLti61</u> , bLti87, <u>bLti96</u>	RS SP/GO
H5	<u>bLge28</u>	RS
H6	<b><u>bLge32</u></b> , <b><u>bLge38</u></b> , <b><u>bLge74</u></b> , <b><u>bLge76</u></b> , <b><u>bLti98</u></b> , <b><u>bLti108</u></b> , <b><u>bLti135</u></b> <u>bLge87</u> , <u>bLti89</u> , <u>bLti97</u>	RS BOL/PR/ES
H7	<b><u>bLge35</u></b>	RS
H8	<u>bLge85</u> , <u>bLti71</u>	BOL/SP
H9	<u>bLti59</u> , <b><u>bLti113</u></b>	SP/RS

H10 **bLti79**  
H11 Lco07, Lco09, Lco13, bLco303, bLco310, bLco317  
H12 Lco09  
H13 Lco13, bLco303

RS  
GO/ARG/URU  
URU  
GO

Tabela 5. Lista dos indivíduos com seu respectivo haplótipo de locos ligados ao cromossomo X. A distribuição geográfica de cada um dos haplótipos também é indicada. Os indivíduos e haplótipos aparentemente não originais ao seu grupo fenotípico estão destacados em negrito.

Haplótipo	Indivíduos	Origem geográfica
<b>Clado <i>Leopardus tigrinus</i> SSE</b>		
<b>H2</b>	<b>bLge02, bLge13</b> , bLti 59, 94, 98, 102, 106, 120, 124, 132	RS/SP
<b>H3</b>	<b>bLge04</b> , bLti46, 49	RS
<b>H4</b>	<b>bLge05</b>	RS
<b>H5</b>	<b>bLge08</b>	RS
<b>H7</b>	<b>bLge10</b>	RS
<b>H8</b>	<b>bLge10</b>	RS
<b>H13</b>	<b>bLge42</b>	RS
H18	bLti01, 108	RS
H19	bLti09, 79	RS
H20	bLti 09	RS
H21	bLti49, 113	RS
H22	bLti56, 62, 75, 87, 89, 135	RS/PR/SP
H23	bLti59, 96	SP/GO
H24	bLti61	SP
H26	bLti71	SP
H27	bLti76	SP
H30	bLti97	ES
H31	bLti121	RS
<b>Clado <i>Leopardus geoffroyi</i></b>		
H1	bLge01	RS
H6	bLge09, 20, 31, 36, 38, 52	RS/ARG/URU
H9	bLge11, 35, 37, 74, 76	RS
H10	bLge28	RS
H11	bLge33, 71	RS
H12	bLge41	RS
H14	bLge71	RS
H15	bLge74	RS
H16	bLge85	BOL
H17	bLge87	BOL
<b>H25</b>	<b>bLti68</b>	RS
<b>H28</b>	<b>bLti79</b>	RS
<b>Clado <i>L. tigrinus</i> CNE</b>		
H29	bLti85, 107, 118, 130	GO/CE/PI
<b>Clado <i>Leopardus colocolo</i></b>		
H32	Lco07	ARG
H33	Lco09	URU
H34	Lco13	GO

Tabela 6. Taxas de recombinação estimadas para cada um dos locos nucleares utilizando o programa LAMARC. Os intervalos de credibilidade de 95% estão mostrados entre parênteses e o loco com a maior taxa está indicado em negrito.

Loco	R (taxa de recombinação)
<i>ATP7A</i>	0.00007 (0.00001 - 1.7871)
<i>BTK</i>	0.00266 (0.00001 - 1.3878)
<i>PLP1 I2</i>	0.00006 - 0.00001 - 1.5474)
<i>PLP1 I5</i>	0.00025 (0.00001 - 1.15406)
<i>BGN</i>	<b>2.9154 (0.00004 - 8.67042)</b>
<i>SILV</i>	0.00008 (0.00001 - 4.34621)
<i>CHRNA1</i>	0.76765 (0.00003 - 2.96980)
<i>ALL</i>	0.710578 (0.00003 - 1.44622)

Tabela 7. Proporção de associação dos haplótipos e/ou genótipos de cada indivíduo aos *clusters* inferidos pela análise Bayesiana do programa STRUCTURE. Estão demonstrados aqui os valores obtidos para cada uma das seguintes análises: 1) conjunto total de marcadores do tipo sequência ligados ao X e autossômicos e 2) conjunto total de locos de microsatélite avaliados previamente por Trigo *et al.* (em preparação). Cada coluna contém o valor de “q” para cada indivíduo em cada *cluster* populacional com seu respectivo intervalo de credibilidade entre parênteses. O asterisco (\*) indica os indivíduos híbridos inferidos através de estudos anteriores. Indivíduos com probabilidades < 0.90 de pertencerem a sua espécie são mostrados em negrito.

ID	Marcadores ligados ao X e Autossômicos				Microsatélites	
	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i> SSE	<i>L. colocolo</i>	<i>L. tigrinus</i> CNE	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i> SSE
bLge 01*	0.950 (0.684,1.000)	0.013 (0.000,0.072)	0.009 (0.000,0.045)	0.028 (0.000,0.209)	0.963 (0.800,1.000)	0.037 (0.000,0.200)
bLge 02*	<b>0.050 (0.000,0.392)</b>	<b>0.933 (0.566,1.000)</b>	0.007 (0.000,0.038)	0.009 (0.000,0.048)	0.920 (0.582,1.000)	0.080 (0.000,0.418)
bLge 04*	<b>0.065 (0.000,0.492)</b>	<b>0.903 (0.435,1.000)</b>	0.019 (0.000,0.128)	0.012 (0.000,0.064)	<b>0.887 (0.466,1.000)</b>	0.113 (0.000,0.534)
bLge 05*	<b>0.078 (0.000,0.493)</b>	<b>0.897 (0.460,1.000)</b>	0.008 (0.000,0.041)	0.017 (0.000,0.101)	<b>0.841 (0.290,1.000)</b>	0.159 (0.000,0.710)
bLge 08*	<b>0.013 (0.000,0.066)</b>	<b>0.858 (0.199,1.000)</b>	0.007 (0.000,0.037)	<b>0.122 (0.000,0.777)</b>	<b>0.361 (0.000,1.000)</b>	<b>0.639 (0.000,1.000)</b>
bLge 09	0.980 (0.883,1.000)	0.008 (0.000,0.041)	0.006 (0.000,0.029)	0.006 (0.000,0.028)	0.975 (0.864,1.000)	0.025 (0.000,0.136)
bLge 10*	<b>0.015 (0.000,0.093)</b>	<b>0.972 (0.832,1.000)</b>	0.006 (0.000,0.029)	0.007 (0.000,0.032)	0.956 (0.762,1.000)	0.044 (0.000,0.238)
bLge 11*	<b>0.733 (0.137,1.000)</b>	<b>0.131 (0.000,0.780)</b>	0.008 (0.000,0.041)	<b>0.128 (0.000,0.682)</b>	<b>0.378 (0.000,1.000)</b>	<b>0.622 (0.000,1.000)</b>
bLge 13*	<b>0.014 (0.000,0.073)</b>	<b>0.950 (0.689,1.000)</b>	0.007 (0.000,0.037)	0.029 (0.000,0.202)	<b>0.281 (0.000,1.000)</b>	<b>0.719 (0.000,1.000)</b>
bLge 20	0.973 (0.842,1.000)	0.012 (0.000,0.065)	0.007 (0.000,0.038)	0.007 (0.000,0.035)	0.964 (0.804,1.000)	0.036 (0.000,0.196)
bLge 28	0.928 (0.580,1.000)	0.035 (0.000,0.254)	0.016 (0.000,0.097)	0.021 (0.000,0.149)	<b>0.526 (0.000,1.000)</b>	<b>0.474 (0.000,1.000)</b>
bLge 31*	0.973 (0.842,1.000)	0.012 (0.000,0.063)	0.007 (0.000,0.039)	0.007 (0.000,0.036)	0.958 (0.774,1.000)	0.042 (0.000,0.226)
bLge 32*	<b>0.235 (0.000,0.894)</b>	<b>0.751 (0.093,1.000)</b>	0.008 (0.000,0.038)	0.007 (0.000,0.035)	<b>0.439 (0.000,1.000)</b>	<b>0.561 (0.000,1.000)</b>
bLge 33*	0.974 (0.843,1.000)	0.012 (0.000,0.064)	0.007 (0.000,0.035)	0.007 (0.000,0.036)	0.971 (0.844,1.000)	0.029 (0.000,0.156)
bLge 35*	0.965 (0.788,1.000)	0.012 (0.000,0.062)	0.015 (0.000,0.090)	0.008 (0.000,0.041)	0.917 (0.593,1.000)	0.083 (0.000,0.407)
bLge 36	0.921 (0.544,1.000)	0.020 (0.000,0.129)	0.006 (0.000,0.031)	0.053 (0.000,0.389)	0.944 (0.701,1.000)	0.056 (0.000,0.299)
bLge 37	0.952 (0.710,1.000)	0.021 (0.000,0.139)	0.006 (0.000,0.031)	0.021 (0.000,0.148)	<b>0.857 (0.131,1.000)</b>	0.143 (0.000,0.869)
bLge 38*	<b>0.893 (0.438,1.000)</b>	<b>0.072 (0.000,0.509)</b>	0.007 (0.000,0.034)	0.028 (0.000,0.212)	<b>0.424 (0.000,1.000)</b>	<b>0.576 (0.000,1.000)</b>
bLge 41	<b>0.708 (0.150,1.000)</b>	<b>0.257 (0.000,0.828)</b>	0.008 (0.000,0.039)	0.027 (0.000,0.199)	0.967 (0.820,1.000)	0.033 (0.000,0.180)
bLge 42*	<b>0.051 (0.000,0.401)</b>	<b>0.920 (0.510,1.000)</b>	0.009 (0.000,0.049)	0.020 (0.000,0.129)	<b>0.478 (0.000,1.000)</b>	<b>0.522 (0.000,1.000)</b>
bLge 46*	<b>0.828 (0.261,1.000)</b>	<b>0.039 (0.000,0.297)</b>	0.008 (0.000,0.042)	<b>0.125 (0.000,0.679)</b>	<b>0.207 (0.000,0.944)</b>	<b>0.793 (0.056,1.000)</b>
bLge 52	0.968 (0.806,1.000)	0.013 (0.000,0.066)	0.007 (0.000,0.037)	0.012 (0.000,0.070)	0.959 (0.786,1.000)	0.041 (0.000,0.214)
bLge 62	0.980 (0.884,1.000)	0.008 (0.000,0.042)	0.006 (0.000,0.029)	0.006 (0.000,0.028)	0.972 (0.847,1.000)	0.028 (0.000,0.153)
bLge 64	0.967 (0.801,1.000)	0.013 (0.000,0.069)	0.007 (0.000,0.039)	0.012 (0.000,0.071)	<b>0.894 (0.476,1.000)</b>	0.106 (0.000,0.524)
bLge 71	0.968 (0.803,1.000)	0.009 (0.000,0.046)	0.007 (0.000,0.036)	0.016 (0.000,0.109)	0.956 (0.766,1.000)	0.044 (0.000,0.234)
bLge 74*	0.976 (0.855,1.000)	0.012 (0.000,0.066)	0.007 (0.000,0.034)	0.006 (0.000,0.029)	<b>0.277 (0.000,1.000)</b>	<b>0.723 (0.000,1.000)</b>
bLge 76*	<b>0.769 (0.125,1.000)</b>	<b>0.182 (0.000,0.850)</b>	0.008 (0.000,0.043)	0.040 (0.000,0.309)	<b>0.263 (0.000,0.997)</b>	<b>0.737 (0.003,1.000)</b>



bLge 82	0.912 (0.373,1.000)	0.059 (0.000,0.504)	0.010 (0.000,0.052)	0.019 (0.000,0.122)	0.973 (0.856,1.000)	0.027 (0.000,0.144)
bLge 85	0.940 (0.638,1.000)	0.033 (0.000,0.238)	0.019 (0.000,0.123)	0.009 (0.000,0.046)	0.956 (0.763,1.000)	0.044 (0.000,0.237)
bLge 86	0.973 (0.841,1.000)	0.013 (0.000,0.064)	0.007 (0.000,0.037)	0.007 (0.000,0.036)	0.963 (0.800,1.000)	0.037 (0.000,0.200)
bLge 87	0.968 (0.808,1.000)	0.015 (0.000,0.082)	0.009 (0.000,0.049)	0.007 (0.000,0.037)	<b>0.890 (0.508,1.000)</b>	0.110 (0.000,0.492)
bLge 90*	0.951 (0.693,1.000)	0.014 (0.000,0.076)	0.007 (0.000,0.037)	0.027 (0.000,0.202)	<b>0.512 (0.000,1.000)</b>	<b>0.488 (0.000,1.000)</b>
bLti 01*	0.009 (0.000,0.046)	0.969 (0.815,1.000)	0.006 (0.000,0.028)	0.016 (0.000,0.095)	0.194 (0.000,0.791)	<b>0.806 (0.209,1.000)</b>
bLti 09*	0.054 (0.000,0.395)	0.927 (0.563,1.000)	0.007 (0.000,0.035)	0.012 (0.000,0.069)	<b>0.527 (0.000,1.000)</b>	<b>0.473 (0.000,1.000)</b>
bLti 46	<b>0.015 (0.000,0.079)</b>	<b>0.858 (0.206,1.000)</b>	0.007 (0.000,0.039)	<b>0.120 (0.000,0.771)</b>	0.171 (0.000,0.693)	<b>0.829 (0.307,1.000)</b>
bLti 49*	0.025 (0.000,0.182)	0.928 (0.604,1.000)	0.006 (0.000,0.030)	0.041 (0.000,0.286)	<b>0.896 (0.496,1.000)</b>	<b>0.104 (0.000,0.504)</b>
bLti 56	0.015 (0.000,0.076)	0.966 (0.793,1.000)	0.007 (0.000,0.037)	0.012 (0.000,0.066)	0.036 (0.000,0.194)	0.964 (0.806,1.000)
bLti 59	0.008 (0.000,0.039)	0.977 (0.861,1.000)	0.006 (0.000,0.031)	0.009 (0.000,0.049)	0.055 (0.000,0.285)	0.945 (0.715,1.000)
bLti 61	0.010 (0.000,0.052)	0.953 (0.709,1.000)	0.008 (0.000,0.039)	0.029 (0.000,0.203)	0.078 (0.000,0.400)	0.922 (0.600,1.000)
bLti 62	0.014 (0.000,0.074)	0.950 (0.685,1.000)	0.007 (0.000,0.037)	0.029 (0.000,0.204)	0.047 (0.000,0.248)	0.953 (0.752,1.000)
bLti 68*	<b>0.550 (0.117,1.000)</b>	<b>0.023 (0.000,0.142)</b>	0.007 (0.000,0.038)	<b>0.420 (0.000,0.867)</b>	0.123 (0.000,0.651)	<b>0.877 (0.349,1.000)</b>
bLti 71	0.062 (0.000,0.422)	0.902 (0.489,1.000)	0.018 (0.000,0.118)	0.018 (0.000,0.106)	0.058 (0.000,0.302)	0.942 (0.698,1.000)
bLti 75	0.009 (0.000,0.044)	0.944 (0.630,1.000)	0.006 (0.000,0.029)	0.042 (0.000,0.329)	0.036 (0.000,0.195)	0.964 (0.805,1.000)
bLti 76	0.051 (0.000,0.399)	0.919 (0.504,1.000)	0.009 (0.000,0.049)	0.020 (0.000,0.133)	0.038 (0.000,0.204)	0.962 (0.796,1.000)
bLti 79*	<b>0.597 (0.164,0.943)</b>	<b>0.384 (0.047,0.819)</b>	0.010 (0.000,0.054)	0.009 (0.000,0.049)	<b>0.605 (0.000,1.000)</b>	<b>0.395 (0.000,1.000)</b>
bLti 80*	<b>0.013 (0.000,0.071)</b>	<b>0.847 (0.181,1.000)</b>	0.007 (0.000,0.040)	0.132 (0.000,0.801)	0.191 (0.000,0.849)	<b>0.809 (0.151,1.000)</b>
bLti 87	0.008 (0.000,0.039)	0.973 (0.841,1.000)	0.007 (0.000,0.036)	0.012 (0.000,0.064)	0.167 (0.000,0.792)	<b>0.833 (0.208,1.000)</b>
bLti 89	0.014 (0.000,0.075)	0.966 (0.798,1.000)	0.007 (0.000,0.037)	0.012 (0.000,0.066)	0.106 (0.000,0.470)	<b>0.894 (0.530,1.000)</b>
bLti 94	0.010 (0.000,0.051)	0.954 (0.713,1.000)	0.007 (0.000,0.037)	0.029 (0.000,0.209)	0.064 (0.000,0.332)	0.936 (0.668,1.000)
bLti 96	0.010 (0.000,0.049)	0.954 (0.716,1.000)	0.007 (0.000,0.038)	0.029 (0.000,0.198)	0.129 (0.000,0.563)	<b>0.871 (0.437,1.000)</b>
bLti 97	0.016 (0.000,0.084)	0.962 (0.772,1.000)	0.009 (0.000,0.049)	0.013 (0.000,0.072)	0.083 (0.000,0.416)	0.917 (0.584,1.000)
bLti 98*	0.009 (0.000,0.048)	0.977 (0.860,1.000)	0.006 (0.000,0.028)	0.008 (0.000,0.043)	<b>0.562 (0.000,1.000)</b>	<b>0.438 (0.000,1.000)</b>
bLti 102*	0.009 (0.000,0.048)	0.977 (0.862,1.000)	0.006 (0.000,0.028)	0.008 (0.000,0.042)	0.072 (0.000,0.375)	0.928 (0.625,1.000)
bLti 106	<b>0.043 (0.000,0.320)</b>	<b>0.898 (0.405,1.000)</b>	0.008 (0.000,0.039)	<b>0.051 (0.000,0.403)</b>	0.050 (0.000,0.268)	0.950 (0.732,1.000)
bLti 108*	0.015 (0.000,0.078)	0.966 (0.795,1.000)	0.007 (0.000,0.037)	0.012 (0.000,0.066)	<b>0.422 (0.000,1.000)</b>	<b>0.578 (0.000,1.000)</b>
bLti 113*	0.011 (0.000,0.056)	0.930 (0.600,1.000)	0.008 (0.000,0.042)	0.051 (0.000,0.351)	0.039 (0.000,0.211)	0.961 (0.789,1.000)
bLti 119*	0.017 (0.000,0.092)	0.938 (0.612,1.000)	0.008 (0.000,0.041)	0.037 (0.000,0.279)	<b>0.471 (0.000,1.000)</b>	<b>0.529 (0.000,1.000)</b>
bLti 120*	0.050 (0.000,0.393)	0.933 (0.567,1.000)	0.008 (0.000,0.038)	0.009 (0.000,0.049)	0.046 (0.000,0.246)	0.954 (0.754,1.000)
bLti 121*	<b>0.149 (0.000,0.751)</b>	<b>0.835 (0.231,1.000)</b>	0.007 (0.000,0.037)	0.009 (0.000,0.045)	<b>0.909 (0.557,1.000)</b>	<b>0.091 (0.000,0.443)</b>
bLti 124	0.014 (0.000,0.074)	0.950 (0.692,1.000)	0.007 (0.000,0.036)	0.028 (0.000,0.200)	0.171 (0.000,0.764)	<b>0.829 (0.236,1.000)</b>
bLti 132	0.014 (0.000,0.075)	0.950 (0.689,1.000)	0.007 (0.000,0.036)	0.029 (0.000,0.200)	<b>0.363 (0.000,1.000)</b>	<b>0.637 (0.000,1.000)</b>
bLti 135*	0.009 (0.000,0.046)	0.977 (0.862,1.000)	0.006 (0.000,0.028)	0.008 (0.000,0.043)	<b>0.698 (0.005,1.000)</b>	<b>0.302 (0.000,0.995)</b>
bLti 85	0.009 (0.000,0.045)	0.013 (0.000,0.069)	0.007 (0.000,0.036)	0.971 (0.824,1.000)	-	-
bLti 107	0.007 (0.000,0.033)	0.009 (0.000,0.045)	0.006 (0.000,0.027)	0.979 (0.876,1.000)	-	-
bLti 118	0.007 (0.000,0.033)	0.008 (0.000,0.041)	0.006 (0.000,0.027)	0.979 (0.878,1.000)	-	-
bLti 130	0.009 (0.000,0.046)	0.013 (0.000,0.071)	0.007 (0.000,0.035)	0.971 (0.826,1.000)	-	-

bLti 151	0.009 (0.000,0.046)	0.013 (0.000,0.070)	0.007 (0.000,0.037)	0.970 (0.823,1.000)	-	-
bLti 152	0.009 (0.000,0.043)	0.013 (0.000,0.071)	0.007 (0.000,0.035)	0.971 (0.829,1.000)	-	-
Lco 07	0.007 (0.000,0.036)	0.007 (0.000,0.034)	0.979 (0.876,1.000)	0.007 (0.000,0.036)	-	-
Lco 09	0.006 (0.000,0.030)	0.006 (0.000,0.027)	0.983 (0.900,1.000)	0.006 (0.000,0.027)	-	-
Lco 13	0.007 (0.000,0.036)	0.007 (0.000,0.035)	0.979 (0.877,1.000)	0.007 (0.000,0.035)	-	-
bLco 303	0.007 (0.000,0.037)	0.007 (0.000,0.037)	0.979 (0.872,1.000)	0.007 (0.000,0.036)	-	-
bLco 310	0.007 (0.000,0.036)	0.007 (0.000,0.035)	0.979 (0.875,1.000)	0.007 (0.000,0.034)	-	-
bLco 317	0.007 (0.000,0.036)	0.007 (0.000,0.034)	0.979 (0.877,1.000)	0.007 (0.000,0.036)	-	-

Tabela 8. Proporção de associação dos haplótipos e genótipos de cada indivíduo aos *clusters* inferidos para o conjunto total de marcadores moleculares através da análise Bayesiana do programa STRUCTURE utilizando o modelo de locos ligados. Cada coluna contém o valor de “q” para cada indivíduo em cada *cluster* populacional com seu respectivo intervalo de credibilidade entre parênteses. O asterisco (\*) indica os indivíduos híbridos inferidos através de estudos anteriores. Indivíduos com probabilidades < 0.90 de pertencerem a sua espécie são mostrados em negrito.

ID	Marcadores ligados ao X, Autossômicos e Microsatélites			
	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i> SSE	<i>L. colocolo</i>	<i>L. tigrinus</i> CNE
bLge 01*	<b>0.773 (0.433,1.000)</b>	0.015 (0.000,0.083)	0.011 (0.000,0.060)	<b>0.202 (0.000,0.540)</b>
bLge 02*	<b>0.485 (0.161,0.792)</b>	<b>0.477 (0.169,0.797)</b>	0.015 (0.000,0.084)	0.022 (0.000,0.123)
bLge 04*	<b>0.472 (0.154,0.753)</b>	<b>0.410 (0.144,0.696)</b>	0.054 (0.000,0.306)	0.064 (0.000,0.298)
bLge 05*	<b>0.282 (0.000,0.579)</b>	<b>0.659 (0.352,0.974)</b>	0.019 (0.000,0.108)	0.039 (0.000,0.215)
bLge 08*	<b>0.171 (0.000,0.473)</b>	<b>0.662 (0.349,0.958)</b>	0.039 (0.000,0.201)	0.128 (0.000,0.463)
bLge 09	0.960 (0.841,1.000)	0.010 (0.000,0.057)	0.013 (0.000,0.074)	0.017 (0.000,0.094)
bLge 10*	<b>0.492 (0.203,0.762)</b>	<b>0.457 (0.193,0.746)</b>	0.014 (0.000,0.080)	0.037 (0.000,0.198)
bLge 11*	<b>0.363 (0.097,0.651)</b>	<b>0.551 (0.252,0.836)</b>	0.023 (0.000,0.132)	0.062 (0.000,0.296)
bLge 13*	<b>0.032 (0.000,0.176)</b>	<b>0.486 (0.196,0.790)</b>	0.009 (0.000,0.052)	<b>0.473 (0.172,0.758)</b>
bLge 20	0.932 (0.765,1.000)	0.033 (0.000,0.165)	0.018 (0.000,0.101)	0.016 (0.000,0.092)
bLge 28	<b>0.576 (0.218,0.943)</b>	0.157 (0.000,0.523)	0.056 (0.000,0.287)	<b>0.212 (0.000,0.567)</b>
bLge 31*	0.923 (0.714,1.000)	0.019 (0.000,0.109)	0.046 (0.000,0.233)	0.012 (0.000,0.071)
bLge 32*	<b>0.454 (0.177,0.725)</b>	<b>0.473 (0.206,0.752)</b>	0.032 (0.000,0.170)	0.040 (0.000,0.206)
bLge 33*	0.956 (0.827,1.000)	0.017 (0.000,0.095)	0.010 (0.000,0.059)	0.016 (0.000,0.093)
bLge 35*	<b>0.811 (0.545,0.997)</b>	<b>0.155 (0.000,0.412)</b>	0.021 (0.000,0.116)	0.014 (0.000,0.080)
bLge 36	<b>0.624 (0.308,0.965)</b>	0.036 (0.000,0.201)	0.045 (0.000,0.200)	<b>0.294 (0.000,0.621)</b>
bLge 37	<b>0.773 (0.398,1.000)</b>	<b>0.162 (0.000,0.536)</b>	0.015 (0.000,0.083)	0.051 (0.000,0.266)
bLge 38*	<b>0.455 (0.193,0.736)</b>	<b>0.423 (0.128,0.691)</b>	0.052 (0.000,0.228)	0.070 (0.000,0.317)
bLge 41	<b>0.832 (0.588,0.999)</b>	<b>0.118 (0.000,0.363)</b>	0.017 (0.000,0.094)	0.033 (0.000,0.181)
bLge 42*	<b>0.367 (0.040,0.664)</b>	<b>0.599 (0.303,0.911)</b>	0.011 (0.000,0.060)	0.024 (0.000,0.138)
bLge 46*	<b>0.255 (0.050,0.521)</b>	<b>0.527 (0.073,0.873)</b>	0.010 (0.000,0.059)	0.207 (0.000,0.640)
bLge 52	<b>0.688 (0.289,0.996)</b>	0.055 (0.000,0.256)	<b>0.219 (0.000,0.629)</b>	0.038 (0.000,0.191)
bLge 62	<b>0.894 (0.671,1.000)</b>	0.015 (0.000,0.084)	0.056 (0.000,0.258)	0.035 (0.000,0.180)
bLge 64	<b>0.746 (0.431,0.997)</b>	0.047 (0.000,0.239)	0.017 (0.000,0.095)	<b>0.190 (0.000,0.518)</b>
bLge 71	<b>0.787 (0.470,0.999)</b>	0.032 (0.000,0.178)	0.059 (0.000,0.258)	<b>0.122 (0.000,0.420)</b>
bLge 74*	<b>0.440 (0.182,0.722)</b>	<b>0.390 (0.009,0.704)</b>	0.019 (0.000,0.107)	0.151 (0.000,0.456)
bLge 76*	<b>0.308 (0.065,0.604)</b>	<b>0.411 (0.002,0.754)</b>	0.034 (0.000,0.182)	0.247 (0.000,0.611)
bLge 82	<b>0.839 (0.531,1.000)</b>	0.015 (0.000,0.086)	0.024 (0.000,0.138)	<b>0.122 (0.000,0.419)</b>
bLge 85	<b>0.786 (0.477,0.999)</b>	0.083 (0.000,0.334)	0.079 (0.000,0.349)	0.052 (0.000,0.245)

bLge 86	0.940 (0.768,1.000)	0.015 (0.000,0.083)	0.025 (0.000,0.138)	0.021 (0.000,0.115)
bLge 87	<b>0.677 (0.405,0.940)</b>	<b>0.263 (0.004,0.523)</b>	0.026 (0.000,0.144)	0.034 (0.000,0.189)
bLge 90*	<b>0.491 (0.195,0.833)</b>	<b>0.391 (0.012,0.715)</b>	0.012 (0.000,0.069)	0.106 (0.000,0.436)
bLti 01*	0.126 (0.000,0.390)	<b>0.805 (0.519,0.999)</b>	0.010 (0.000,0.057)	0.059 (0.000,0.292)
bLti 09*	<b>0.271 (0.000,0.578)</b>	<b>0.651 (0.362,0.954)</b>	0.044 (0.000,0.205)	0.034 (0.000,0.187)
bLti 46	0.018 (0.000,0.103)	0.944 (0.781,1.000)	0.018 (0.000,0.101)	0.020 (0.000,0.114)
bLti 49*	<b>0.443 (0.123,0.734)</b>	<b>0.430 (0.165,0.721)</b>	0.010 (0.000,0.058)	0.117 (0.000,0.452)
bLti 56	0.010 (0.000,0.057)	0.964 (0.853,1.000)	0.016 (0.000,0.089)	0.010 (0.000,0.058)
bLti 59	0.014 (0.000,0.077)	0.945 (0.790,1.000)	0.029 (0.000,0.156)	0.013 (0.000,0.071)
bLti 61	0.018 (0.000,0.105)	0.940 (0.771,1.000)	0.014 (0.000,0.076)	0.028 (0.000,0.153)
bLti 62	0.037 (0.000,0.170)	0.923 (0.741,1.000)	0.019 (0.000,0.107)	0.022 (0.000,0.123)
bLti 68*	0.131 (0.004,0.333)	<b>0.295 (0.000,0.774)</b>	0.012 (0.000,0.069)	<b>0.562 (0.041,0.920)</b>
bLti 71	0.039 (0.000,0.204)	0.917 (0.709,1.000)	0.022 (0.000,0.122)	0.022 (0.000,0.127)
bLti 75	0.012 (0.000,0.071)	<b>0.884 (0.662,1.000)</b>	0.022 (0.000,0.118)	0.082 (0.000,0.293)
bLti 76	0.022 (0.000,0.119)	<b>0.885 (0.655,1.000)</b>	0.073 (0.000,0.293)	0.020 (0.000,0.110)
bLti 79*	<b>0.590 (0.348,0.815)</b>	<b>0.380 (0.158,0.623)</b>	0.013 (0.000,0.076)	0.017 (0.000,0.093)
bLti 80*	0.025 (0.000,0.138)	<b>0.615 (0.274,0.980)</b>	0.038 (0.000,0.177)	<b>0.322 (0.000,0.677)</b>
bLti 87	0.025 (0.000,0.136)	0.936 (0.764,1.000)	0.022 (0.000,0.125)	0.017 (0.000,0.094)
bLti 89	0.035 (0.000,0.181)	<b>0.899 (0.683,1.000)</b>	0.049 (0.000,0.227)	0.017 (0.000,0.097)
bLti 94	0.019 (0.000,0.107)	0.914 (0.682,1.000)	0.015 (0.000,0.085)	0.052 (0.000,0.265)
bLti 96	0.031 (0.000,0.153)	0.910 (0.709,1.000)	0.028 (0.000,0.155)	0.031 (0.000,0.168)
bLti 97	0.044 (0.000,0.217)	<b>0.869 (0.634,1.000)</b>	0.056 (0.000,0.245)	0.031 (0.000,0.171)
bLti 98*	<b>0.259 (0.000,0.557)</b>	<b>0.659 (0.363,0.962)</b>	0.012 (0.000,0.068)	0.070 (0.000,0.313)
bLti 102*	0.017 (0.000,0.098)	<b>0.886 (0.635,1.000)</b>	0.015 (0.000,0.084)	0.082 (0.000,0.327)
bLti 106	0.031 (0.000,0.161)	<b>0.862 (0.555,1.000)</b>	0.013 (0.000,0.072)	0.095 (0.000,0.389)
bLti 108*	0.058 (0.000,0.265)	<b>0.891 (0.652,1.000)</b>	0.029 (0.000,0.161)	0.021 (0.000,0.123)
bLti 113*	0.015 (0.000,0.081)	<b>0.755 (0.482,0.996)</b>	0.016 (0.000,0.089)	<b>0.215 (0.000,0.492)</b>
bLti 119*	<b>0.243 (0.000,0.550)</b>	<b>0.672 (0.356,0.972)</b>	0.045 (0.000,0.209)	0.040 (0.000,0.218)
bLti 120*	0.063 (0.000,0.282)	<b>0.768 (0.449,0.998)</b>	0.012 (0.000,0.068)	<b>0.157 (0.000,0.474)</b>
bLti 121*	<b>0.668 (0.401,0.892)</b>	<b>0.250 (0.052,0.501)</b>	0.036 (0.000,0.172)	0.046 (0.000,0.228)
bLti 124	0.025 (0.000,0.140)	<b>0.876 (0.601,1.000)</b>	0.017 (0.000,0.096)	0.082 (0.000,0.346)
bLti 132	0.074 (0.000,0.329)	<b>0.814 (0.487,1.000)</b>	0.026 (0.000,0.144)	0.086 (0.000,0.380)
bLti 135*	<b>0.244 (0.000,0.514)</b>	<b>0.718 (0.444,0.985)</b>	0.011 (0.000,0.063)	0.027 (0.000,0.152)
bLti 85	0.026 (0.000,0.144)	0.017 (0.000,0.095)	0.014 (0.000,0.081)	0.943 (0.784,1.000)
bLti 107	0.032 (0.000,0.167)	0.026 (0.000,0.144)	0.029 (0.000,0.164)	0.913 (0.702,1.000)
bLti 118	0.024 (0.000,0.130)	0.019 (0.000,0.107)	0.023 (0.000,0.125)	0.934 (0.770,1.000)
bLti 130	0.190 (0.000,0.473)	0.078 (0.000,0.361)	0.014 (0.000,0.081)	<b>0.717 (0.411,0.989)</b>
bLti 151	0.069 (0.000,0.303)	0.046 (0.000,0.231)	0.035 (0.000,0.176)	<b>0.850 (0.578,1.000)</b>
bLti 152	0.141 (0.000,0.425)	0.024 (0.000,0.137)	0.022 (0.000,0.121)	<b>0.813 (0.521,0.999)</b>

Lco 07	0.025 (0.000,0.141)	0.019 (0.000,0.108)	0.937 (0.769,1.000)	0.019 (0.000,0.108)
Lco 09	0.011 (0.000,0.062)	0.012 (0.000,0.065)	0.964 (0.858,1.000)	0.014 (0.000,0.077)
Lco 13	0.014 (0.000,0.077)	0.013 (0.000,0.074)	0.960 (0.846,1.000)	0.012 (0.000,0.069)
bLco 303	0.026 (0.000,0.151)	0.026 (0.000,0.146)	0.922 (0.692,1.000)	0.026 (0.000,0.147)
bLco 310	0.026 (0.000,0.149)	0.026 (0.000,0.149)	0.922 (0.696,1.000)	0.026 (0.000,0.148)
bLco 317	0.026 (0.000,0.148)	0.026 (0.000,0.148)	0.922 (0.696,1.000)	0.026 (0.000,0.148)

Tabela 9. Parâmetros demográficos inferidos para as três espécies de felídeos (*Leopardus tigrinus*, *L. geoffroyi* e *L. colocolo*) usando o método baseado em coalescência implementado no programa Lamarc e considerando *L. tigrinus* do centro-nordeste (CNE) como uma quarta população. Os valores são as médias calculadas a partir de múltiplas análises para cada um dos segmentos usando o método Bayesiano (veja Material e Métodos). As taxas de migração são expressas como o número de migrantes por geração (Nm) e os intervalos de confiança de 95% estão entre parênteses. As maiores taxas são mostradas em negrito.

	<i>ATP7A</i>	<i>BTK</i>	<i>PLP1 I2</i>
$\theta$ <i>L. tigrinus</i> SSE	0.00069 (0.00012 – 0.00315)	0.00148 (0.00022 – 0.00406)	0.00041 (7.29E-05 – 0.00147)
$\theta$ <i>L. geoffroyi</i>	0.00166 (0.00034 – 0.00632)	0.00038 (2.84E-05 – 0.00174)	0.00077 (0.00012 – 0.00236)
$\theta$ <i>L. colocolo</i>	0.00090 (3.18E-05 – 0.00752)	0.00060 (2.07E-05 - 0.00335)	0.00127 (0.00015 - 0.00912)
$\theta$ <i>L. tigrinus</i> CNE	1.65E-05 (1.04E-05 - 0.00157)	1.49E-05 (1.02E-05 - 0.00111)	1.47E-05 (1.03E-05 - 0.00108)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. geoffroyi</i> )	<b>0.89365 (0.00594 - 6.08708)</b>	<b>0.32108 (0.00081 - 1.77162)</b>	<b>0.62819 (0.00433 - 2.35340)</b>
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. colocolo</i> )	0.19994 (3.95E-07 - 6.77655)	0.10706 (2.54E-07 - 2.83808)	0.07299 (1.81E-06 - 4.88122)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00180 (1.23E-07 - 1.13753)	0.00464 (1.28E-07 - 1.10913)	0.00443 (1.27E-07 - 1.05827)
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. tigrinus</i> SSE)	<b>0.61151 (0.01040 - 3.20225)</b>	<b>0.69951 (7.36E-05 - 3.89762)</b>	<b>0.36998 (0.01000 - 1.48738)</b>
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. colocolo</i> )	0.37540 (4.86E-07 - 9.18604)	0.08423 (2.50E-07 - 2.57095)	0.09704 (1.82E-06 - 5.01386)
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00434 (1.27E-07 - 1.41643)	0.00383 (1.25E-07 - 1.02402)	0.00512 (1.36E-07 - 1.20839)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. tigrinus</i> SSE)	0.11488 (1.54E-06 - 2.52953)	0.17750 (2.85E-06 - 2.70404)	0.06736 (9.13E-07 - 1.15095)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. geoffroyi</i> )	0.29985 (5.60E-06 - 5.30271)	0.07895 (3.63E-07 - 1.56151)	0.09205 (1.53E-06 - 1.60432)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00465 (1.29E-07 - 1.50003)	0.00374 (1.27E-07 - 1.04811)	0.00397 (1.28E-07 - 0.99995)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. tigrinus</i> SSE)	0.07299 (1.49E-06 - 2.01263)	0.19482 (2.95E-06 - 2.75648)	0.09038 (9.85E-07 - 1.37197)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. geoffroyi</i> )	0.14180 (4.43E-06 - 3.34307)	0.08695 (3.71E-07 - 1.58972)	0.16015 (1.98E-06 - 2.08279)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. colocolo</i> )	0.14577 (4.10E-07 - 6.16792)	0.10612 (2.53E-07 - 2.73576)	0.08698 (1.80E-06 - 5.09481)

	<i>PLP1 I5</i>	<i>BGN</i>	<i>SILV</i>
$\theta$ <i>L. tigrinus</i> SSE	0.00025 (199E-05 – 0.00184)	0.00148 (0.00044 – 0.00368)	0.00024 (1.65E-05 – 0.00218)
$\theta$ <i>L. geoffroyi</i>	0.00025 (1.60E-05 – 0.00138)	0.00278 (0.00111 – 0.01015)	0.00088 (3.26E-05 – 0.00273)
$\theta$ <i>L. colocolo</i>	0.00174 (0.00032 - 0.00816)	0.00042 (1.93E-05 - 0.00209)	1.84E-05 (1.05E-05 - 0.00095)
$\theta$ <i>L. tigrinus</i> CNE	2.59E-05 (1.04E-05 - 0.00109)	4.15E-05 (1.05E-05 - 0.00094)	3.01E-05 (1.04E-05 - 0.00103)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. geoffroyi</i> )	<b>0.20364 (0.00039 - 1.39843)</b>	<b>1.04078 (0.04830 - 9.01234)</b>	<b>0.63235 (3.02E-05 - 2.70562)</b>
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. colocolo</i> )	0.07775 (3.86E-06 - 3.20748)	0.04687 (2.32E-07 - 1.46811)	0.00236 (1.26E-07 - 0.71256)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00812 (1.41E-07 - 1.16068)	0.03150 (5.94E-07 - 0.99848)	0.01650 (2.04E-07 - 1.28784)

Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. tigrinus</i> SSE)	<b>0.19175 (6.47E-06 - 1.86924)</b>	<b>1.29861 (0.04381 - 3.71007)</b>	<b>0.18847 (3.73E-06 - 2.24960)</b>
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. colocolo</i> )	0.06145 (3.83E-06 - 2.88968)	0.08202 (2.51E-07 - 1.92886)	0.00524 (1.34E-07 - 0.94655)
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00723 (1.35E-07 - 1.08845)	0.01300 (1.27E-07 - 0.92545)	0.01290 (1.47E-07 - 1.35171)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. tigrinus</i> SSE)	0.03184 (2.46E-07 - 1.38170)	0.09899 (5.41E-06 - 1.54248)	0.02917 (2.04E-07 - 1.62311)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. geoffroyi</i> )	0.03392 (1.94E-07 - 1.08056)	0.14515 (1.47E-05 - 2.83910)	0.12140 (4.50E-07 - 2.15636)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00429 (1.25E-07 - 0.89659)	0.00846 (1.28E-07 - 0.81540)	0.00650 (1.27E-07 - 0.890728)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. tigrinus</i> SSE)	0.06229 (3.06E-07 - 1.81828)	0.24533 (1.94E-05 - 2.45404)	0.08615 (3.51E-07 - 2.21086)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. geoffroyi</i> )	0.06782 (2.35E-07 - 1.38952)	0.06821 (1.28E-05 - 2.15935)	0.14250 (4.33E-07 - 2.26977)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. colocolo</i> )	0.08089 (3.82E-06 - 3.09791)	0.01673 (2.29E-07 - 1.13507)	0.00130 (1.25E-07 - 0.61821)

	<i>CHRNA1</i>	ALL
$\theta$ <i>L. tigrinus</i> SSE	0.00328 (0.00113 - 0.00849)	0.00110 (0.00064 - 0.00170)
$\theta$ <i>L. geoffroyi</i>	0.00362 (0.00111 - 0.00910)	0.00121 (0.00080 - 0.00212)
$\theta$ <i>L. colocolo</i>	0.00128 (0.00012 - 0.00492)	0.00085 (0.00035 - 0.00156)
$\theta$ <i>L. tigrinus</i> CNE	1.61E-05 (1.05E-05 - 0.00121)	1.54E-05 (1.27E-05 - 0.00018)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. geoffroyi</i> )	<b>3.22599 (0.17700 - 9.13790)</b>	<b>0.92595 (0.28500 - 1.90626)</b>
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. colocolo</i> )	0.04067 (1.46E-06 - 2.26936)	0.07225 (1.00E-05 - 0.39119)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> SSE into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00702 (1.47E-07 - 1.58722)	0.00643 (0.00119 - 0.13857)
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. tigrinus</i> SSE)	<b>2.93096 (0.21186 - 8.51987)</b>	<b>0.92832 (0.32286 - 1.60289)</b>
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. colocolo</i> )	0.05233 (1.49E-06 - 2.61141)	0.10883 (1.47E-05 - 0.54822)
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00720 (1.52E-07 - 1.61354)	0.00533 (1.35E-05 - 0.11939)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. tigrinus</i> SSE)	0.12105 (1.41E-05 - 1.79897)	0.09284 (3.74E-05 - 0.39372)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. geoffroyi</i> )	0.14286 (1.41E-05 - 1.94254)	0.10163 (4.23E-04 - 0.48031)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. tigrinus</i> CNE)	0.00371 (1.35E-07 - 1.15033)	0.00349 (7.59E-07 - 0.09131)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. tigrinus</i> SSE)	0.18441 (1.60E-05 - 2.54595)	0.16055 (0.02031 - 0.58777)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. geoffroyi</i> )	0.21386 (1.66E-05 - 2.80922)	0.12106 (0.00173 - 0.53770)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> CNE into <i>L. colocolo</i> )	0.05172 (1.48E-06 - 2.43180)	0.06767 (1.02E-05 - 0.35847)

## Legenda das Figuras

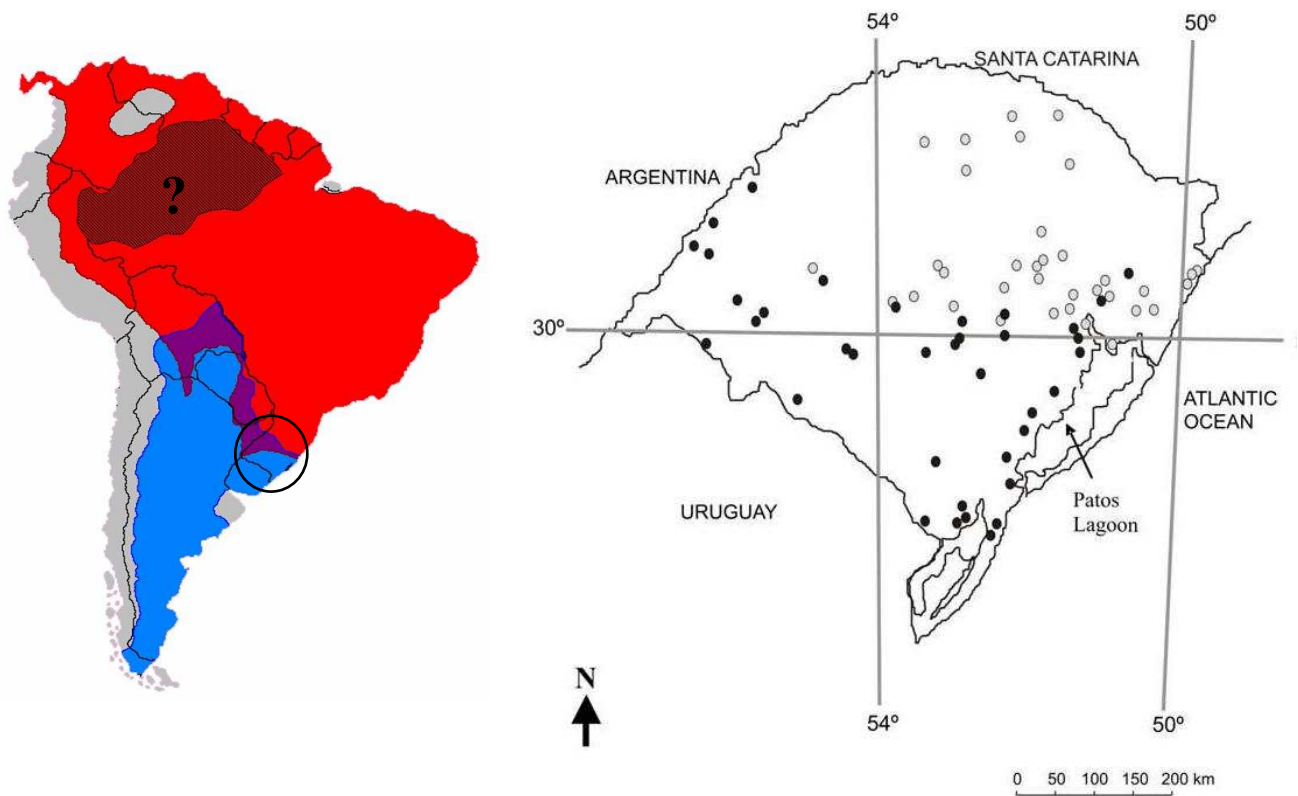
Fig. 1. A) Mapa da distribuição geográfica de *Leopardus tigrinus* (área na cor vermelha) e *Leopardus geoffroyi* (área na cor azul) na América do Sul (modificado de Oliveira 1994, Nowell and Jackson 1996, Eisenberg and Redford 1999, Sunquist and Sunquist 2002) com a indicação de sua potencial zona de contato geográfico (faixa na cor roxa). O círculo indica a posição do Rio Grande do Sul e o ponto de interrogação indica a incerteza com relação à distribuição de *L. tigrinus* na bacia Amazônica. B) Mapa mostrando os registros de ocorrência de *L. tigrinus* (pontos cinza) e *L. geoffroyi* (pontos pretos) no estado do Rio Grande do Sul (os pontos não correspondem apenas aos indivíduos selecionados neste estudo). A zona híbrida, na Depressão Central, localiza-se de leste a oeste em torno do paralelo 30° S.

Fig. 2. Desenho esquemático do cromossomo X com a localização aproximada dos genes em megabases (Mb).

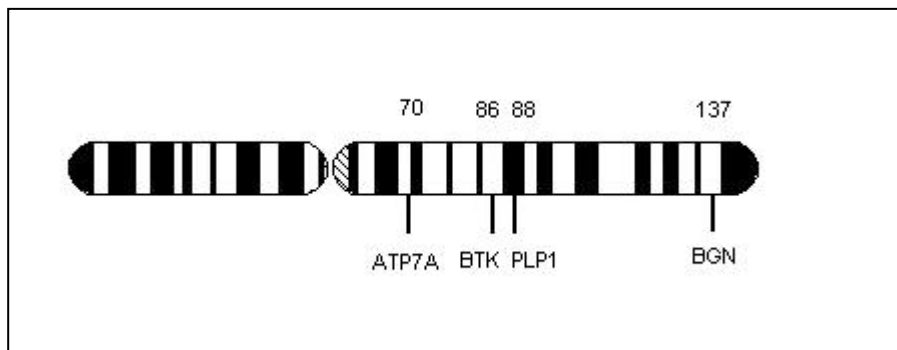
Fig. 3. Rede de haplótipos gerada para os segmentos nucleares: (A) *ATP7A*; (B) *BTK*; (C) *PLP1 I2*; (D) *PLP1 I5*; (E) *BGN*, (F) segmentos do cromossomo X concatenados; (G) *SILV*; e (H) *CHRNA1*. Cada haplótipo é representado por um círculo proporcional em tamanho a sua frequência, as cores indicam a frequência de cada haplótipo em cada uma das espécies (preto = *L. geoffroyi*, cinza claro = *L. tigrinus*, cinza escuro = *L. tigrinus* CNE e branco = *L. colocolo*). As barras sobre as linhas indicam o número de substituições entre os haplótipos, e os quadrados brancos representam os vetores médios.

Fig. 4. Representação dos haplótipos dos locos nucleares ligados ao X identificados através do programa ARLEQUIN. Para cada um dos haplótipos é indicada a origem geográfica e o clado da espécie a que pertence. Somente os sítios variáveis são mostrados. Os números dos sítios se referem à posição em pares de base (pb) em cada um dos locos (primeira linha) e no cromossomo X quando considerando os locos concatenados (segunda linha). As posições hachuradas em colorido indicam os eventos de recombinação detectados entre os sítios através do DnaSp.

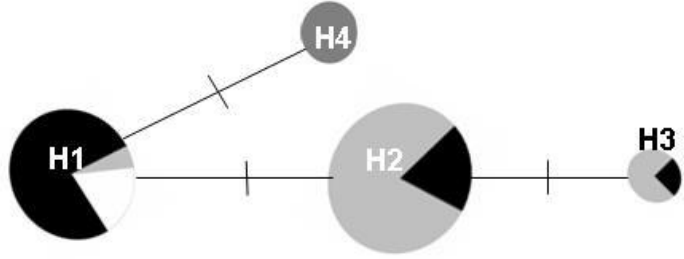




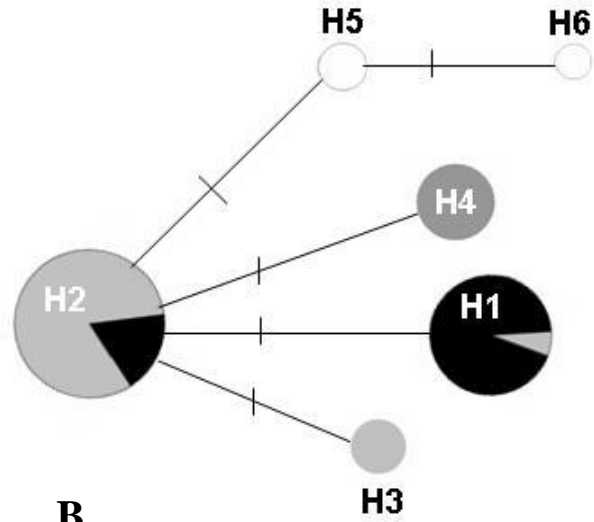
**Fig. 1**



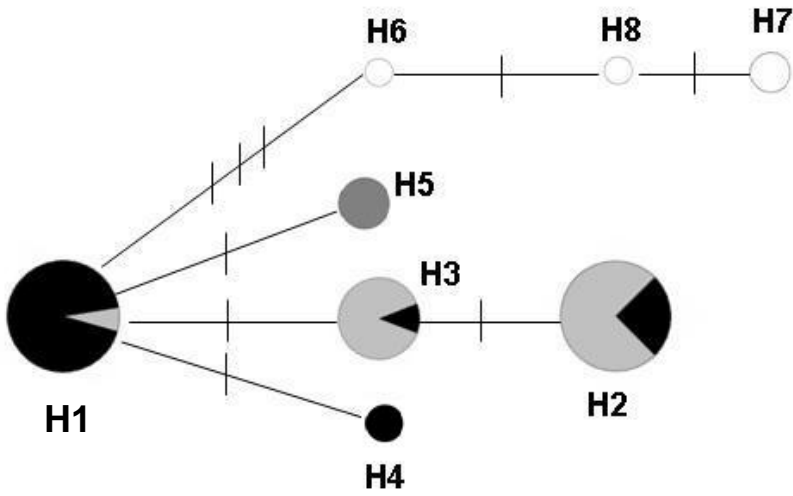
**Fig. 2**



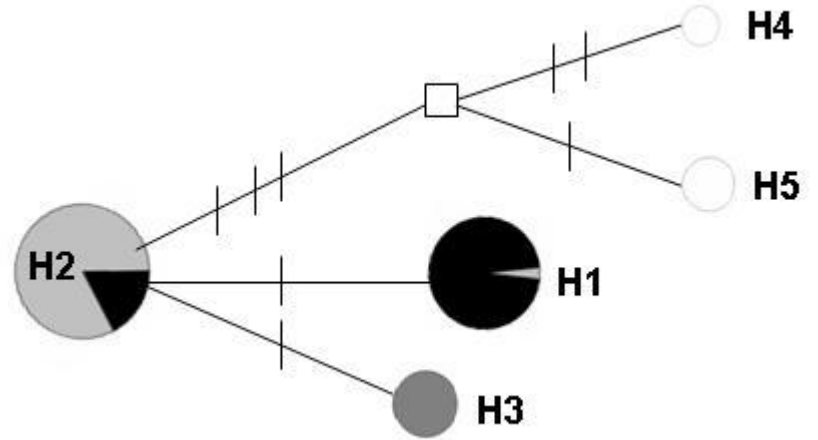
A



B

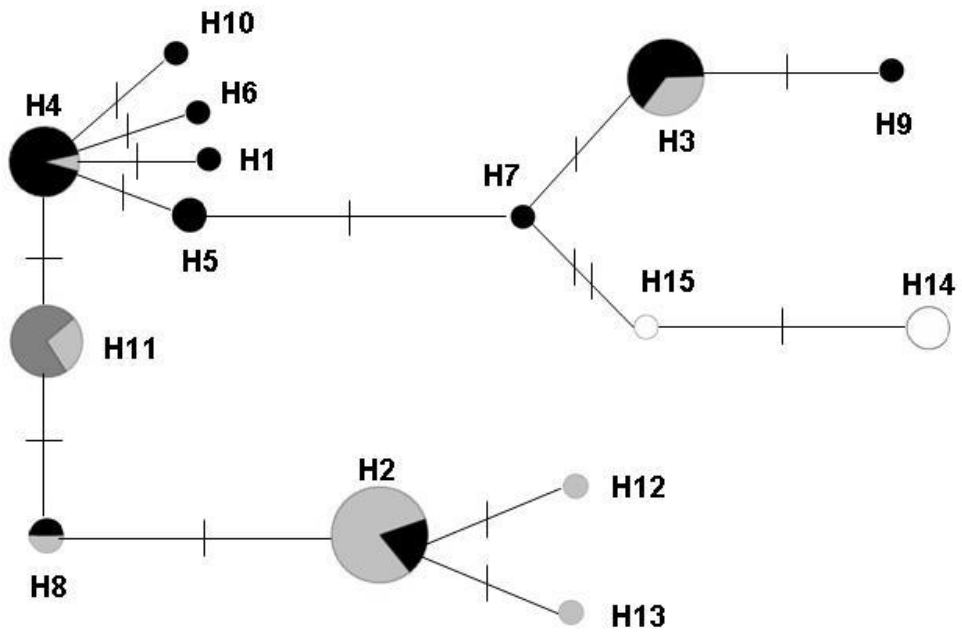


C

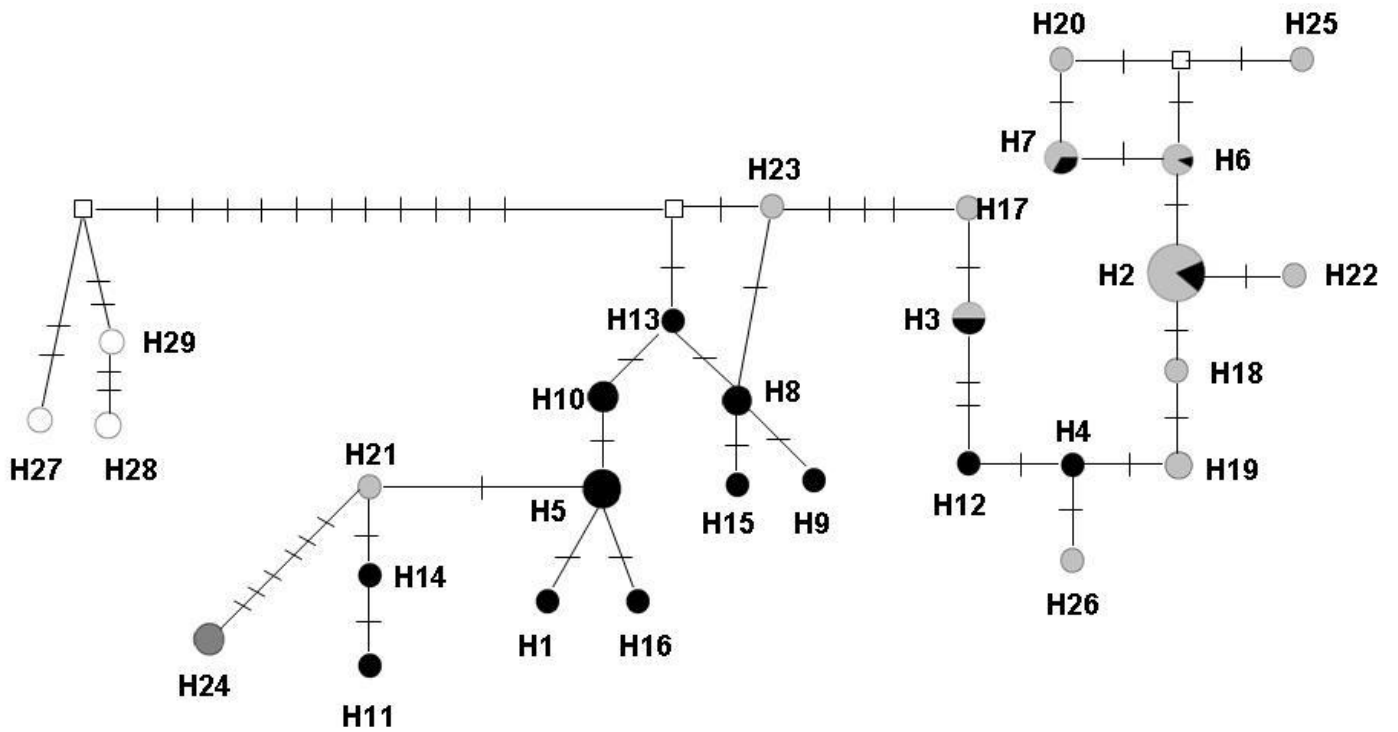


D

Fig. 3

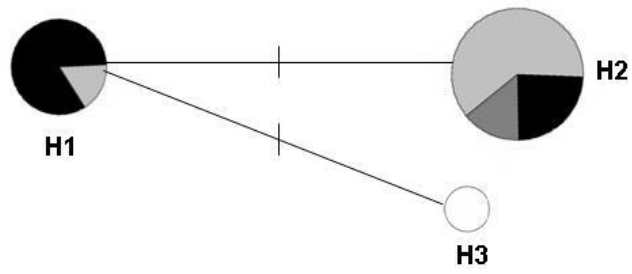


E

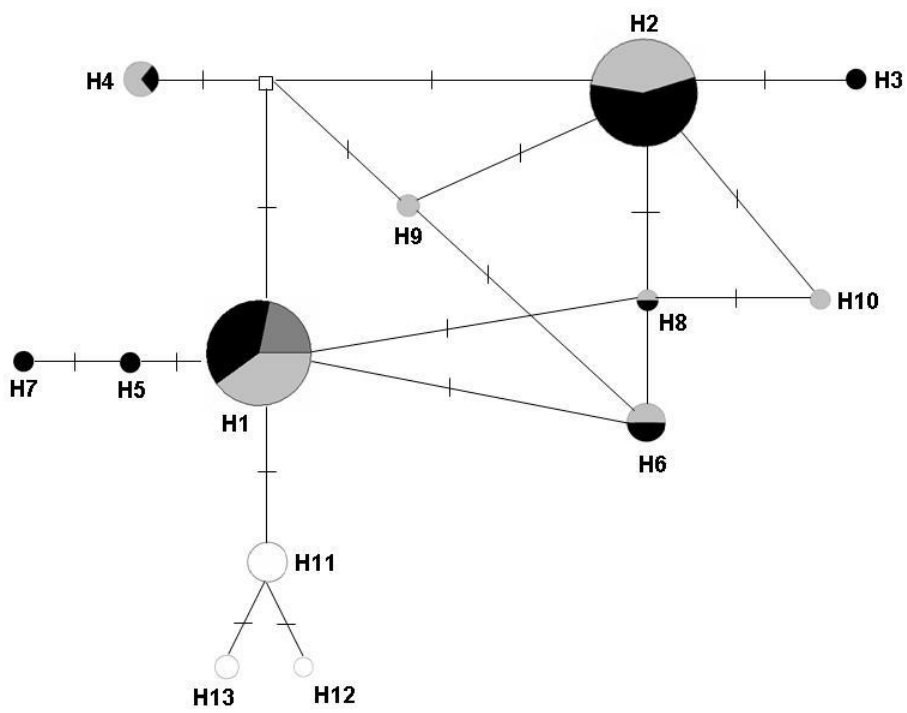


F

Fig. 3



G



H

Fig. 3

	ATP7A					BTK					PLP1 I2					PLP1 I5					BGN					Origem geográfica															
H2	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	RS/SP	Clado <i>Leopardus tigrinus</i> SSE
H3	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	A	C	T	T	T	G	T	T	T	T	C	RS		
H4	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	T	T	T	C	RS	
H5	G	T	C	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	RS	
H7	N	T	G	G	A	G	T	A	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	RS	
H8	N	C	G	G	A	G	T	A	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	RS	
H13	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	T	G	T	T	T	T	C	RS	
H18	G	T	N	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	RS	
H19	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	A	C	T	T	T	G	T	T	T	T	T	C	RS	
H20	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	T	C	RS	
H21	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	T	T	C	RS	
H22	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	RS/PR/SP	
H23	G	C	G	G	A	G	T	A	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	SP/GO	
H24	G	C	G	G	A	G	T	G	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	SP	
H26	N	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	SP	
H27	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	T	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	T	SP	
H30	G	T	G	G	A	G	T	G	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	T	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	ES	
H31	G	T	G	G	A	G	T	A	C	C	C	G	G	A	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	T	T	T	C	RS	
H1	N	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	A	T	T	T	T	C	RS	
H6	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	T	T	T	C	RS/ARG/UF	
H9	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	A	C	T	T	T	T	G	T	T	T	T	C	RS	
H10	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	C	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	A	C	T	T	T	T	G	T	T	T	T	C	RS	
H11	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	A	C	C	T	T	C	G	T	T	T	T	C	RS	
H12	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	C	C	RS	
H14	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	A	C	T	T	T	C	G	T	T	T	T	C	RS	
H15	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	C	T	C	RS	
H16	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	A	C	T	T	T	T	G	T	T	T	C	C	BOL	
H17	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	T	T	C	C	BOL	
H25	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	A	T	A	G	G	G	C	C	T	T	C	G	T	C	T	T	C	RS	
H28	G	T	G	G	G	G	T	A	A	C	C	G	G	G	T	A	T	G	C	G	A	C	G	T	A	G	G	A	C	T	T	T	T	G	T	T	T	T	C	RS	
H29	G	T	G	A	G	G	C	A	C	C	C	G	G	G	T	A	T	T	C	G	A	C	G	T	A	G	A	G	C	C	T	T	C	G	T	C	T	T	C	GO/CE/PI **	
H32	A	T	G	G	G	A	T	A	C	C	C	G	A	G	T	C	T	G	T	A	A	T	G	G	G	C	G	A	C	T	C	C	C	G	C	T	T	T	C	ARG	
H33	G	T	G	G	G	A	T	A	C	G	C	A	A	G	T	C	G	T	A	C	C	G	G	G	G	G	A	C	T	C	C	C	G	C	T	T	T	C	URU		
H34	G	T	G	G	G	A	T	A	C	C	C	A	A	G	T	C	T	G	T	A	C	C	G	G	G	G	G	A	C	T	C	C	C	G	C	T	T	T	C	GO	
	15	207	297	326	331	205	313	319	355	364	8	79	126	169	203	437	450	475	738	87	122	157	1949	2078	307	356	487	548	100	108	148	167	212	267	284	352	500	522	570	584	Posição (pb) no loco
	15	207	297	326	331	590	698	704	740	749	992	1063	1110	1153	1187	1421	1434	1459	1722	1879	1914	1949	2078	2099	2148	2279	2340	2482	2490	2530	2549	2594	2649	2666	2734	2882	2904	2952	2966	Posição (pb) no X	

\*\* Clado referente à população de *L. tigrinus* do CNE

Fig. 4

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Allendorf FW, Leary RF, Spruell P, Wenburg DJK. 2001. The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends Ecol. Evol.* 16: 613-622.
- Arnold ML. 1992. Natural hybridization as an evolutionary process. *Annu Rev Ecol Syst.* 23: 237-261.
- Bandelt HJ, Foster P, Rohl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Mol. Biol. Evol.* 16: 37-48.
- Barton NH. 2001. The role of hybridization in evolution. *Mol. Ecol.* 10: 551-568.
- Barton NH, Hewitt GM. 1985. Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 113-148
- Beaumont M, Barrat EM, Gottelli D, Kitchener AC, Daniels MJ, Pritchard JK, Bruford W. 2001. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology* 10: 319-336.
- Brumfield RT, Beerli P, Nickerson DA, Edwards SV. 2003. The utility of single nucleotide polymorphisms in inferences of population history. *Trends Ecol. Evol.* 18: 249-257.
- Congdon BC, Piatt JF, Martin K, Friesen VL. 2000. Mechanisms of population differentiation in marbled murrelets: historical versus contemporary processes. *Evolution* 54: 974-986.
- Culver M, Menotti-Raymond MA, O'Brien SJ. 2001. Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in pumas (*Puma concolor*). *Mol. Biol. Evol.* 18: 1151- 1156.
- Eisenberg J, Redford K. 1999. *Mammals of the Neotropics: the Central Neotropics*. Vol. 3. Illinois: University of Chicago Press.
- Eizirik E, Murphy WJ, O'Brien SJ. 2001. Molecular Dating and Biogeography of the Early Placental Mammal Radiation. *The Journal of Heredity*: 213-219.
- Eizirik E, Indrusiak CB, Trigo TC, Sana DA, Mazim FD, Freitas TRO. 2006. Refined Mapping and Characterization of the Geographic contact zone between *Oncilla* and Geoffroy's cat in Southern Brazil. *Cat News* 45: 8-11.
- Falush D, Stephens M, Pritchard TJK. 2003. Inference of Population Structure Using Genetics Multilocus Genotype Data: Linked Loci and Correlated Allele Frequencies. *Genetics* 164: 1567-1587.
- Flamand JRB, Vankan D, Gairke KP, Duong H, Barker JSF. 2003. Genetic identification of wild Asian water buffalo in Nepal. *Anim. Conserv.* 6: 265-270.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge: Cambridge University Press.
- Gay L, Neubauer G, Zagalska-Neubauer M, Debain C, Pons JM, David P, Crochet PA. 2007. Molecular and morphological patterns of introgression between two large white-headed gull species in a zone of recent secondary contact. *Mol. Ecol.* 16: 3215-3227.
- Gordon D, Abajian C, Green P. 1998. Consed: a graphical tool for sequence finishing. *Genome Res.* 8: 195-202.

- Gottelli D, Sillero-Zubiri C, Applebaum GD, Roy MS, Girman DJ, Garcia-Moreno J, Ostrander EA, Wayne RK. 1994. Molecular genetics of the most endangered canid: the Ethiopian wolf, *Canis simensis*. *Mol. Ecol.* 3: 301-312.
- Hansen MM, Ruzzante DE, Nielsen EE, Mensberg KD. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Mol. Ecol.* 9: 383-594.
- Hare MP. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends Ecol. Evol.* 16: 700-706
- Hare MP, Cipriano F, Palumbi SR. 2002. Genetic evidence on the demography of speciation in allopatric dolphin species. *Evolution* 56: 804-816.
- Harrison RG. 1993. Hybrid zones and the evolutionary process. New York: Oxford University Press.
- IBAMA. 2003. Lista nacional das espécies da fauna Brasileira ameaçadas de extinção. Disponível no site: <http://www.mma.gov.br/port/sbf/fauna/index.cfm>.
- IUCN/SSC Cat Specialist Group. 2003. *Leopardus tigrinus/Leopardus geoffroyi*. In: IUCN 2003 IUCN Red List of Threatened Species. Disponível no site: <http://www.redlist.org/>
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slaterry J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien SJ. 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science* 311: 73-77.
- Kuhner MK. 2006. Genetics and population analysis LAMARC 2.0: maximum likelihood and Bayesian estimation of population parameters. *Bioinform. Appl. Note* 22: 768-770.
- Lancaster ML, Gemmill NJ, Negro S, Goldsworthy S, Sunnucks P. 2006. Ménage à trois on Macquarie Island: hybridization among three species of fur seal (*Arctocephalus* spp.) following historical population extinction. *Mol. Ecol.* 15: 3681-3692.
- Lecis R, Pierpaoli M, Birò ZS, Szemethy L, Ragni B, Vercillo F, Randi DE. 2006. Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Mol. Ecol.* 15: 119-131.
- Lindblad-Toh K, Wade CM, Mikkelsen TS, et al. (46 co-authors). 2005. Genome sequence, comparative analysis and haplotype structure of the domestic dog. *Nature* 438: 803-819.
- Lyons LA, Laughlin TF, Copeland NG, Jenkins NA, Womack JE, O'Brien SJ. 1997. Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nature* 15: 47-56.
- Marques AAB, Fontana CS, Vélez E, Bencke GA, Schneider M, Reis RE. 2002. Lista de referência da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Decreto nº 41.672, de 10 junho de 2002. Porto Alegre: FZB/MCT-PUCRS/PANGEA (Publicações avulsas FZB, 11). p. 1-52.
- Murphy WJ, Sun S, Chen ZQ, Pecon-Slaterry J, O'Brien SJ. 1999. Extensive conservation of sex chromosome organization between cat and human revealed by parallel radiation hybrid mapping. *Genome Res.* 9: 1223-1230.

- Nolte AW, Freyhof J, Tautz D. 2006. When invaders meet locally adapted types: rapid moulding of hybrid zones between sculpins (*Cottus*, Pisces) in the Rhine system. *Mol. Ecol.* 15: 1983-1993.
- Nowell K, Jackson P. 1996. Wild Cats: status survey and conservation action plan. IUCN/SSC Cat Specialist Group, Gland, Switzerland.
- O'Brien, SJ & Mayr, E (1991) Bureaucratic Mischief: Recognizing Endangered Species and Subspecies. *Science*, 251: 1187-1188.
- Oliveira, TG. 1994. Neotropical Cats: Ecology and Conservation. São Luís: EDUFMA.
- Pacheco NM, Congdon BC, Friesen VL. 2002. The utility of nuclear introns for investigating hybridization and genetic introgression: a case study involving *Brachyramphus murrelets*. *Conserv. Genet.* 3: 175-182.
- Palumbi SR. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. In: HILLIS DM, MORITZ C, MABLE BK, editors. *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. p. 205-247.
- Pontius JU, O'Brien SJ. 2007. Genome Annotation Resource Fields - GARFIELD: A Genome Browser for *Felis catus*. *Journal of Heredity* 98: 386-389.
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly PJ. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Pritchard JK, Wen X, Falush D. 2007. Documentation for structure software: Version 2.2. p. 1-36.
- Randi E, Pierpaoli M, Beaumont M, Ragni B, Sforzi A. 2001. Genetic Identification of wild and domestic cats (*Felis silvestris*) and their hybrids using bayesian clustering methods. *Mol. Biol. Evol.* 18: 1679-1693.
- Reich DE, Wayne RK, Goldstein DB. 1999. Genetic evidence for a recent origin by hybridization of red wolves. *Mol. Ecol.* 8: 139-144.
- Roy MS, Geffen E, Smith D, Ostrander EA, Wayne RK. 1994. Patterns of differentiation and hybridization in North American Wolflike canids, revealed by analysis of microsatellite loci. *Mol. Biol. Evol.* 11: 553- 570.
- Rozas J, Sánchez-Delbarrio JC, Messeguer X, Rozas R. 2003. DNASP, DNA polymorphism analyses by the coalescent and other methods. *Bioinformatics* 19: 2496-2497.
- Rozen S, Skaletsky HJ 2000. Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S, editors. *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. Totowa, NJ: Humana Press. p. 365-386.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schlötherer C. 1998. Microsatellites. In: Hoelzel AR, editors. *Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach*. 2nd edition. New York: Oxford University Press Inc. p. 237-261.



- Schneider S, Kueffer JM, Roesli D, Excoffier L. 2000. Arlequin ver. 2.1: A software for population genetic data analysis. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Schwartz MK, Pilgrim KL, Mckelvey KS, Lindquist L, Claar JJ, Loch S, Ruggiero LF. 2004. Hybridization between Canada lynx and bobcats: genetic results and management implications. *Conserv. Genet.* 5: 349- 355.
- Seldin MF, Morii T, Collins-Schramm HE, Chima B, Kittles R, Criswell LA, Li H. 2004. Putative ancestral origins of chromosomal segments in individual African Americans: implications for admixture mapping. *Genome Res.* 14: 1076-1084.
- Shi L, Drummond P, De Kloet S, Pimentel-Smith G, Smith EJ. 2001. Comparative DNA sequence analysis of genetic variation in the African grey parrot, *Psittacus erythacus*. *Genetica* 110: 227-230.
- Slatkin M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457-462.
- Schmidt-Kuntzel A, Nelson G, David V, Schäffer A, Eizirik E, Roelke-Parker M, Kehler J, Hannah S, O'Brien SJ, Menotti-Raymond M. 2009. Linkage Map and the Sex-linked Orange Locus – Mapping of *Orange*, Multiple Origins, and Epistasis over *Non-Agouti*. *Genetics*.
- Stephens M, Smith N, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Amer. Jour. of Hum. Genet.* 68: 978-989.
- Sunquist ME, Sunquist F. 2002. *Wild cats of the World*. Chicago: University Chicago Press.
- Tamura K, Dudley J, Nei M, Kumar S. 2007. MEGA: MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol. Biol. Evol.* 24: 1596-1599
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ. 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Trigo TC, Freitas TRO, Kunzler G, Cardoso L, Silva JCR, Johnson WE, O'Brien SJ, Bonatto SL, Eizirik E. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Mol. Ecol.* 17: 4317-4333.
- Vähä J, Primmer CR. 2006. Efficiency of model-based Bayesian methods for detecting hybrid individuals under different hybridization scenarios and with different numbers of loci. *Mol. Ecol.* 15: 63-72.
- Venta PJ, Brouillette JA, Yuzbasiyan-Gurkan V, Brewer GJ. 1996. Gene-specific universal mammalian sequence-tagged sites: application to the canine genome. *Biochemical Genetics* 34: 321-341.
- Verardi A, Lucchini V, Randi E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Mol. Ecol.* 15: 2845-2855.

- Vilà C, Wayne RK. 1999. Hybridization between wolves and dogs. *Conserv Biol* 13: 195-198.
- Watterson GA. 1975. On the number of segregating sites in genetical models without recombination. *Theoretical Pop Biology* 7: 256-276.
- Wurster-Hill DH, Centerwall WR. 1982. The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids. *Cytogenet Cell Genet* 34: 178-92.
- Zhang DX, Hewitt G. 2003. Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Mol. Ecol.* 12: 563-584.

## APÉNDICE

Table 1 – Demographic parameters inferred for the three hybridizing species (*Leopardus tigrinus*, *L. geoffroyi* and *L. colocolo*) using the coalescent-based approaches implemented in Lamarc. Migration rates are expressed as number of migrants. Ninety-five per cent confidence intervals are show in parenthesis.

	mtDNA	X segment	Y segment
$\theta$ <i>L. tigrinus</i>	0.04396 (0.02491 – 0.07689)	0.00029 (0.00007 – 0.00073)	0.00035 (0.00009 – 0.00147)
$\theta$ <i>L. geoffroyi</i>	0.03387 (0.01711 – 0.05649)	0.00027 (0.00003 – 0.00071)	0.00019 (0.00002 – 0.00090)
$\theta$ <i>L. colocolo</i>	0.06681 (0.02234 – 0.13657)	0.00030 (0.00004 – 0.00223)	0.00054 (0.00003 – 0.00380)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> into <i>L. geoffroyi</i> )	1.948 (0.226 – 10.465)	0.230 (0.001 – 0.717)	0.166 (0.001 – 0.910)
Nm ( <i>L. tigrinus</i> into <i>L. colocolo</i> )	2.611 (0.114 – 13.383)	0.119 (0.000 – 2.101)	0.048 (0.000 – 2.275)
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. tigrinus</i> )	3.656 (0.588 – 12.627)	0.255 (0.008 – 0.732)	0.238 (0.005 – 0.343)
Nm ( <i>L. geoffroyi</i> into <i>L. colocolo</i> )	0.005 (0.000 – 2.158)	0.000 (0.000 – 0.993)	0.066 (0.000 – 2.507)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. tigrinus</i> )	0.736 (0.018 – 4.005)	0.047 (0.000 – 0.602)	0.044 (0.000 – 1.033)
Nm ( <i>L. colocolo</i> into <i>L. geoffroyi</i> )	0.001 (0.000 – 0.744)	0.000 (0.000 – 0.327)	0.043 (0.000 – 0.816)

Table 2. Individuals inferred to have a hybrid (*L. tigrinus* vs. *L. geoffroyi*) origin based on the complete set of molecular markers used in this study. I) Proportion of membership  $q$  of each individual inferred by microsatellite analyses using STRUCTURE. The values in parentheses are the posterior credibility intervals. II) Species-specific haplotypes from molecular segments of the mitochondrial DNA (mtDNA), X and Y chromosome introns. Introgressed haplotypes are shown in bold.

<i>Leopardus geoffroyi</i>					<i>Leopardus tigrinus</i>				
ID	I		II		ID	I		II	
	Microsatellites	mtDNA	X chr	Y chr		Microsatellites	mtDNA	X chr	Y chr
bLge01φ	0.973 (0.839, 1.000)	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	bLti01*φ	0.316 (0.098,0.567)	<b>Lge</b>	<i>Lti</i>	<b>F</b>
bLge02φ	0.811 (0.494, 1.000)	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	bLti05φ	0.026 (0.000,0.193)	<i>Lti</i>	<b>Lge</b>	<b>Lge</b>
bLge04*φ	0.475 (0.208, 0.737)	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	bLti09*φ	0.546 (0.303,0.782)	<b>Lge</b>	<i>Lti</i>	<b>F</b>
bLge05*φ	0.532 (0.293, 0.769)	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	bLti47*	0.391 (0.097,0.696)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	F
bLge07*φ	0.432 (0.120, 0.736)	<b>Lti</b>	---	<i>Lge</i>	bLti49*φ	0.636 (0.388,0.855)	<b>Lge</b>	<i>Lti</i>	<b>F</b>
bLge08*φ	0.554 (0.302, 0.800)	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	bLti51*	0.317 (0.098,0.575)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	F
bLge10φ	0.883 (0.635, 1.000)	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>	<b>F</b>	bLti68φ	0.035 (0.000,0.253)	<i>Lti</i>	<b>Lge</b>	<i>Lti</i>
bLge11*φ	0.527 (0.275, 0.777)	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	bLti79*φ	0.561 (0.322,0.795)	<b>Lge</b>	<b>Lge / Lti</b>	<b>F</b>
bLge12φ	0.992 (0.956, 1.000)	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	bLti98*	0.640 (0.379,0.878)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	F
bLge13*φ	0.483 (0.247, 0.720)	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	bLti100*	0.285 (0.017,0.558)	<i>Lti</i>	---	<i>Lti</i>
bLge31*	0.738 (0.486, 0.944)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	bLti102*	0.344 (0.055,0.659)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	F
bLge32*φ	0.567 (0.329, 0.796)	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	bLti108*	0.313 (0.085,0.586)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	---
bLge33*	0.820 (0.600, 0.994)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	bLti119*φ	0.504 (0.245,0.763)	<i>Lti</i>	---	<b>Lge</b>
bLge35*	0.784 (0.550, 0.957)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	bLti120*	0.295 (0.072,0.564)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>
bLge38*	0.535 (0.272, 0.789)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	F	bLti121*φ	0.787 (0.543,0.962)	<b>Lge</b>	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>
bLge39*	0.645 (0.361, 0.896)	<i>Lge</i>	---	---	bLti135*	0.524 (0.276,0.771)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	F
bLge42*φ	0.494 (0.257, 0.732)	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	bLti137*	0.244 (0.002,0.514)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>
bLge46*φ	0.327 (0.052, 0.626)	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>	bLti138*	0.361 (0.017,0.664)	<i>Lti</i>	---	F
bLge47*	0.703 (0.447, 0.917)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	F	bLti140*	0.296 (0.081,0.549)	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>	<i>Lti</i>
bLge49φ	0.773 (0.403, 1.000)	<i>Lge</i>	<i>Lti</i>	<i>Lge</i>	bLti141*	0.408 (0.177,0.661)	<i>Lti</i>	---	---

Table 2 (Cont.)

<i>Leopardus geoffroyi</i>					<i>Leopardus tigrinus</i>				
ID	I		II		ID	I		II	
	Microsatellites	mtDNA	X chr	Y chr		Microsatellites	mtDNA	X chr	Y chr
bLge72*φ	0.166 (0.000, 0.462)	<b>Lti</b>	---	<b>Lti</b>	bLti149*	0.458 (0.157,0.742)	<b>Lti</b>	---	---
bLge73*	0.404 (0.166, 0.663)	<i>Lge</i>	---	<i>Lge</i>					
bLge74*φ	0.365 (0.121, 0.635)	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	<b>F</b>					
bLge75*	0.606 (0.308, 0.891)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	F					
bLge76*	0.526 (0.244, 0.799)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>					
bLge78*	0.765 (0.536, 0.945)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	F					
bLge79*φ	0.653 (0.366, 0.900)	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>	<b>Lti</b>					
bLge80φ	0.942 (0.781, 1.000)	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>					
bLge89*	0.752 (0.507, 0.947)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	---					
bLge90*φ	0.560 (0.288, 0.824)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	<b>Lti</b>					
bLge91*	0.645 (0.390, 0.865)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>					
bLge93*φ	0.390 (0.117, 0.692)	<b>Lti</b>	<i>Lge</i>	<b>F</b>					
bLge94*	0.535 (0.282, 0.774)	<i>Lge</i>	<i>Lge</i>	F					
bLge96*	0.549 (0.285, 0.795)	<i>Lge</i>	---	---					
LgeN11φ	0.979 (0.844, 1.000)	<b>Lti</b>	---	---					

\* Evidence of hybridization based on microsatellite data; φ Evidence of hybridization based on molecular sequences.

Note: F = Female; *Lge* = *L. geoffroyi* specific haplotype; *Lti* = *L. tigrinus* specific haplotype.

Table 3 – Levels of genetic differentiation between the four clusters defined by STRUCTURE analysis based on Fst and Rst indexes.

	<i>L. geoffroyi</i>	SSE <i>L. tigrinus</i>	CNE <i>L. tigrinus</i>	<i>L. colocolo</i>
<i>L. geoffroyi</i>	---	0.105* (2.122)	0.413* (0.355)	0.535* (0.217)
SSE <i>L. tigrinus</i>	0.069* (3.367)	---	0.328* (0.512)	0.680* (0.118)
CNE <i>L. tigrinus</i>	0.099* (2.263)	0.176* (1.174)	---	0.837* (0.049)
<i>L. colocolo</i>	0.143* (1.498)	0.119* (1.842)	0.241* (0.789)	---

Fst below, Rst above \*  $p < 0.001$

Abbreviations: SSE – south and southeast Brazilian regions and CNE – central and northeast Brazilian regions.