

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**História evolutiva de *Leopardus colocolo* (Mammalia, Felidae):
análise de padrões filogeográficos e sua influência no processo de
hibridação com *Leopardus tigrinus***

Anelise da Silva Santos

Porto Alegre - 2012

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

História evolutiva de *Leopardus colocolo* (Mammalia, Felidae): análise de padrões filogeográficos e sua influência no processo de hibridação com *Leopardus tigrinus*

**Anelise da Silva Santos
Orientador: Dr. Eduardo Eizirik**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2012

SUMÁRIO

DEDICATÓRIA	IV
AGRADECIMENTOS	V
RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
APRESENTAÇÃO	IX
ARTIGO CIENTÍFICO	XX
Resumo	2
Introdução	2
Materiais e Métodos	5
Resultados	11
Discussão	16
Considerações Finais	30
Financiamento	32
Agradecimentos	32
Referências	33
Legenda das Tabelas	40
Legenda das Figuras	40
Tabelas	43
Figuras	49
REFERÊNCIAS	XXI

DEDICATÓRIA

“A compaixão pelos animais está intimamente ligada à bondade de caráter, e pode ser seguramente afirmado que quem é cruel com os animais não pode ser um bom homem.”

Arthur Schopenhauer

Dedico esta dissertação a todos que lutam
em defesa da vida e que admiram a
natureza nos seus pequenos detalhes.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, prof. Eduardo Eizirik, pelo voto de confiança e pelo apoio nestes seis anos de “carnivoróloga”. Sou muito grata, de verdade!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul, pelo suporte financeiro ao projeto.

Aos professores do PPG-Zoologia pelos ensinamentos passados.

Aos meus colegas de pós-graduação pelo convívio e troca de ideias.

A todos os colegas genômicos: pela troca de experiências, pelas conversas, pelas risadas na hora do café... o trabalho flui melhor quando estamos em um lugar onde nos sentimos bem... o Genoma é um destes.

À minha trupe favorita: Cris, Rê, Taia, Aninha, Tali, Marina, Ale, Ane, Flávia, Elenara, Mirian, Tati e Fê... vocês são mara! Em especial à Carlinha, que conviveu comigo durante todo este mestrado, das aulas da pós à bancada, dividindo angústias e episódios de Glee! Obrigada pela amizade.

À Cladi e à Pri, que tanto me ajudaram na realização deste projeto durante o período de bancada. Obrigada pela força. Tiaguinho e Bia: obrigada pela ajudinha naquelas extrações!

Aos meus amigos que eu tanto adoro: Afonso, Nati, Karen, Adri, Kim, Lauren, Felipe, Jana, Cla, Paula, Camila, Jatoba, Jonas, Dani, Rac... não me imagino sem a amizade de vocês. Um obrigada especial para o meu amigo Zé, que tanto me ajudou na construção dos mapas de distribuição do trabalho. Prometo não te importunar tão cedo!

À minha irmã, Loraine, por ter “segurado as pontas” em casa neste último ano... muito obrigada mesmo.

À minha irmãzinha, Maria Juliana, por ter me tornado forte, mesmo sem saber.

À minha vózinha querida, dona Maria, pela acolhida em sua casa nestes últimos meses tão angustiantes! Obrigada pelo carinho e pelos cuidados!

Às minhas tias, que também se preocuparam comigo nesta finaleira de trabalho... obrigada pelas palavras de apoio.

À minha amiguinha felina, dona Kissy, por estar sempre pertinho de mim e me conhecer melhor do que qualquer pessoa.

Aos meus pais, Ronaldo e Lucimar, que sempre me incentivaram a estudar. Apesar das dificuldades e da distância, isto pertence a vocês também!

RESUMO

Leopardus colocolo (popularmente conhecido como gato-palheiro) é uma espécie pouco conhecida de felídeo neotropical que possui uma ampla distribuição geográfica na América do Sul, sendo fortemente associada a habitats com vegetação aberta. A presença de diferenças fenotípicas entre populações geográficas desta espécie levantou questões quanto à taxonomia e a história demográfica deste táxon. Posteriormente, estudos filogeográficos iniciais indicaram que a espécie apresenta realmente uma forte estrutura genética, mas ficaram predominantemente restritos a amostras de regiões andinas, de forma que grande parte da distribuição deste felídeo não foi analisada detalhadamente. Além disso, a recente descoberta de evidências de hibridação entre *L. colocolo* e outra espécie de felídeo neotropical, *Leopardus tigrinus*, nas regiões centro-oeste e nordeste do Brasil, revelou uma complexidade ainda maior de sua história evolutiva, e enfatizou a necessidade de estudos mais detalhados acerca de seus padrões filogeográficos e demografia histórica. Estudos prévios revelaram que este evento de hibridação é relativamente antigo, sendo atualmente detectado apenas como uma introgressão de DNA mitocondrial (mtDNA) de *L. colocolo* em populações de *L. tigrinus*, sem qualquer vestígio até o momento identificado no genoma nuclear. Assim sendo, o objetivo deste trabalho foi analisar quatro segmentos mitocondriais de indivíduos de *L. colocolo* amostrados amplamente em sua distribuição geográfica, em conjunto com amostras de *L. tigrinus* híbridos provenientes das regiões centro-oeste e nordeste do Brasil. A análise de 2141 pares de bases da região controle e dos genes *ATP8*, *ND5* e *Cit-b* do DNA mitocondrial indicou uma forte estruturação populacional em *L. colocolo*, com altas diversidades haplotípica e nucleotídica em comparação com outros felídeos neotropicais. Os haplótipos chilenos, bolivianos e argentinos foram posicionados como os mais basais na estrutura filogeográfica de *L. colocolo*, enquanto as amostras brasileiras e uruguaias formaram grupos mais recentes, sugerindo uma colonização oeste – leste das linhagens desta espécie. Análises demográficas indicaram uma expansão populacional há aproximadamente 50 mil anos, o que coincide com estudos paleoclimáticos e paleogeográficos que indicam uma expansão das vegetações do tipo savana no Brasil e consequente diminuição das florestas. As análises em conjunto com as amostras de *L. tigrinus* híbridos revelaram uma história complexa de hibridação. Não encontramos compartilhamento de haplótipos entre *L. colocolo* e *L. tigrinus* híbridos quando os segmentos mitocondriais foram analisados em conjunto (concatenados), apoiando a hipótese de que este evento de hibridação seja bastante antigo. Além disto, a análise da estrutura populacional revelou que as populações do gato-palheiro oriundas do sul do Brasil e do Uruguai são mais próximas a amostras de *L. tigrinus* híbridos do que a linhagens atuais de *L. colocolo* do centro-oeste e do nordeste brasileiro. Este fato, além de surpreendente do ponto de vista evolutivo, tem consequências diretas para a conservação destes grupos do sul, os quais se encontram isolados geograficamente e parecem evoluir sem fluxo gênico (ao menos mitocondrial) com populações próximas. Caso este resultado seja confirmado com marcadores nucleares, isto enfatizaria a priorização imediata destas populações para fins de manejo e conservação. Do ponto de vista evolutivo, este trabalho evidenciou a importância de analisar as populações de *L. colocolo* do leste da América do Sul em conjunto com as amostras de híbridos de *L. tigrinus*, visto que uma parte essencial da história mitocondrial do gato-palheiro parece estar sendo retratada apenas pela inclusão de amostras desta outra espécie.

ABSTRACT

Evolutionary history of *Leopardus colocolo* (Mammalia, Felidae): analysis of phylogeographic patterns and their influence on the hybridization process with *Leopardus tigrinus*.

The pampas cat, *Leopardus colocolo*, is a little-known species of Neotropical felid that has a broad geographic distribution in South America, and is strongly associated with grasslands. The presence of phenotypic differences among geographic populations of this species has raised questions about the demographic history and taxonomy of this felid. More recently, initial phylogeographic studies showed that this species indeed possesses a strong genetic structure, but were mostly restricted to Andean samples, so that much of its distribution was not analyzed in detail. Furthermore, the recent discovery of evidence of hybridization between *L. colocolo* and another Neotropical felid (*L. tigrinus*) in central and northeastern Brazil, added an even greater complexity to the evolutionary history of this species, and emphasized the need for more detailed studies on its phylogeographic patterns and historical demography. Previous studies have indicated that this hybridization event is relatively old, and is currently detected only as an introgression of *L. colocolo* mitochondrial DNA (mtDNA) into *L. tigrinus* populations, without any trace so far identified in the nuclear genome. Therefore, the aim of this study was to analyze four mitochondrial segments in *L. colocolo* individuals sampled broadly across their geographic distribution, along with samples of *L. tigrinus* hybrids from central and northeastern Brazil. The analysis of 2,141 base pairs of the mtDNA control region and *ATP8*, *ND5* and *Cyt-b* genes revealed a strong population structure in *L. colocolo*, with high haplotype and nucleotide diversity in comparison with others Neotropical cats. Haplotypes from Chile, Bolivia and Argentina were positioned as the most basal in the phylogeographic structure of *L. colocolo*, while samples from Brazil and Uruguay formed recent, internal groups, suggesting a west-to-east colonization for this species. Demographic analyses indicated the occurrence of two episodes of population expansion, an earlier one (ca. 200,000 years ago) in the west, and another ca. 50,000 years ago in the east. The latter coincides with paleoclimatic and paleogeographic studies that indicated an expansion of grasslands in Brazil and consequent loss of forests. The joint analysis with the *L. tigrinus* hybrid samples revealed a complex history of hybridization. We found no haplotype sharing between *L. colocolo* and *L. tigrinus* hybrids, supporting the hypothesis that this hybridization event is quite old. Moreover, the analysis of population structure revealed that the pampas cat populations from southern Brazil and Uruguay are phylogenetically closer to *L. tigrinus* hybrid haplotypes than to the extant lineages of *L. colocolo* from central and northeastern Brazil. The most plausible interpretation to this unusual pattern is that ancestral *L. colocolo* haplotype lineages from central Brazil have only been sampled in present-day hybrids, and may be extinct in their original species. The observed pattern also indicates that southern Brazil and Uruguay were colonized by *L. colocolo* from central Brazil, with no immediate connection to nearby populations still present in Argentina. This has direct consequences for the conservation of this group, which is geographically isolated and appears to evolve without gene flow (at least mitochondrial) with nearby populations. If this result is confirmed with nuclear markers, it will emphasize the immediate prioritization of these populations for conservation and management. From an evolutionary standpoint, our results showed the importance of analyzing *L. colocolo* populations from eastern South America, as well as the inclusion of *L. tigrinus* hybrids, because an essential portion of the pampas cat mitochondrial history seems to be currently recorded only by these introgressed haplotypes.

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação, intitulada “História evolutiva de *Leopardus colocolo* (Mammalia, Felidae): análise de padrões filogeográficos e sua influência no processo de hibridação com *Leopardus tigrinus*” foi desenvolvida como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Zoologia, da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Este trabalho teve como objetivo investigar a história evolutiva de *Leopardus colocolo*, caracterizando padrões filogeográficos, inferindo processos históricos de estruturação e/ou expansão populacional, e utilizando estas informações para aprofundar o conhecimento sobre a hibridação entre esta espécie e *L. tigrinus*.

Os resultados aqui apresentados foram gerados ao longo dos anos de 2010 e 2011 no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da PUCRS, sob orientação do Professor Dr. Eduardo Eizirik.

O trabalho está sendo apresentado sob a forma de um artigo científico, segundo as normas da revista *Journal of Heredity*, para o qual o mesmo será posteriormente traduzido para a língua inglesa e submetido (categoria *Article*). As normas de submissão para autores estão disponíveis no sítio http://www.oxfordjournals.org/our_journals/jhered/for_authors/msprep_submission.html. As tabelas e as figuras podem ser encontradas após o texto do manuscrito. Antecede o artigo um capítulo introdutório caracterizando o histórico do problema.

INTRODUÇÃO GERAL

Leopardus colocolo (Molina 1782)

A região neotropical possui atualmente dez espécies de felídeos (Sunquist e Sunquist 2002), os quais colonizaram a América do Sul após a formação do Istmo do Panamá, no Plioceno, há cerca de três milhões de anos (Johnson et al. 2006). Segundo Johnson et al. (2006), as espécies neotropicais de felídeos são divididas em três linhagens: a Linhagem da Jaguatirica, a Linhagem do Puma e a Linhagem *Panthera*. A Linhagem da Jaguatirica é a única endêmica do Neotrópico, compreendendo sete das dez espécies de felídeos atuais desta região (Figura 1): *Leopardus pardalis* (jaguatirica), *Leopardus wiedii* (gato-maracajá), *Leopardus tigrinus* (gato-do-mato-pequeno), *Leopardus geoffroyi* (gato-do-mato-grande), *Leopardus colocolo* (gato-palheiro), *Leopardus guigna* (huiña) e *Leopardus jacobita* (gato-andino).

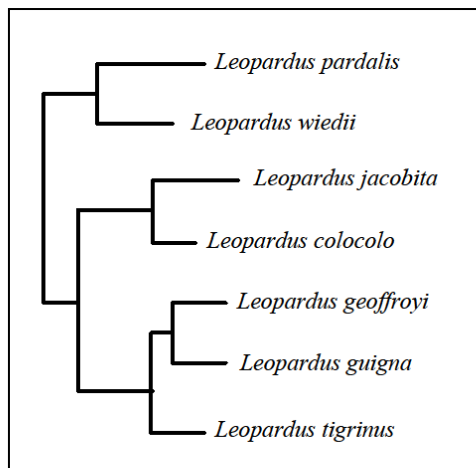


Figura 1: Relações filogenéticas entre as espécies que compõem o gênero *Leopardus* (Johnson et al. 2006).

Leopardus colocolo (Molina 1782), popularmente conhecido como gato-palheiro ou gato-dos-pampas, é um dos felídeos menos conhecidos dentre os gatos da América do Sul (Silveira 1995). A espécie possui um porte pequeno, com comprimento total variando de 66,3 cm a 106 cm e peso entre 1,7 kg e 3,65 kg (Sunquist e Sunquist 2002). Suas principais características diagnósticas são as orelhas grandes e pontiagudas, a cauda curta, a pelagem relativamente longa e áspera (principalmente na região do dorso) e a presença de listras transversais largas e escuras nas pernas anteriores e posteriores. Quanto aos padrões de pelagem, *L. colocolo* é a espécie mais diferenciada dentre os felídeos da Linhagem da

Jaguatirica, com uma coloração muito variável, podendo ir do cinza-amarelado ao cinza escuro ou marrom-avermelhado, com ou sem a presença de ocelos escuros. (Eisenberg e Redford 1999; Nowell e Jackson 1996; Oliveira 1994; Oliveira e Cassaro 1999; Figura 2a). A ocorrência de indivíduos melânicos é confirmada a partir de registros em campo e cativeiro (Robinson 1976; Silveira et al. 2005).

A espécie é preferencialmente terrestre, embora possa subir em árvores com facilidade (Oliveira 1994) e se manter sobre os galhos (Silveira 1995). Segundo Eisenberg e Redford (1999), *L. colocolo* possui hábitos noturnos, no entanto, um estudo realizado por Silveira et al. (2005) no Parque Nacional de Emas, Brasil, mostrou que a espécie apresenta, pelo menos nessa região, atividades principalmente diurnas, seguida de algumas atividades crepusculares e ocasionalmente noturnas.

A dieta do gato-palheiro inclui principalmente pequenos mamíferos e aves terrestres (Napolitano et al. 2008; Nowell e Jackson 1996; Romo 1995; Silva 1984; Silveira et al. 2005; Walker et al. 2007), porém há registros de alguns animais que consumiram algumas espécies de répteis (Bagno et al. 2004; Walker et al. 2007), uma espécie de besouro (Bagno et al. 2004) e até cabras adultas (Oliveira 1994). Aspectos reprodutivos de *L. colocolo* são pouco conhecidos. Sabe-se que após uma gestação de cerca de 80 dias nascem de um a três filhotes (Oliveira 1994).

O gato-palheiro possui uma ampla distribuição na América do Sul (Figura 2b), ocorrendo em uma variedade de habitats. Sua distribuição acompanha em grande parte a cadeia montanhosa dos Andes, ocorrendo possivelmente desde o sudoeste da Colômbia (Ruiz-Garcia et al. 2003), seguindo pelas áreas montanhosas do Equador, Peru, Bolívia, Chile e Argentina, até o Estreito de Magalhães. Também ocorre no Chaco paraguaio e nos pampas argentinos e uruguaios (Eisenberg e Redford 1999; Nowell e Jackson 1996; Villalba e Delgado 2005). No Brasil, a espécie está distribuída em duas regiões distintas e aparentemente disjuntas no âmbito do território nacional. Uma delas abrange o Cerrado, nas regiões central, sudeste e nordeste do país, e também as planícies inundáveis do Pantanal (Bagno et al. 2004; Sánchez-Soto 2007; Silveira 1995). A segunda área se limita ao Rio no Grande do Sul (RS), no qual sua distribuição é pouco conhecida devido à escassez de registros. Aparentemente restringe-se à metade sul, com a maioria dos registros na Campanha do Sudoeste e na Depressão Central (Indrusiak e Eizirik 2003), em provável conexão com populações do Uruguai (ver Figura 2b). Oliveira (1994) afirma que *L. colocolo* é raro no Brasil, ao contrário das regiões de clima temperado, onde é mais facilmente encontrado.



Figura 2: a) *Leopardus colocolo*. Figura extraída de Silveira (1999). b) Registros de ocorrência de *Leopardus colocolo*. Extraída do site: IUCN 2011. *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.* <www.iucnredlist.org>. Obs.: A descontinuidade observada na Argentina não é confirmada, sendo provavelmente resultado de falta de dados da região envolvida.

Sobre seu *status* de conservação na natureza, *L. colocolo* está incluso em diversas listas internacionais, nacionais e regionais da fauna selvagem ameaçada de extinção (Indrusiak e Eizirik 2003; Machado et al. 2008; Pereira et al. 2008; UNEP-WCMC 2012). Segundo Pereira et al. (2008), as principais ameaças à sobrevivência da espécie são a perda e a degradação de habitats devido à agricultura e à pecuária extensiva. Eisenberg e Redford (1999), a partir da compilação de dados de diversos autores, afirmaram que a espécie foi importante no comércio de peles (ver também Brito e Elgueta 2003), tendo sido exportadas pela Argentina cerca de 78.000 peles, entre 1976 e 1979. A retaliação por pecuaristas, assim como a caça realizada para fins culturais - uma prática realizada tradicionalmente por alguns povos na região andina - também são ameaças consideráveis para a espécie (Pereira et al. 2008). Apesar dos dados expostos acima, é difícil dizer com exatidão quais são as ameaças para esta espécie, visto que muito pouco é conhecido sobre a mesma. A carência de conhecimento sobre aspectos básicos da biologia desta espécie acaba por dificultar a elaboração e efetivação de estratégias adequadas para o seu manejo e conservação (Nowell e Jackson 1996).

Ferramentas Moleculares e o Estudo da Filogeografia

Com o avanço da genética molecular nos últimos anos, tem-se permitido aprimorar estudos sobre estruturação demográfica, variabilidade genética e subdivisões em escala

geográfica de populações naturais, trazendo grandes contribuições para a compreensão de padrões evolutivos e biogeográficos em diversos táxons, bem como para a definição de unidades e prioridades para a conservação de espécies ameaçadas (Avice e Hamrick 1996; O'Brien 1994). Neste contexto, um campo de estudo que vem fornecendo informações extremamente significativas é a filogeografia (Avice 1994).

A filogeografia é uma área de estudo que integra diversas disciplinas nos campos micro- e macroevolutivo (Bermingham e Moritz 1998), ocupando-se da investigação e definição dos “princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas”, principalmente as intra-específicas (Avice 2000). Para a análise e a interpretação da distribuição destas linhagens, geralmente, necessita-se do apoio de disciplinas como a genética molecular, genética populacional, filogenética, paleontologia, geologia, etologia e geografia histórica (Avice 2000). O envolvimento destas diferentes disciplinas permite que os estudos filogeográficos não somente possam ser utilizados para documentar a atual variabilidade entre e dentro das populações, mas também para inferir as relações filogenéticas entre populações, provendo conhecimento sobre como os organismos reagiram historicamente às mudanças do ambiente (Moritz e Faith 1998).

Para fins de conservação e manejo, os estudos filogeográficos nos permitem ainda identificar dentro de cada espécie dois tipos de unidades demográficas que devem ser consideradas em programas de conservação de espécies: as Unidades Evolutivamente Significativas (UES) e as Unidades de Manejo (UM). As UES são constituídas por populações que se encontram diferenciadas em termos genéticos, morfológicos e/ou ecológicos, estando isoladas demograficamente de outras populações próximas (co-específicas), e, portanto, merecendo ser consideradas como unidades independentes para fins de conservação (Eizirik 1996; Eizirik et al. 2006; King e Burke 1999; Moritz 1994). Já as UM, contidas nas UES, são formadas por populações regionais com restrita conexão demográfica entre si, mas não necessariamente com diferenciação genética significativa, podendo ser também manejadas de forma independente, dependendo da situação específica (Eizirik 1996; Eizirik et al. 2006; Moritz 1994). Desta forma, a análise da distribuição geográfica da diversidade genética dentro de uma espécie é de extrema importância para identificar e priorizar áreas nas quais programas de manejo e conservação devam ser elaborados (Moritz e Faith 1998). Para estes tipos de programas, é fundamental avaliar se a espécie apresenta uma distribuição contínua da variabilidade ou se esta se encontra subdividida, pois, no primeiro caso, qualquer área de sua distribuição pode ser representativa

da espécie enquanto que, havendo estruturação, a representatividade de cada subpopulação terá que ser preservada (Mattevi 2003; Haag 2009).

A utilização da variação em sequências do DNA mitocondrial (mtDNA) tem sido a metodologia mais amplamente utilizada para inferir os padrões filogeográficos das espécies (Avice 2000). Isto se deve a sua fácil caracterização (devido ao conhecimento já disponível sobre sua estrutura); em mamíferos, por exemplo, sequências de mtDNA têm uma taxa de mutação maior do que os genes nucleares e apresentam ausência essencialmente completa de recombinação, evidenciando, desta forma, processos de diferenciação populacional mais rapidamente do que marcadores nucleares (Eizirik et al. 2006). Por esta razão, o mtDNA é frequentemente empregado em estudos populacionais, evolutivos e/ou voltados para a conservação, sendo bastante útil em investigações sobre relações filogenéticas entre diferentes grupos e na identificação de subdivisões geográficas entre unidades populacionais (Avice 2000; Avice et al. 1987; Bermingham e Moritz 1998;).

Estudos Moleculares e Taxonômicos com *Leopardus colocolo*

A história evolutiva de *Leopardus colocolo* aparenta ser bastante complexa. Apesar de a espécie já ter sido alvo de alguns estudos taxonômicos e evolutivos, ainda não foram elucidadas de forma sólida questões quanto a subdivisões populacionais, subespecíficas e até específicas envolvendo este táxon. Neste sentido, a literatura científica disponível atualmente evidencia que ainda são necessários vários estudos com foco específico neste felídeo neotropical.

Garcia-Perea (1994) realizou um estudo sistemático e biogeográfico com as subespécies descritas para *L. colocolo* através de análises morfométricas e de padrões de pelagem. A conclusão do trabalho levou a autora a propor a elevação de três subespécies de *Lynchailurus* (= *Leopardus*) *colocolo* ao nível de espécies distintas – *L. pajeros* (com ocorrência ao longo dos Andes, do Equador até a Patagônia argentina), *L. colocolo* (centro e noroeste do Chile) e *L. braccatus* (Brasil, Paraguai e Uruguai). Garcia-Perea afirmou que os três grupos (“pajeros”, “colocolo” e “braccatus”) apresentavam variação morfológica e ecológica associada a diferentes áreas geográficas, e que tais características são suficientes para a delimitação de grupos específicos. Neste trabalho, a autora reconheceu 11 subespécies, as quais estariam distribuídas da seguinte maneira: *L. pajeros* conteria as subespécies *L. p. budini*, *L. p. crespoi*, *L. p. crucinus*, *L. p. garleppi*, *L. p. pajeros*, *L. p. steinbachi* e *L. p. thomasi*; *L. colocolo* conteria as subespécies *L. c. colocolo* e *L. c. wolffsohni*; e *L. braccatus*

conteria as subespécies *L. b. braccatus* e *L. b. munoai*. As duas últimas correspondem às subespécies encontradas no Brasil.

Apesar de o estudo desenvolvido por Garcia-Perea indicar uma divisão em nível específico, Johnson et al. (1999), avaliando padrões filogeográficos de quatro espécies de felídeos neotropicais (*L. colocolo*, *L. tigrinus*, *L. geoffroyi* e *L. guigna*) a partir dos genes mitocondriais *16S*, *ATP8* e *ND5*, indicaram a existência apenas de estruturação genética em nível subespecífico, não obtendo suporte para o reconhecimento de subdivisões em nível de espécie. Evidências genéticas de uma divisão em nível subespecífico também foram reportadas por Cossíos et al. (2009) através de uma análise dos genes mitocondriais *ND5* e *ATP8*, da região controladora do mtDNA e de locos de microssatélites. Os autores deste último trabalho ressaltaram que os diferentes clados encontrados no estudo são congruentes com a distribuição das subespécies morfológicas descritas por Garcia-Perea (1994).

Apesar da ausência de evidências genéticas para uma divisão de *L. colocolo* em diferentes espécies, Johnson et al. (1999), Napolitano et al. (2008) e Cossíos et al. (2009) indicaram em seus trabalhos a existência de populações fortemente estruturadas em algumas áreas da distribuição da espécie. Johnson et al. (1999), referindo-se à subdivisão geográfica de *L. colocolo* e à baixa profundidade genealógica intraespecífica detectadas em seu estudo, sugeriram que as populações geograficamente distintas de gato-palheiro divergiram recentemente e permaneceram relativamente pequenas. Este padrão pode decorrer de períodos de isolamento completo ou reduzido fluxo gênico entre as populações, levando a observações como as reportadas para amostras do norte do Chile por Napolitano et al. (2008), em que não há haplótipos compartilhados com animais de áreas geográficas vizinhas. Estes autores (que analisaram os mesmos genes empregados por Johnson et al. 1999) evidenciaram não apenas a existência de uma alta variação genética nas populações de *L. colocolo* mas também que o Altiplano Chileno tem mantido um tamanho populacional relativamente alto da espécie e sem evidência de *bottlenecks* recentes. Da mesma maneira que Napolitano et al. (2008), Cossíos et al. (2009) observaram grande variação em nível populacional em seu trabalho com amostras focadas na região central dos Andes, em que foi inferida a existência de no mínimo quatro grupos de populações que os autores sugerem ser tratadas como UM distintas (Figura 3).

De forma geral, os três estudos anteriormente citados sugerem que as linhagens do mtDNA estão relacionadas filogeneticamente da seguinte forma: i) as amostras peruanas encontram-se mais próximas das populações do extremo norte chileno; ii) as populações brasileiras e uruguaias são mais relacionadas com amostras de populações da Bolívia e do

norte do Chile; iii) as populações do oeste argentino estão mais próximas de populações do Chile central. Entretanto, a análise destes dados é bastante complexa (como por exemplo, para elucidar as relações entre os grupos descritos em i, ii e iii), visto que são trabalhos limitados a algumas regiões específicas da distribuição da espécie, e/ou baseados em um número amostral reduzido, especialmente no que tange a indivíduos provenientes do Brasil.

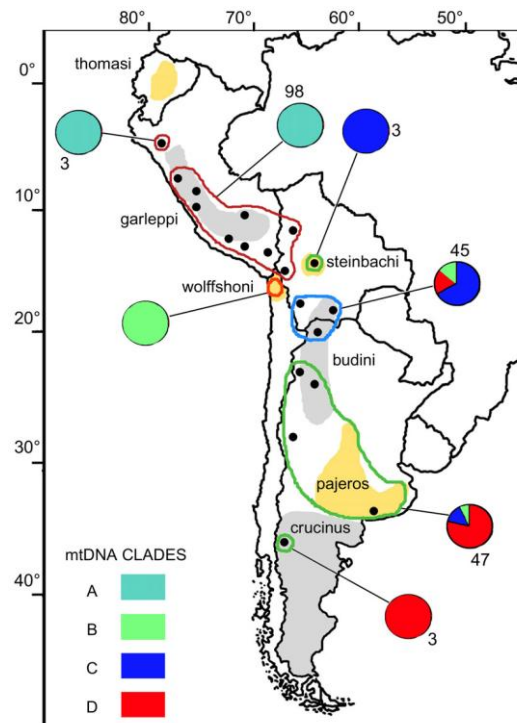


Figura 3: Distribuição dos quatro clados de DNA mitocondrial identificados para *L. colocolo* por Cossíos et al. (2009) e propostos como Unidades de Manejo da espécie.

Apesar de já existirem estes estudos filogeográficos anteriores, ainda não há um trabalho que analise toda a distribuição de *L. colocolo* com uma amostragem mais completa. Estudos mais aprofundados são necessários para investigar em maior detalhe os níveis de subdivisão genética das populações do gato-palheiro, a fim de embasar a definição de unidades apropriadas para a conservação desta espécie (Indrusiak e Eizirik 2003).

Evidências de hibridação com *Leopardus tigrinus* (Schreber 1775)

Além da marcada estruturação filogeográfica desta espécie, outro aspecto que adiciona complexidade à reconstrução da história evolutiva de *L. colocolo* é a ocorrência de hibridação com outra espécie de felídeo Neotropical, *Leopardus tigrinus* (Schreber 1775). Esta espécie, conhecida como gato-do-mato-pequeno, apresenta um porte pequeno, com um comprimento

total variando entre 71 cm a 93,4 cm e peso entre 1,75 kg e 3,5 kg (Sunquist e Sunquist 2002; Figura 4a). Sua distribuição se estende do sul da Costa Rica até o sul do Brasil e nordeste da Argentina, podendo incluir porções disjuntas ainda pouco compreendidas (Eisenberg e Redford 1999; E. Eizirik, observação pessoal; Oliveira 1994; Figura 4b). O primeiro estudo que identificou os eventos de hibridação entre estas duas espécies foi o de Johnson et al. (1999) através da análise de sequências do mtDNA e do gene *ZFY* localizado no cromossomo Y. Neste estudo, indivíduos identificados morfológicamente como *L. tigrinus*, apresentaram sequências de mtDNA específicas de *L. colocolo* e sequências do gene *ZFY* específicas de *L. tigrinus*, implicando serem descendentes de cruzamentos entre fêmeas de *L. colocolo* e machos de *L. tigrinus*. Um estudo posterior, realizado por Trigo et al. (2008), incluindo alguns dos mesmos indivíduos identificados por Johnson et al. (1999) em combinação a outras amostras, corroborou a existência destes eventos na região central do Brasil. Estes dois estudos documentaram a primeira evidência de eventos de hibridação entre *L. tigrinus* e *L. colocolo*, mas restringiram-se apenas à identificação de híbridos, sem maiores investigações dos padrões, causas e extensão destes eventos. Em um estudo mais recente, Trigo et al. (dados não publicados) realizou análises mais aprofundadas sobre a hibridação entre *L. tigrinus* e *L. colocolo*, evidenciando que este processo parece ter sido antigo, tendo provavelmente se originado de causas naturais. Um resultado importante daquele estudo foi que a evidência de hibridação foi apenas detectada pela análise do DNA mitocondrial (mtDNA), sem qualquer observação de um padrão genético semelhante nos vários marcadores nucleares analisados (microssatélites autossômicos e sequências de introns localizados nos cromossomos X e Y). A partir destes resultados, inferiu-se que este processo de hibridação, além de relativamente antigo, foi fortemente unidirecional, levando à introgressão do mtDNA de *L. colocolo* na população de indivíduos morfológicamente identificados como *L. tigrinus*. Além disso, os resultados reportados por Trigo et al. (dados não publicados) indicaram que todos os indivíduos de *L. tigrinus* amostrados no nordeste do Brasil, e vários daqueles amostrados na região central do país, apresentavam sequências de mtDNA de *L. colocolo*, salientando a magnitude deste processo de introgressão nestas populações. A partir destas análises, diversas perguntas foram geradas quanto à idade, magnitude e contexto geográfico deste processo de hibridação, salientando a necessidade da realização de estudos aprofundados e integrados sobre a história evolutiva de *L. colocolo* e *L. tigrinus*. Para isto, são importantes estudos básicos de definição de suas áreas de ocorrência e limites de distribuição nas regiões central e nordeste do Brasil, além da inclusão de

indivíduos provenientes destas regiões em estudos filogeográficos detalhados, o que não foi realizado de forma abrangente até o momento.

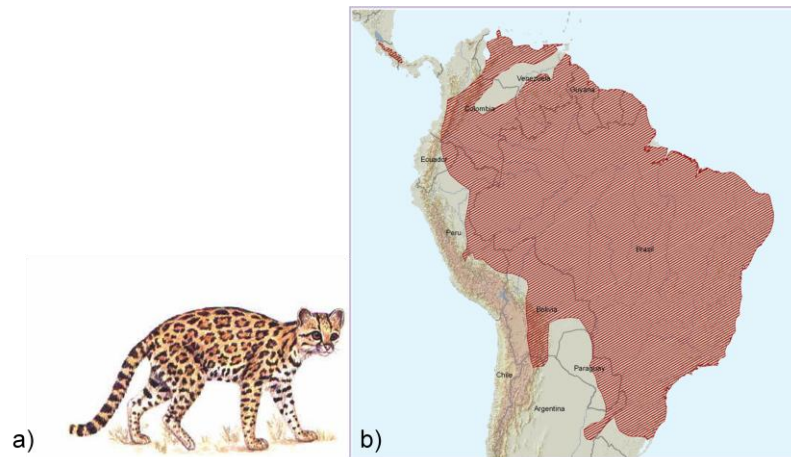


Figura 4: a) *Leopardus tigrinus*. Figura extraída de Silveira (1999). b) Distribuição geográfica de ocorrência de *Leopardus tigrinus*. Extraída do site: IUCN 2011. *IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.2.* <www.iucnredlist.org>.

Assim sendo, torna-se de suma importância investigar o processo de colonização histórica de *L. colocolo* na região leste da América do Sul, onde ocorreu sua hibridação com *L. tigrinus*, a fim de tentar elucidar o contexto espaço/temporal deste processo. Para isto, é necessário analisar especificamente o mtDNA, pois este foi o único sistema genético que até o momento detectou este processo de hibridação. Neste aspecto, os objetivos deste estudo são os seguintes:

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Investigar a história evolutiva de *Leopardus colocolo*, caracterizando padrões filogeográficos, inferindo processos históricos de estruturação e/ou expansão populacional, e utilizando estas informações para aprofundar o conhecimento sobre a hibridação entre esta espécie e *L. tigrinus*.

Objetivos Específicos

1. Gerar sequências de DNA correspondentes a quatro segmentos do genoma mitocondrial para ao menos 40 indivíduos de *L. colocolo* provenientes de diferentes regiões geográficas, com ênfase em populações brasileiras.

2. Integrar os dados gerados no objetivo específico 1 com sequências de DNA já disponíveis para esta espécie, as quais incluem um ou mais dos segmentos focais deste estudo, e amostram predominantemente a porção andina da distribuição da espécie. Com isto, gerar um banco de dados único contendo sequências de mtDNA de *L. colocolo* que representem de forma abrangente sua distribuição geográfica.
3. Investigar a diversidade genética existente nos segmentos mitocondriais e analisar a distribuição geográfica da variabilidade encontrada ao longo da distribuição da espécie, incluindo comparações com sequências equivalentes geradas para *L. tigrinus*.
4. Realizar inferências sobre os processos históricos que afetaram e/ou que estão afetando a distribuição da diversidade genética de *L. colocolo*, com ênfase na avaliação de cenários alternativos para a colonização do leste da América do Sul por esta espécie, e na investigação da hibridação entre esta espécie e *L. tigrinus* no centro/nordeste do Brasil.

ARTIGO CIENTÍFICO

**“Análise de padrões filogeográficos revela uma história evolutiva complexa
do gato-palheiro (*Leopardus colocolo*) (Carnivora, Felidae)”**

Anelise da Silva Santos e Eduardo Eizirik

**A ser traduzido para o inglês e posteriormente submetido ao periódico científico
*Journal of Heredity***

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25

Artigo Original

Análise de padrões filogeográficos revela uma história evolutiva complexa do gato-palheiro (*Leopardus colocolo*) (Carnivora, Felidae)

Anelise da S. Santos¹ e Eduardo Eizirik^{1,2}

¹Faculdade de Biociências, PUCRS. Av. Ipiranga 6681, prédio 12. Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil.

²Instituto Pró-Carnívoros. Av. Horácio Neto, 1030, Casa 10, Parque Edmundo Zandoni, Atibaia, SP 12940-970, Brasil.

Palavras-chave: *Leopardus colocolo*, *Leopardus tigrinus*, filogeografia, DNA mitochondrial, demografia, hibridação.

Autor para correspondência:

Eduardo Eizirik, Faculdade de Biociências, PUCRS. Av. Ipiranga 6681, prédio 12. Porto Alegre, RS 90619-900, Brazil. Fax: 55-51-3320-3612. Email: eduardo.eizirik@pucrs.br

Running Title: História evolutiva do gato-palheiro

26 **Resumo**

27 *Leopardus colocolo* é uma espécie de felídeo neotropical típica de áreas abertas, que
28 possui ampla distribuição geográfica na América do Sul. Estudos filogeográficos iniciais,
29 predominantemente restritos à região andina, indicaram que a espécie apresenta forte
30 estrutura genética populacional. Além disso, a recente descoberta de evidências de hibridação
31 com *Leopardus tigrinus* no Brasil, unicamente detectada pelo DNA mitocondrial, enfatizou a
32 necessidade de estudos mais detalhados acerca dos padrões filogeográficos e demografia
33 histórica de *L. colocolo*. A análise de 2141 pares de bases do DNA mitocondrial indicou uma
34 forte estruturação populacional em *L. colocolo*, sugerindo uma colonização oeste-leste das
35 linhagens desta espécie. Nós detectamos evidências de dois eventos de expansão
36 populacional, um mais antigo (cerca de 200 mil anos atrás), no oeste, e outro mais recente
37 (cerca de 50.000 anos atrás), no leste, que coincide com a expansão das vegetações do tipo
38 savana no Brasil. Análises conjuntas com amostras de *L. tigrinus* híbridos revelaram
39 completa ausência de compartilhamento de haplótipos com *L. colocolo*, apoiando a hipótese
40 de que este evento de hibridação seja antigo. As análises também revelaram uma proximidade
41 filogenética entre as amostras de *L. colocolo* do sul do Brasil e Uruguai com os híbridos de *L.*
42 *tigrinus*, indicando que uma parte essencial da história mitocondrial do gato-palheiro parece
43 estar sendo retratada apenas pela inclusão de amostras desta outra espécie.

44

45 **Introdução**

46 A formação do Istmo do Panamá, há cerca de três milhões de anos (MYA, *million*
47 *years ago*) possibilitou a invasão de diversas espécies provenientes da América do Norte para
48 a América do Sul, algumas das quais deram origem a radiações adaptativas formando grupos
49 exclusivamente neotropicais (Eizirik 2012, dados não publicados). Este é o caso do gênero
50 *Leopardus* (Mammalia, Carnivora, Felidae), composto por sete espécies endêmicas do

51 Neotrópico. Este grupo iniciou sua diversificação há cerca de 2,9 MYA (Johnson et al. 2006),
52 e é hoje formado por felídeos de pequeno e médio porte que se distribuem por uma variedade
53 de habitats na América do Sul e Central (Eisenberg e Redford 1999; Nowell e Jackson 1996).

54 Uma das espécies contidas neste gênero, *Leopardus colocolo* (Molina 1782),
55 popularmente conhecida como gato-palheiro, é um dos felídeos menos conhecidos da
56 América do Sul (Silveira 1995). Trata-se de uma espécie associada a habitats abertos,
57 ocorrendo nos pampas argentinos e uruguaios, no chaco boliviano e paraguaio, e em elevadas
58 altitudes ao longo da cadeia montanhosa dos Andes, do sudoeste da Colômbia até o Estreito
59 de Magalhães. No Brasil, ocorre no extremo sul (bioma Pampa) e nas regiões centro-oeste e
60 parte do nordeste do país, compreendendo os biomas Pantanal e Cerrado (Eisenberg e
61 Redford 1999; Godoi et al. 2010; Nowell e Jackson 1996; Pereira et al. 2002; Ruiz-Garcia et
62 al. 2003; Silveira 1995; Villalba e Delgado 2005) (Figura 1).

63 A história evolutiva do gato-palheiro aparenta ser bastante complexa, o que acarretou
64 dúvidas a respeito de sua taxonomia. Análises morfométricas e de padrões de pelagem
65 realizadas para diferentes populações deste felídeo por Garcia-Perea (1994) evidenciaram a
66 presença de grande variação, levando aquela autora a propor a divisão de *L. colocolo* em três
67 espécies distintas. No entanto, com o advento da genética molecular nas últimas décadas,
68 novas análises puderam ser realizadas e novas áreas de estudo surgiram, como a
69 filogeografia. Esta área de estudo integra diversas disciplinas nos campos micro- e
70 macroevolutivo (Bermingham e Moritz 1998), investigando as relações temporais e espaciais
71 de linhagens genealógicas intra-específicas (Avice 2000).

72 Os trabalhos filogeográficos realizados com *L. colocolo* até o momento não
73 sustentaram a divisão proposta por Garcia-Perea (1994), mas corroboraram a hipótese de
74 forte estruturação populacional nesta espécie (Cossíos et al. 2009; Johnson et al. 1999). Um
75 dos principais problemas que limitam a compreensão da história evolutiva deste felídeo é

76 dificuldade em se obter uma amostragem representativa de suas populações, tanto em termos
77 numéricos como do ponto de vista de cobertura geográfica. Isto possivelmente se deve às
78 baixas densidades em que esta espécie ocorre, aliadas à carência de esforços amostrais
79 direcionados especificamente aos ambientes abertos que habita. Apesar disso, alguns estudos
80 já realizados com base em amostragens parciais da distribuição geográfica de *L. colocolo*
81 permitiram que se obtivesse algumas inferências relevantes no que tange à sua estruturação
82 populacional e história evolutiva (Cossíos et al. 2009; Johnson et al. 1999; Napolitano et al.
83 2008), abrindo caminho para investigações mais detalhadas destes aspectos.

84 Um evento que acrescenta complexidade à história evolutiva de *L. colocolo* é a
85 ocorrência de hibridação entre esta espécie e outro felídeo Neotropical, *Leopardus tigrinus*
86 (Schreber 1775). Esta espécie, conhecida como gato-do-mato-pequeno, também apresenta um
87 porte pequeno e possui uma distribuição predominantemente associada a habitats florestais,
88 se estendendo desde o sul da Costa Rica até o sul do Brasil e nordeste da Argentina
89 (Eisenberg e Redford 1999; Oliveira 1994; Figura 1). Apesar de sua associação a vegetações
90 mais densas, *L. tigrinus* também é encontrado nos biomas Cerrado e Caatinga, nas regiões
91 centro-oeste e nordeste (CNE) do Brasil. É exatamente a partir de amostras de *L. tigrinus*
92 oriundas da região CNE que foram reportados eventos de hibridação entre estas duas espécies
93 de felídeo. Johnson et al. (1999), Trigo et al. (2008) e Trigo et al. (dados não publicados)
94 analisaram sequências de genes mitocondriais e nucleares, bem como locos de
95 microssatélites, verificando que a evidência de hibridação é apenas detectada pela análise de
96 segmentos do DNA mitocondrial (mtDNA). Tendo em vista a ausência de um padrão
97 semelhante em qualquer um dos marcadores nucleares analisados, inferiu-se que este
98 processo de hibridação, além de relativamente antigo, foi fortemente unidirecional, levando à
99 introgressão do mtDNA de *L. colocolo* em populações de indivíduos morfologicamente
100 identificados como *L. tigrinus* na região CNE do Brasil. No entanto, ainda não foram

101 elucidadas questões mais aprofundadas como a idade e o contexto demográfico deste evento
102 de hibridação, as quais podem ser investigadas através de estudos mais detalhados de
103 filogeografia empregando o mtDNA.

104 Um foco particular destas investigações deve ser a análise da história evolutiva das
105 populações de *L. colocolo* do leste da América do Sul, a fim de viabilizar o entendimento do
106 contexto espaço/temporal da hibridação ocorrida com *L. tigrinus*. Tal análise não foi
107 realizada até o momento, em parte devido ao baixo número amostral de indivíduos
108 provenientes do Brasil incluídos nos trabalhos anteriores. Desta forma, o objetivo deste
109 estudo foi investigar a história evolutiva de *Leopardus colocolo* com base na análise
110 detalhada de segmentos mitocondriais, caracterizando padrões filogeográficos, inferindo
111 processos históricos de estruturação e/ou expansão populacional, e utilizando estas
112 informações para aprofundar o conhecimento sobre a hibridação entre esta espécie e
113 *Leopardus tigrinus*.

114

115 **Materiais e Métodos**

116 ***Amostragem***

117 O presente estudo incluiu a geração de dados de sequência mitocondrial de 40
118 indivíduos de *L. colocolo* e 28 indivíduos de *L. tigrinus*, sendo estes provenientes das regiões
119 centro-oeste e nordeste (CNE) do Brasil (Tabela 1, Figura 1). Amostras sanguíneas foram
120 obtidas de animais mantidos em cativeiro com procedência geográfica conhecida ou
121 indivíduos capturados em campo, e preservadas em uma solução saturada de sal (100 mM
122 Tris, 100 mM EDTA, 2% SDS). Amostras de outros tecidos foram obtidas de espécimes
123 encontrados mortos em estradas (vítimas de atropelamento) e foram mantidas em álcool 96%.
124 Amostras de *Leopardus pardalis* e *Leopardus wiedii* também foram incluídas para serem
125 usadas como grupo externo em algumas análises.

126 ***Extração de DNA, amplificação e sequenciamento***

127 A extração de DNA genômico foi realizada através do protocolo padrão de
128 fenol/clorofórmio (Sambrook et al. 1989) ou utilizando os kits comerciais de extração
129 *DNeasy Blood & Tissue Kit* (QIAGEN) e *PureLink™ Genomic DNA Mini Kit* (Invitrogen),
130 seguindo as instruções dos fabricantes. Todas as amostras de DNA extraídas foram
131 quantificadas em gel de agarose 1% corado com *GelRed®* (Biotium Inc.) usando o marcador
132 de peso molecular *LowMass DNA Ladder* (Invitrogen) como padrão de concentração, e
133 posteriormente diluídas a fim de se obter uma concentração final de trabalho de 5-10 ng/μL.

134 Quatro segmentos do mtDNA foram amplificados via Reação em Cadeia da
135 Polimerase (PCR, Saiki et al. 1985): (I) a porção 5' do gene *ND5*, utilizando os primers
136 descritos por Trigo et al. (2008); (II) o gene citocromo b (*Cit-b*) completo, usando os primers
137 propostos por Tchaicka et al. (2007) ou aqueles descritos por Irwin et al. (1991) e Koepfli e
138 Wayne (1998), que dividem o gene em dois amplicons, como alternativa para amostras com
139 DNA mais degradado; (III) um segmento do gene *ATP8*, utilizando os primers descritos por
140 Johnson et al. (1998); e (IV) a porção final do primeiro segmento hipervariável da região
141 controle do mtDNA, usando os primers descritos por Tchaicka et al. (2007) e Cossíos et al.
142 (2009).

143 As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20μL, contendo tampão
144 de PCR 1X (Invitrogen), 0,2 μM de cada *primer*, 0,2mM de dNTPs, 1,5-2 mM de MgCl₂
145 (Invitrogen), 0,2U de *Platinum® Taq Polymerase* (Invitrogen) e 5-20 ng de DNA genômico.
146 A adição de 0,2% de Triton X-100 na reação de PCR foi utilizada para ajudar na remoção de
147 agentes inibidores de PCR nos segmentos *ND5*, *Cit-b* e região controle. No caso destes três
148 segmentos, as condições de amplificação consistiram de um passo inicial de desnaturação de
149 3min a 94°C, 5 ciclos de *touchdown* (45s de desnaturação a 94°C, 45s de anelamento com
150 temperatura variando de 55°C a 51°C e extensão por 1min30s a 72°C), 40 ciclos adicionais

151 com anelamento de 30s à temperatura de 50°C, e extensão final de 30min a 72°C. Para o
152 segmento do gene *ATP8*, as condições de amplificação tiveram um passo inicial de
153 desnaturação de 3min a 94°C seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s,
154 anelamento a 50°C por 45s e 1min30s de extensão a 72°C, e o passo de extensão final por
155 10min a 72°C.

156 Os produtos de PCR foram verificados em gel de agarose 1% corado com *GelRed*®
157 (Biotium Inc.) e posteriormente purificados utilizando um protocolo baseado em precipitação
158 com acetato de amônio e isopropanol. As amostras que não apresentaram bons resultados
159 com este protocolo foram novamente amplificadas, quantificadas usando o marcador de peso
160 molecular *LowMass DNA Ladder* (Invitrogen) e purificadas com as enzimas Exonuclease I
161 (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP). Ambas as fitas de cada produto de PCR
162 purificado foram sequenciadas com o *DYEnamic ET Dye Terminator Sequencing Kit* (GE
163 Healthcare) e lidas com o sequenciador automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). Para
164 a região controle do mtDNA, devido à ocorrência de uma região repetitiva na mesma que
165 induz heteroplasmia (ver Eizirik et al. 1998 e Kim et al. 2001 como exemplo em outros
166 felídeos), e à dificuldade de sequenciar e alinhar as repetições em tandem (onde anela o
167 primer *forward* utilizado neste estudo), somente a fita reversa foi sequenciada. Neste caso, as
168 amostras foram amplificadas e sequenciadas no mínimo duas vezes de forma independente, a
169 fim de avaliar a reprodutibilidade da sequência obtida.

170 A visualização dos eletroferogramas, bem como a construção de sequências consenso
171 das duas fitas de cada amostra foram realizadas no software *Geneious Pro 5.5.2* (Drummond
172 et al. 2011). Como complementação aos dados gerados neste estudo, foram adicionadas
173 sequências previamente obtidas por Trigo et al. (2008) e Trigo et al. (dados não publicados)
174 do gene *ND5*, as quais incluem 19 sequências de *L. colocolo* e 21 sequências de *L. tigrinus* da
175 região CNE. Também foram incluídas sequências curtas amplificadas para os genes *ATP8* e

176 ND5 (133 e 270 pares de base [pb], respectivamente) e região controle (170 pb) de 19
177 amostras de indivíduos analisados por Cossíos et al. (2009), que abrangem a porção andina da
178 distribuição de *L. colocolo* (Figura 1).

179

180 *Análise das sequências*

181 O conjunto completo de dados para cada segmento foi alinhado com o algoritmo
182 MUSCLE (Edgar 2004), o qual está implementado no pacote MEGA5 (Tamura et al. 2011).
183 Os alinhamentos foram verificados e editados manualmente quando necessário. A seguir,
184 foram realizadas algumas análises exploratórias com cada segmento do mtDNA empregando
185 o software MEGA5, a fim de avaliar os níveis de diversidade e a informação filogenética
186 contida nos mesmos. Estatísticas básicas de diversidade genética, como número de sítios
187 variáveis (V), número de sítios informativos para parcimônia (P), número de haplótipos (h),
188 diversidade nucleotídica (π) e diversidade haplotípica (Hd) foram estimados com os
189 programas MEGA 5, ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier e Lischer 2010) e DnaSP 5.0 (Librado e
190 Rozas 2009).

191 Análises filogenéticas preliminares baseadas no algoritmo de distância *Neighbor-*
192 *Joining* (NJ, Saitou et al. 1987) foram realizadas para avaliar se existia algum conflito
193 genealógico significativo entre os segmentos estudados, impossibilitando concatená-los em
194 uma única matriz. Como nenhum conflito foi observado, os quatro segmentos mitocondriais
195 foram concatenados e todas as análises filogenéticas subsequentes foram realizadas com esta
196 concatenação. Dois conjuntos de dados foram estabelecidos para uso nas análises descritas a
197 seguir: (i) todas as sequências geradas neste estudo mais os segmentos utilizadas por Trigo et
198 al. (2008) e Trigo et al. (dados não publicados) (*Data set A [DSA]*) e (ii) todas as sequências
199 do DSA mais os segmentos reportados por Cossíos *et al.*, (2009) (*Data set B [DSB]*). As

200 sequencias reportadas por Cossíos et al. são mais curtas, de forma que o DSB apresenta uma
201 cobertura geográfica mais ampla, porém uma maior quantidade de dados faltantes na matriz.

202 As análises filogenéticas finais foram realizadas com apenas um representante de cada
203 haplótipo, sob três critérios de otimalidade diferentes: Inferência Bayesiana (BI – *Bayesian*
204 *Inference*), Máxima Verossimilhança (ML – *Maximum likelihood*) e Máxima Parcimônia
205 (MP). Para determinar o melhor modelo de substituição nucleotídica, utilizou-se o programa
206 jModelTest 0.1.1 (Guindon e Gascuel 2003; Posada 2008), aplicando o Critério de
207 Informação de Akaike (AIC - *Akaike Information Criterion*; Akaike 1974).

208 A análise de BI foi realizada com o programa MrBayes 3.1 (Ronquist e Huelsenbeck
209 2003), incluindo duas corridas independentes de Cadeia de Markov Monte Carlo (MCMC),
210 cada uma contendo quatro cadeias *Metropolis-coupled* (uma fria e três aquecidas) para cinco
211 milhões de gerações. As árvores foram amostradas a cada 100 gerações, descartando as
212 primeiras 2500 árvores como *burn-in*. O programa Tracer 1.5 (Rambaut e Drummond 2007)
213 foi utilizado para visualização e análise dos arquivos de saída dos pacotes MrBayes.

214 O programa PhyML 3.0 (Guindon et al. 2010) foi utilizado para as análises de ML, no
215 qual as árvores foram inferidas com uma busca heurística do tipo *Subtree Pruning Regrafting*
216 (SPR) + *Nearest-Neighbor-Interchange* (NNI) com uma árvore inicial randômica e suporte
217 dos nós estimado com 1000 pseudoreplicações de *bootstrap*.

218 Por fim, o programa PAUP* 4.0b10 (Swofford 2002) foi usado para inferir as relações
219 filogenéticas sob o método de MP, com uma busca heurística empregando 50 replicatas de
220 *random taxon addition* seguido de *tree-bisection and reconnection* (TBR) e 100 replicatas de
221 *bootstrap* não-paramétrico.

222 Além das análises filogenéticas, redes de haplótipos foram construídas com o
223 algoritmo *median-joining* (Bandelt et al. 1999) implementado no programa NETWORK
224 4.6.0.0 (<http://www.fluxus-engineering.com/sharenet.htm>) para retratar as relações evolutivas

225 entre os haplótipos e sua associação com a geografia. Em paralelo, análises de estruturação
226 populacional foram realizadas assumindo unidades geográficas amplas, devido a limitações
227 no tamanho amostral disponível para determinadas regiões. Como medidas de diferenciação
228 entre os grandes grupos, estimamos índices de fixação (F_{ST} , Wright 1965), utilizando o
229 método de Análise de Variância Molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992) implementado
230 no software ARLEQUIN. Para avaliar a correlação entre distâncias genéticas e distâncias
231 geográficas, realizamos testes de Mantel (Mantel 1967) com 100 mil permutações para
232 avaliação de significância, utilizando o programa ALLELES IN SPACE (AIS; Miller 2005).

233 Para estimar parâmetros demográficos históricos e avaliar possíveis cenários para a
234 colonização do leste da América do Sul por *L. colocolo*, foram realizados testes de
235 neutralidade (D de Tajima [Tajima 1989] e F_s de Fu [Fu 1997]) e análises de distribuição par-
236 a-par de diferenças (*Mismatch Distribution Analysis* [Rogers e Harpending 1992]) com os
237 programas DnaSP e ARLEQUIN. Segundo Ramirez-Soriano et al. (2008), estes testes são
238 indicados para detectar diferentes eventos demográficos como expansões, contrações e
239 *bottlenecks*. Para estimar possíveis mudanças no tamanho populacional da espécie ao longo
240 do tempo, foram estimados *Bayesian Skyline plots* com o pacote BEAST 1.6.0 (Drummond e
241 Rambaut 2007). A taxa mutacional para a concatenação de segmentos empregada aqui foi
242 calculada a partir de uma corrida inicial do programa BEAST, a qual utilizou nove haplótipos
243 de *L. colocolo* para representar a diversidade atual da espécie, 200 milhões de gerações de
244 MCMC (20 milhões descartados como *burn-in*), uma premissa de *Yule process* como *tree*
245 *prior*, e uma calibração molecular conservadora baseada na estimativa reportada por Johnson
246 et al. (2006) para a divergência entre *L. colocolo* e *Leopardus pardalis* + *Leopardus wiedii*.
247 Especificamente, assumimos uma probabilidade anterior (*prior*) uniforme para este nó, cujos
248 limites foram estabelecidos pelo intervalo de credibilidade 95% para a idade desta
249 divergência estimado por Johnson et al. (2006).

250 **Resultados**

251 Foram obtidos um total de 2141 pb de sequência para *L. colocolo* e *L. tigrinus*
252 híbridos da região CNE. Amostras de 65 indivíduos foram sequenciadas para 133 pb do gene
253 *ATP8* e 413 pb da região controle. Para o gene *ND5*, foram gerados 567 pb de 25 amostras
254 (40 amostras já haviam sido previamente sequenciadas por Trigo *et al.*, 2008 e Trigo *et al.*,
255 dados não publicados). Foram sequenciados 1028 pb do gene *Cit-b* para 53 amostras,
256 enquanto que, para 10 indivíduos, apenas 600 pb deste gene foram obtidos. Para dois
257 indivíduos (Lco12 e bLco14) não obtivemos sucesso no sequenciamento deste último
258 segmento. Três indivíduos (bLti72, bLti96 e bLti209) apresentaram duas inserções e uma
259 deleção na região controle, totalizando 415 pb de fragmento analisado. A partir de
260 comparação com sequências disponíveis no GenBank, constatamos que estes três indivíduos,
261 inicialmente hipotetizados como sendo híbridos devido a sua procedência geográfica (ver
262 Tabela 1), contém mtDNA autóctone de *L. tigrinus* (ver Trigo *et al.* [2008] para definição dos
263 clados oriundos de cada espécie), e desta forma os tratamos como grupo externo em conjunto
264 com haplótipos de *L. pardalis* e *L. wiedii*.

265 Em ambos os *data sets* analisados, a região controle foi o segmento mais variável,
266 tanto em termos de diversidade haplotípica como de diversidade nucleotídica (Tabela 2).
267 Apesar de o DSB apresentar um número de caracteres menor do que o DSA (devido à maior
268 presença de dados faltantes neste conjunto, e a deleção completa destes sítios empregada
269 nestas análises), a inclusão de um número maior de indivíduos oriundos da porção andina da
270 distribuição de *L. colocolo* induziu um aumento do π em relação ao observado com o
271 primeiro conjunto. No entanto, quando o gene *ND5* foi analisado separadamente, este
272 apresentou uma diversidade haplotípica (*Hd*) menor para o DSB, indicando que neste caso o
273 tamanho do segmento teve mais influência nesta estimativa. Da mesma forma, para os dois
274 conjuntos de dados analisados para o gene *Cit-b*, o grupo com maior comprimento de

275 sequência apresentou um Hd maior, mesmo com um número menor de amostras andinas (ver
276 Tabelas 1 e 2). Os conjuntos de dados concatenados apresentaram valores de Hd altos e π
277 baixos. A identificação dos haplótipos listados na Tabela 1 foi realizada com todas as
278 amostras analisadas neste estudo (contendo seus tamanhos de sequência originais) e foi
279 obtida a partir de uma análise de diferenças par-a-par entre as mesmas, resultando em 68
280 haplótipos de grupo interno (58 dos quais amostrados uma única vez) e cinco haplótipos de
281 grupo externo. O modelo de substituição nucleotídica GTR + I + G ($-\ln L = 6823,9384$) foi
282 identificado como sendo o mais adequado a este conjunto de dados, sendo aplicado em todas
283 as análises filogenéticas subsequentes baseadas em modelo.

284 Para os dois conjuntos de dados analisados, as árvores filogenéticas construídas com
285 os três métodos foram similares com respeito às suas principais características topológicas
286 (Figuras 2A e 2B). Nas análises Bayesianas, o desvio padrão médio das frequências de
287 grupos entre as duas corridas paralelas foi menor do que 0,05, indicando uma convergência
288 para uma probabilidade posterior estacionária dos clados identificados. Evidências de
289 estruturação geográfica foram observadas em ambos os conjuntos, sobressaindo-se a
290 localização basal dos haplótipos provenientes do Chile e de algumas sequências da
291 Argentina, bem como a identificação de um clado interno contendo amostras brasileiras e
292 uruguaias, o qual foi fortemente apoiado em todas as análises (valores de *bootstrap* $\geq 88\%$ e
293 probabilidade posterior de 1).

294 Dentro deste clado do Brasil/Uruguai, dois subgrupos foram evidenciados (ver
295 Figuras 2A e 2B): um primeiro clado continha todos os indivíduos de *L. colocolo* do centro-
296 oeste e nordeste do Brasil, haplótipos provenientes das regiões de Catamarca/Salta, Jujuy,
297 Potosí e Tacna/Puno (H42, H50, H52, H51 e H53 [apenas H42 no caso da análise do DSA]),
298 e grande parte dos híbridos de *L. tigrinus* amostrados no nordeste brasileiro; o segundo
299 subgrupo continha haplótipos de *L. colocolo* do sul do Brasil + Uruguai, além de alguns

300 indivíduos híbridos de *L. tigrinus*. Tendo em vista a estruturação interna observada no
301 primeiro clado, subdividimos o mesmo em dois grupos: Grupo 1, cuja monofilia foi bastante
302 apoiada, e Grupo 2, contendo uma série de haplótipos basais relacionados através de uma
303 politomia geral na base do clado. O segundo subgrupo principal deste clado interno foi
304 tratado como uma unidade (Grupo 3) nesta categorização filogenética. Divergências mais
305 basais, englobando haplótipos provenientes do Chile, Argentina e Bolívia, foram
306 categorizadas como sendo os Grupos 4 - 7 (ver Figuras 2A e 2B).

307 As redes de haplótipos também indicaram uma estruturação geográfica para os
308 indivíduos oriundos do Brasil e do Uruguai, com dois grupos mais evidentes: (i) *L. colocolo*
309 do sul do Brasil e do Uruguai + *L. tigrinus* da região CNE e (ii) *L. colocolo* do centro-oeste e
310 nordeste + *L. tigrinus* do nordeste (H4) + haplótipos H42, H50, H52, H51 e H53 (apenas o
311 H42 para o DSA), com no mínimo quatro passos mutacionais entre (i) e (ii) (Figuras 3A e
312 3B). Nas análises do DSA, o haplótipo H49, oriundo do norte chileno foi o mais basal na
313 árvore filogenética e o mais próximo do grupo externo na rede de haplótipos. Para o mesmo
314 conjunto de dados, o Grupo 4 (H37) da Bolívia foi o haplótipo mais próximo das amostras
315 brasileiras, com 28 mutações de distância, e grupo-irmão dos mesmos nas análises
316 filogenéticas. As redes de haplótipos também refletiram os resultados da filogenia para os
317 grupos de número cinco e seis, sendo dois grupos bastante suportados que possuem no
318 mínimo 33 passos mutacionais entre eles (Figuras 2A e 3A). Analisando apenas a rede de
319 haplótipos do DSB (calculado com deleção completa; Figura 3B), pode-se ver que as
320 sequências contidas nos grupos do centro-oeste e do nordeste - tanto para *L. colocolo* como
321 para os híbridos CNE de *L. tigrinus* - apresentaram um padrão em forma de estrela, com
322 sequências menos frequentes conectadas com poucos passos mutacionais a haplótipos mais
323 frequentes - sugerindo uma possível expansão demográfica. O Grupo 4 na Figura 2B também
324 formou um agrupamento no *network* (Figura 3B), separado por pelo menos 13 mutações do

325 grupo brasileiro. O Grupo 5 está separado por no mínimo 14 mutações do Grupo 7 + H49, e
326 este último agrupamento apresenta uma distância de no mínimo 12 passos mutacionais do
327 Grupo 6.

328 Assim como nas árvores filogenéticas, os haplótipos do Chile, Argentina e Bolívia
329 foram posicionados como os mais basais na estrutura filogeográfica de *L. colocolo*. Além
330 disso, observamos que as amostras do Peru e da Bolívia estão mais próximas dos haplótipos
331 do leste do que os grupos chilenos e argentinos. As principais distinções referem-se às
332 posições dos grupos três e quatro nos *networks*, em que no DSA o H37 (Grupo 4) está
333 posicionado entre Chile e Brasil e no DSB aparecem como grupo mais distante do *outgroup*.
334 Da mesma forma, as amostras o Grupo 3 estão mais distantes do grupo externo e para o outro
335 conjunto de dados, se posiciona entre os grupos cinco e dois (do Chile e do Brasil,
336 respectivamente). Estas discrepâncias se devem a uma diferença de enraizamento entre as
337 redes geradas com o DSA e DSB, afetando especificamente esta porção da genealogia.

338 Os resultados das análises subsequentes foram gerados apenas para o *data set B*, em
339 virtude de este conjunto apresentar a maior abrangência da distribuição geográfica de *L.*
340 *colocolo*. Três testes foram realizados para averiguar quais cenários de subdivisão
341 filogeográfica representam melhor a estruturação genética desta espécie: Leste *versus* Oeste
342 (tendo como divisor o meridiano 60W), Norte *versus* Sul (assumindo o Trópico de
343 Capricórnio como separador dos grupos) e entre Biomas (Pampa x Cerrado x Caatinga x
344 Monte + Estepes pampeanos e patagônicos x Puna). Os valores de F_{ST} para Leste/Oeste e
345 entre Biomas foram similares e considerados altos (0,42431 [p = 0,00000] e 0,43148 [p =
346 0,00000], respectivamente; Tabela 3). Em contraponto, os resultados da AMOVA para
347 Norte/Sul mostraram um valor de F_{ST} mais baixo, de 0,17044 (p = 0,00000) com 83% da
348 variabilidade genética observada ocorrendo dentro destes dois grupos. Entre os diferentes
349 biomas, o maior F_{ST} par-a-par ocorreu entre Pampa e Caatinga (0,61112; p = 0,00000)

350 seguido de Pampa e Puna (0,56365; $p = 0,00000$; Tabela 4), sugerindo um possível papel do
351 isolamento por distância na indução deste padrão de diferenciação genética. O resultado do
352 teste de Mantel mostrou uma correlação significativa entre distância genética e distância
353 geográfica tanto para o conjunto inteiro de dados ($r = 0,337$; $P = 0,000$) como para os grupos
354 Leste ($r = 0,276$; $P = 0,000$) e Oeste ($r = 0,281$; $P = 0,000$) (Figuras 4A, 4B e 4C).

355 Para testar a hipótese de uma expansão populacional recente em *L. colocolo*, foram
356 realizadas análises de *Mismatch Distribution* e testes de neutralidade para o todo o conjunto
357 de dados. A primeira análise resultou em um gráfico bimodal, que pode indicar uma
358 estruturação entre dois grupos (Figura 5A). Desta forma, foram realizadas mais duas análises,
359 uma para as amostras oriundas do Oeste da América do Sul (Figura 5B) e outra para as
360 amostras do Leste da América do Sul (Figura 5C), visto que estes dois grandes grupos
361 apresentaram um alto valor de F_{ST} entre si (Tabela 3). A primeira análise mostrou um padrão
362 de distribuição aproximadamente unimodal (ainda que irregular) com uma moda em cerca de
363 30 diferenças, sugestivo de uma expansão populacional rápida e relativamente antiga. A
364 análise focada na região leste não evidenciou um padrão unimodal sugestivo de expansão
365 demográfica.

366 O teste de neutralidade F_S de Fu foi congruente com as análises de *Mismatch*,
367 apresentando valores negativos e significantes para Leste, Oeste e no conjunto de todas as
368 amostras (Tabela 3). A fim de testar outros possíveis desvios do modelo neutro, novos testes
369 de neutralidade foram realizados em um nível regional, avaliando os biomas definidos na
370 AMOVA. O bioma Pampa foi o único grupo com significância tanto para D de Tajima como
371 para F_S de Fu. Valores negativos e significantes também foram encontrados para F_S de Fu
372 nos biomas Caatinga e Monte + Estepes (Tabela 3).

373 As análises do *Skyline plot* Bayesiano mostraram uma constância no tamanho
374 populacional até aproximadamente 0,2 milhões de anos atrás (MYA, *million years ago*), com

375 forte sinal de expansão populacional em períodos de tempo mais recentes. Quando todas as
376 amostras foram incluídas na análise, foi observado um aumento populacional gradual até 0,05
377 MYA, com um sinal de marcada expansão demográfica em seguida e declínio populacional a
378 partir de 0,025 MYA (Figura 6A). Para o grupo oriundo do oeste da América do Sul,
379 visualizamos uma forte expansão populacional iniciando 0,2 MYA, seguida de um período
380 mais recente de tamanho constante (Figura 6B). A análise do grupo do leste indicou a
381 ocorrência de uma expansão demográfica pronunciada e mais recente do que a observada no
382 oeste, com início 0,05 MYA, e seguida de um aparente declínio aproximadamente 0,012
383 MYA (Figura 6C).

384

385 **Discussão**

386 *Diversidade Genética*

387 Este trabalho demonstrou que *L. colocolo* apresenta uma alta diversidade genética
388 quando comparado a outros felídeos neotropicais e alguns outros carnívoros da região. A
389 diversidade haplotípica encontrada neste estudo para a região controle foi bastante alta
390 ($0,9817 \pm 0,0071$ e $0,9825 \pm 0,0059$ para o DSA e DSB, respectivamente). Cossíos et al.
391 (2009), avaliando a diversidade da região controladora em amostras de *L. colocolo* da região
392 andina, registraram uma diversidade haplotípica de 0,94 e ressaltaram que a grande
393 diversidade encontrada também ocorre em nível populacional, sendo comparável com Hd_s
394 encontrados em espécies não ameaçadas, como *Leopardus pardalis* e *Leopardus wiedii*
395 ($0,962 \pm 0,015$ e $0,985 \pm 0,018$ respectivamente; Eizirik et al. 1998). Eizirik et al. (2001)
396 analisaram a região controle em onças-pintadas e encontraram uma diversidade haplotípica
397 de $0,9399 (\pm 0,0262)$. Comparado com outros carnívoros, *L. colocolo* apresenta uma das
398 maiores diversidades genéticas observadas até o momento. Trinca et al. (2012) reportaram
399 uma Hd para a lontra neotropical (*Lontra longicaudis*) de $0,9043 \pm 0,00477$ enquanto

400 Tchaicka et al. (2007) encontraram uma diversidade haplotípica para o cachorro-do-mato
401 (*Cerdocyon thous*) de $0,83 \pm 0,032$. Tsuchiya-Jerep (2009), ao estudar dois procionídeos,
402 encontrou uma diversidade haplotípica bastante alta, porém mais baixa do que a observada
403 em *L. colocolo*: $0,790 (\pm 0,00133)$ para *Nasua nasua* e $0,762 (\pm 0,00181)$ para *Procyon*
404 *cancrivorus*.

405 Este estudo também indicou um valor bastante alto para a diversidade nucleotídica na
406 região controle ($\pi = 0,03475 \pm 0,00482$ para o DSA e $\pi = 0,06965 \pm 0,01110$ para o DSB),
407 quando comparado a outras espécies de carnívoros. Trinca et al. (2012) encontraram um π de
408 $0,01149 \pm 0,00270$ para *L. longicaudis* e Tchaicka et al. (2007) reportaram uma diversidade
409 nucleotídica também considerada alta, de $0,019 \pm 0,002$ para as populações de *C. thous*.
410 *Nasua nasua* também apresentou um valor de π ($\pi = 0,01748 \pm 0,00182$) considerado alto
411 (Tsuchiya-Jerep 2009). Os dados de Cossíos et al. (2009) para as amostras de gato-palheiro
412 dos Andes revelaram uma diversidade nucleotídica levemente menor do que o nosso estudo
413 indicou, de $0,0609$. Outros felídeos da região neotropical também apresentam alta diversidade
414 nucleotídica para a região controladora do mtDNA. Eizirik et al. (1998) encontraram um π
415 para *L. pardalis* ($\pi = 0,068 \pm 0,034$) semelhante ao reportado neste estudo para *L. colocolo*,
416 enquanto que a diversidade encontrada em *L. wiedii* foi ainda mais alta ($\pi = 0,183 \pm 0,092$).
417 Para *Panthera onca*, a diversidade nucleotídica encontrada por Eizirik et al. (2001) foi de
418 $0,00771 \pm 0,00010$. Desta forma, constata-se que a diversidade nucleotídica da região
419 controle de *L. colocolo* pode ser considerada alta em relação ao que se observa em outros
420 carnívoros já analisados para este segmento mitocondrial.

421 A diversidade genética também foi bastante alta para os outros segmentos analisados
422 neste estudo. Considerando o gene *ND5*, nosso estudo registrou uma diversidade nucleotídica
423 de $0,00503 (\pm 0,00127)$ para o DSA e de $0,00799 (\pm 0,00247)$ para o DSB. C. Pires et al.
424 (comunicação pessoal) observaram um valor de π semelhante ao DSA para o gato-mourisco

425 (*Puma yagouarundi*), de $0,0050 (\pm 0,0012)$. Para duas espécies próximas a *L. colocolo*,
426 *Leopardus tigrinus* [excluindo-se indivíduos híbridos] e *Leopardus geoffroyi*, tanto a
427 diversidade nucleotídica como a diversidade haplotípica encontrada foram menores do que
428 para a nossa espécie em estudo: $\pi = 0,0031 \pm 0,0004$ e $Hd = 0,759 \pm 0,045$ para *L. tigrinus* e
429 $\pi = 0,0039 \pm 0,0004$ e $Hd = 0,825 \pm 0,045$ para *L. geoffroyi* (Trigo et al. 2008; T. Trigo et al.
430 comunicação pessoal). Considerando o mesmo fragmento para o *ND5*, outros carnívoros
431 tiveram resultados contrastantes: Trinca et al. (2012) reportaram uma diversidade
432 nucleotídica de $0,00741 \pm 0,00177$ para *L. longicaudis* e Tsuchiya-Jerep (2009) obteve um π
433 de $0,01949 \pm 0,00001$ para *N. nasua* enquanto que, para *P. cancrivorus*, o valor de π foi de
434 $0,00239 \pm 0,00060$.

435 Com relação ao gene *Cit-b*, poucos trabalhos com carnívoros utilizaram o mesmo
436 segmento analisado neste estudo. A diversidade que encontramos para *L. colocolo*, incluindo
437 haplótipos híbridos amostrados em *L. tigrinus* CNE ($\pi = 0,00592 \pm 0,00128$ e $Hd = 0,9267 \pm$
438 $0,0201$ para o DSA com 1028 pb e $\pi = 0,00612 \pm 0,00141$ e $Hd = 0,8751 \pm 0,0194$ para o
439 DSA com 600 pb) foi levemente maior, por exemplo, do que a encontrada para *P.*
440 *yagouarundi* ($\pi = 0,0053 \pm 0,0013$) (C. Pires et al. comunicação pessoal). *Procyon*
441 *cancrivorus* também apresentou uma diversidade menor em comparação ao nosso objeto de
442 estudo ($\pi = 0,00187 \pm 0,00014$ e $Hd = 0,832 \pm 0,00161$), ao passo que *N. nasua* apresentou
443 uma diversidade nucleotídica consideravelmente maior ($\pi = 0,01771 \pm 0,00253$) mas uma
444 diversidade haplotípica menor ($Hd = 0,783 \pm 0,00153$) (Tsuchiya-Jerep 2009).

445 Tendo em vista que os segmentos utilizados neste estudo não são exatamente os
446 mesmos analisados anteriormente para esta espécie, não podemos realizar uma comparação
447 mais precisa entre os resultados obtidos por diferentes autores. Johnson et al. (1999), ao
448 comparar quatro espécies de felídeos neotropicais, observaram que a diversidade
449 nucleotídica de *L. colocolo* foi a segunda maior entre as espécies analisadas, com $\pi = 0,0049$

450 $\pm 0,004$ para uma concatenação dos segmentos *16S*, *ATP8* e *ND5*. Avaliando a região
451 controle e os genes *ATP8* e *ND5*, Trigo et al. (2008) reportaram uma diversidade haplotípica
452 de $0,8444 \pm 0,1029$ e uma diversidade nucleotídica de $0,009462 \pm 0,005638$. Em seu estudo
453 mais recente, Trigo et al. (dados não publicados) evidenciaram uma *Hd* de $0,949 \pm 0,023$ e
454 um $\pi = 0,006 \pm 0,004$ para os segmentos *ND5* e região controle. Apesar de não serem
455 diretamente comparáveis devido à diferente composição de segmentos, podemos inferir que o
456 aumento do número amostral e da cobertura geográfica da espécie contribuiu para que
457 encontrássemos valores mais elevados de diversidade para o nosso conjunto de dados
458 concatenado ($\pi = 0,01624 \pm 0,00212$ e *Hd* = $0,9846 \pm 0,0069$ para o DSA e $\pi = 0,02776 \pm$
459 $0,00386$ e *Hd* = $0,9834 \pm 0,0059$ para o DSB) em relação a estes estudos anteriores. Tendo
460 em vista esta expansão amostral, bem como o maior número de segmentos analisados neste
461 estudo, podemos considerar os dados aqui apresentados como a estimativa mais completa
462 disponível até o momento da diversidade genética desta espécie.

463

464 ***Estrutura Populacional***

465 Nossos resultados indicaram a existência de uma forte estruturação genética nas
466 populações de *L. colocolo* (Tabela 3; Figuras 2 e 3). Os dois conjuntos de dados (DSA e
467 DSB) apresentaram uma topologia filogenética muito semelhante; não houve qualquer troca
468 de haplótipos entre os haplogrupos identificados nas Figuras 2A e 2B, apenas o acréscimo de
469 novos haplótipos aos grupos existentes no DSA e a definição de um novo haplogrupo com o
470 DSB.

471 Em ambos os conjuntos de dados, as populações chilenas sempre estiveram próximas
472 da base do grupo interno, juntamente com amostras argentinas e alguns haplótipos da Bolívia
473 (provenientes da região do Potosí). Esta constatação nos sugere que a região Oeste da
474 distribuição de *L. colocolo* é mais basal e, portanto, mais antiga do que as populações

475 amostradas no Leste. Além disto, avaliando mais detalhadamente os haplótipos mais
476 próximos à raiz do grupo interno, inferimos que a área inicial de diversificação das linhagens
477 mitocondriais atuais da espécie provavelmente foi a região do altiplano andino,
478 compreendendo o norte do Chile, sudoeste da Bolívia e norte da Argentina (ver Figuras 2 e
479 3).

480 Outra área que nosso trabalho também indica ser basal compreende as regiões centro-
481 oeste/sul da Argentina e centro do Chile. Nós encontramos dois grupos bastante estruturados
482 nestas áreas, que podemos hipotetizar serem separadas pela cadeia montanhosa andina.
483 Estudos de campo revelaram que o gato-palheiro ocupa áreas com altitude média de $3.567 \pm$
484 67 metros na região andina (ao contrário de seu congênere gato-andino [*L. jacobita*], que
485 apresenta uma altitude média de ocorrência de 4.236 ± 140 metros) (Perovic et al. 2003) e
486 desta forma torna-se explicável esta separação entre estes dois grupos, visto que esta região
487 apresenta cadeias montanhosas que podem dificultar uma travessia. Curiosamente, um
488 haplótipo do Chile central se agrupou mais proximamente aos haplótipos argentinos do que
489 aos outros dois haplótipos chilenos da mesma região. O fato de não termos uma procedência
490 geográfica precisa para estas amostras dificulta um melhor entendimento sobre as mesmas.
491 Uma suposição que podemos aventar é que o haplótipo H48 ocupava uma área mais elevada
492 e desta forma pudesse ter mais contato com populações da Argentina, ao contrário dos
493 haplótipos H46 e H47, que poderiam ocupar áreas mais baixas da distribuição da espécie e
494 assim ter menos contato com grupos de altitude. Futuros estudos com amostragem mais
495 detalhada nestas regiões serão necessários para investigar de forma mais específica a sua
496 estruturação histórica.

497 A respeito do grupo 4, formado pelas amostras do Peru e algumas da Bolívia (H37 e
498 H55, ambas da região de La Paz), nossos dois conjuntos de dados (*Data sets A e B*)
499 apresentaram resoluções discordantes nas análises de *median joining*. Este fato decorre

500 provavelmente de uma instabilidade nos ramos envolvidos induzida pelo grande número de
501 mutações separando estes haplótipos de *L. colocolo* e suas linhagens mais próximas, uma
502 consequência da alta estruturação populacional afetando estas regiões. Esta situação é atípica,
503 visto que mais frequentemente este tipo de instabilidade é observado nos ramos próximos à
504 raiz, o que não foi evidenciado neste trabalho. O fato de o DSA apresentar um maior número
505 de segmentos, maior tamanho de sequências e assim, mais informação filogenética, nos leva a
506 inferir que este conjunto de dados reflete melhor a história real do grupo. Apesar disto, as
507 análises filogenéticas (ver Figura 2) demonstraram haver um apoio consistente para a união
508 do grupo 4 com as linhagens do leste da América do Sul, sugerindo que as populações de
509 Puna e Chaco podem representar a região de origem das linhagens ancestrais que
510 colonizaram o leste da América do Sul. Esta inferência é bastante relevante no sentido de
511 compreender de forma mais clara a história evolutiva de *L. colocolo*, especialmente no que
512 tange ao processo de colonização do Cerrado brasileiro, e sua influência no episódio histórico
513 de hibridação com *L. tigrinus* (ver abaixo).

514 A análise detalhada dos haplótipos do leste da América do Sul revelou também
515 padrões bastante interessantes, pelo fato de termos amostras de indivíduos de *L. tigrinus*
516 híbridos ajudando a contar a história evolutiva de *L. colocolo*. A primeira característica
517 evidenciada foi a falta de compartilhamento de haplótipos entre *L. colocolo* e *L. tigrinus*. Esta
518 falta de compartilhamento sugere que o processo de introgressão é bastante antigo, com
519 ambas as espécies já tendo acumulado mutações independentes a partir dos haplótipos
520 ancestrais, os quais parecem já estarem extintos atualmente (ou ocorrendo em frequências
521 baixas a ponto de escaparem à amostragem deste estudo).

522 As árvores filogenéticas apresentaram ramos curtos para os haplótipos brasileiros em
523 relação ao comprimento de ramos dos haplótipos das regiões próximas à Cordilheira dos
524 Andes. Da mesma forma, as redes de haplótipos mostraram um menor número de mutações

525 entre os haplótipos do grupo Leste, apoiando a inferência de que eles são um grupo recente,
526 sem estruturação populacional interna detectável com nossos dados. Outra característica que
527 nos chama atenção nos *networks* é a posição dos haplótipos amostrados em *L. tigrinus*
528 híbridos, os quais dão a impressão de terem originado as populações de *L. colocolo* da região
529 leste (Figuras 3A e 3B). Curiosamente, as populações de gato-palheiro amostradas no Brasil
530 estão claramente divididas em grupos geográficos distintos, separadas por um número
531 considerável de mutações, enquanto os haplótipos de *L. tigrinus* se posicionam de forma
532 intermediária entre os mesmos. Este é um achado bastante inusitado, cuja interpretação mais
533 plausível é que os haplótipos mais basais (centrais) amostrados em *L. tigrinus* híbridos (ou
534 inferidos como *median vectors*) já ocorriam na população ancestral de *L. colocolo* que
535 colonizou o leste da América do Sul, e subsequentemente deram origem aos diferentes
536 haplogrupos amostrados nesta região.

537 Um destes haplogrupos (Grupo 3 – ver Figura 2) foi formado por indivíduos de *L.*
538 *tigrinus* híbridos amostrados no centro-oeste e nordeste do Brasil, bem como um clado mais
539 interno (e bem apoiado) de *L. colocolo* englobando todos os haplótipos do sul do Brasil
540 (estado do Rio Grande do Sul) e do Uruguai. Separado por sete mutações de diferença, o
541 segundo grande clado inclui dois subgrupos (Grupos 1 e 2 – ver Figura 2). O haplogrupo 1
542 foi formado por haplótipos de *L. colocolo* da região centro oeste e nordeste, um único
543 haplótipo de *L. tigrinus* híbrido do Ceará (H4) e um subgrupo de amostras andinas (oriundas
544 do Peru, Bolívia e Argentina). O haplogrupo 2 apresentou pouca estruturação interna, sendo
545 formado exclusivamente por haplótipos amostrados em indivíduos híbridos do nordeste
546 brasileiro. A análise destes dados sob forma de *network* (Figura 3) apóia a inferência de que o
547 haplogrupo 2 é parafilético em relação ao haplogrupo 1, salientando a posição basal dos
548 haplótipos híbridos nesta porção da estrutura filogeográfica de *L. colocolo*. Apesar de não
549 termos uma procedência geográfica precisa em vários casos, uma observação interessante

550 com relação aos haplótipos de *L. tigrinus* híbridos é a aparente relação entre os filogrupos e
551 os biomas dos quais provêm as amostras. De uma forma geral, os haplótipos do haplogrupo 3
552 foram amostrados no bioma Cerrado, enquanto que os haplótipos encontrados nos
553 haplogrupos 1 e 2 referem-se a indivíduos coletados no bioma Caatinga.

554 Formulamos duas hipóteses para tentar explicar as relações evidenciadas no mtDNA
555 entre os haplótipos de gato-palheiro do centro-oeste brasileiro e os haplótipos da região sul do
556 Brasil e do Uruguai. Ambas incluem um cenário inicial de colonização do leste via
557 Chaco/Pantanal/Cerrado com eventos antigos de hibridação com *L. tigrinus* nesta região. A
558 partir desta região, a primeira hipótese sugere duas rotas de colonização: uma em direção ao
559 nordeste brasileiro e outra em direção ao sul do Brasil e do Uruguai. Desta forma, os
560 haplótipos híbridos amostrados no nordeste representariam linhagens do centro-oeste (que
561 posteriormente foram para o nordeste), os quais originaram os haplótipos de gato-palheiro da
562 mesma região e os três únicos haplótipos de *L. tigrinus* híbridos amostrados no centro-oeste.
563 A segunda hipótese postularia uma expansão inicial para o nordeste, com diversificação de
564 haplótipos de *L. colocolo* e introgressão em *L. tigrinus* nesta área, seguidas de um evento de
565 retorno de parte das linhagens para o centro-oeste via cerrado, com uma subsequente
566 colonização em direção ao sul do Brasil e do Uruguai. O teste destas hipóteses alternativas
567 pode ser conduzido através de uma expansão amostral nestas regiões, de forma a identificar
568 de maneira mais precisa a área de ocorrência atual dos haplótipos, bem como suas relações
569 genealógicas.

570 A análise da população do bioma Pampa (região sul do Brasil e Uruguai),
571 independente do cenário exato do seu surgimento, revelou um grupo que necessita de atenção
572 especial no que tange a medidas conservacionistas. Atualmente estes indivíduos estão
573 isolados de qualquer outra população, tanto ao norte (isolados pela Mata Atlântica) como ao
574 oeste (isolados pelas Bacias dos Rios Uruguai, Paraguai e Paraná) e ao sul (isolado pela Bacia

575 do Rio da Prata). No estado do Rio Grande do Sul, a espécie *L. colocolo* é categorizada como
576 “Em Perigo” (Indrusiak & Eizirik, 2003), e pelas diferenças encontradas tanto nas análises
577 genéticas como fenotípicas (esta é a única região em que encontramos a subespécie *L. c.*
578 *munoi*; Garcia-Perea 1994), podemos sugerir que estas populações realmente constituam
579 uma Unidade Evolutivamente Significativa (ESU) distinta (ver definições de ESU em Moritz
580 1994; Eizirik 1996; Eizirik et al. 2006).

581 Uma observação particularmente interessante foi a presença de um subgrupo andino
582 contido em um haplogrupo predominantemente brasileiro (Grupo 1 – ver Figuras 2 e 3). A
583 estruturação filogeográfica observada sugere um possível retorno pelo Cerrado de volta para
584 o oeste, em direção à região do Puna e Monte. O trabalho de Cossíos et al. (2009) já havia
585 reportado que esta região apresenta não só uma mistura de clados de regiões adjacentes,
586 como também três fenótipos distintos de *L. colocolo* (ver Garcia-Perea 1994 para mais
587 detalhes), o que demonstra ser uma importante zona de contato. Além disto, Napolitano et al.
588 (2008) analisaram a diversidade genética de *Leopardus colocolo* em áreas de altiplano no
589 norte do Chile e verificaram a existência de um grupo de haplótipos relacionados, que ao
590 serem reanalisados por Cossíos et al. (2009) mostraram ser próximos ao subgrupo que nós
591 inferimos ter “voltado” para a região oeste. Além disto, Napolitano et al. (2008) também
592 citam a existência de um indivíduo cujo haplótipo não era proximamente relacionado aos
593 demais da mesma área de estudo, e que foi agrupado com amostras do Brasil. Estes
594 resultados sugerem que há consistentes evidências de uma história evolutiva complexa
595 afetando a filogeografia de *L. colocolo* nesta região. Do ponto de vista biogeográfico, Roig-
596 Juñent et al. (2006) referem-se às zonas de Puna e Monte como sub-áreas, pelo fato delas
597 conectarem outras zonas. Estes autores também ressaltam que área de Monte localizada ao
598 norte é mais relacionada à região do Chaco do que às demais regiões de Monte. Estas
599 observações ressaltam a importância desta região de contato na história desta espécie,

600 tornando importante o aumento de estudos focando nesta área para melhor compreender sua
601 evolução.

602 Apesar da evidência de isolamento por distância afetando a diversidade mitocondrial
603 de *L. colocolo* (Figura 4), observamos casos de ausência de correlação que são influenciados
604 pela complexidade desta região de contato entre haplogrupos. A presença de haplótipos não
605 correlacionados nos testes de Mantel (Figuras 4A e 4C) reflete comparações envolvendo
606 haplótipos desta zona, onde detectamos indivíduos amostrados em regiões bastante próximas
607 mas que apresentam grande diferença genética. Da mesma maneira, os haplótipos do Sul do
608 Brasil e do Uruguai apresentam uma alta diferenciação em relação aos haplótipos argentinos,
609 apesar de sua proximidade geográfica. Estes achados ilustram a idéia de que a elucidação da
610 história demográfica das populações pode melhorar o entendimento das causas subjacentes
611 aos padrões geográficos observados na atualidade.

612

613 ***Inferências Demográficas***

614 As análises demográficas realizadas neste estudo indicam que ocorreram episódios de
615 expansão populacional em diferentes momentos da história de *L. colocolo*. Os testes de
616 neutralidade estimados para a maioria dos grupos populacionais resultaram em valores
617 significativamente negativos para o índice F_S de Fu (a única estimativa significativa para o D
618 de Tajima foi referente à população do Pampa). Em um contexto demográfico, valores
619 significativamente negativos destes índices indicam a ocorrência de expansão demográfica
620 (p.ex. Fu 1997). Ramírez-Soriano et al. (2008) categorizou 14 testes de neutralidade em duas
621 classes estatísticas, de acordo com os parâmetros analisados. O teste F_S de Fu se enquadra na
622 classe que inclui estatísticas baseadas na distribuição haplotípica e, dentre estes, os autores
623 mostraram ser o F_S de Fu um dos índices mais sensíveis para detectar eventos demográficos

624 de expansão populacional. Neste contexto, é plausível que o índice F_S de Fu tenha detectado
625 evidências de expansão populacional de forma mais conclusiva do que o teste D de Tajima.

626 As análises de *Mismatch* não evidenciaram tão claramente padrões sugestivos de uma
627 expansão populacional como o teste de neutralidade F_S . O gráfico da distribuição de
628 diferenças par-a-par mais indicativo de expansão populacional foi o do grupo oeste (Figura
629 5B). Neste caso, a estrutura foi essencialmente unimodal, ainda que irregular, o que pode
630 resultar de uma amostragem ainda insuficiente dos haplótipos, ou de uma história
631 demográfica mais complexa após o evento de expansão demográfica. Um aspecto
632 interessante observado neste gráfico é que a moda das diferenças par-a-par foi bastante alta
633 (cerca de 28), indicando um evento de expansão consideravelmente antigo, o que é plausível
634 à luz dos demais resultados deste estudo. Os outros dois gráficos apresentaram padrões
635 menos claros, o que provavelmente reflete a história evolutiva complexa detectada com as
636 demais análises, incluindo um considerável efeito de estruturação populacional. Ramos-
637 Onsins e Rozas (2002) compararam o poder estatístico de diferentes análises de demografia
638 histórica, concluindo que os testes baseados na distribuição *Mismatch* são muito
639 conservadores. Eles sugeriram o uso de outros testes, baseados em níveis de polimorfismo
640 (como o D de Tajima) ou na distribuição haplotípica (como o F_S de Fu), o que parece ser
641 compatível com os resultados deste estudo.

642 Da mesma forma, nas redes de haplótipos poucos grupos mostraram um sinal
643 consistente de expansão. Esta ausência de um sinal claro pode ser decorrente de um déficit
644 amostral (como no grupo Oeste, por exemplo, do qual temos poucos representantes de cada
645 região) ou pode ser o reflexo de uma expansão antiga, em que processos subsequentes de
646 mutação, deriva genética e estruturação populacional podem ter obliterado o padrão inicial.

647 As análises Bayesianas de *skyline plot*, por outro lado, conseguiram recuperar de
648 forma bastante consistente os eventos de expansão populacional sugeridos pelo índice F_S de

649 Fu. O *skyline plot* dos indivíduos amostrados na região oeste da América do Sul indica a
650 ocorrência de um evento de expansão demográfica iniciado em torno de 200 mil anos atrás
651 (Figura 6B), durante o final do Pleistoceno Médio (Gibbard e Kolfshoten 2004). Este evento
652 não foi detectado na análise de toda a distribuição de *L. colocolo* (Figura 6A), possivelmente
653 devido à baixa representatividade da região oeste em relação ao total de amostras. Assim
654 como observado em outras espécies (p.ex. (Avice et al. 1998), eventos ocorridos durante o
655 Pleistoceno parecem ter tido um papel importante na histórica demográfica das atuais
656 populações de *L. colocolo*, incluindo esta expansão populacional inicial que possivelmente
657 ocasionou a ocupação de novas regiões e subsequente isolamento geográfico de alguns
658 grupos.

659 Além desta expansão demográfica inicial no oeste, detectamos um segundo processo
660 de expansão quando analisamos separadamente as amostras do leste da distribuição (Figura
661 6C). Este processo, que também foi detectado na análise geral (Figura 6A), teve início há
662 cerca de 50 mil anos, coincidindo com a datação que Ledru et al (1996) estimaram para um
663 período mais frio e mais árido no Brasil, o que acarretaria na diminuição das florestas e na
664 expansão de vegetações típicas de campos subtropicais (Behling 1998; Behling 2002). Desta
665 forma, inferimos que neste período as populações de *L. colocolo* do leste da América do Sul
666 expandiram seu tamanho e provavelmente sua distribuição geográfica, colonizando novas
667 regiões. Estima-se que entre 45.000-33.000 anos atrás, começou a ocorrer um aumento
668 gradual na umidade, com um retorno da vegetação de floresta por volta de 17.000 anos atrás
669 (Ledru et al. 1996). Este aumento das florestas e consequente retração nas áreas de campo
670 pode ter causado um declínio demográfico em *L. colocolo*, que nossa análise sugere ter
671 ocorrido entre 20.000 e 10.000 anos atrás, além de potencialmente fomentar o isolamento
672 genético entre diferentes enclaves de áreas abertas.

673 Uma expansão do centro-oeste para o sul durante um período glacial é a mais
674 provável explicação para a atual distribuição de *L. colocolo* na região sul brasileira e no
675 Uruguai, visto que não temos indícios de proximidade filogenética destas populações com
676 grupos geograficamente próximos, como os da Argentina. Com a expansão das florestas
677 tropicais durante o final do Pleistoceno e início do Holoceno, estas populações do pampa
678 provavelmente se tornaram isoladas das demais. Nossos dados corroboram a hipótese de
679 Johnson et al. (1999), de que as bacias do Rio da Prata e do Rio Paraguai formam uma
680 importante barreira para o fluxo gênico entre populações de *L. colocolo*, ao menos no que
681 tange ao mtDNA. Apesar de os dois testes de neutralidade terem apresentado valores
682 significativos para esta população pampeana, o *Skyline plot* realizado para este grupo
683 apresentou apenas uma leve indicação de expansão há 7000 anos, atingindo um platô há
684 aproximadamente 2500 anos (Figura S1). Tendo em vista os resultados deste estudo,
685 indicando a presença de uma história evolutiva diferenciada de *L. colocolo* nesta região,
686 torna-se prioritária uma investigação mais detalhada de sua demografia histórica, com base
687 em uma amostragem mais detalhada das populações remanescentes nestas áreas.

688

689 ***Hibridação entre Leopardus colocolo e Leopardus tigrinus***

690 Assim como *L. colocolo*, *L. tigrinus* também apresenta uma história evolutiva
691 bastante complexa. Trigo et al. (2008) revelaram dois eventos de hibridação envolvendo *L.*
692 *tigrinus*: além do já retratado evento com *L. colocolo*, há evidências de uma ativa zona
693 híbrida envolvendo o gato-do-mato-pequeno e o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*)
694 na região sul do Brasil.

695 Uma das hipóteses levantadas por Trigo et al. (dados não publicados) para explicar
696 tais eventos de hibridação sugere a ocorrência de pelo menos um evento de expansão
697 demográfica de *L. tigrinus* após uma fase em que a espécie apresentava um tamanho

698 populacional pequeno. De acordo com a datação realizada por Trigo et al. (2008) para o clado
699 mitocondrial de *L. tigrinus* (75,7 mil anos atrás [intervalos de 28,7 - 157 mil anos atrás]),
700 estima-se que a expansão demográfica tenha ocorrido durante um período interglacial, em
701 que as florestas tropicais, até então restritas a áreas de refúgios, tiveram um crescimento
702 substancial quando o clima sofreu um aumento nos níveis de umidade (Ledru et al. 1996;
703 Behling et al. 1998). Apesar de atualmente os biomas Cerrado e Caatinga apresentarem
704 características xeromórficas, ainda existem remanescentes de florestas nesta região. A origem
705 destes remanescentes pode estar associada a fases úmidas durante o Pleistoceno que
706 permitiram a expansão das florestas (De Oliveira et al. 1999; Pessenda et al. 2010). Assim,
707 podemos hipotetizar que machos de *L. tigrinus* (que possivelmente seriam os primeiros a
708 dispersar) teriam dificuldades em encontrar parceiras da mesma espécie e se reproduziriam
709 com fêmeas de *L. colocolo* resultantes do processo de colonização da região central do Brasil,
710 detectado neste estudo. Os descendentes híbridos do gênero feminino poderiam ter
711 retrocruzado com machos de *L. tigrinus* e seus descendentes podem ter expandido sua
712 distribuição para a região nordeste do Brasil.

713 Adicionando novos segmentos mitocondriais e aumentando o número amostral de *L.*
714 *colocolo* em sua área de distribuição, nosso estudo demonstrou de forma mais clara do que as
715 análises anteriores que parece não ocorrer compartilhamento atual de haplótipos entre esta
716 espécie e os híbridos de *L. tigrinus*. Com isso, apoiamos a hipótese sugerida por Trigo et al.
717 (dados não publicados) de que este episódio de hibridação é bastante antigo. Além disso,
718 corroboramos e estendemos a observação de níveis extremos de introgressão de haplótipos de
719 *L. colocolo* em populações atuais de *L. tigrinus* das regiões CNE do Brasil, reforçando a
720 interpretação de que este episódio de fluxo gênico inter-específico foi muito intenso. A partir
721 das análises apresentadas aqui, investigações adicionais podem ser delineadas para
722 melhorarmos a compreensão sobre este evento histórico, incluindo uma estimativa mais

723 precisa da idade do clado brasileiro e do tempo decorrido deste o episódio de hibridação, bem
724 como inferências sobre o tamanho efetivo das populações envolvidas.

725

726 **Considerações Finais**

727 Os resultados apresentados neste trabalho contribuíram para uma compreensão mais
728 detalhada da história de *L. colocolo*. Este foi o trabalho com a maior abrangência da
729 distribuição geográfica do gato-palheiro realizado até o momento. Além disso, a inclusão de
730 um maior número de segmentos do mtDNA em relação aos estudos prévios possibilitou
731 encontrarmos novos padrões filogeográficos para a espécie, além de testar hipóteses
732 sugeridas por outros autores.

733 Nós encontramos uma alta diversidade nesta espécie, tanto haplotípica como
734 nucleotídica, e assim como no estudo de Johnson et al. (1999), nossos resultados sugerem que
735 as populações andinas são as mais basais na filogenia de *L. colocolo*. Entretanto, esta
736 hipótese não havia sido testada rigorosamente até agora, e encontra apoio filogenético sólido
737 pela primeira vez neste estudo. Além disso, em concordância com a inferência reportada no
738 trabalho de Cossíos et al. (2009), a região do altiplano andino mostra ser uma importante
739 zona de contato entre as populações dos Andes e merece atenção em futuros trabalhos, visto
740 que nós encontramos grupos de origem recente e próximas às populações brasileiras nesta
741 área andina, sugerindo um possível retorno ao oeste.

742 As populações do leste da América do Sul são de origem recente e necessitam de
743 novos estudos, não só filogenéticos como também aqueles diretamente aplicados à sua
744 conservação. De acordo com a história materna registrada no mtDNA, nós mostramos que as
745 populações da região Sul do Brasil e do Uruguai aparentam estar isoladas, o que requer
746 atenção em termos de conservação e ações de manejo. Da mesma forma, ações de manejo
747 focando em *L. tigrinus* (p.ex. em cativeiro) merecem cautela, principalmente quando os

748 indivíduos não possuem procedência geográfica conhecida ou caracterização genética
749 detalhada, pois há uma complexa composição de genomas autóctones e introgressão de
750 mtDNA de *L. colocolo* no centro e nordeste do Brasil . O uso de marcadores moleculares
751 adicionais (como os ligados ao cromossomo Y) pode auxiliar no melhor entendimento destes
752 padrões e no conhecimento da história demográfica analisada sob a ótica paterna.

753 Apesar da necessidade de estudos adicionais para complementar os resultados aqui
754 realizados, podemos dizer que as mudanças climáticas que ocorreram durante o final do
755 Pleistoceno e início do Holoceno parecem ter moldado a história evolutiva de *L. colocolo* e *L.*
756 *tigrinus*. Com o aumento do conhecimento sobre paleoclimatologia, distribuição de fósseis e
757 filogeografia, novas perspectivas estão sendo abertas para o entendimento de zonas híbridas
758 (Hewitt, 2011) ou de populações com origem híbrida. Desta forma, maiores subsídios
759 teóricos poderão melhorar o entendimento da complexa e interligada história evolutiva destas
760 duas espécies.

761 **Financiamento**

762 Este trabalho foi amparado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e
763 Tecnológico - CNPq, Brasil (*Grant number* 131164/2010-4) e pelo Programa Pesquisador
764 Gaúcho, da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul - FAPERGS,
765 Brasil.

766

767 **Agradecimentos**

768 Os autores gostariam de agradecer a todas as instituições e pessoas listadas na Tabela
769 1, que gentilmente cederam as amostras utilizadas neste estudo. Agradecemos também à
770 Cladinara R. Sarturi e à Priscilla M. Zamberlan por toda assistência técnica durante a
771 realização deste trabalho, aos alunos Tiago F. da Silva e Beatriz Lippert pela ajuda na
772 extração de DNA de algumas amostras, e ao José Ricardo S. Barradas pela ajuda no
773 georreferenciamento dos mapas de distribuição apresentados neste estudo.

774 **Referências**

- 775 Akaike H. 1974. A new look at the statistical identification model. IEEE T Automat Contr.
776 19:716-723.
- 777 Avise JC, Walker DE, Johns GC. 1998. Speciation durations and Pleistocene on vertebrate
778 phylogeography. Proc R Soc Lond B. 265:1707-1712.
- 779 Avise JC. 2000. Phylogeography: The History and Formation of Species. Cambridge (MA):
780 Harvard University Press.
- 781 Bandelt HJ, Forster P, Röhl A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific
782 phylogenies. Mol Biol Evol. 16:37-48.
- 783 Behling H. 1998. Late Quaternary vegetational and climatic changes in Brazil. Rev Palaeobot
784 Palynol. 99:143-156.
- 785 Behling H. 2002. South and Southeast Brazilian grasslands during Late Quaternary times: a
786 synthesis. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol. 177:19-27.
- 787 Bermingham E, Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications.
788 Mol Ecol. 7:367-369.
- 789 Cossíos D, Lucherini M, Ruiz-García M, Angers B. 2009. Influence of ancient glacial periods
790 on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). BMC Evol Biol.
791 9:68.
- 792 De Oliveira PE, Barreto AMF, Suguio K. 1999. Late Pleistocene/Holocene climatic and
793 vegetational history of the Brazilian caatinga: the fossil dunes of the middle São
794 Francisco River. Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol. 152:319-337.
- 795 Drummond A, Rambaut A. 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees.
796 BMC Evol Biol. 7:214.

797 Drummond AJ, Ashton B, Buxton S, Cheung M, Cooper A, Duran C, Field M, Heled J,
798 Kearsse M, Markowitz S, Moir R, Stones-Havas S, Sturrock S, Thierer T, Wilson A.
799 2011. Geneious v. 5.4. Disponível em: <http://www.geneious.com>.

800 Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high
801 throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792-1797.

802 Eisenberg JF, Redford KH. 1999. *Mammals of the Neotropics, Vol. 3. The Central Tropics:*
803 *Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil.* Chicago (IL): The University of Chicago Press.

804 Eizirik E, Bonatto SL, Johnson WE, Crawshaw PG Jr, Vié JC, Brousset DM, O'Brien SJ,
805 Salzano FM. 1998. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA
806 control region in two Neotropical cats (Mammalia, Felidae). *J Mol Evol.* 47:613-624.

807 Eizirik E, Kim J, Menotti-Raymond M, Crawshaw Jr PG, O'Brien SJ, Johnson WE. 2001.
808 Phylogeography, population history e conservation of jaguars (*Panthera onca*,
809 Mammalia, Felidae). *Mol Ecol.* 10:65-79.

810 Excoffier L, Lischer HEL. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform
811 population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resour.* 10:564-567.

812 Excoffier L, Smouse P, Quattro J. 1992. Analysis of Molecular Variance inferred from metric
813 distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction
814 data. *Genetics.* 131:479-491.

815 Fu YX. 1997. Statistical test of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking
816 and background selection. *Genetics.* 147:915-925.

817 Garcia-Perea R. 1994. The Pampas Cat Group (Genus *Lynchailurus* Severtzov, 1858)
818 (Carnivora: Felidae), a Systematic and Biogeographic Review. *Am Mus Novit.* 3096:1-
819 36.

820 Gibbard P, Kolfshoten T. 2004. The Pleistocene and Holocene Epochs. In: Gradstein FM,
821 Ogg JG, Smith AG, editors. A Geologic Time Scale. Cambridge: Cambridge University
822 Press; p. 441-452.

823 Godoi MN, Teribele R, Bianchi RC, Olifiers N, Concone HVB, Xavier NLF. 2010. New
824 records of pampas cat (*Leopardus colocolo*, Molina 1782) for Mato Grosso do Sul State,
825 Brazil. *Cat News*. 52:28-29.

826 Guindon S, Dufayard JF, Lefort V, Anisimova M, Hordijk W, Gascuel O. 2010. New
827 Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the
828 Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*. 59:307-321.

829 Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large
830 phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol*. 52:696-704.

831 Hewitt GM. 2011. Quaternary phylogeography: the roots of hybrid zones. *Genetica*. 139:617-
832 638.

833 Irwin DM, Kocher TD, Wilson AC. 1991. Evolution of the cytochrome b gene of mammals. *J*
834 *Mol Evol*. 32:128-144.

835 IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. [acesso em 16 Jan 2012]. Disponível em:
836 <http://www.iucnredlist.org>.

837 Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E, O'Brien SJ.
838 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science*.
839 311:73-77.

840 Johnson WE, Pecon-Slattery J, Eizirik E, Kim J, Menotti-Raymond M, Bonacic C, Cambre
841 R, Crawshaw P, Nunes A, Seuánez HN, Moreira MAM, Seymour KL, Simon F,
842 Swanson W, O'Brien SJ. 1999. Disparate phylogeography patterns of molecular genetic
843 variation in four closely related South American small cat species. *Mol Ecol*. 8:S79-S94.

844 Kim JH, Eizirik E, O'Brien SJ, Johnson WE. 2001. Structure and patterns of sequence
845 variation in the mitochondrial DNA control region of the great cats. *Mitochondrion*.
846 14:279-292.

847 Koepfli KP, Wayne RK. 1998. Phylogenetic relationships of otters (Carnivora: Mustelidae)
848 based on mitochondrial cytochrome b sequences. *J Zool (Lond)*. 246:401-416.

849 Ledru M, Braga PIS, Soubiès F, Fournier M, Martin L, Suguio K, Turcq B. 1996. The last
850 50,000 years in the Neotropics (Southern Brazil): evolution of vegetation and climate.
851 *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol*. 123:239-257.

852 Librado P, Rozas J. 2009. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA
853 polymorphism data. *Bioinformatics*. 25:1451-1452.

854 Mantel N. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach.
855 *Cancer Res*. 27:209-220.

856 Miller MP. 2005. ALLELES IN SPACE: Computer software for the joint analysis o
857 interindividual spatial and genetic information. *J Hered*. 96:711-724.

858 Molina GI. 1782. *Saggio sulla storia natural del Chile*. Bologna. 367 p.

859 Napolitano C, Bennett M, Johnson WE, O'Brien SJ, Marquet PA, Barría I, Poulin E, Iriarte
860 A. 2008. Ecological and biogeographical inferences on two sympatric and enigmatic
861 Andean cat species using genetic identification of faecal samples. *Mol Ecol*. 17:678-690.

862 Nowell K, Jackson P. 1996. *Wilds cats: Status Survey and Conservation Action Plan*. Gland
863 (Switzerland): IUCN.

864 Oliveira TG. 1994. *Neotropical Cats: Ecology and Conservation*. São Luís (MA): EDUFMA.

865 Pereira J, Varela D, Fracassi N. 2002. Pampas cat in Argentina: is it absent from the
866 pampas? *Cat News*. 36:20-22.

867 Pessenda LCR, Gouveia SEM, Ribeiro AS, De Oliveira PE, Aravena R. 2010. Late
868 Pleistocene and Holocene vegetation changes in northeastern Brazil determined from

869 carbon isotopes and charcoal records in soils. *Palaeogeogr Palaeoclimatol Palaeoecol.*
870 297:597-608.

871 Posada D. 2008. jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol.* 25(7):1253-
872 1256.

873 Rambaut A, Drummond AJ. 2007. Tracer Analysis Tool v. 1.4. Disponible em:
874 <http://beast.bio.ed.ac.uk/tracer>.

875 Ramirez-Soriano A, Ramos-Onsins SE, Rozas J, Calafell F, Navarro A. 2008. Statistical
876 power analysis of neutrality tests under demographic expansions, contractions and
877 bottlenecks with recombination. *Genetics.* 179:555-567.

878 Ramos-Onsins SE, Rozas J. 2002. Statistical properties of new neutrality tests against
879 population growth. *Mol Biol Evol.* 19:2092-2100.

880 Rogers AR, Harpending HC. 1992. Population growth makes waves in the distribution of
881 pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol.* 9:552-569.

882 Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed
883 models. *Bioinformatics.* 19:1572-1574.

884 Ruiz-Garcia M, Payán CE, Hernández-Camacho JI. 2003. Possible Records of *Lynchailurus*
885 in South-western Colombia. *Cat News.* 38:35-37.

886 Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985.
887 Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis
888 for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* 230:1350-1354.

889 Saitou N, Nei M. 1987. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing
890 phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 4:406-425.

891 Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989. *Molecular Cloning*, 2nd edn. Long Island (NY):
892 Cold Spring Harbor Laboratory Press. Schreber JCD. 1775. *Die Säugethiere in*
893 *Abbildungen nach der Natur, mit Beschreibung.* Erlangen. v3.

- 894 Silveira L. 1995. Notes on the distribution and natural history of the pampas cat, *Felis*
895 *colocolo*, in Brazil. *Mammalia*. 59(2):284-288.
- 896 Swofford DL. 2002. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Others
897 Methods), Version 4. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- 898 Tajima F. 1989. Statistical methods to test for nucleotide mutation hypothesis by DNA
899 polymorphism. *Genetics*. 123:585-595.
- 900 Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. 2011. MEGA5: Molecular
901 Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance,
902 and Maximum Parsimony Methods. *Mol Biol Evol*. 28(10):2731-2739.
- 903 Tchaicka L, Eizirik E, Oliveira TG, Cândido JF, Freitas TRO. 2007. Phylogeography and
904 population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Mol Ecol*. 16:819-838.
- 905 Trigo TC, Freitas TRO, Kunzler G, Cardoso L, Silva JCR, Johnson WE, O'Brien SJ, Bonatto
906 SL, Eizirik E. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus
907 *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L.*
908 *tigrinus* in southern Brazil. *Mol Ecol*. 17:4317-4333.
- 909 Trinca CS, De Thoisy B, Rosas FCW, Waldemarin HF, Koepfli KP, Vianna JA, Eizirik E.
910 2012 [no prelo]. Phylogeography and demographic history of the Neotropical otter
911 (*Lontra longicaudis*). *J Hered*.
- 912 Tsuchiya-Jerep MT. 2009. Filogeografia, história demográfica e diversidade molecular de
913 duas espécies neotropicais da família Procyonidae (Mammalia, Carnivora): *Nasua nasua*
914 e *Procyon cancrivorus* [Dissertação de Mestrado]. Porto Alegre (RS): Pontifícia
915 Universidade Católica do Rio Grande do Sul. 85 p.
- 916 Villalba L, Delgado E. 2005. Pampas Cat Photographed in High Southwest Bolivia. *Cat*
917 *News*. 42:31.

918 Wright S. 1965. The interpretation of population structure by *F*-statistics with special regard
919 to systems of mating. *Evolution*. 19:395-420.

920 **Legenda das Tabelas**

921 **Tabela 1.** Lista dos indivíduos analisados no presente estudo com o seu respectivo haplótipo
922 para os segmentos mitocondriais concatenados. A procedência geográfica de cada um dos
923 haplótipos também está indicada.

924

925 **Tabela 2.** Estimativas de diversidade do grupo interno para cada segmento do DNA
926 mitocondrial analisado (separado em dois conjuntos de dados: *Data Set A* [DSA] e *Data Set*
927 *B* [DSB] – ver texto principal para detalhamento).

928

929 **Tabela 3.** Valores de F_{ST} calculados para três agrupamentos populacionais de *L. colocolo* e
930 *L. tigrinus* CNE e resultados dos testes de neutralidade para cada população. A análise foi
931 realizada com o *Data set B* e os valores com asterisco são significantes para $\alpha < 0,05$.

932

933 **Tabela 4.** Estimativas de F_{ST} par-a-par para as populações de *L. colocolo* e *L. tigrinus* CNE
934 (abaixo da diagonal) e seus níveis de significância correspondentes (acima da diagonal).
935 Todos os valores foram estatisticamente significantes.

936

937 **Legenda das Figuras**

938 **Figura 1. Esquerda)** Distribuição geográfica de *Leopardus colocolo* (cinza médio) e
939 *Leopardus tigrinus* (cinza claro) segundo o site *IUCN Red List of Threatened Species* (versão
940 2011.2). A área mais escura do mapa da América do Sul representa as regiões simpátricas
941 entre as duas espécies. A descontinuidade observada na distribuição de *L. colocolo* na
942 Argentina não é confirmada, sendo provavelmente resultado de falta de dados da região
943 envolvida. **Direita)** Mapa indicando a distribuição das amostras utilizadas neste estudo. Os

944 círculos pontilhados representam as regiões brasileiras a que pertencem as amostras e os
945 algarismos contidos nos quadrados indicam o número de amostras pertencentes àquela região.

946

947 **Figura 2.** Filograma Bayesiano representando as relações evolutivas entre os haplótipos de
948 mtDNA de *Leopardus colocolo* e *Leopardus tigrinus* híbridos identificados neste estudo.
949 Códigos de identificação contendo um asterisco indicam haplótipos provenientes de
950 indivíduos híbridos. Valores próximos aos ramos indicam o suporte para o nó adjacente
951 baseado em BI/ML/MP. Valores de probabilidade posterior foram convertidos em
952 porcentagem. Traços indicam suporte < 50%. **A)** Árvore gerada a partir do *Data set A*. **B)**
953 Árvore gerada a partir do *Data set B*.

954

955 **Figura 3.** Rede de haplótipos construída com o algoritmo *median-joining* para *Leopardus*
956 *colocolo* e *Leopardus tigrinus* híbridos, baseado nas sequências concatenadas de mtDNA
957 (todos os sítios contendo *indels* ou dados faltantes foram excluídos). Cada haplótipo é
958 representado por um círculo proporcional à sua frequência. O número de diferenças entre os
959 haplótipos é representado por linhas transversais colocadas nos ramos, cada uma corresponde
960 a um passo mutacional. Diferenças entre haplótipos ≥ 10 mutações estão indicadas pelo
961 número correspondente. **A)** *Network* gerado para o *Data set A*. **B)** *Network* gerado para o
962 *Data set B*.

963

964 **Figura 4.** Gráfico representando a correlação entre distância genética e distância geográfica
965 para *Leopardus colocolo* e *Leopardus tigrinus* híbridos, utilizando o conjunto de dados
966 concatenados (todos os sítios contendo dados faltantes foram excluídos). **A)** Gráfico do
967 conjunto inteiro de amostras. **B)** Gráfico do conjunto de amostras do oeste da América do
968 Sul. **C)** Gráfico do conjunto de amostras do leste da América do Sul.

969 **Figura 5.** Análise de distribuição de diferenças (*Mismatch Distribution*) entre haplótipos. A
970 linha contínua vermelha indica a frequência observada das diferenças par-a-par entre os
971 haplótipos, enquanto que a linha azul pontilhada representa a frequência esperada dentro de
972 um modelo de expansão populacional repentino. **A)** Gráfico do conjunto inteiro de amostras.
973 **B)** Gráfico do conjunto de amostras do oeste da América do Sul. **C)** Gráfico do conjunto de
974 amostras do leste da América do Sul.

975

976 **Figura 6.** História demográfica de *Leopardus colocolo* e *Leopardus tigrinus* de origem
977 híbrida, inferida através de um *Skyline plot* Bayesiano. A análise empregou uma taxa de
978 substituição específica para os dados deste estudo (ver texto principal). **A)** Gráfico do
979 conjunto inteiro de amostras. **B)** Gráfico do conjunto de amostras do oeste da América do
980 Sul. **C)** Gráfico do conjunto de amostras do leste da América do Sul.

981

982 **Material Suplementar**

983 **Figura S1.** História demográfica de *L. colocolo* no bioma Pampa, inferida através de um
984 *Skyline plot* Bayesiano. A análise empregou uma taxa de substituição específica para os
985 dados deste estudo (ver texto principal).

Tabela 1. Lista dos indivíduos analisados no presente estudo com o seu respectivo haplótipo para os segmentos mitocondriais concatenados. A procedência geográfica de cada um dos haplótipos também está indicada.

Indivíduos	Haplótipo	Procedência geográfica	Instituição/Coletor/Contato
bLco301 ^{A, N, C*, RC} , bLco302 ^{A, N, C, RC} , bLco311 ^{A, N, C, RC} , bLco312 ^{A, N, C, RC} , bLco317 ^{A, N, C, RC} , bLco320 ^{A, N, C, RC} Lco30 ^{A, N, C, RC}	H1	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Leandro Silveira, Anah Jácomo, Mariana Furtado, Cynthia Kashivakura
bLco309 ^{A, N, C, RC} , bLco310 ^{A, N, C, RC}	H2	Origem desconhecida	NCI-USA
bLti150 ^{A, N, C, RC}	H3	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Leandro Silveira, Anah Jácomo, Mariana Furtado, Cynthia Kashivakura
bLco305 ^{A, N, C, RC} , bLco314 ^{A, N, C, RC}	H4	Ceará/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira
bLco307 ^{A, N, C, RC}	H5	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Leandro Silveira, Anah Jácomo, Mariana Furtado, Cynthia Kashivakura
Lco13 ^{A, N, C, RC}	H6	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Leandro Silveira, Anah Jácomo, Mariana Furtado, Cynthia Kashivakura
bLco306 ^{A, N, C, RC}	H7	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Zoológico de São Paulo (NCI-USA)
bLco308 ^{A, N, C, RC}	H8	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Leandro Silveira, Anah Jácomo, Mariana Furtado, Cynthia Kashivakura
bLco09 ^{A, N, C, RC}	H9	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Leandro Silveira, Anah Jácomo, Mariana Furtado, Cynthia Kashivakura
bLco24 ^{A, N, C, RC}	H10	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Maurício Barbanti
bLti107 ^{A, N, C, RC}	H11	Maranhão/Região Nordeste/Brasil	Carlos Benhur Kasper
bLti304 ^{A, N, C, RC}	H12	Piauí/Região Nordeste/Brasil	Criadouro de Morro Reuter
bLti148 ^{A, N, C, RC}	H13	Piauí/Região Nordeste/Brasil	Zoológico de Teresina
bLti166 ^{A, N, C, RC}	H14	Maranhão/Região Nordeste/Brasil	LBGM – PUCRS
bLti129 ^{A, N, C, RC}	H15	Pernambuco/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira
bLti154 ^{A, N, C, RC}	H16	Piauí/Região Nordeste/Brasil	M. Reis / IBAMA
bLti130 ^{A, N, C, RC}	H17	Maranhão/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira
bLti218 ^{A, N, C, RC}	H18	Piauí/Região Nordeste/Brasil	M. Reis / IBAMA
bLti153 ^{A, N, C, RC}	H19	Sergipe/Região Nordeste/Brasil	Zoológico de Aracajú
bLti151 ^{A, N, C, RC} , bLti170 ^{A, N, C, RC}	H20	Ceará/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira
bLti118 ^{A, N, C, RC} , bLti157 ^{A, N, C*, RC} , bLti164 ^{A, N, C, RC} , bLti222 ^{A, N, C, RC}	H21	Ceará/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira
	H22	Maranhão - Piauí/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira

Tabela 1. Continuação

Indivíduos	Haplótipo	Procedência geográfica	Instituição/Coletor/Contato
bLti156 ^{A, N, C, RC} , bLti219 ^{A, N, C, RC}	H23	Pernambuco - Piauí/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira/ Zoológico de Recife
bLti147 ^{A, N, C, RC} , bLti155 ^{A, N, C, RC}	H24	Maranhão/Região Nordeste/Brasil	Lígia Tchaicka/Tadeu Gomes de Oliveira
bLti85 ^{A, N, C, RC}	H25	Origem desconhecida	NCI-USA
bLti24 ^{A, N, C, RC}	H26	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Zoológico de Goiânia (NCI-USA)
bLti28 ^{A, N, C, RC}	H27	Distrito Federal/Região Centro Oeste/Brasil	Zoológico de Brasília (NCI-USA)
bLco20 ^{A, N, C, RC} , bLco27 ^{A, N, C, RC}	H28	Rio Grande do Sul/Região Sul/Brasil	Felipe Peters
bLco21 ^{A, N, C, RC}	H29	Rio Grande do Sul/Região Sul/Brasil	Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul
bLco29 ^{A, N, C, RC}	H30	Rio Grande do Sul/Região Sul/Brasil	LBGM – PUCRS
bLco32 ^{A, N, C, RC}	H31	Canelones/Uruguai	Museu Nacional de História Natural de Montevidéu
bLco17 ^{A, N, C, RC} , bLco26 ^{A, N, C*, RC}	H32	Rio Grande do Sul/Região Sul/Brasil	Jan Mähler/Felipe Peters
bLco28 ^{A, N, C, RC}	H33	Rio Grande do Sul/Região Sul/Brasil	LBGM – PUCRS
bLco06 ^{A, N, C, RC}	H34	Soriano/Uruguai	Parque Zoológico de Mercedes (NCI-USA)
bLco16 ^{A, N, C, RC}	H35	Rio Grande do Sul/Região Sul/Brasil	Glaysen Bencke/Jorge Marinho
bLco11 ^{A, N, C, RC} , bLco38 ^{A, N, C, RC}	H36	Rio Grande do Sul/Região Sul/Brasil	Zoológico de Sapucaia do Sul/ Flavia P. Peter e Virgiane Knorr
Lco23 ^{A, N, C, RC}	H37	La Paz/Bolívia	Zoológico de La Paz (NCI-USA)
bLco04 ^{A, N, C, RC}	H38	Mendoza/Argentina	Parque Zoológico de Mendoza (NCI-USA)
bLco05 ^{A, N, C, RC}	H39	Córdoba/Argentina	Parque Zoológico de Córdoba (NCI-USA)
Lco09 ^{A, N, C, RC}	H40	Soriano/Uruguai	Parque Zoológico de Mercedes (NCI-USA)
bLco31 ^{A, N, C*, RC}	H41	Mato Grosso/Região Centro Oeste/Brasil	Carolina C. Cheida
bLco14 ^{A, N, RC}	H42	Catamarca/Argentina	Lúcia Soler
bLco30 ^{A, N, C*, RC}	H43	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Guilherme Miranda/Gustavo Chemale
bLti175 ^{A, N, C*, RC}	H44	Ceará/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira
bLti152 ^{A, N, C*, RC}	H45	Piauí/Região Nordeste/Brasil	Tadeu Gomes de Oliveira

Tabela 1. Continuação

Indivíduos	Haplótipo	Procedência geográfica	Instituição/Coletor/Contato
Lco10 ^{A, N, C*, RC}	H46	5ª Região/Chile	Zoológico de Quilpue (NCI-USA)
Lco12 ^{A, N, RC}	H47	5ª Região/Chile	Mina el Soldado (NCI-USA)
Lco11 ^{A, N, C*, RC}	H48	5ª Região/Chile	Zoológico de Quilpue (NCI-USA)
Lco26 ^{A, N, C*, RC}	H49	Iquique /Chile	SAG (NCI-USA)
LcoL4 ^{**}	H50	Tacna - Puno/Peru	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoM9 ^{**}	H51	Catamarca - Salta/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoSL30 ^{**}	H52	Potosi/Bolívia	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoM133 ^{**}	H53	Jujuy/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoL1 ^{**}	H54	Tacna - Puno/Peru	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoL5 ^{**}	H55	La Paz - Onuro/Bolívia	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoL21 ^{**}	H56	Yauyos - Canchayllo/Peru	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoL23 ^{**}	H57	Junin National Reserve/Peru	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoH12 ^{**}	H58	Lambayeque/Peru	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoPil1 ^{**}	H59	Pilcaniyeu/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoB81 ^{**}	H60	Buenos Aires/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoE11 ^{**}	H61	San Juan - Mendoza/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoSL5 ^{**}	H62	Potosi/Bolívia	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoM34 ^{**}	H63	Jujuy/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoM82 ^{**}	H64	Catamarca - Salta/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoFJ1M ^{**}	H65	Potosi/Bolívia	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoSL1 ^{**}	H66	Potosi/Bolívia	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoBB1 ^{**}	H67	Jujuy/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
LcoE04 ^{**}	H68	Catamarca - Salta/Argentina	Cossíos <i>et al.</i> (2009)
bLti72§ ^{A, N, C, RC}	H69	Mato Grosso do Sul/Centro Oeste/Brasil	Zoológico de Catanduva
bLti96§ ^{A, N, C, RC}	H70	Goiás/Região Centro Oeste/Brasil	Flávio Rodrigues
bLti209§ ^{A, N, C, RC}	H71	Distrito Federal/Região Centro Oeste/Brasil	Criadouro de Morro Reuter
bLwi32§ ^{A, N, C, RC}	H72	São Paulo - Brasil	Zoológico de Tapiraí
bLpa72§ ^{A, N, C*, RC}	H73	São Paulo/Região Sudeste/Brasil	Zoológico de São Bernardo do Campo

Nota: amostras sequenciadas para cada segmento mitocondrial: A) ATP8; N) ND5; C) CitB (1028pb); C*) CitB (600pb); RC) Região Controle.

***) Segmentos curtos de ATP8 (133pb), ND5 (250pb) e RC (171pb) gerados por Cossíos et al. (2009). §) Grupo externo.

Tabela 2. Estimativas de diversidade do grupo interno para cada segmento do DNA mitocondrial analisado (separado em dois conjuntos de dados: *Data Set A* [DSA] e *Data Set B* [DSB] – ver texto principal para detalhamento).

Segmento		<i>N</i>	<i>L</i> (pb)	<i>V</i>	<i>P</i>	<i>h</i>	<i>Hd</i> (DP) ^{1,2}	π (DP) ^{1,2}
<i>ATP8</i>								
	DSA	65	133	9	4	10	0,3361 (\pm 0,0764)	0,00421 (\pm 0,00175)
	DSB	84	133	11	9	16	0,5944 (\pm 0,0626)	0,01084 (\pm 0,00407)
<i>ND5</i>								
	DSA	65	567	34	18	19	0,8548 (\pm 0,0255)	0,00503 (\pm 0,00127)
	DSB	84	270	25	15	26	0,7263 (\pm 0,0487)	0,00799 (\pm 0,00247)
<i>Cit-b</i>								
	DAS (1028 pb)	53	1028	57	28	23	0,9267 (\pm 0,0201)	0,00592 (\pm 0,00128)
	DAS (600 pb)	63	600	33	17	16	0,8751 (\pm 0,0194)	0,00612 (\pm 0,00141)
Região Controle								
	DSA	65	413	82	60	43	0,9817 (\pm 0,0071)	0,03475 (\pm 0,00482)
	DSB	84	170	67	51	57	0,9825 (\pm 0,0059)	0,06965 (\pm 0,01110)
Concatenação								
	DSA	65	2141	182	110	49	0,9846 (\pm 0,0069)	0,01624 (\pm 0,00212)
	DSB	84	573	103	75	60	0,9834 (\pm 0,0059)	0,02776 (\pm 0,00386)

¹ Calculado utilizando deleção completa.

² Calculado utilizando distância-*p*.

N, número de sequências

L (Length), comprimento da sequência em pares de bases (pb)

V, sítios variáveis

P, sítios informativos para parcimônia

h, número de haplótipos

Hd, diversidade haplotípica

π , diversidade nucleotídica

DP, desvio padrão

Tabela 3. Valores de F_{ST} calculados para três agrupamentos populacionais de *L. colocolo* e *L. tigrinus* CNE e resultados dos testes de neutralidade para cada população. A análise foi realizada com o *Data set B* e os valores com asterisco são significantes para $\alpha < 0,05$.

Teste	População	F_{ST}	D de Tajima	F_S de Fu
Leste X Oeste		0,42431 (p = 0,00000)		
	Leste		-0,28774	-15,90929*
	Oeste		0,15908	-11,16720*
Norte X Sul		0,17044 (p = 0,00000)		
	Norte		-0,67796	-22,44270*
	Sul		-0,16097	-5,71733*
Biomias		0,43148 (p = 0,00000)		
	Pampa		-1,89698*	-4,11876*
	Cerrado		0,0954	-2,59233
	Caatinga		-1,32166	-3,64655*
	Monte+Estepes		0,2074	-4,81433*
	Puna		0,10924	-1,41517
	Todas as amostras		-0,67043	-24,11258*

Tabela 4. Estimativas de F_{ST} par-a-par para as populações de *L. colocolo* e *L. tigrinus* CNE (abaixo da diagonal) e seus níveis de significância correspondentes (acima da diagonal). Todos os valores foram estatisticamente significantes.

	Pampa	Cerrado	Caatinga	Monte+Estepes	Puna
Pampa	*	0,00000	0,00000	0,00000	0,00000
Cerrado	0,49495	*	0,01775	0,00000	0,00000
Caatinga	0,61112	0,13749	*	0,00000	0,00000
Monte+Estepes	0,44645	0,46572	0,40732	*	0,00000
Puna	0,56365	0,52495	0,49108	0,15468	*

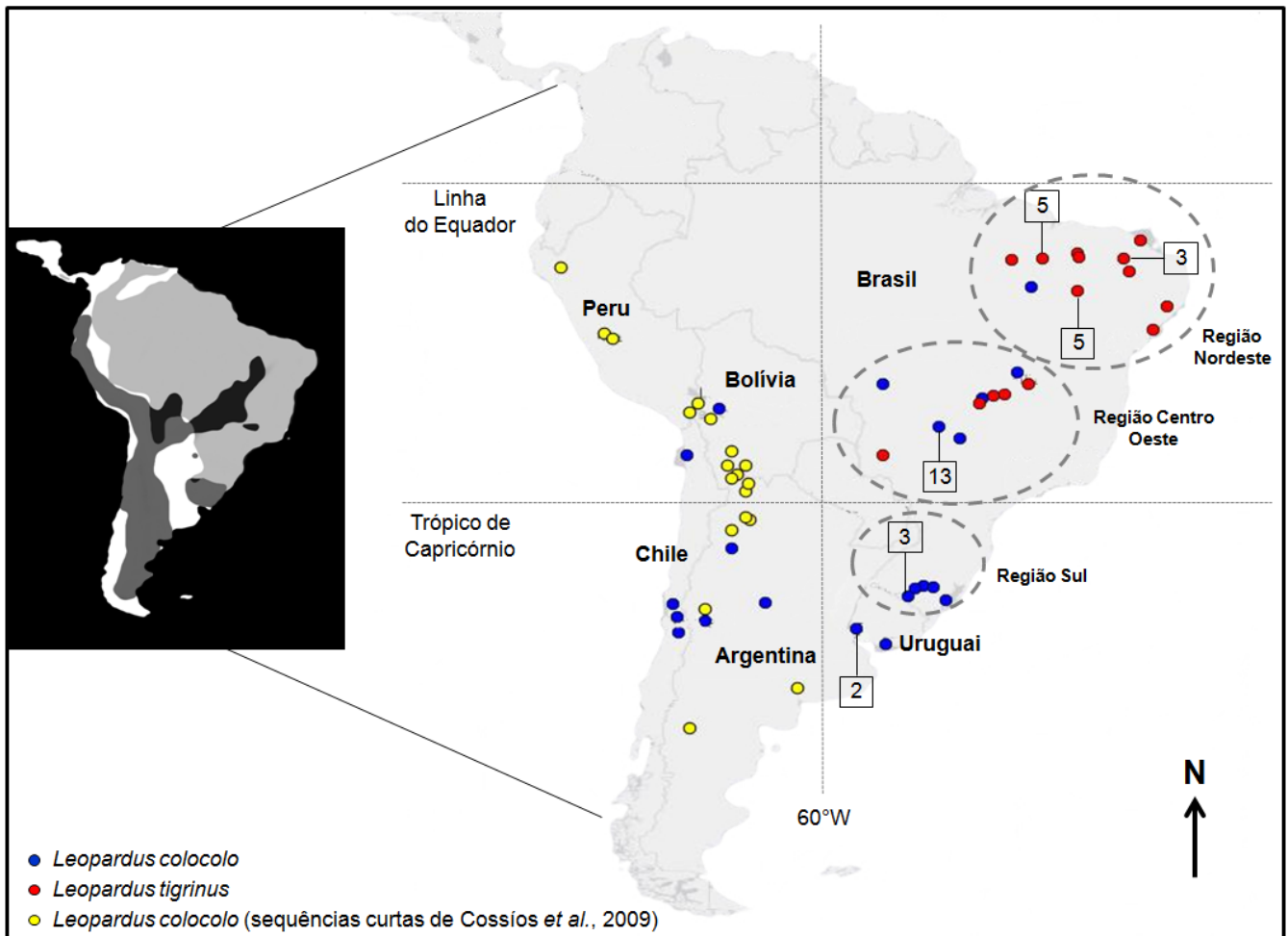


Figura 1. Esquerda) Distribuição geográfica de *Leopardus colocolo* (cinza médio) e *Leopardus tigrinus* (cinza claro) segundo o site *IUCN Red List of Threatened Species* (versão 2011.2). A área mais escura do mapa da América do Sul representa as regiões simpátricas entre as duas espécies. A descontinuidade observada na distribuição de *L. colocolo* na Argentina não é confirmada, sendo provavelmente resultado de falta de dados da região envolvida. **Direita)** Mapa indicando a distribuição das amostras utilizadas neste estudo. Os círculos pontilhados representam as regiões brasileiras a que pertencem as amostras e os algarismos contidos nos quadrados indicam o número de amostras pertencentes àquela região.

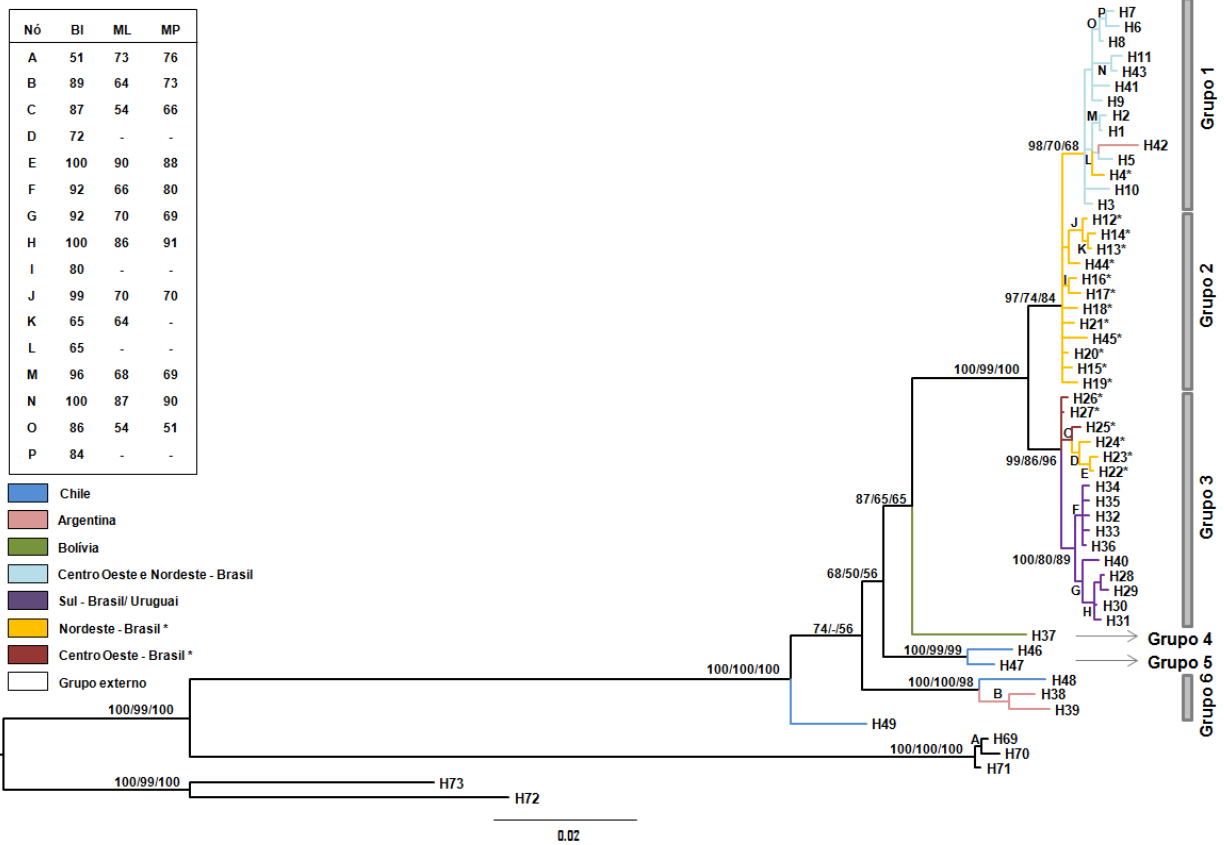


Figura 2A.

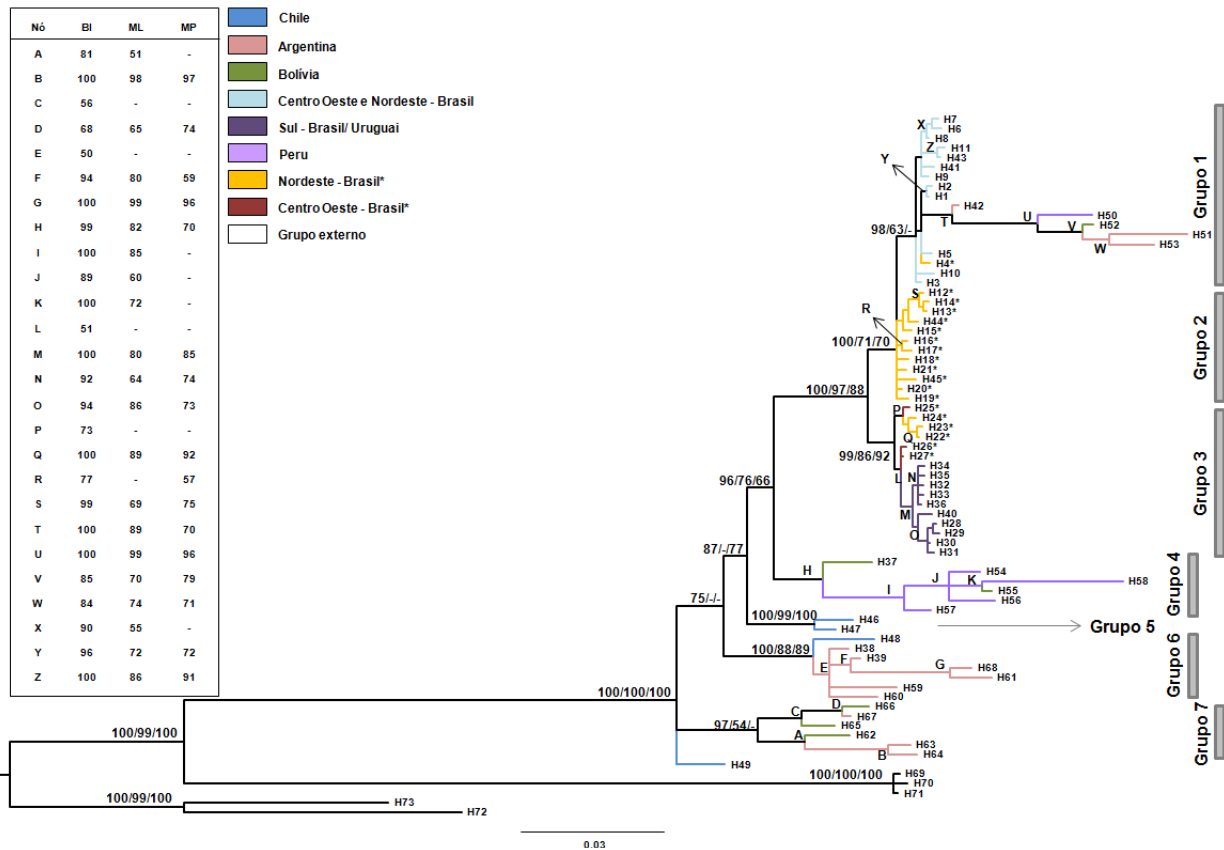


Figura 2B.

Figura 2. Filograma Bayesiano representando as relações evolutivas entre os haplótipos de mtDNA de *Leopardus colocolo* e *Leopardus tigrinus* híbridos identificados neste estudo. Códigos de identificação contendo um asterisco indicam haplótipos provenientes de indivíduos híbridos. Valores próximos aos ramos indicam o suporte para o nó adjacente baseado em BI/ML/MP. Valores de probabilidade posterior foram convertidos em porcentagem. Traços indicam suporte < 50%. **A)** Árvore gerada a partir do *Data set A*. **B)** Árvore gerada a partir do *Data set B*.

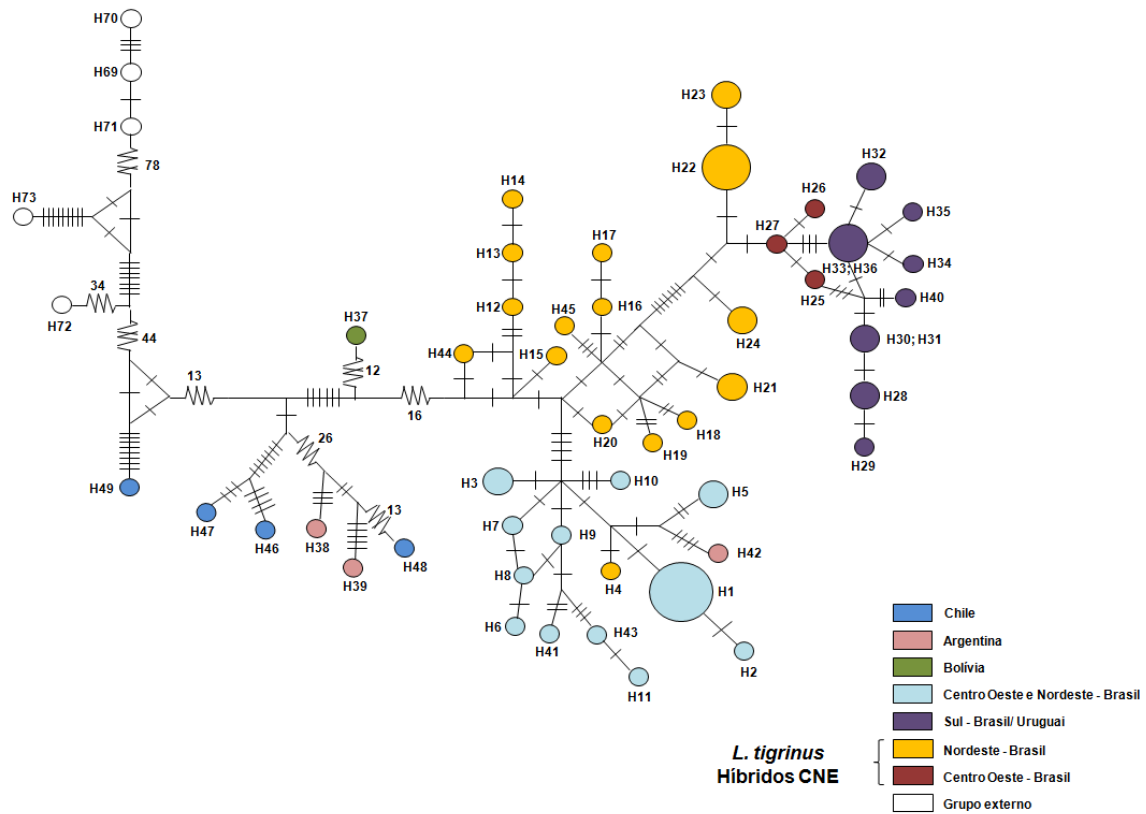


Figura 3A.

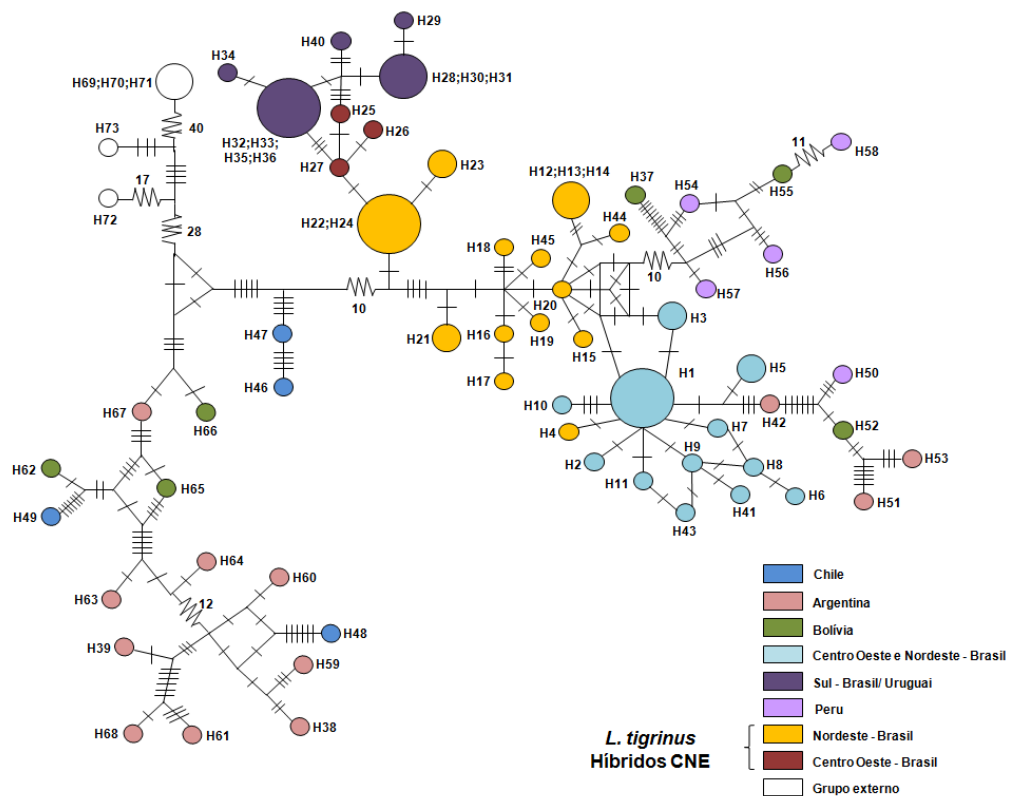


Figura 3B.

Figura 3. Rede de haplótipos construída com o algoritmo *median-joining* para *Leopardus colocolo* e *Leopardus tigrinus* híbridos, baseado nas sequências concatenadas de mtDNA (todos os sítios contendo *indels* ou dados faltantes foram excluídos). Cada haplótipo é representado por um círculo proporcional à sua frequência. O número de diferenças entre os haplótipos é representado por linhas transversais colocadas nos ramos, cada uma corresponde a um passo mutacional. Diferenças entre haplótipos ≥ 10 mutações estão indicadas pelo número correspondente. **A)** *Network* gerado para o *Data set A*. **B)** *Network* gerado para o *Data set B*.

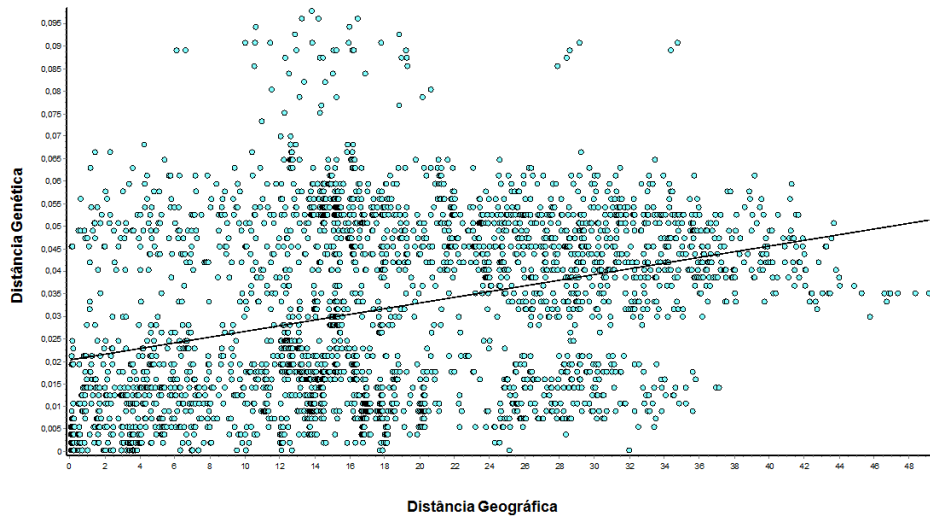


Figura 4A.

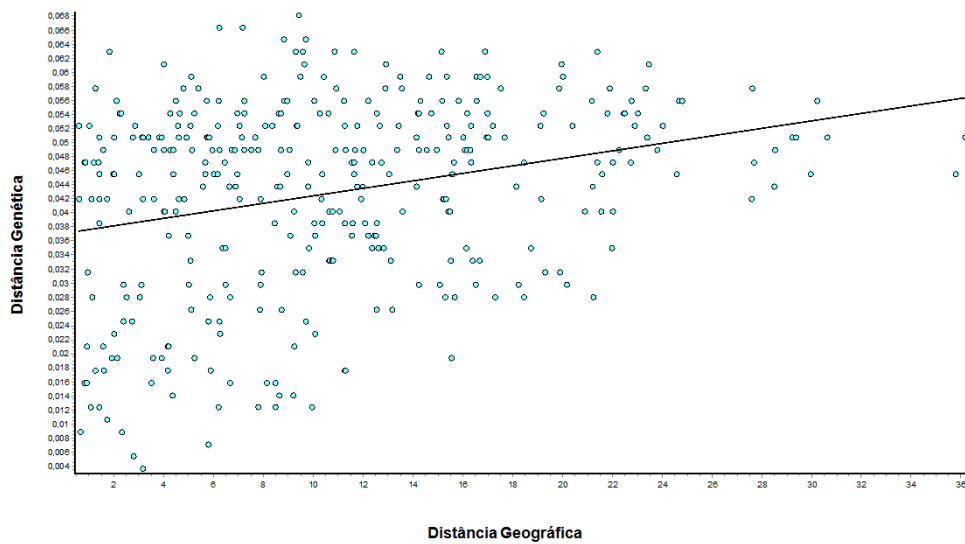


Figura 4B.

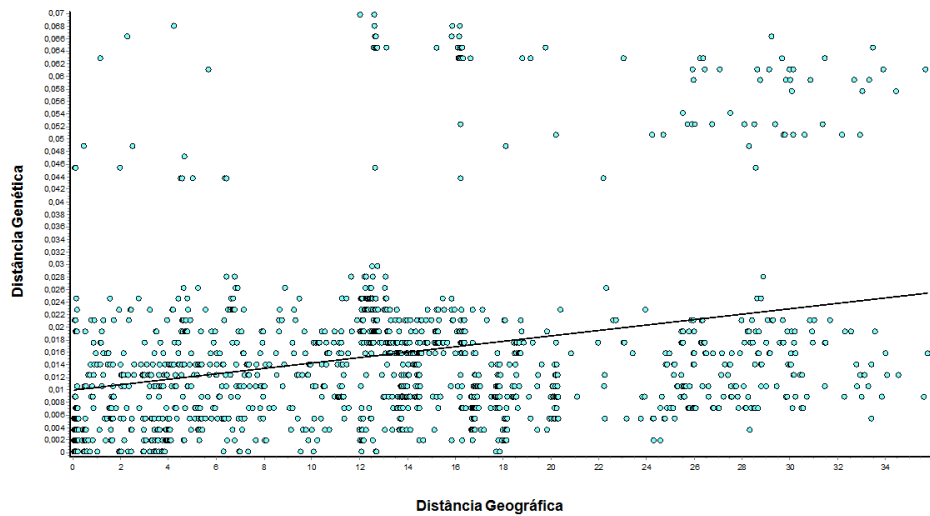


Figura 4C.

Figura 4. Gráfico representando a correlação entre distância genética e distância geográfica para *Leopardus colocolo* e *Leopardus tigrinus* híbridos, utilizando o conjunto de dados concatenados (todos os sítios contendo dados faltantes foram excluídos). **A)** Gráfico do conjunto inteiro de amostras. **B)** Gráfico do conjunto de amostras do oeste da América do Sul. **C)** Gráfico do conjunto de amostras do leste da América do Sul.

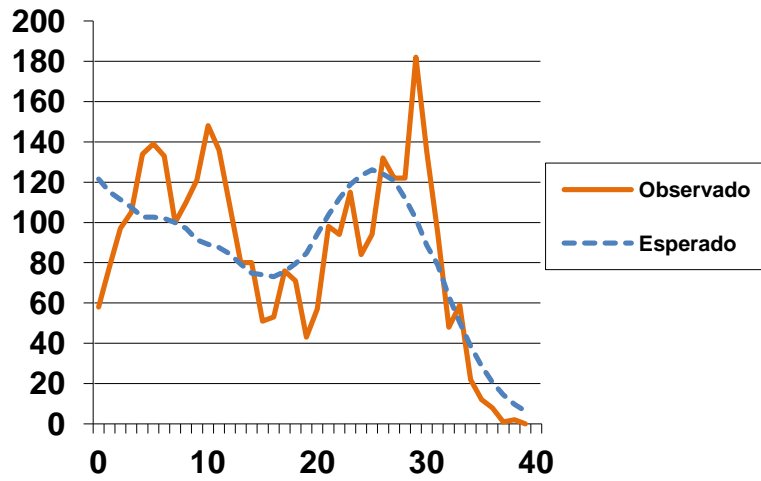


Figura 5A.

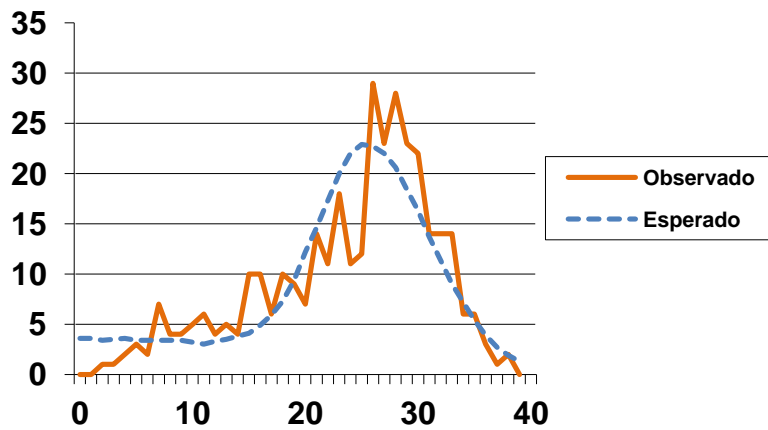


Figura 5B.

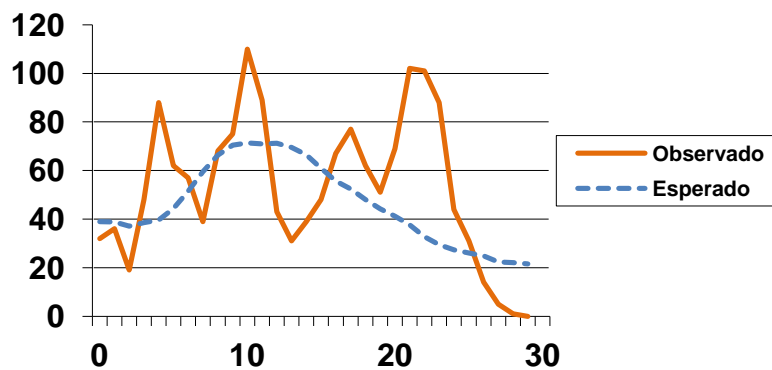


Figura 5C.

Figura 5. Análise de distribuição de diferenças (*Mismatch Distribution*) entre haplótipos. A linha contínua vermelha indica a frequência observada das diferenças par-a-par entre os haplótipos, enquanto que a linha azul pontilhada representa a frequência esperada dentro de um modelo de expansão populacional repentino. **A)** Gráfico do conjunto inteiro de amostras. **B)** Gráfico do conjunto de amostras do oeste da América do Sul. **C)** Gráfico do conjunto de amostras do leste da América do Sul.

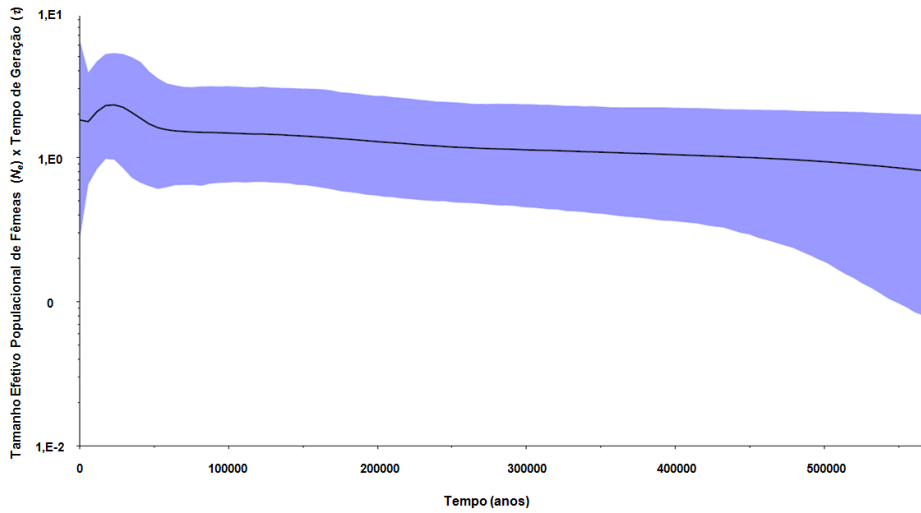


Figura 6A.

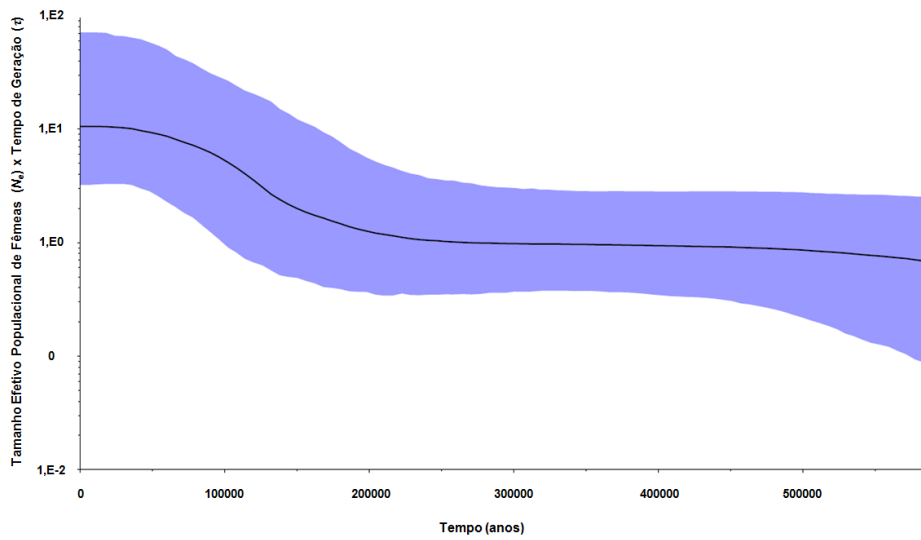


Figura 6B.

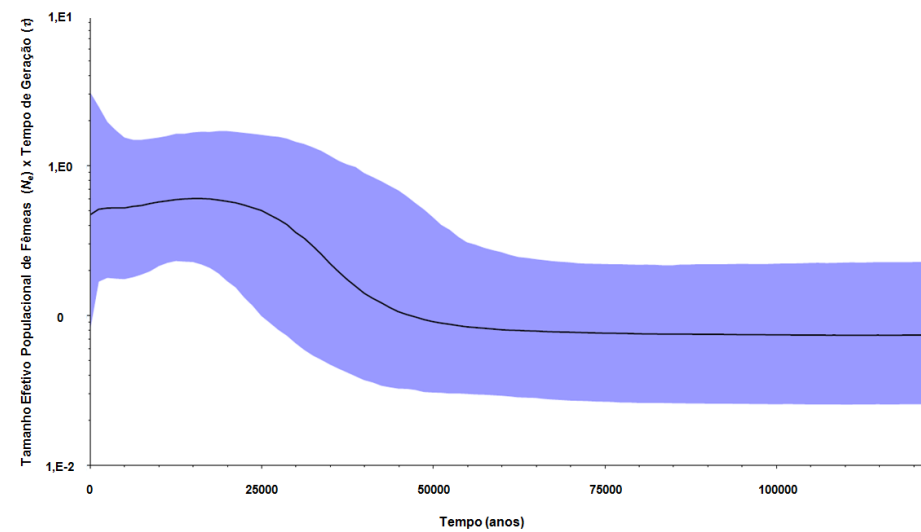


Figura 6C.

Figura 6. História demográfica de *Leopardus colocolo* e *Leopardus tigrinus* de origem híbrida, inferida através de um *Skyline plot* Bayesiano. A análise empregou uma taxa de substituição específica para os dados deste estudo (ver texto principal). **A)** Gráfico do conjunto inteiro de amostras. **B)** Gráfico do conjunto de amostras do oeste da América do Sul. **C)** Gráfico do conjunto de amostras do leste da América do Sul.

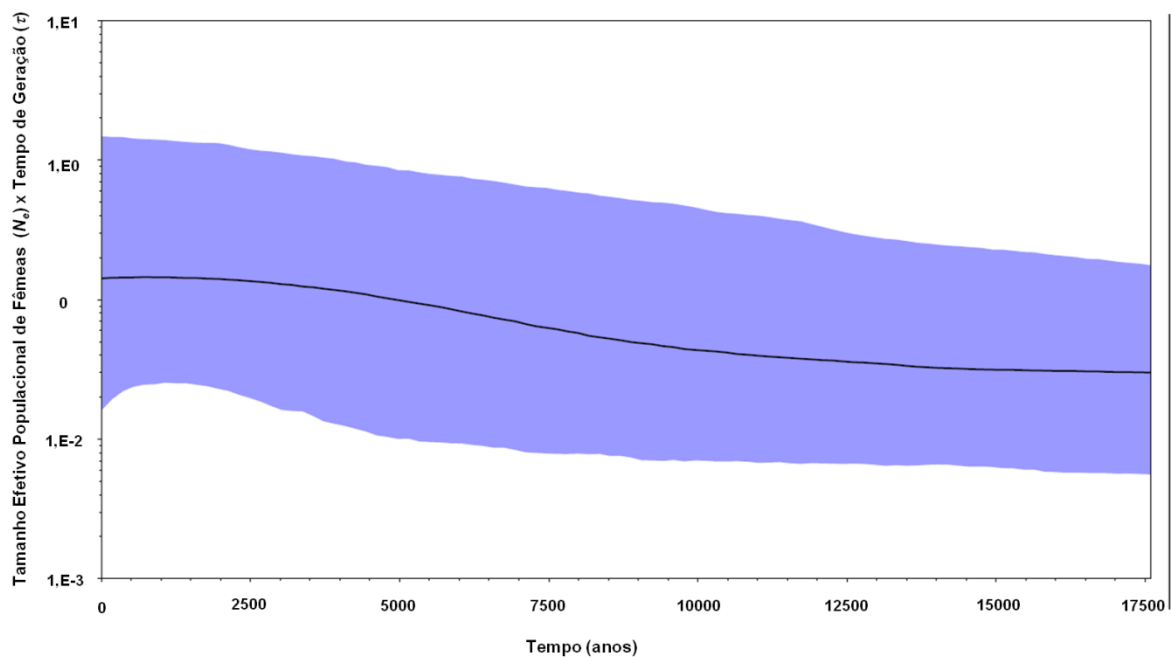


Figura S1. História demográfica de *L. colocolo* no bioma Pampa, inferida através de um Skyline plot Bayesiano. A análise empregou uma taxa de substituição específica para os dados deste estudo (ver texto principal).

REFERÊNCIAS

- Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Eigel JE, Reeb CA, Saunders NC. 1987. Intraspecific Phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between populations genetics and systematics. *Annu Rev Ecol Syst.* 18:489-522.
- Avise JC, Hamrick JL. 1996. *Conservation Genetics: Case Histories from Nature*. New York (NY): Chapman & Hall.
- Avise JC. 1994. *Molecular markers, natural history e evolution*.
- Avise JC. 2000. *Phylogeography: The History and Formation of Species*. Cambridge (MA): Harvard University Press.
- Bagno MA, Rodrigues FHG, Villalobos MP, Dalponte JC, Paula RC, Brandão RA, Britto B, Bezerra AMR. 2004. Notes on the Natural History and Conservation Status of Pampas Cat, *Oncifelis colocolo*, in the Brazilian Cerrado. *Mammalia.* 68(1):75-79.
- Bermingham E, Moritz C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Mol Ecol.* 7:367-369.
- Brito JL, Elgueta E. 2003. Guigna and Pampas Cat Mortality Due to Human Conflict in Central Chile. *Cat News.* 38:32-35.
- Cossíos D, Lucherini M, Ruiz-García M, Angers B. 2009. Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). *BMC Evol Biol.* 9:68.
- Eisenberg JF, Redford KH. 1999. *Mammals of the Neotropics, Vol. 3. The Central Tropics: Ecuador, Peru, Bolivia, Brazil*. Chicago (IL): The University of Chicago Press.
- Eizirik E, Johnson WE, O'Brien SJ. 2006. Definindo unidades evolutivamente significativas e unidades de manejo para a conservação de carnívoros neotropicais. In: Morato RG,

- Rodrigues FHG, Eizirik E, Mangini PR, Azevedo FCC, Marinho Filho JS, editores. Manejo e Conservação de Carnívoros Neotropicais. São Paulo (SP): IBAMA; p. 47-66.
- Eizirik E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. *Brazil J Genet.* 19:23-29.
- Garcia-Perea R. 1994. The Pampas Cat Group (Genus *Lynchailurus* Severtzov, 1858) (Carnivora: Felidae), a Systematic and Biogeographic Review. *Am Mus Novit.* 3096:1-36.
- Haag T. 2009. Genética da Conservação e Ecologia Molecular de Onças-Pintadas (*Panthera onca*, Felidae) [Tese de Doutorado]. Porto Alegre (RS): Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 150 p.
- Indrusiak C, Eizirik E. 2003. *Oncifelis colocolo*. In: Fontana CS, Bencke GA, Reis RE, editores. Livro vermelho da fauna ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: EDIPUCRS; p. 518-519.
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery 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.
- Johnson WE, Pecon-Slattery J, Eizirik E, Kim J, Menotti-Raymond M, Bonacic C, Cambre R, Crawshaw P, Nunes A, Seuánez HN, Moreira MAM, Seymour KL, Simon F, Swanson W, O'Brien SJ. 1999. Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Mol Ecol.* 8:S79-S94.
- King TL, Burke T. 1999. Special Issue on Gene Conservation: Identification and Management of Genetic Diversity. *Mol Ecol.* 8:S1-S3.
- Machado ABM, Drummond GM, Paglia AP. 2008. Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. Brasília (DF): Ministério do Meio Ambiente; Belo Horizonte (MG): Fundação Biodiversitas.

- Mattevi MS. 2003. Caracterização Genético-Molecular da Biodiversidade. In: Marques EK, editor. Diagnóstico genético-molecular. Canoas: ULBRA; p. 259-282.
- Molina GI. 1782. Saggio sulla storia natural del Chile. Bologna. 367 p.
- Moritz C, Faith D. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Mol Ecol.* 7:419-429.
- Moritz C. 1994. Defining “Evolutionarily Significant Units” for conservation. *Trends Ecol Evol.* 9:373-375.
- Napolitano C, Bennett M, Johnson WE, O’Brien SJ, Marquet PA, Barría I, Poulin E, Iriarte A. 2008. Ecological and biogeographical inferences on two sympatric and enigmatic Andean cat species using genetic identification of faecal samples. *Mol Ecol.* 17:678-690.
- Nowell K, Jackson P. 1996. Wilds cats: Status Survey and Conservation Action Plan. Gland (Switzerland): IUCN.
- O’Brien SJ. 1994. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annu Rev Genet.* 28:467-489.
- Oliveira TG, Cassaro K. 1999. Guia de Identificação dos Felinos Brasileiros. Bauru (SP): Sociedade de Zoológicos do Brasil.
- Oliveira TG. 1994. Neotropical Cats: Ecology and Conservation. São Luís (MA): EDUFMA.
- Pereira J, Lucherini M, Oliveira T, Eizirik E, Acosta G, Leite-Pitman R. 2008. *Leopardus colocolo*. In: IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2010.1. [acesso em 16 Jan 2012]. Disponível em: <http://www.iucnredlist.org>.
- Robinson R. 1976. Homologous genetic variation in the Felidae. *Genetica.* 46:1-31.

- Romo MC. 1995. Food habits of the Andean Fox (*Pseudalopex culpaeus*) and notes on the mountain cat (*Felis colocolo*) and puma (*Felis concolor*) in the Río Abiseo National Park, Perú. *Mammalia*. 59(3):335-343.
- Ruiz-Garcia M, Payán CE, Hernández-Camacho JI. 2003. Possible Records of *Lynchailurus* in South-western Colombia. *Cat News*. 38:35-37.
- Sánchez-Soto S. 2007. Nuevo registro de *Oncifelis colocolo* (Felidae) para el Pantanal de Brasil. *Rev Mex Biodiv*. 78:211-212.
- Schreber JCD. 1775. Die Säugethiere in Abbildungen nach der Natur, mit Beschreibung. Erlangen. v3.
- Silva F. 1984. Mamíferos Silvestres do Rio Grande do Sul. Porto Alegre (RS): Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.
- Silveira L, Jácomo ATA, Furtado MM. 2005. Pampas cat ecology and conservation in the Brazilian grasslands. Cat Project of the Month - September 2005. IUCN/SSC Cat Specialist Group. [acesso 17 Mai 2010]. Disponível em: <http://www.catsg.org>.
- Silveira L. 1995. Notes on the distribution and natural history of the pampas cat, *Felis colocolo*, in Brazil. *Mammalia*. 59(2):284-288.
- Sunquist M, Sunquist F. 2002. Wild Cats of the World. Chicago (IL): The University of Chicago Press.
- 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.
- UNEP-WCMC 2012. UNEP-WCMC Species Database: CITES - Listed Species. [acesso em 16 Jan 2012]. Disponível em: <http://www.cites.org>.

Villalba L, Delgado E. 2005. Pampas Cat Photographed in High Southwest Bolivia. *Cat News*. 42:31.

Walker RS, Novaro AJ, Perovic P, Palacios R, Donadio E, Lucherini M, Pia M, López MS. 2007. Diets of three species of Andean carnivores in high-altitude deserts of Argentina. *J Mammal*. 88(2):519-525.