

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA  
MOLECULAR

ESTRUTURA GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE *Leopardus tigrinus*  
(CARNIVORA, FELIDAE) NO SUL, SUDESTE E CENTRO-OESTE DO  
BRASIL INFERIDA PELA ANÁLISE DE MICROSSATÉLITES

Tatiane Campos Trigo

Orientador: Dr. Thales R. O. de Freitas

Co-orientador: Dr. Eduardo Eizirik

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Genética e Biologia  
Molecular da Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul para a obtenção do Título  
de Mestre em Genética e Biologia  
Molecular

Porto Alegre

2003

**Aos meus pais**

*“ O homem é o único animal de que tenho medo. Nunca admirei a coragem dos domadores de leões, já que, pelo menos enquanto estão dentro da jaula, estão livres de serem atacados por outros homens. Os leões não são perigosos pois não têm ideais, nem religião, nem credo político, nem cavalheirismo ou preocupações de linhagem. Em suma, não há motivos para que eles destruam qualquer coisa que não queiram comer.”*

G. Bernard Shaw

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética do Departamento de Genética do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado por: Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS) e (CNPq).

## SUMÁRIO

<b>AGRADECIMENTOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	
1.1 Biologia da Conservação.....	1
1.2 Genética da Conservação.....	2
1.2.1 Variabilidade Genética.....	2
1.2.2 Análise de Estruturas Familiares e Parentesco.....	4
1.2.3 Estrutura Populacional e Filogeografia.....	5
1.2.4 Filogenia.....	7
1.3 Marcadores Moleculares.....	9
1.3.1 Microssatélites.....	9
1.4 Ordem Carnivora.....	11
1.5 Família Felidae.....	11
1.6 Os Felídeos Neotropicais.....	14
1.7 O gato-do-mato-pequeno.....	15
1.8 Estudos Moleculares em Felídeos.....	18
1.8.1 Padrões Filogenéticos entre os Felídeos da Região Neotropical.....	18
1.8.2 Variabilidade e Estrutura Genética em Felídeos Neotropicais.....	21
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>25</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	
3.1 Obtenção de Amostras.....	26
3.2 Extração de DNA.....	31
3.3 Amplificação por PCR “Polymerase Chain Reaction” dos Locos de Microssatélite.....	33
3.4 Determinação dos Alelos e Genótipos dos Indivíduos.....	36
3.5 Análise dos Dados.....	37
<b>4. RESULTADOS</b>	
4.1 Características dos Locos de Microssatélite Analisados em <i>Leopardus     tigrinus</i> e <i>Oncifelis geoffroyi</i> .....	40
4.2 Estrutura Genética de <i>Leopardus tigrinus</i> .....	50
<b>5. DISCUSSÃO</b>	
5.1 Variabilidade Genética, Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação em <i>Leopardus tigrinus</i> e <i>Oncifelis geoffroyi</i> .....	64
5.2 Reconhecimento de <i>Leopardus tigrinus</i> e <i>Oncifelis geoffroyi</i> como Unidades Geneticamente Distintas.....	66
5.3 Considerações sobre os Índices de Diferenciação Genética $F_{st}$ e $R_{st}$ .....	72
5.4 Estrutura Genética de <i>Leopardus tigrinus</i> .....	76
5.5 Implicações para a Conservação.....	80
<b>6. RESUMO E CONCLUSÕES.....</b>	<b>83</b>
<b>7. SUMMARY AND CONCLUSIONS.....</b>	<b>86</b>
<b>8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>89</b>
<b>9. ANEXOS.....</b>	<b>100</b>

## AGRADECIMENTOS

Ao professor Thales de Freitas, pela orientação, confiança, paciência e amizade.

Ao Eduardo Eizirik, pela orientação (mesmo à distância), confiança, todos os ensinamentos, amizade e, principalmente, por ter tornado real meu sonho de trabalhar com felinos.

Aos colegas e amigos do laboratório: Lígia Tchaicka, Vanessa Andrade, Camila Castilhos, Vanina Heuser, Adriana Gava, Gabriela Fernandez, Elise Giacomoni, Juliana da Silva, Leandro Jerusalinsky, Lucas Klassmann, Tarik El Jundi, Gislene Gonçalves, Juliano Coelho, Pedro Fruet, Paulo Ott, Daniel Prá, Jorge Marinho, Ana Lupe, Priscila Farinha, Thaís, Thaísa e em especial às novas colegas no estudo dos carnívoros Vanessa Lipp e Cristine Trinca, por terem tornado os dias de trabalho mais alegres e agradáveis.

À Lígia Tchaicka pela parceria de festas, cursos e preocupações nas disciplinas e desenvolvimento das técnicas de laboratório, e sobretudo por ter se tornado uma grande amiga.

Aos professores do Departamento de Genética, por toda contribuição e ensinamentos.

Ao Elmo, Helen, Lucia Andréa, por toda ajuda na resolução de vários problemas do dia-a-dia.

À Rose e ao Luciano, por todo o trabalho no laboratório indispensável para a realização deste estudo e por todas as conversas divertidas.

À minha irmã Cariane Trigo e as grandes amigas Ana Paula Serafim, Aniele Giacomini, Ana Paula Brandt e Aline Lorenz, por agüentarem meu mau-humor, minhas constantes reclamações das “análises”, total paciência e todas as ajudas prestadas (em todos os assuntos!).

À Cibele Indrusiak, por toda atenção, ensinamentos, ajuda na coleta de amostras, amizade e por ser um exemplo de pesquisadora na área de carnívoros.

Ao Jan Mähler, Dênis Sana, Flávio Rodrigues, Paulo Ott, Edson Salomão, Tiago Breier, Juliana da Silva, Fernanda Bittencourt, Lauren Veronese, Fernanda Trierweiler, Márcio Martins, Cariane Trigo, Miguel Andrade, Adriano Scherer, Lázaro Cabral, Sônia Cechin, Lúcia Olímpio e Kuriakin Toscan pela ajuda na coleta das amostras utilizadas neste estudo.

À Associação Mata Ciliar / Plano de Manejo de Felinos Brasileiros, pela coleta de grande parte das amostras de *Leopardus tigrinus* provenientes de cativeiro.

À CAPES, CNPq e FAPERGs pelo apoio financeiro.

Aos meus pais Vilmarina e Constantino Campos Trigo e à minha tia Mara, por todo o amor, dedicação e confiança depositadas em mim durante toda minha vida e por serem responsáveis pela pessoa que sou hoje.

Ao Ziggy, Misha, Manu, Kinder, Malani, Tibot e aos que já se foram mas jamais serão esquecidos Simba, Mâli, Nala e Kali, por terem sido sempre meus companheiros, motivos de alegria e meus consolos nos momentos mais difíceis, e a todos felinos, selvagens ou não, simplesmente por existirem!

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1 Biologia da Conservação**

O crescimento populacional humano, contínuo e desenfreado, vem provocando uma enorme crise da biodiversidade, com a devastação de milhares de comunidades biológicas que levaram milhões de anos para se desenvolver. Inúmeras são as transformações de sistemas naturais diretamente relacionadas à atividade humana, como a diminuição da distribuição e densidade de muitas espécies devido à caça predatória, destruição de habitats e ação de predadores e competidores introduzidos pelo homem. A partir destas ameaças surge a necessidade de se fazer algo para impedir esta destruição, concentrando esforços para se salvar espécies e ambientes degradados.

A Biologia da Conservação constitui uma ciência multidisciplinar desenvolvida como resposta à crise com a qual a diversidade biológica se confronta atualmente. Como uma ciência multidisciplinar, engloba uma variedade de disciplinas como a Antropologia, Ecologia, Biologia Evolutiva, Genética, Legislação e Política Ambiental, que geram, em conjunto, informações aplicadas para o manejo dos recursos naturais (PRIMACK & RODRIGUES, 2001).

A diversidade biológica é o ponto central da Biologia da Conservação. Podemos reconhecer três níveis principais de diversidade biológica: a diversidade em nível de espécies, de variação genética e de variação entre as comunidades (PRIMACK & RODRIGUES, 2001). Todos estes níveis estão inteiramente interligados, sendo que a alteração da diversidade em um deles provavelmente afetará a dos outros. Para fins de conservação, é necessário que todos estes níveis sejam estudados para que recebam a proteção adequada.



## **1.2. Genética da Conservação**

Preocupações com a conservação da biodiversidade representam também a conservação da diversidade genética (AVISE, 1994). A Genética da Conservação é a disciplina que tem como objetivos o estudo e a preservação desta diversidade, assim como dos processos evolutivos atuantes sobre as populações naturais e dos ambientes nos quais estes processos que nutrem a diversidade biológica sejam mantidos (SCHONEWALD-COX *et al.*, 1983; AVISE, 1994).

A diversidade genética apresenta-se extremamente importante para a evolução e viabilidade a longo prazo das populações. Além disso, ela pode ser utilizada como instrumento de investigação por ecólogos e sistematistas para verificar as afinidades e os limites entre as espécies através da filogenia, detectar modos de reprodução e estrutura familiar e definir estruturas populacionais, estimando níveis de migração e dispersão nas populações (AVISE, 1994).

### **1.2.1 Variabilidade Genética**

A variabilidade genética é a matéria-prima da evolução, é através dela que a seleção natural atua gerando novas formas adaptativas (DOBZHANSKY *et al.*, 1977). Desta maneira, altos níveis desta variabilidade serão, geralmente, importantes para a viabilidade das populações por apresentarem uma maior amplitude de possibilidades onde a seleção natural possa agir, gerando um maior número de adaptações e assim tendendo a aumentar a probabilidade de sobrevivência destas populações ao longo do tempo evolutivo e ecológico (AVISE, 1994).

Como todos os níveis de diversidade - genética, espécies e comunidades - estão interligados, se a variabilidade genética é importante para a viabilidade das populações,

também será para os níveis mais altos de biodiversidade dos quais estas populações são componentes funcionais.

A deriva genética – flutuação ao acaso das frequências alélicas entre gerações - e o endocruzamento – cruzamento entre aparentados - constituem dois processos de fundamental importância dentro da Genética da Conservação, pois podem provocar a perda da variabilidade genética principalmente em populações isoladas e de tamanho reduzido (LACY, 1997; AMOS & BALMFORD, 2001). Além disso, o excesso de endocruzamento dentro de uma população pode levar ao fenômeno da Depressão Endogâmica.

Diversos mecanismos na natureza evitam a endogamia na maioria das populações selvagens, no entanto quando a densidade demográfica é baixa e nenhum outro acasalamento é possível, estes mecanismos podem falhar. O desenvolvimento contínuo de eventos de endogamia pode levar à depressão endogâmica, que expressa coletivamente os vários impactos no valor adaptativo das espécies provocados pelo endocruzamento (KELLER & WALLER, 2002). Ao provocar um acréscimo no número de homozigotos dentro de uma população, o endocruzamento pode levar a um aumento da exposição de alelos deletérios recessivos em homozigose, que pode ser o responsável pelos impactos surgidos no valor adaptativo das espécies ou populações, juntamente com a existência de uma vantagem adaptativa dos heterozigotos sobre os homozigotos (AMOS & BALMFORD, 2001; KELLER & WALLER, 2002).

Vários são os impactos conhecidos no valor adaptativo das espécies provocados pelo endocruzamento, como altas taxas de mortalidade, baixa fecundidade, reduzida habilidade de acasalamento, crescimento lento, instabilidade no desenvolvimento e

grande suscetibilidade a doenças (ver por exemplo LACY, 1997; CRNOKRAK & ROFF, 1999; KELLER & WALLER, 2002).

Muitas espécies selvagens estudadas, que sofreram reduções populacionais drásticas, naturais ou provocadas pelo homem, revelaram uma acentuada perda da variabilidade genética associada a efeitos negativos em seu valor adaptativo. Casos clássicos incluem o guepardo *Acinonyx jubatus* (O'BRIEN *et al.*, 1983; O'BRIEN *et al.*, 1985; O'BRIEN *et al.*, 1986), o Puma da Flórida *Puma concolor coryi* (BARONE *et al.*, 1994), uma população isolada de leões africanos *Panthera leo leo* e a única população remanescente de leões asiáticos *Panthera leo persica* (O'BRIEN *et al.*, 1987; WILDT *et al.*, 1987).

Tendo em vista a importância da diversidade genética para as populações e as possíveis conseqüências de alterações em seus padrões naturais, os estudos genéticos nesta área envolvem, principalmente, a caracterização dos níveis de variabilidade genética dentro das populações e espécies, e a identificação de como as atividades humanas estão afetando estes níveis (como exemplos NADER *et al.* 1998; SUCHENTRUNK *et al.*, 1999; GRATIVOL *et al.*, 2001; LU *et al.*, 2001; DALLAS *et al.* 2002; ÚJVÁRI *et al.*, 2002).

### **1.2.2 Análise de Estruturas Familiares e Parentesco**

Estudos das relações de parentesco, estruturas sociais e sistemas de acasalamento pela análise de marcadores moleculares, freqüentemente, geram informações preciosas sobre a biologia e história natural das espécies (AVISE, 1994).

Os estudos moleculares podem auxiliar no esclarecimento de vários aspectos da biologia reprodutiva das espécies, como a definição do sucesso reprodutivo em machos

e fêmeas e dos sistemas e estratégias de acasalamento (como exemplos CONRAD *et al.*, 2001; CONSTABLE *et al.* 2001; DAVIS *et al.*, 2001; GARNIER *et al.*, 2001).

A definição de estruturas sociais e familiares, bem como de padrões de migração sexo-específico e comportamento migratório, também pode ser realizada pela análise de marcadores moleculares. Estudos genéticos, por exemplo, permitiram verificar que várias espécies de cetáceos (BAKER & PALUMBI, 1996), tartarugas marinhas (BOWEN & AVISE, 1996) e inúmeras aves (HAIG & AVISE, 1996), de difícil acompanhamento na natureza, apresentam comportamento migratório com fidelidade à região natal – filopatria e, freqüentemente, se mantêm agrupadas em estruturas familiares muito fechadas com pouco intercâmbio entre grupos.

A definição exata destes aspectos biológicos, é de fundamental importância na elaboração de programas de manejo, principalmente reprodutivos, para as espécies tanto em cativeiro quanto em ambiente selvagem (AVISE, 1994).

### **1.2.3 Estrutura Populacional e Filogeografia**

O estudo das estruturas populacionais por marcadores moleculares, talvez seja a parte mais importante da Genética da Conservação.

As populações naturais geralmente não mantêm panmixia, ou seja, a probabilidade de reprodução entre dois indivíduos quaisquer não é sempre a mesma, dependendo de fatores biológicos e geográficos. Esta ausência de panmixia, freqüentemente, determina uma variabilidade genética não uniformemente distribuída ao longo de toda a área de uma espécie. Os fatores que limitam a panmixia incluem a pequena capacidade de deslocamento dos adultos, seleção de habitat com fidelidade natal – filopatria, cruzamento com escolha de parceiro, distância e barreiras geográficas (WRIGHT, 1978).

Um dos principais aspectos nos estudos de estruturas populacionais constitui a determinação dos níveis de fluxo gênico entre as populações, pois este é o maior componente da estrutura populacional, determinando a extensão a qual cada população local de uma espécie é uma unidade geneticamente diferenciada (SLATKIN, 1994).

Os padrões históricos da distribuição geográfica da diversidade genética, e dos princípios e processos governantes desta, são definidos através dos estudos filogeográficos. A filogeografia constitui uma disciplina interativa que une dados da genética molecular, genética de populações, demografia e geografia histórica, a fim de delimitar a história evolutiva das linhagens genealógicas, especialmente ao nível intra-específico (AVISE, 1998; BERMINGHAM & MORITZ, 1998; AVISE, 2000).

O acesso à distribuição geográfica da variabilidade genética dentro de cada espécie assume central importância em programas de manejo e conservação, pois permite a identificação de áreas geográficas com restrita troca de indivíduos que reflitam linhagens evolutivamente independentes, além da identificação de áreas prioritárias para o monitoramento, manejo e proteção (AVISE, 1994; MORITZ & FAITH, 1998; TAYLOR & DIZON, 1999).

A partir de estudos de filogeografia e estrutura populacional podemos identificar dentro de cada espécie dois tipos de linhagens evolutivas para fins de manejo: as Unidades Evolutivamente Significativas (UES) e as Unidades de Manejo (UM).

As UES consistem de populações substancialmente isoladas reprodutivamente de outros grupos co-específicos e representam, assim, um importante componente da herança evolutiva de uma espécie (MORITZ, 1994; EIZIRIK, 1996; KING & BURKE, 1999). As UES são caracterizadas por populações, dentro de uma espécie, formando agrupamentos monofiléticos recíprocos para seqüências de DNA mitocondrial (DNAm<sub>t</sub>) e/ou demonstrando divergências significativas nas frequências alélicas em locos

nucleares, em consequência a um isolamento demográfico histórico (MORITZ, 1994). No contexto da biologia da conservação, acredita-se que cada UES deva ser protegida e manejada de forma independente, na intenção de manter os processos evolutivos identificados para a espécie em questão (MORITZ, 1994; EIZIRIK 1996).

As UM representam um nível de unidade de conservação abaixo das UES, consistindo de populações regionais com restrita conexão demográfica entre si, reconhecidas por divergências significativas nas frequências alélicas, mitocondriais ou nucleares, não importando a diferenciação filogenética dos alelos. O foco das UM reside mais na estruturação contemporânea da população do que em fatores históricos (MORITZ, 1994).

A aplicação destes conceitos em programas de conservação de espécies é direcionada na intenção de se preservar os padrões históricos de diferenciação das populações que podem, por sua vez, representar padrões de adaptações ecológicas locais (DIMMICK *et al.*, 2001).

Vários tem sido os estudos realizados na busca da definição de estruturas populacionais, níveis de fluxo gênico e identificação de linhagens evolutivas com fins de auxiliar no manejo de espécies ameaçadas como, por exemplo, no peixe-boi marinho *Trichechus manatus* (GARCIA-RODRIGUEZ *et al.*, 1998), no lobo cinza *Canis lupus* (VILÀ *et al.*, 1999), na jaguatirica *Leopardus pardalis* e no gato-maracajá *Leopardus wiedii* (EIZIRIK *et al.*, 1998) e na onça pintada *Panthera onca* (EIZIRIK *et al.*, 2001).

#### **1.2.4 Filogenia**

Os dados moleculares combinados com descrições morfológicas provêm uma chave para a classificação biológica ou taxonômica. Para espécies ameaçadas, estes avanços são criticamente importantes, pois o reconhecimento das categorias

sistemáticas - subespécies, espécies, gêneros, família - suportam a base para a legislação de proteção (O'BRIEN, 1994). A incapacidade de distinguir claramente estas categorias retarda os esforços de preservação, dificultando a elaboração de leis eficazes para sua proteção (O'BRIEN & MAYR, 1991).

Os estudos filogenéticos, além de importantes para a identificação das categorias taxonômicas, podem ser utilizados na definição de hierarquias de prioridade para a conservação de espécies ameaçadas, que envolvem, normalmente a distinção taxonômica ou a profundidade da divergência filogenética. Espécies sem parentes próximos, por exemplo, com uma divergência extremamente antiga de grupos aparentados, têm maior prioridade na conservação do que espécies recentes e proximamente relacionadas a outros táxons (O'BRIEN & MAYR, 1991).

A diversidade filogenética também pode ser utilizada como auxiliar na identificação de áreas prioritárias para a conservação da biodiversidade, que envolve muitas vezes, o máximo de informação taxonômica possível, como riqueza e padrões de distribuição de táxons, grau de endemismos e complementariedade taxonômica entre áreas (POSADAS *et al.*, 2001; RODRIGUES & GASTON, 2002).

Além de todas estas contribuições à Genética da Conservação, a análise filogenética pode revelar eventos de hibridação e introgressão entre espécies selvagens, como no caso do lobo cinza *Canis lupus* e do coiote *Canis latrans* (WAYNE, 1996) e entre espécies exóticas com selvagens, como lobos cinzas com cães domésticos (RANDI & LUCCHINI, 2002) ou gatos selvagens com gatos domésticos (BEAUMONT *et al.*, 2000).

### **1.3 Marcadores Moleculares**

Os dados básicos para os estudos em Genética da Conservação constituem, geralmente, os chamados marcadores moleculares. É através destes marcadores que podemos avaliar a variabilidade genética existente nas populações e espécies.

A genética molecular tem proporcionado numerosas técnicas de acesso à variabilidade dentro e entre populações, tanto através de polimorfismos de proteínas quanto de DNA (AVISE, 1994).

Os polimorfismos de DNA têm sido analisados principalmente através de genes do DNAm e Microssatélites. O DNAm constitui um sistema matrilinear na maioria das espécies, sem recombinação intermolecular, apresentando altas taxas evolutivas, e por isso tem sido muito utilizado em estudos de diversidade genética e padrões filogeográficos (AVISE, 1998). No entanto, devido a sua herança uniparental, este marcador tende a não revelar os padrões genealógicos representativos da população como um todo (HARE, 2001).

#### **1.3.1 Microssatélites**

Dentre os marcadores moleculares mais utilizados ultimamente em estudos de diversidade genética e estrutura populacional, encontram-se os Microssatélites que estão incluídos dentro das seqüências de DNA nuclear denominadas de SSRs “Simple Sequence Repeats”, (KASHI *et al.*, 1997) ou VNTRs “Variable Number of Tandem Repeats” (MURRAY, 1996). Estas seqüências consistem de segmentos de DNA com um número variável de unidades repetitivas organizadas lado a lado, e se dividem em duas categorias de acordo com o tamanho destas unidades: (1) Minissatélites, apresentando



repetições de 15-70 pares de base e (2) Microssatélites, com repetições que variam de 1 a 6 pares de base (MURRAY, 1996).

Os microssatélites apresentam-se como locos altamente polimórficos, com alelos codominantes, encontrando-se amplamente dispersos em genomas eucarióticos e podendo ocorrer também em genomas procarióticos sob baixas frequências (SCHLOTTERER, 1998). As mutações que ocorrem nestes marcadores são, principalmente, mudanças no número de repetições, causadas por erros de pareamento devido ao deslizamento das fitas no momento da replicação. Estes erros são responsáveis pela adição ou deleção de repetições que conferem o caráter altamente polimórfico destes locos (SCHLOTTERER, 1998).

Além do alto nível de polimorfismo e alta taxa de mutação, estes locos geralmente apresentam-se seletivamente neutros, sendo assim compatíveis com vários dos pressupostos usualmente utilizados em genética de populações (MURRAY, 1996). Por apresentarem alelos menores do que 1Kb, permitem a utilização de DNA altamente fragmentado ou em pequenas quantidades, inclusive obtido a partir de amostras antigas (BRUFORD & WAYNE, 1993).

As características apresentadas por estes locos permitem sua utilização em uma ampla variedade de estudos, como na identificação de indivíduos ou espécies (ERNEST, *et al.*, 2000), na comparação da variabilidade genética entre espécies e populações (MENOTTI-RAYMOND & O'BRIEN, 1995; JOHNSON *et al.*, 1999), no grau de estrutura das populações e migração (CIOFI & BRUFORD, 1999; WAITS *et al.*, 2000) e na determinação de parentesco e estruturas sociais (MORIN *et al.*, 1994; NESJE *et al.*, 2000).

## **1.4 A Ordem Carnivora**

A ordem Carnivora inclui táxons extremamente heterogêneos que variam consideravelmente em tamanho, dieta e especializações locomotoras. Tal amplo alcance de adaptações tem levado a vários exemplos de paralelismo e convergência na evolução de características morfológicas, os quais têm dificultado os esforços dos taxonomistas em relacionar certos grupos (WAYNE *et al.*, 1989). Uma das classificações mais aceita divide os carnívoros em duas grandes superfamílias: os Arctoidea ou Canoidea com as famílias Canidae, Ursidae, Procyonidae, Mustelidae, Phocidae, Odobenidae e Otariidae, e os Aeluroidea ou Feloidea com as famílias Viverridae, Herpestidae, Hyaenidae e Felidae (WOZENCRAFT, 1993).

Uma das principais características de seus integrantes refere-se à adaptação morfológica dos dentes ao hábito carnívoro: os dentes caninos são fortes, encurvados e bastante desenvolvidos e os pré-molares e molares são usualmente adaptados para cortar, sendo o último pré-molar superior e o primeiro molar inferior denominados carniceiros (NOWAK, 1999).

Os Carnívoros apresentam um papel importante na estrutura de comunidades, controlando a abundância relativa de suas presas, sendo que a remoção de um carnívoro topo pode provocar um desequilíbrio ecológico dentro de uma guilda ou ecossistema (EISENBERG, 1989).

## **1.5 Família Felidae**

Os felídeos são exímios predadores, apresentando várias especializações em sua forma, estrutura e comportamento que refletem seu hábito estritamente carnívoro (KITCHENER, 1991). Dentro da Ordem Carnivora representam o maior desenvolvimento dos carniceiros, assim como a maior redução dentária (NOWAK, 1999) em reflexo a uma

dieta constituída quase exclusivamente de carne (EISENBERG & REDFORD, 1999). Os sentidos são aguçados para detectar a presa, com um grande desenvolvimento do olfato, da audição e de olhos especializados para visão binocular (KITCHENER, 1991). Com exceção do guepardo *Acinonyx jubatus* que é um caçador corredor por curtas distâncias, os felídeos são especializados em camuflagem e um rápido avanço sobre a presa (EISENBERG, 1989). Apresentam garras retratéis que ficam protegidas do desgaste, sendo mantidas sempre afiadas para o momento da captura (KITCHENER, 1991; NOWAK, 1999).

A maioria de seus integrantes é noturna, mas com alguns ativos principalmente durante o dia (OLIVEIRA, 1994; NOWAK, 1999). Com exceção dos leões e guepardos, todas as demais espécies de felídeos, para as quais há dados disponíveis, são solitárias (SANDELL, 1989). A mais comum unidade social é formada pela mãe e sua prole semi-dependente (KITCHENER, 1991; EISENBERG & REDFORD, 1999).

Mesmo sendo solitários os felídeos apresentam-se políginos ou até promíscuos (KITCHENER, 1991). A poliginia é mantida indiretamente pela defesa de uma área exclusiva, pelo macho, que geralmente compreende a área de duas ou mais fêmeas (KITCHENER, 1991; OLIVEIRA, 1994).

Toda a evolução dos felídeos verdadeiros e de seus ancestrais foi marcada por uma grande quantidade de extinções e eventos de convergência e paralelismo que levavam a novas formas extremamente semelhantes às já extintas (MARTIN, 1989). As primeiras formas semelhantes aos felídeos eram gatos-dente-de-sabre, incluídos na família Nimravidia, surgidos há cerca de 35 milhões de anos (KITCHENER, 1991), que já apresentavam a maioria das adaptações básicas encontradas nos felídeos atuais, como garras retratéis, dentes carniceiros, e caninos bem desenvolvidos (MARTIN, 1989). Os

primeiros gatos verdadeiros apareceram no Oligoceno na América do Norte, Eurásia e mais tarde na África (MARTIN, 1989; EISENBERG & REDFORD, 1999).

A Família Felidae encontra-se distribuída por todo o planeta, à exceção dos pólos, Austrália, Nova Zelândia, Madagascar e certas ilhas da Australásia e do Caribe (NOWAK, 1999). WOZENCRAFT (1993), reconhece três sub-famílias, 18 gêneros e 36 espécies dentro da família. No entanto, há uma grande diversidade de opiniões de como os gatos devam ser classificados, principalmente, ao nível de subfamílias e gêneros (ver NOWAK, 1999).

Os felídeos têm sido parte do ambiente, cultura e mitologia humana há milhões de anos (NOWELL & JACKSON, 1996). No entanto, esta família vem sofrendo inúmeras ameaças à sua sobrevivência, o que tornou muitas de suas espécies e subespécies raras ou ameaçadas em pelo menos parte de suas distribuições. O principal fator afetando o “status” da vida selvagem hoje, incluindo a maioria das espécies de felídeos, constitui a alteração e fragmentação de seus habitats naturais devido à atividade humana (JACKSON, 1992; NOWELL & JACKSON, 1996). Além da destruição de habitats, os felídeos vêm sofrendo sérias ameaças devido ao comércio ilegal de peles, à caça esportiva, à perseguição direta devido a conflitos com produtores rurais, e até mesmo à caça para obtenção de partes de seus corpos com supostos fins medicinais (NOWELL & JACKSON, 1996; NOWAK, 1999).

Juntamente com todos estes fatores, há ainda, um conhecimento muito limitado sobre a distribuição, biologia e comportamento de quase todas as espécies de felídeos, dificultando o planejamento e implementação de medidas efetivas de conservação (NOWELL & JACKSON, 1996).

## 1.6 Os Felídeos Neotropicais

Dentro da região zoogeográfica Neotropical, que se estende desde o sul da América do Norte até o extremo sul da América do Sul (EMMONS & FEER, 1997), podemos encontrar, atualmente, dez espécies de felídeos: a onça *Panthera onca*, o puma *Puma concolor*, o jaguarundi *Herpailurus yagouaroundi*, a jaguatirica *Leopardus pardalis*, o gato-maracajá *Leopardus wiedii*, o gato-do-mato-pequeno *Leopardus tigrinus*, o gato-do-mato-grande *Oncifelis geoffroyi*, o güiña *Oncifelis guigna*, o gato-palheiro *Lynchailurus colocolo* e o gato-andino *Oreailurus jacobita*.

Apenas o güiña e o gato-andino não ocorrem em território brasileiro, sendo espécies raras e de distribuição restrita, sendo a primeira encontrada nas partes sul e central do Chile e a segunda nas regiões dos Andes no sul do Peru, no centro e oeste da Bolívia, noroeste da Argentina e nordeste do Chile (OLIVEIRA, 1994).

A onça é o maior felídeo das Américas e o único representante atual do gênero *Panthera* no Novo Mundo (NOWELL & JACKSON, 1996). A distribuição geográfica da espécie é extremamente similar a da jaguatirica, maracajá, gato-do-mato-pequeno e jaguarundi, compreendendo desde as planícies costeiras do México até o norte da Argentina. As cinco espécies mencionadas, parecem ter fortes preferências por áreas florestadas a áreas de vegetações mais abertas (OLIVEIRA, 1994; NOWELL & JACKSON, 1996; EISENBERG & REDFORD, 1999).

O puma constitui a segunda maior espécie de felídeo do Brasil (OLIVEIRA & CASSARO, 1999). A espécie possui a maior distribuição latitudinal dentre todas as espécies de felídeos selvagens, sendo encontrada em todos os tipos de habitats do Canadá até a Patagônia (KITCHENER, 1991).

O gato-palheiro e o gato-do-mato-grande são espécies de pequeno porte que ocorrem nas regiões mais ao sul da América do Sul e parecem ser características de

regiões mais abertas de campos, savanas e florestas secas. O gato-palheiro encontra-se desde o sul da Patagônia, através da Argentina, Uruguai, Paraguai, sul e oeste da Bolívia, Peru, Equador e sul, sudoeste e centro do Brasil. Já o gato-do-mato-grande ocorre desde a Bolívia, Argentina, Paraguai, Uruguai e sul do Brasil (KITCHENER, 1991; NOWELL & JACKSON, 1996; EISENBERG & REDFORD, 1999).

### **1.7 O gato-do-mato-pequeno**

O gato-do-mato-pequeno *Leopardus tigrinus* é a menor espécie de felídeo do Brasil, tendo porte e proporções corporais semelhantes às do gato doméstico, com comprimento médio total de 75,5 cm e peso variando de 1,75 a 3,5 kg (OLIVEIRA & CASSARO, 1999). A coloração da pelagem é castanho-amarelada com manchas amplas e escuras formando rosetas, podendo ocorrer indivíduos melânicos (EISENBERG & REDFORD, 1999) (Figura 1).

Acredita-se que a espécie ocupe predominantemente áreas de floresta úmida tropical e sub-tropical (NOWAK, 1999), no entanto, existem registros nos mais variados ambientes, incluindo florestas subtropicais e decíduas, cerrados, florestas secundárias, plantações abandonadas de eucaliptos, áreas próximas a plantações e altamente afetadas por desmatamentos (OLIVEIRA, 1994; NOWELL & JACKSON, 1996; OLIVEIRA & CASSARO, 1999).

A espécie distribui-se por uma área bastante extensa, ocorrendo desde a Costa Rica até o sul do Brasil e nordeste da Argentina (OLIVEIRA, 1994; NOWELL & JACKSON, 1996; EISENBERG & REDFORD, 1999) (Figura 2). No entanto, esta distribuição, não está completamente definida e parece não ser contínua, principalmente pela falta de evidências da sua ocorrência na região da Bacia Amazônica (NOWELL & JACKSON, 1996).

Nas décadas de 1970 e 1980, o gato-do-mato-pequeno foi extremamente perseguido para o comércio internacional de peles. Juntamente com o gato-do-mato-grande, esta espécie alcançou a posição de liderança entre os felídeos neotropicais capturados para este comércio (OLIVEIRA, 1994). Atualmente, a espécie encontra-se bastante ameaçada devido principalmente à destruição de seus habitats, sendo considerada “vulnerável” pela IUCN “União Internacional de Conservação da Natureza” e constando do Apêndice I - espécies ameaçadas -, da CITES “Convenção sobre o Comércio Internacional das Espécies Ameaçadas da Fauna e Flora Selvagem” (WOZENCRAFT, 1993). Além destes fatores, o gato-mato-pequeno, é, hoje, uma das espécies de felídeos neotropicais mais desconhecidas, pouco se sabendo sobre seus hábitos na natureza, densidade, relações com outras espécies e requerimento de habitats (NOWELL & JACKSON, 1996).

Devido a estes fatores, a compreensão de sua variabilidade e estrutura genética na natureza é fundamental para se auxiliar na definição de áreas prioritárias e estratégias adequadas para sua conservação em vida selvagem, e também para embasar a seleção de indivíduos em projetos de reprodução em cativeiro.



Figura 1 – *Leopardus tigrinus* (Schereber, 1775). Foto: Tadeu G. de Oliveira. Fonte: OLIVEIRA & CASSARO (1999).

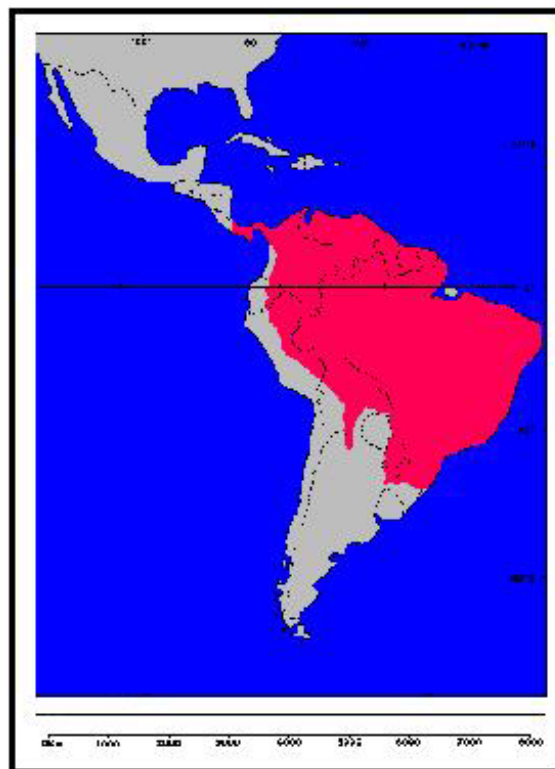


Figura 2 - Distribuição geográfica de *Leopardus tigrinus*. A área vermelha representa a distribuição da espécie. Modificado a partir de OLIVEIRA (1994) e EISENBERG & REDFORD (1999) .



## 1.8 Estudos Moleculares em Felídeos

### 1.8.1 Padrões Filogenéticos entre os Felídeos da Região Neotropical

A definição das relações evolutivas entre as espécies é um componente integral dos programas de conservação da Família Felidae (O'BRIEN, 1994).

A classificação sistemática e evolutiva dos felídeos a partir de critérios morfológicos e comportamentais produz classificações amplamente diferenciadas, visto que grande parte destes critérios estão relacionados a função de captura de presas resultando em uma grande similaridade entre todos os gatos (KITCHENER, 1991). No entanto, o desenvolvimento de técnicas moleculares e celulares tem contribuído muito para o esclarecimento de suas relações filogenéticas.

Estudos moleculares recentes usando citogenética (WURSTER-HILL & CENTERWALL, 1982), distâncias imunológicas (COLLIER E O'BRIEN, 1985), hibridização DNA-DNA (WAYNE *et al.*, 1989), aloenzimas (PECON-SLATERRY *et al.*, 1994), DNAmRFLPs (JOHNSON *et al.*, 1996) e seqüenciamento de genes mitocondriais (MASUDA *et al.*, 1996), indicaram a existência de pelo menos três linhagens maiores dentro da família Felidae. Estas linhagens seriam formadas por: 1) Linhagem da jaguatirica, incluindo os pequenos felídeos da Região Neotropical; 2) Linhagem do gato doméstico, com os pequenos felídeos da Região Mediterrânea e 3) Linhagem dos panteríneos, consistindo de um grupo heterogêneo de felídeos de médio e grande porte, incluindo o gênero *Panthera*. Posteriormente, a linhagem dos panteríneos foi subdividida em seis linhagens diferentes (JOHNSON & O'BRIEN, 1997; PECON-SLATERRY & O'BRIEN, 1998; MATTERN & MCLENNAN, 2000).

A linhagem da jaguatirica compreende sete das dez espécies de felídeos da Região Neotropical: *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii*, *Leopardus tigrinus*,

*Lynchailurus colocolo*, *Oncifelis geoffroyi*, *Oncifelis guigna* e *Oreailurus jacobita*. As relações filogenéticas entre os integrantes desta linhagem apoiam o agrupamento de *L. pardalis*-*L. wiedii*-*O. jacobita* e *O. guigna*-*O. geoffroyi* (MASUDA *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1998, 1999). As evidências moleculares mais recentes (JOHNSON *et al.* 1998, 1999) apoiam o posicionamento filogenético de *L. tigrinus* como espécie-irmã do par *guigna-geoffroyi*. Algumas análises posicionaram *L. tigrinus* como espécie-irmã de *O. colocolo*, mas mesmo estas indicaram que este par estaria mais proximamente relacionado ao sub-grupo *guigna-geoffroyi* do que ao *pardalis-wiedii-jacobita* (MATTERN & MCLENNAN, 2000).

O mais recente ancestral comum entre os pequenos felídeos da América do Sul, segundo dados moleculares, deve ter ocorrido a 5,10 milhões de anos (JOHNSON & O'BRIEN, 1997), seguido de diferenciação há 2-5 milhões de anos (JOHNSON *et al.*, 1996). As evidências biogeográficas são condizentes às relações moleculares observadas entre os integrantes desta linhagem, sendo os períodos de diferenciação das espécies segundo datações moleculares coincidentes com a formação do Istmo do Panamá há 3-5 milhões de anos, o qual permitiu a troca de faunas entre as Américas do Sul e do Norte até então isoladas (MARTIN, 1989). Provavelmente, um ancestral dos pequenos felídeos sul-americanos tenha migrado da América do Norte durante e após a formação do Istmo para a América do Sul, dando origem às espécies atuais (JOHNSON *et al.*, 1996; JOHNSON & O'BRIEN, 1997).

Estudos citogenéticos comparativos oferecem, também, fortes evidências para o agrupamento desta linhagem, tendo seus integrantes um número diplóide de 36 cromossomos em contraste com todos os outros felídeos, com um número diplóide de 38 (WURSTER-HILL & CENTERWALL, 1982).

As outras três espécies restantes da Região Neotropical estão incluídas em dois grupos monofiléticos distintos.

A onça encontra-se dentro da linhagem *Panthera* que é composta pelas cinco espécies do gênero *Panthera* (*P. leo*, *P. pardus*, *P. tigris*, *P. onca* e *P. uncia*) e pelo leopardo nebuloso *Neofelis nebulosa*. O grupo, segundo estimativas baseadas em seqüências de genes mitocondriais (JOHNSON & O'BRIEN, 1997), compartilha um ancestral comum que divergiu dos outros felídeos modernos há 6,0 milhões de anos. A primeira espécie a divergir parece ter sido o leopardo nebuloso seguido do leopardo da neve *P. uncia*, no entanto a resolução das outras quatro espécies do gênero *Panthera* permanece mal-resolvida, provavelmente devido a uma recente divergência a 2-3 milhões de anos (JOHNSON & O'BRIEN, 1997; KIM *et al.*, 2001).

O puma *Puma concolor* e o jaguarundi *Herpailurus yaguaroundi* encontram-se dentro do mesmo grupo monofilético, juntamente com o guepardo *Acinonyx jubatus*, tendo este se diferenciado dos outros felídeos modernos há cerca de 8,2 milhões de anos (JOHNSON *et al.*, 1997). Análises recentes baseadas exclusiva ou parcialmente em dados moleculares indicam que o puma e o jaguarundi são espécies-irmãs, sendo o guepardo a divergência mais basal neste grupo (JOHNSON & O'BRIEN 1997; MATTERN & MCLENNAN, 2000).

Várias relações entre os integrantes da família Felidae ainda permanecem não resolvidas, como as relações hierárquicas entre os oito grupos atualmente definidos. As relações filogenéticas em Felidae são difíceis de se esclarecer devido a um grande número de autapomorfias e simplesiomorfias, padrão típico de grupos que sofreram uma diversificação relativamente rápida e recente em sua história evolutiva (MATTERN & MCLENNAN, 2000).

### 1.8.2 Variabilidade e Estrutura Genética em Felídeos Neotropicais

Vários estudos moleculares têm sido realizados com o intuito de analisar os níveis de variabilidade genética e padrões filogeográficos nas espécies de felídeos neotropicais. Com, exceção do jaguarundi *H. yagouaroundi*, todas as outras nove espécies apresentam estudos neste sentido.

EIZIRIK *et al.* (1998), através do sequenciamento da região controladora do DNAm<sub>t</sub>, analisou os níveis de variabilidade genética e padrões filogeográficos de *L. pardalis* e *L. wiedii* ao longo de suas distribuições geográficas. Ambas as espécies apresentaram altos níveis de diversidade genética e evidentes partições geográficas semelhantes. As subdivisões geográficas encontradas para as duas espécies foram basicamente concordantes, com o reconhecimento de três grupos maiores: América Central, Norte da América do Sul e Sul da América do Sul, sendo os dois últimos provavelmente isolados pelo Rio Amazonas. Foram, também, identificadas diferenciações mais discretas dentro de alguns dos grandes grupos para cada uma das espécies, provavelmente refletindo padrões históricos de isolamento pela distância.

Os três grupos maiores para cada espécie puderam claramente ser considerados como Unidades Evolutivamente Significativas, devendo ser conservados e manejados como entidades distintas. As subdivisões menores dentro das duas espécies foram indicadas pelo menos como Unidades de Manejo, pois o grau de diferenciação do DNAm<sub>t</sub> indicou uma baixa conexão demográfica entre estas regiões.

JOHNSON *et al.* (1999), pesquisaram quatro espécies de pequenos felídeos neotropicais da linhagem da jaguatirica: *O. guigna*, *O. geoffroyi*, *L. tigrinus* e *L. colocolo*. A análise baseada no sequenciamento de genes mitocondriais nas quatro espécies, e 20 locos de microssatélite nas duas primeiras, revelou níveis consideráveis de variabilidade genética e padrões de estruturação diferenciados entre elas.

*O. guigna* e *O. geoffroyi* não demonstraram padrões geográficos discerníveis ao longo de sua distribuição. Em contraste, *L. tigrinus* e *L. colocolo* revelaram grupos intraespecíficos bem definidos.

A ausência de um padrão filogeográfico em *O. geoffroyi*, constitui um indicativo de que a espécie, provavelmente, mantém uma grande população panmítica sem barreiras significativas ao fluxo gênico. No entanto, a ausência de uma estruturação populacional definida em *O. guigna*, pode ter sido tanto um artefato do pequeno tamanho populacional analisado (n=6), quanto refletir os padrões de uma espécie de pequena distribuição geográfica sem barreiras efetivas ao fluxo gênico.

Em *L. tigrinus* foi identificada a existência de dois grupos filogeográficos extremamente distintos, correspondendo a duas das quatro subespécies atualmente reconhecidas, *L. t. oncilla*, da Costa Rica e *L. t. guttula*, do Brasil, que teriam sido isoladas provavelmente pela bacia do rio Amazonas há cerca de 3,7 milhões de anos. A divergência genética encontrada entre estes dois grupos dentro de *L. tigrinus* foi comparável a valores interespecíficos encontrados na linhagem da jaguatirica, sendo sugerido por estes autores como um exemplo de espécies crípticas.

*L. colocolo* demonstrou níveis de variabilidade relativamente altos e uma grande quantidade de subdivisão geográfica com a existência de pelo menos três grupos distintos: Argentina Central/Chile Central, Norte do Chile e Bolívia/Brasil/Uruguai, sugerindo a hipótese de que historicamente, as bacias do Paraguai e Rio da Prata formaram barreiras significantes ao fluxo gênico na espécie.

JOHNSON *et al.* (1998), através do sequenciamento de segmentos de genes mitocondriais, em exemplares do raro gato-andino *O. jacobita*, verificaram níveis moderados de variabilidade genética e nenhuma estruturação populacional. No entanto, o pequeno tamanho amostral (n=9), pode ter influenciado os resultados, sendo

necessárias informações mais detalhadas para refinar o conhecimento dos padrões genéticos nesta espécie.

CULVER, *et al.* (2000) analisaram a variabilidade e estrutura genética das populações de *Puma concolor* pela análise de seqüências do DNAMt e 10 locos de microssatélite. Apesar de apresentar níveis relativamente altos de diversidade genética, especialmente em locos de microssatélite, esta espécie exibiu uma pequena estruturação geográfica. Um nível moderado de diferenciação genética foi observado a nível macrogeográfico, sendo semelhante ao padrão observado em *L. pardalis* e *L. wieddi*, porém sem monofilia recíproca dos grupos regionais. Estes resultados sugerem uma origem sul-americana relativamente recente para as populações atuais desta espécie.

EIZIRIK *et al.* (2001), investigaram a diversidade genética, estrutura populacional e história demográfica em *Panthera onca* ao longo de sua distribuição geográfica, pela análise da região controladora do DNAMt e 29 locos de microssatélite. Os níveis de diversidade genética encontrados foram baixos a moderados para os dados de DNAMt e altos para os de microssatélites.

Não foram encontrados fortes suportes para a definição de estruturas geográficas maiores, todavia os dados permitiram o reconhecimento de até quatro partições filogeográficas incompletamente isoladas, extremamente similares às encontradas no puma, jaguatirica e maracajá. As implicações para o manejo e conservação da espécie incluíram a não-definição de sub-grupos diferenciados constituindo Unidades Evolutivamente Significativas, e a indicação de alternativas de manejo, possivelmente incluindo intervenção ativa para mediar o fluxo gênico entre as populações remanescentes e, atualmente, isoladas de *P. onca*.

Apesar da realização de todos estes estudos sobre os padrões filogeográficos nas espécies de felídeos neotropicais, permitindo a definição de suas estruturas genéticas em

uma escala global, estes não foram capazes de definir estruturas genéticas em um padrão local ou regional, principalmente por apresentarem, em sua grande maioria, um pequeno tamanho amostral. Para a análise de tais padrões, é necessária uma amostragem maior e mais concentrada em determinadas regiões, permitindo uma análise mais minuciosa sobre suas relações populacionais e geográficas.

## 2. OBJETIVOS

Este trabalho tem por objetivos:

1. Investigar a diversidade genética existente em oito locos de microssatélite em populações do gato-do-mato-pequeno *Leopardus tigrinus* amostradas nas regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil e em indivíduos do gato-do-mato-grande *Oncifelis geoffroyi*, a fim de se avaliar os níveis de variabilidade intra e inter-específicos;
2. Utilizar as informações obtidas para analisar a distribuição geográfica da variabilidade genética ao longo da área que compreende o limite sul da distribuição de *Leopardus tigrinus* no Brasil, analisando processos de fluxo gênico, estrutura populacional e existência de Unidades Evolutivamente Significativas e/ou Unidades de Manejo nesta espécie;
3. Relacionar os resultados obtidos com informações disponíveis sobre a biologia desta espécie, a fim de contribuir para a elaboração de estratégias adequadas para sua conservação e manejo em campo e cativeiro.



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de Amostras

A amostra total utilizada neste trabalho, consistiu de 54 indivíduos de *Leopardus tigrinus* provenientes das regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste do Brasil, e 20 indivíduos de *Oncifelis geoffroyi* a serem utilizados para comparação dos níveis de variabilidade interespecíficos e como grupo externo nas análises populacionais de *L. tigrinus*.

As amostras de *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi* utilizadas neste estudo foram obtidas da seguinte maneira:

##### Amostras de tecido sangüíneo

- ➔ Indivíduos mantidos em cativeiro com procedência geográfica conhecida;
- ➔ Indivíduos capturados em campo por projetos de Ecologia realizados pela Associação Pró-Carnívoros;
- ➔ Indivíduos capturados por fazendeiros do interior do Estado do Rio Grande do Sul e posteriormente liberados em seu habitat.

##### Amostras de tecido muscular

- ➔ Animais encontrados mortos em estradas, vítimas de atropelamento;
- ➔ Animais abatidos por caçadores e apreendidos pelas organizações competentes.

Um total de nove estados do Brasil foi amostrado para *L. tigrinus*: Rio Grande do Sul (n=16), Santa Catarina (n=1), Paraná (n=7), São Paulo (n=23), Rio de Janeiro (n=1), Espírito Santo (n=1), Mato Grosso (n=1), Mato Grosso do Sul (n=2) e Goiás (n=2) (Tabela 1). As amostras de *O. geoffroyi* foram coletadas em sua maioria no Estado do Rio Grande do Sul (n=18), sendo as duas amostras restantes provenientes do

Uruguai e Argentina (Tabela 2). Das 54 amostras de *L. tigrinus* coletadas, 46 apresentam procedência ao nível de Município, totalizando 34 municípios amostrados ao longo de toda a área estudada (Figura 3). Apenas oito amostras apresentaram procedência somente ao nível de Estado, devido a falta de registros precisos obtidos pelos zoológicos no momento de entrada dos animais. Todas as amostras de *O. geoffroyi*, com exceção dos indivíduos provenientes do Uruguai e Argentina, apresentam procedência ao nível de município (Tabela 2).

As amostras de sangue foram preservadas com anticoagulantes K<sub>3</sub> EDTA ou Citrato de Sódio e acondicionadas a temperatura de 4°C. As amostras de tecido muscular foram preservadas em álcool 70% a temperatura ambiente.

A maioria das amostras de sangue de animais mantidos em cativeiro foram obtidas através da colaboração com o “Plano de Manejo de Felinos Brasileiros” desenvolvido pela Associação Mata Ciliar – São Paulo.

Tabela 1 – Caracterização da amostra de *Leopardus tigrinus* utilizada no presente estudo. AMC = Amostras coletadas pela Associação Mata Ciliar – Plano de Manejo de Felinos Brasileiros.

Código	Tecido	Procedência		Instituição
		Estado	Município	
Lti01	Músculo	RS	Triunfo	Animal atropelado
Lti04	Sangue	RS	---	Zoo Sapucaia do Sul - RS
Lti05	Sangue	RS	---	Zoo Sapucaia do Sul - RS
Lti09	Músculo	RS	Cachoeira do Sul	Zoo Sapucaia do Sul - RS
Lti10	Sangue	RS	Guaporé	Zoo Sapucaia do Sul - RS
Lti24	Sangue	GO	---	Zoo Goiânia - GO
Lti43	Sangue	PR	Curitiba	Zoo Curitiba - PR
Lti44	Sangue	SC	Curitibanos	Zoo Curitiba - PR
Lti46	Sangue	RS	Garibaldi	Zoo Particular M. Forestier - RS
Lti47	Sangue	RS	Garibaldi	Zoo Particular M. Forestier - RS
Lti48	Sangue	RS	Estrela	Zoo Sapucaia do Sul - RS
Lti49	Músculo	RS	Guaíba	Animal atropelado
Lti50	Músculo	RS	Palmeira das Missões	Animal atropelado
Lti53	Sangue	RJ	Valença	Zoo Rio de Janeiro – RJ/AMC
Lti54	Sangue	SP	Mogi Guaçu	Zoo Mogi Guaçu – SP/AMC
Lti55	Sangue	SP	Limeira	Zoo Limeira – SP/AMC
Lti56	Sangue	SP	Piracicaba	Zoo Piracicaba – SP/AMC
Lti57	Sangue	SP	Piracicaba	Zoo Piracicaba – SP/AMC
Lti58	Sangue	SP	Americana	Zoo São B. do Campo – SP/AMC
Lti59	Sangue	SP	Mogi Guaçu	Zoo São B. do Campo – SP/AMC
Lti60	Sangue	SP	Rafard	Zoo Campinas – SP/AMC
Lti61	Sangue	SP	São Carlos	Zoo Campinas – SP/AMC
Lti62	Sangue	SP	Campinas	Zoo Campinas – SP/AMC
Lti64	Sangue	SP	---	Zoo São J. Rio Pardo– SP/AMC
Lti65	Sangue	SP	---	Zoo São J. Rio Pardo – SP/AMC
Lti66	Sangue	SP	Sorocaba	Zoo São J. Rio Pardo – SP/AMC
Lti68	Músculo	RS	Montenegro	Animal atropelado
Lti69	Músculo	RS	Santa Cruz do Sul	Animal atropelado
Lti70	Sangue	SP	Sorocaba	Zoo Sorocaba – SP/AMC
Lti71	Sangue	SP	Sorocaba	Zoo Sorocaba – SP/AMC
Lti72	Sangue	MS	Miranda	Zoo Catanduva – SP/AMC
Lti73	Sangue	SP	Campinas	Zoo São J. Rio Preto – SP/AMC
Lti74	Sangue	SP	São José do Rio Preto	Zoo São J. Rio Preto – SP/AMC
Lti75	Sangue	SP	Bauru	Zoo Bauru – SP/AMC
Lti76	Sangue	SP	Pedreira	Zoo Pedreira – SP/AMC
Lti77	Sangue	SP	Pedreira	Zoo Pedreira – SP/AMC
Lti78	Sangue	SP	Leme	Zoo Leme – SP/AMC
Lti79	Músculo	RS	Guaíba	Animal atropelado
Lti80	Músculo	RS	Santo A. da Patrulha	Animal atropelado

Lti81	Sangue	MS	Anaurilândia	Capturado em campo/PróCarnívoros
Lti84	Sangue	SP	---	Zoo Jundiá – SP / AMC
Lti85	Sangue	GO	---	Zoo Goiânia – GO / AMC

Tabela 1. Continuação

Código	Tecido	Procedência		Instituição
		Estado	Município	
Lti86	Sangue	SP	Moji Mirim	Zoo Jundiá – SP / AMC
Lti87	Sangue	SP	Moji Mirim	Zoo Jundiá – SP / AMC
Lti88	Sangue	PR	---	Zoo Maringá – PR/AMC
Lti89	Sangue	PR	Pato Branco	Zoo Cascavel – PR/AMC
Lti90	Sangue	PR	Nova Aurora	Zoo Cascavel – PR/AMC
Lti91	Sangue	PR	Curitiba	Zoo Curitiba – PR/AMC
Lti92	Sangue	PR	Curitiba	Zoo Curitiba – PR/AMC
Lti93	Sangue	PR	Curitiba	Zoo Curitiba – PR/AMC
Lti94	Músculo	RS	Ibarama	Animal abatido por caçadores
Lti96	Músculo	MT	Águas Boas	Animal atropelado
Lti97	Músculo	ES	Dom Martins	Animal atropelado
Lti98	Músculo	RS	Restinga Seca	Animal atropelado

Tabela 2 – Caracterização da amostra de *Oncifelis geoffroyi* utilizada no presente estudo.

Código	Tecido	Procedência		Instituição
		Estado/País	Município	
Oge01	Sangue	RS	Santa Cruz do Sul	Zoo Sapucaia do Sul - RS
Oge02	Sangue	RS	Cachoeira do Sul	Zoo Cachoeira do Sul - RS
Oge03	Sangue	RS	Cachoeira do Sul	Zoo Cachoeira do Sul - RS
Oge04	Sangue	RS	Cachoeira do Sul	Zoo Cachoeira do Sul - RS
Oge05	Sangue	RS	Cachoeira do Sul	Zoo Cachoeira do Sul - RS
Oge07	Sangue	RS	Cachoeira do Sul	Zoo Cachoeira do Sul - RS
Oge08	Músculo	RS	Cachoeira do Sul	Animal atropelado
Oge09	Sangue	Argentina	---	Zoo Cordoba - ARG
Oge10	Músculo	RS	Cachoeira do Sul	Animal atropelado
Oge11	Músculo	RS	Cachoeira do Sul	Animal atropelado
Oge12	Músculo	RS	Cachoeira do Sul	Animal atropelado
Oge13	Músculo	RS	Eldorado do Sul	Animal atropelado
Oge20	Músculo	Uruguai	---	Museo de C. Naturales - URU
Oge28	Músculo	RS	Arambaré	Animal atropelado
Oge29	Sangue	RS	Quaraí	Capturado por fazendeiros
Oge32	Sangue	RS	Pantano Grande	Capturado por fazendeiros
Oge33	Músculo	RS	Alegrete	Animal atropelado
Oge36	Músculo	RS	Taim	Animal atropelado
Oge37	Sangue	RS	São Lourenço	Zoo Sapucaia do Sul - RS
Oge38	Músculo	RS	Santa Maria	Animal atropelado

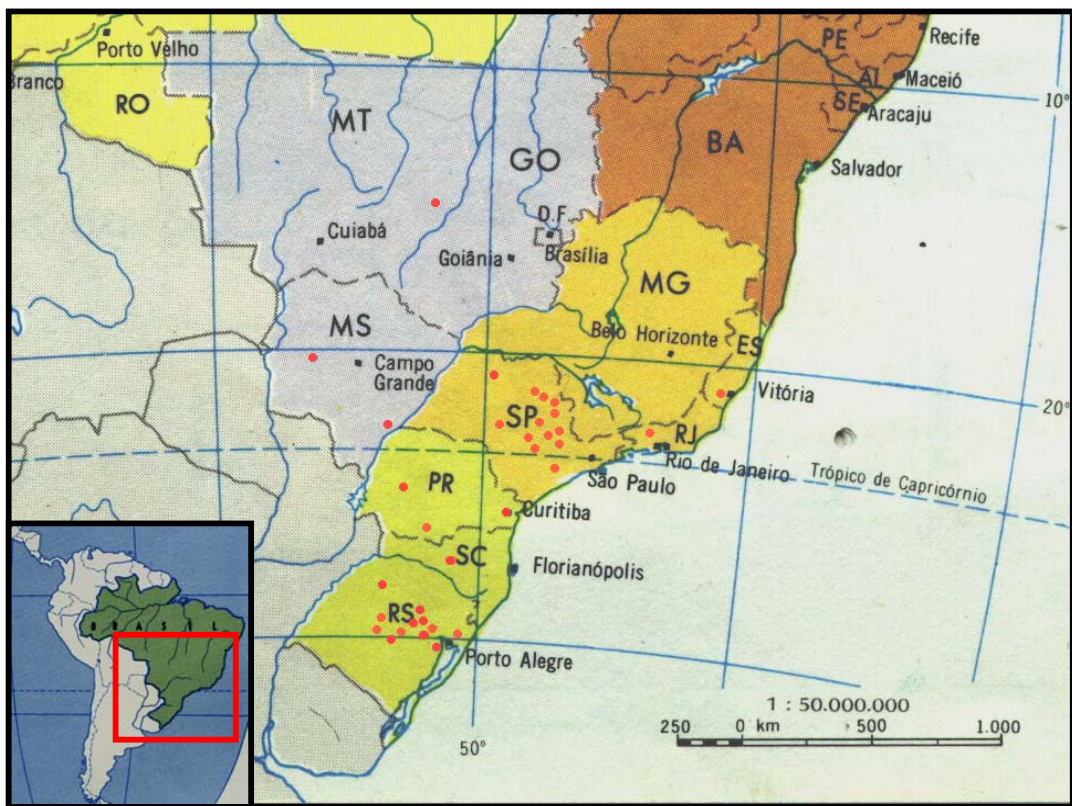


Figura 3 - Distribuição aproximada das amostras obtidas de *Leopardus tigrinus* com procedência ao nível de município. Cada ponto vermelho representa um município de origem de uma ou mais amostras.

### 3.2 Extração de DNA

Para a extração do DNA, foram utilizados dois protocolos diferentes de acordo com o tipo de tecido.

Para a extração do DNA a partir de amostras de tecido muscular foi utilizado protocolo retirado de MEDRANO *et al.* (1990) que consiste na extração do DNA sem utilização de Fenol/Clorofórmio, como descrito a seguir:

- 1) 0,1 a 0,5 gramas de tecido;
- 2) Adição de 750µl de tampão de extração STE pH 8,0 (100 mM NaCl; 10 mM Tris-HCl; 1 mM EDTA);
- 3) Centrifugação por 10 minutos a 4000rpm;
- 4) Descarte do sobrenadante e repetição dos passos 2 e 3;
- 5) Descarte do sobrenadante e adição de 550µl de Tampão de Lise (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 20 mM EDTA pH 8,0; 1% SDS; 200 mM NaCl; 1% β-Mercapto-Ethanol) e proteinase K (10 mg/ml), para ruptura das células liberando-se o DNA na solução;
- 6) Banho-maria a 37° C “overnight” ou 55-60° C por 3 horas;
- 7) Adição de 350µl de Cloreto de Sódio 5M para precipitação das proteínas e outros restos celulares;
- 8) Agitação em Vórtex por 15 segundos;
- 9) Centrifugação por 30 minutos a 13000rpm;
- 10) Isolamento do sobrenadante e adição de 2 vezes o volume retirado de Etanol Absoluto para precipitação do DNA;
- 11) Estocagem a 4° C “overnight”;
- 12) Centrifugação por 30 minutos a 13000rpm;

- 13) Descarte do sobrenadante e adição de 1000µl de Etanol 70%;
- 14) Centrifugação por 5 minutos a 6000rpm;
- 15) Repetição dos passos 13 e 14;
- 16) Descarte do sobrenadante e secagem a temperatura ambiente por 30 minutos;
- 17) Eluição do DNA precipitado em 100µl de Tampão TE (10mM de Tris-HCl pH8,0; 1mM EDTA).

Para as amostras de sangue foi utilizado protocolo para o isolamento do DNA com o uso de Fenol/Clorofórmio, modificado a partir de PALUMBI *et al.* (1991), LAIRD *et al.*, (1991) e HILLIS *et al.* (1996). As extrações de sangue foram realizadas a partir de sangue total, e não somente dos leucócitos, a fim de se obter o DNA possivelmente liberado no plasma com a ruptura natural das células. Devido à grande quantidade de hemoglobina presente nas amostras, o uso de Fenol/Clorofórmio se mostrou mais eficiente na remoção dos restos celulares. O protocolo adaptado seguiu os seguintes passos:

- 1) 600µl de sangue total;
- 2) Adição de 575µl de Tampão de Lise (idem ao protocolo descrito acima) e 25µl de proteinase K (10mg/ml) para ruptura das células;
- 3) Banho-maria a 37° C “overnight” ou 55° C por 2 horas;
- 4) Adição de 600µl de Fenol e agitação em vórtex por 15 segundos;
- 5) Centrifugação por 10 minutos a 4000rpm;
- 6) Isolamento do sobrenadante e estimativa do seu volume;
- 7) Adição de 1 vez o volume retirado de Fenol-Clorofórmio (1:1) e agitação em vórtex por 15 segundos;
- 8) Centrifugação por 10 minutos a 4000rpm;

- 9) Isolamento do sobrenadante e estimativa do seu volume;
- 10) Adição de 1vez o volume retirado de Clorofórmio e agitação em vórtex por 15 segundos;
- 11) Isolamento do sobrenadante, estimativa do seu volume e adição de 1/10 do volume retirado de NaCl 2M e 2,5 vezes o volume de Etanol Absoluto para a precipitação do DNA;
- 12) Estocagem a 4° C “overnight”;
- 13) Centrifugação por 10 minutos a 10000rpm;
- 14) Descarte do sobrenadante e adição de 1000µl de Etanol 70%;
- 15) Repetição dos passos 13 e 14;
- 16) Descarte do sobrenadante e secagem a temperatura ambiente por 30 minutos;
- 17) Eluição do DNA em 100µl de Tampão TE.

O resultado das extrações foi verificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1% com Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X , corado com Brometo de Etídeo e visualizado em translumidor de luz ultra-violeta. A quantificação aproximada do DNA obtido foi realizada pela comparação com fragmentos de Fago-λ de concentração conhecida.

### **3.3 Amplificação por PCR “Polymerase Chain Reaction” dos Locos de Microsatélite**

Foram selecionados oito primers para locos de microsatélite descritos para o gato-doméstico (*Felis catus*) por MENOTTI-RAYMOND *et al.* (1999), que se apresentaram polimórficos para esta espécie: FCA391, FCA424, FCA441, FCA453, F42, F98, F124 e



F146. Todos os locos encontram-se em diferentes cromossomos no gato doméstico com exceção de FCA453, F42 e F146 (Tabela 3).

Todos os primers selecionados foram desenhados para locos com repetições de quatro nucleotídeos, o que facilita a análise em gel de poliacrilamida por gerarem uma menor quantidade de artefatos produzidos por PCR do que locos com repetições de dois ou três nucleotídeos (SCHLOTTERER, 1998).

Os locos selecionados foram amplificados por PCR “Polymerase Chain Reaction” (PALUMBI, 1996) em reações de 15µl que consistiam de:

- cerca de 25 ng de DNA genômico;
- 1X Tampão PCR (10 mM Tris-HCl pH 8,3; 50 mM KCl);
- 1,5-3,0 mM de MgCl<sub>2</sub> - as concentrações de MgCl<sub>2</sub> variaram de acordo com o primer utilizado, ver Tabela 4;
- 0,5 Unidades de Taq DNA Polimerase/GIBCO BRL;
- 0,2 mM de dNTPs;
- 0,1 µM da solução contendo cada par de Primers;
- Água Miliq para completar o volume.

As reações de PCR foram realizadas em termocicladores, consistindo das seguintes condições de amplificação: 3 minutos de desnaturação inicial a 94°C; 30 ciclos de 45 segundos de desnaturação a 94°C, 45 segundos de anelamento a 48-60°C (a temperatura de anelamento variou de acordo com o primer utilizado, ver Tabela 4), 1 minuto de extensão a 72°C, e um período de 15 minutos para extensão final a 72°C.

O resultado das amplificações foi verificado por eletroforese horizontal em gel de agarose 1,5% com Tampão Tris-Borato-EDTA (TBE) 1X, corado com Brometo de Etídeo e visualizado em translumidor de luz ultra-violeta.

Tabela 3- Descrição dos oito locos de microsatélite utilizados neste estudo e as heterozigosidades (H) e tamanho dos fragmentos de DNA gerados por PCR em *Felis catus*, em pares de base. Dados retirados de MENOTTI-RAYMOND *et al.* (1999).

<b>Locos</b>	<b>Cromossomo</b>	<b>Primer 1 5'→3'</b>	<b>Primer 2 5'→3'</b>	<b>H</b>	<b>Tamanho dos fragmentos</b>
FCA391	B3	GCCTTCTAACTTCCTTGCAGA	TTTAGGTAGCCCATTTTCATCA	0,81	237-273
FCA424	C2	TGGAAAAATGTGGAATACTGAA	CCAATTTGTAGTGACATCCCC	0,68	171-187
FCA441	D3	ATCGGTAGGTAGGTAGATATAG	GCTTGCTTCAAATTTTCAC	0,74	153-183
FCA453	A1	AATTCTGAGAACAAGCTGAGG	ATCCTCTATGGCAGGACTTTG	0,62	186-198
F42	A1	CCCACGTGGACTAATCAAAT	CACTGCACAAATTAAGAGGC	0,83	205-231
F98	B4	TCAGAGCCTGCTTGGGATTC	GTTTGTACTGCTATTGGTGG	0,53	171-183
F124	E1	TGCTGGGTATGAAGCCTACT	ATTGCCTCAACTACCTAGGC	0,88	208-249
F146	A1	TTACGGTCTCTCCACAAGTC	GAACCAGGTGATGAGAACTG	0,73	145-158

Tabela 4 – Condições de amplificação dos locos analisados em *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi*.

Locos	Concentração de MgCl <sub>2</sub> (mM)	Temperatura de Anelamento (° C)
FCA391	2,0	56
FCA424	2,0	53
FCA441	2,0	49
FCA453	1,5	60
F42	2,0	57
F98	2,0	56
F124	2,0	57
F146	3,0	48

### 3.4 Determinação dos Alelos e Genótipos dos Indivíduos

Os produtos de PCR obtidos foram analisados em eletroforese vertical, em géis de poliacrilamida 6% não-desnaturante, a fim de se determinar os alelos e genótipos de cada indivíduo. Os géis foram confeccionados em placas de vidro de 32cm de comprimento por 20cm de largura, com espaçadores de 0,8mm. A eletroforese foi realizada com tampão TBE 1X, a uma potência constante de 40 Watts. O tempo de corrida variou de duas a três horas e meia, dependendo do tamanho dos fragmentos gerados por PCR para cada um dos locos. Posteriormente, os géis foram corados com nitrato de prata, seguindo protocolo descrito por TEGELSTROM (1992) e plastificados com celofane.

O genótipo e o tamanho dos alelos encontrados para cada indivíduo analisado foram determinados manualmente por comparação com um marcador molecular de 25 pares de base (Gibco/BRL) e com uma “Escada alélica” construída com os próprios alelos encontrados para cada loco (Figura 4).

Para a amostragem total, incluindo *L. tigrinus* e *O. geoffroyi*, foram realizadas de 25% a 75% de repetições por loco das análises em gel de poliacrilamida para a confirmação dos genótipos e tamanho dos alelos encontrados. Para todas as repetições realizadas, houve 100% de confirmação dos dados.

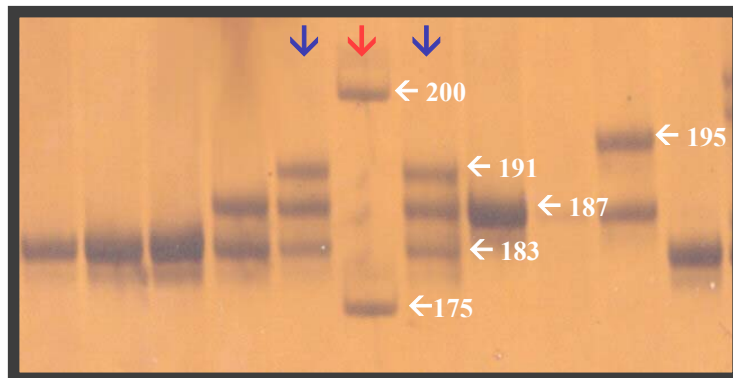


Figura 4 – Gel de Poliacrilamida 6% não-desnaturante, corado com Nitrato de Prata demonstrando o padrão de bandas obtidas para o loco FCA424. ↓ Escada Alélica, ↓ Marcador de 25 pares de base. Em branco, o tamanho dos fragmentos de DNA em pares de base.

### 3.5 Análise dos Dados

A diversidade genética encontrada nos locos analisados para *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi* foi estimada pelo número de locos polimórficos, número de alelos por loco, número de alelos exclusivos, heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) a partir das frequências alélicas supondo equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada um dos locos.

O programa ARLEQUIN 2.1 (SCHNEIDER *et al.*, 2000), foi utilizado para o cálculo das heterozigosidades observadas e esperadas, assim como para os testes de desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg, utilizando o teste exato baseado no método descrito por GUO & THOMPSON (1992). A distribuição das frequências alélicas, presença

de alelos exclusivos e teste de desequilíbrio de ligação entre os locos foram obtidas pelo programa GENEPOP 3.1d (RAYMOND & ROUSSET, 1995). Os níveis de significância para os desvios do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação foram ajustados segundo método sequencial de Bonferroni para múltiplas comparações (RICE, 1989).

O programa MICROSAT (MINCH, 1997) foi utilizado para o cálculo de duas medidas de distância genética entre os indivíduos: Dps – proporção de alelos compartilhados e Dkf - proporção de parentesco. As matrizes de distâncias resultantes foram utilizadas para a construção de árvores filogenéticas segundo método de Neighbor Joining (SAITOU & NEI, 1987) com o programa NEIGHBOR, incluso no pacote PHYLIP 3.5 (FELSENSTEIN, 1993).

O programa STRUCTURE (PRITCHARD *et al.*, 2000) foi utilizado para inferir a estrutura populacional de *Leopardus tigrinus*, assim como para associar indivíduos à sua população fonte. Para tal, o programa utiliza-se de um método de agrupamento Bayesiano. Este modelo assume que há K populações (onde K pode ser desconhecido), cada uma das quais caracterizada por um conjunto de frequências alélicas para cada loco. Os indivíduos da amostra são atribuídos probabilisticamente às populações, ou juntamente a duas ou mais populações se seus genótipos indicarem que eles são miscigenados. Este método pode ser utilizado para detectar a presença de uma estrutura populacional críptica e para realizar o teste de atribuição dos indivíduos às populações. O modelo assume Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Equilíbrio de Ligação entre os locos dentro de cada população, sendo que a existência de desvios do equilíbrio leva a população a ser dividida em subpopulações, às quais os indivíduos são alocados. Os resultados apresentados neste trabalho são baseados em 100.000 interações e 100.000 “burn-in”.

Estimativas de diferenciação entre as subpopulações foram obtidas no programa ARLEQUIN 2.1 pela análise da variância molecular – AMOVA (EXCOFFIER *et al.*, 1992) a partir dos índices de fixação  $F_{st}$  (WEIR & COCKERHAM, 1984) e  $R_{st}$  (SLATKIN, 1995a). A significância estatística dos valores encontrados para os dois índices utilizados foi testada utilizando-se 10.000 permutações pelo programa ARLEQUIN 2.1.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Características dos Locos de Microssatélite Analisados em *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi*

Os oito locos de microssatélite analisados revelaram-se polimórficos para as duas espécies. Para *Leopardus tigrinus* foi encontrado um total de 56 alelos, sendo F124 o loco mais polimórfico com 13 alelos. Apenas um loco, F98, apresentou desvios significativos entre a proporção de heterozigotos observada e a esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ , após correção de Bonferroni) (Tabela 5). Para *Oncifelis geoffroyi* foi encontrado um total de 40 alelos, sendo F42, o loco mais polimórfico com 9 alelos. Nenhum dos locos analisados para esta espécie apresentou desvios significativos entre a proporção de heterozigotos observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) (Tabela 6).

Os níveis de variabilidade genética encontrados para as duas espécies foram relativamente altos e semelhantes, tendo *L. tigrinus* apresentado uma heterozigosidade média observada e número médio de alelos por loco levemente maiores do que *O. geoffroyi* (Tabelas 5 e 6). *L. tigrinus* apresentou 17 alelos exclusivos em relação a *O. geoffroyi* que por sua vez, apresentou apenas um alelo privado (221) para o loco F42, sendo todos os demais compartilhados com *L. tigrinus* (Figura 5).

O teste de desequilíbrio de ligação indicou dois locos ligados – F42 e FCA424 – em *L. tigrinus* e nenhum desequilíbrio em *O. geoffroyi* (nível de significância  $\alpha = 0,05$ , incluindo correção de Bonferroni para 24 comparações).

As distribuições das frequências alélicas tanto em *L. tigrinus* quanto em *O. geoffroyi* demonstraram-se aproximadamente unimodais (Figura 5), o que pode ser esperado para populações que sofreram uma expansão demográfica no passado recente (REICH & GOLDSTEIN, 1998).

Tabela 5 - Características dos locos de microssatélite analisados para *Leopardus tigrinus*, considerando a amostra como uma única população (n=54). Número de alelos por loco (A), tamanho dos fragmentos de DNA gerados por PCR (pb = pares de base), heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He).

Loco	A	Fragmento (pb)	Ho	He
FCA391	7	219-247	0.833 <sup>NS</sup>	0.783
FCA424	5	183-203	0.611 <sup>NS</sup>	0.662
FCA441	5	134-150	0.593 <sup>NS</sup>	0.695
FCA453	5	192-208	0.667 <sup>NS</sup>	0.664
F42	9	225-257	0.796 <sup>NS</sup>	0.855
F98	5	163-179	0.296 <sup>*</sup>	0.428
F124	13	164-216	0.815 <sup>NS</sup>	0.809
F146	7	148-172	0.537 <sup>NS</sup>	0.658
Média	7	---	0,645	0,694

NS = diferenças não significativas entre a proporção de heterozigotos observada e a esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ , após correção de Bonferroni). \* diferenças significativas ( $p < 0,05$ )

Tabela 6 – Características dos locos de microssatélite analisados para *Oncifelis geoffroyi*. Número de alelos por loco (A), tamanho dos fragmentos de DNA gerados por PCR (pb = pares de base), heterozigosidade observada (Ho) e heterozigosidade esperada (He).

Loco	A	Fragmentos (pb)	Ho	He
FCA391	5	219-235	0.800 <sup>NS</sup>	0.806
FCA424	3	183-195	0.350 <sup>NS</sup>	0.433
FCA441	5	134-150	0.700 <sup>NS</sup>	0.671
FCA453	4	192-208	0.700 <sup>NS</sup>	0.687
F42	9	221-253	0.700 <sup>NS</sup>	0.877
F98	3	163-175	0.600 <sup>NS</sup>	0.697
F124	6	172-196	0.600 <sup>NS</sup>	0.832
F146	5	148-168	0.650 <sup>NS</sup>	0.633
Média	5	---	0,638	0,705

NS = diferenças não significativas entre a proporção de heterozigotos observada e a esperada de acordo com o Equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p > 0,05$ , após correção de Bonferroni).



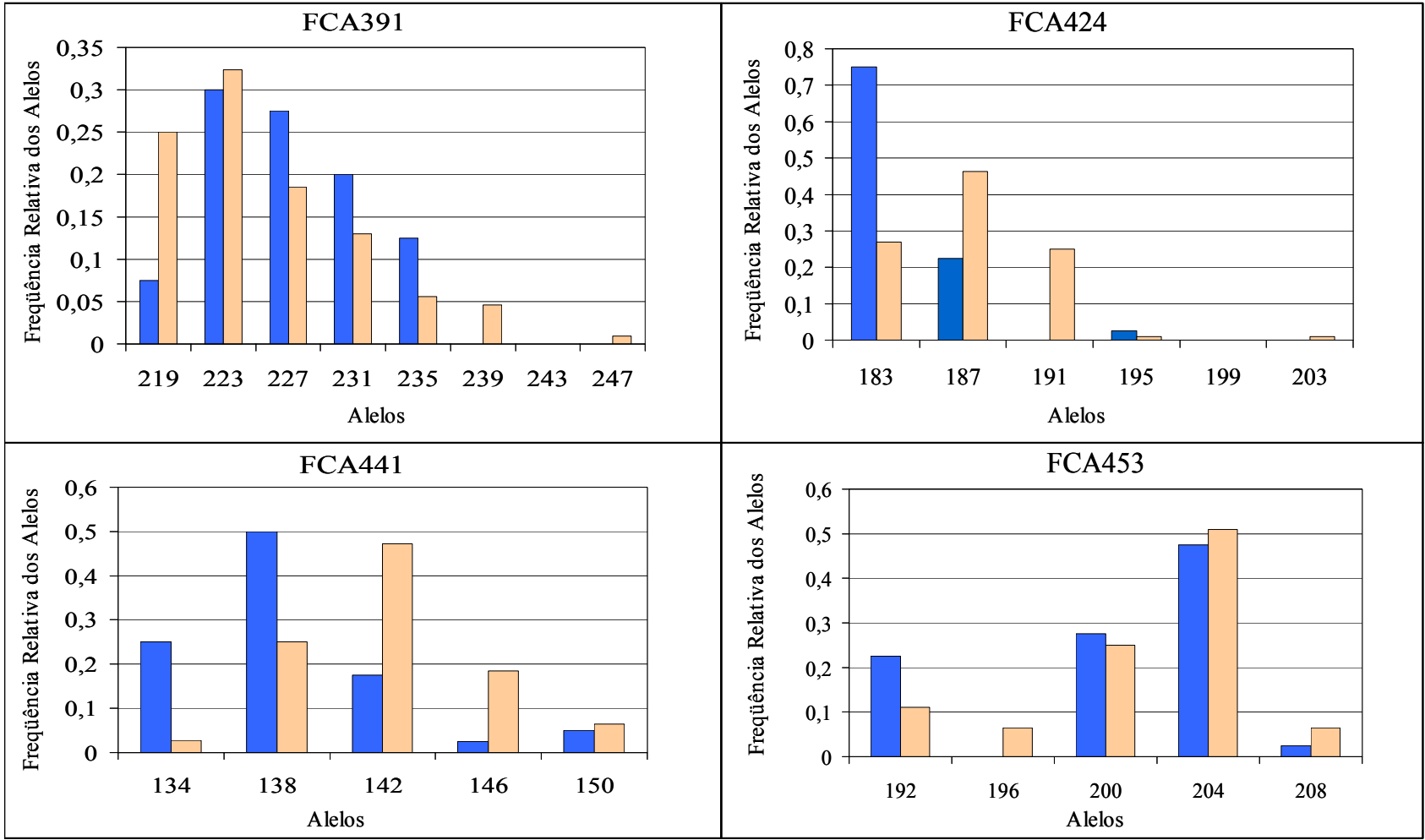


Figura 5 – Histogramas ilustrando a distribuição das frequências dos alelos encontrados para os locos de microsatélites analisados em *Oncifelis geoffroyi* e *Leopardus tigrinus*

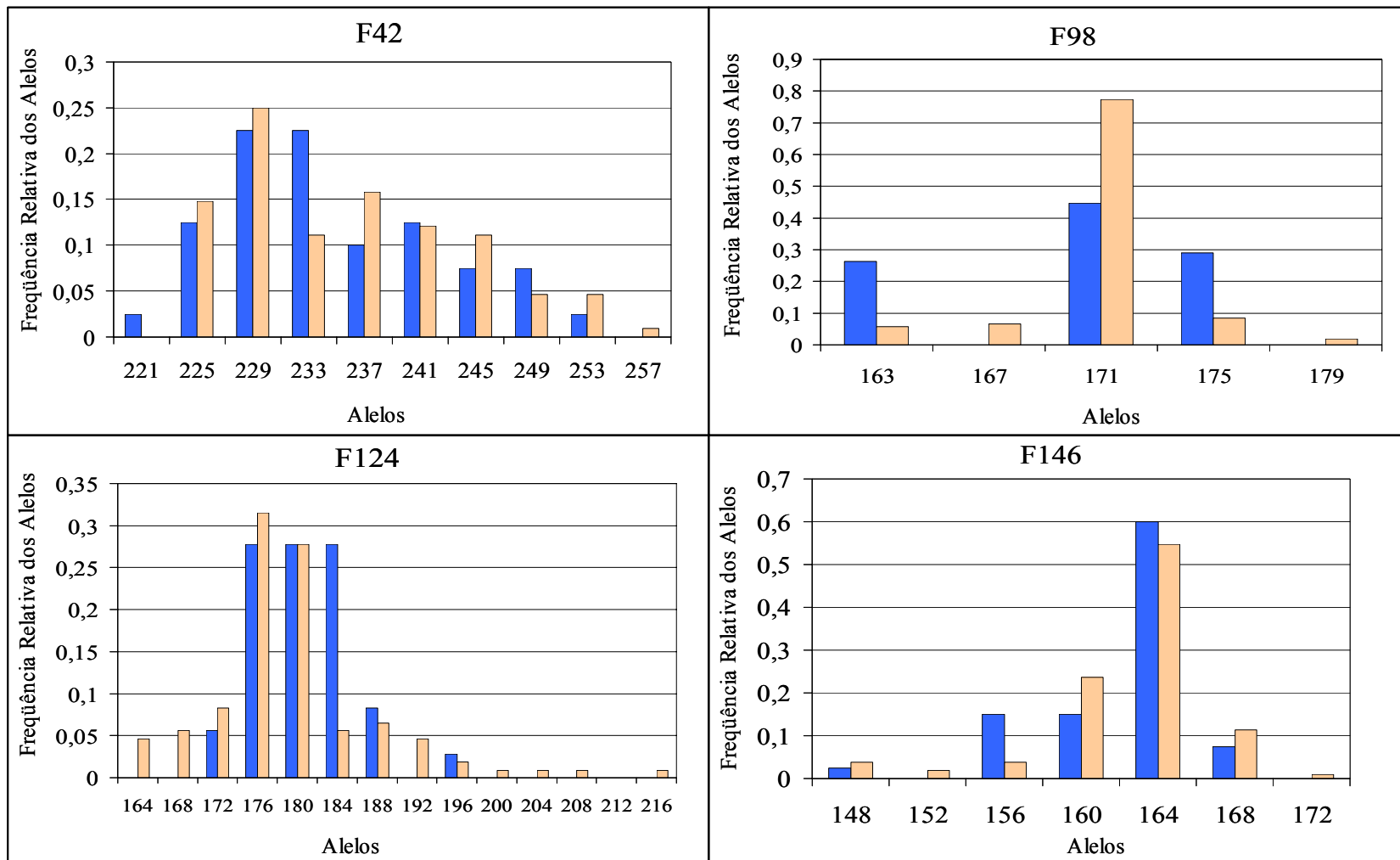


Figura 5 - Continuação. ■ *Oncifelis geoffroyi* ■ *Leopardus tigrinus*

A análise da variância molecular (AMOVA) de acordo com os índices de fixação  $F_{st}$  e  $R_{st}$  foi utilizada para o teste de diferenciação genética entre as duas espécies. O valor obtido para  $F_{st}$  ( $=0,065$ ,  $p<0,01$ ) indicou a existência de diferenciação significativa entre as espécies, no entanto o valor de  $R_{st}$  ( $=0,059$ ,  $p>0,05$ ) não apresentou-se significativo. Apesar da significância encontrada para o  $F_{st}$ , o valor obtido apresentou-se extremamente baixo em relação a valores usualmente observados entre espécies (JOHNSON *et al.*, 1999; RANDI & LUCCHINI, 2002).

Para o teste de agrupamento dos indivíduos entre as duas espécies foram construídas árvores filogenéticas de acordo com o método de Neighbor Joining. Foram utilizadas duas estimativas de distância para a construção das árvores, Dps - proporção de alelos compartilhados e Dkf - coeficiente de parentesco. Para cada um dos índices foram construídas duas árvores: Dps ( $1-ps$  e  $-\ln(ps)$ ) e Dkf ( $1-kf$  e  $-\ln(kf)$ ). As quatro árvores geradas revelaram resultados semelhantes, sendo somente duas delas exibidas neste trabalho (Figura 6). Os valores de “bootstrap” obtidos foram extremamente baixos, não sustentando a formação de agrupamentos distintos (monofiléticos) para as duas espécies, e assim invalidando a utilização de *O. geoffroyi* como grupo externo nas análises populacionais de *L. tigrinus*.

Como as árvores filogenéticas construídas por Neighbor Joining, falharam na distinção genética entre as duas espécies, o programa STRUCTURE foi utilizado para resolver estes padrões. A análise utilizando STRUCTURE, foi realizada de duas maneiras principais. Na primeira não foi utilizada a informação prévia da espécie de origem para cada indivíduo, assumindo-se que a amostra total de *O. geoffroyi* e *L. tigrinus* continha um número K de populações diferenciadas. O objetivo desta análise é identificar a existência de estrutura populacional, ou seja,  $K>1$ , e estimar a probabilidade do número de populações diferenciadas dentro da amostra geral. Neste

caso foi utilizada a opção USEPOPINFO=0, a qual não incorpora informações pré-definidas da origem geográfica ou fenotípica dos indivíduos. O número de populações existentes, é então, determinado somente a partir dos dados genéticos. A probabilidade do número de populações para todos os dados foi estimada fixando-se valores de K=1-5, e comparando-se a probabilidade de cada valor. Um total de cinco análises independentes para cada valor de K foi rodado, a fim de se testar a consistência dos dados obtidos. Os valores gerados para cada K, apresentaram-se bastante semelhantes, variando apenas na ordem de um a dois decimais. A maior probabilidade encontrada foi a da existência de duas subpopulações ( $P = 0,998$ ), indicando que a população como um todo contém pelo menos dois grupos geneticamente distintos.

A partir destes dados, foi estimada a proporção de associação ( $q$ ) de cada população pré-definida (*O. geoffroyi* e *L. tigrinus*) aos dois grupos encontrados pela primeira análise. A proporção de associação ( $q$ ) constitui na proporção média dos genótipos de cada população pré-definida que foram inferidas como sendo de cada um dos grupos pelo programa. A análise revelou uma maior associação de *L. tigrinus* ao Grupo I ( $q=0,659$ ) e *O. geoffroyi* ao Grupo II ( $q=0,820$ ). As duas espécies foram essencialmente separadas em dois grupos distintos baseados somente em sua constituição genética, no entanto foram encontradas proporções relativamente altas de associação de *L. tigrinus* ao Grupo II, referente a *O. geoffroyi* (Tabela 7a). Estes dados indicam que apesar de haver dois grupos geneticamente distintos, a amostra apresenta indivíduos não totalmente diferenciados entre as duas espécies.

Na segunda análise realizada, foi utilizada a informação prévia de espécie, considerando-se duas populações, *L. tigrinus* e *O. geoffroyi*, usando a opção USEPOPINFO=1. Esta opção é utilizada para que o programa possa inferir o agrupamento correto ou não dos indivíduos e suas ancestralidades. Definindo-se

previamente as populações, o programa estima as probabilidades de cada indivíduo pertencer exclusivamente à população de origem pré-definida, bem como de pertencer a outra população, ou apresentar ancestralidade significativa nesta em até duas gerações no passado. As probabilidades de associação ( $q$ ) para cada indivíduo, que representam a proporção de cada genótipo individual que teria sido originada em um ou mais de um grupo, foram estimadas utilizando dois valores diferentes para a taxa de migração prévia entre os grupos ( $v$ ) de 0,05 e 0,1, como recomendado por PRITCHARD *et al.* (2000), gerando dados concordantes. Neste contexto, um migrante entre as duas espécies equivale a um híbrido. Somente indivíduos de *L. tigrinus* demonstraram ancestralidade significativa em *O. geoffroyi*, sendo estes listados na Tabela 8. Segundo esta análise todos estes indivíduos podem ser considerados como híbridos entre as duas espécies.

Nove indivíduos de *L. tigrinus* foram considerados como híbridos pela análise do programa STRUCTURE, sendo que destes, Lti49, Lti85 e Lti98, demonstraram probabilidades extremamente altas ( $>0,9$ ) de pertencer a população de *O. geoffroyi*, para as duas taxas de migração prévia utilizadas. Os indivíduos Lti09, Lti79 e Lti88, demonstraram probabilidades intermediárias ( $>0,5$ ) de pertencer a população de *O. geoffroyi*, com valores relativamente altos de ancestralidade nesta população.

Os mesmos indivíduos de *L. tigrinus* identificados como possíveis híbridos pelo programa STRUCTURE aparecem agrupados próximos a indivíduos de *O. geoffroyi* nas análises filogenéticas (Figura 6).

Dos nove indivíduos de *L. tigrinus* que apresentaram ancestralidade significativa em *O. geoffroyi* pela análise do programa STRUCTURE, cinco deles são provenientes da região central do Estado do Rio Grande do Sul, um indivíduo proveniente do Estado do Paraná, dois do Estado de Goiás e um do Mato Grosso do Sul. A origem geográfica dos indivíduos considerados como possíveis híbridos, na maioria dos casos, foi

concordante com áreas de contato entre as distribuições geográficas das duas espécies (Anexo 1). Analisando os alelos obtidos para cada uma das espécies, pôde-se verificar que dois alelos, nos locos F98 e F124, foram encontrados somente em *O. geoffroyi* e em indivíduos provenientes do Estado do Rio Grande do Sul, e dois outros (nos locos FCA391 e FCA441) somente em *O. geoffroyi* e indivíduos provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul (dados não exibidos). Estes resultados podem indicar a ocorrência de introgressão de alelos exclusivos de *O. geoffroyi* em *L. tigrinus*, a partir da hibridação entre as duas espécies em suas áreas de contato.

Retirando-se os possíveis híbridos, identificados pela análise do programa STRUCTURE, os valores obtidos para os dois índices de fixação tornaram-se significativos e mais elevados no caso do  $F_{st}$  ( $F_{st} = 0,103$ ,  $p < 0,01$  e  $R_{st} = 0,0368$ ,  $p < 0,05$ ).

Da mesma maneira, a análise realizada com STRUCTURE, utilizando-se USEPOPINFO=0 e retirando-se os híbridos sugeridos pelo mesmo programa, revelou um aumento na proporção de associação ( $q$ ) de *L. tigrinus* ao Grupo I, subindo de 0,659 para 0,725 (Tabela 7b).

Análises posteriores do Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação, com a exclusão dos nove indivíduos considerados como híbridos pelo programa STRUCTURE, não demonstraram desvios significativos do número de heterozigotos observado e esperado para nenhum dos locos em nenhuma das duas espécies, assim como nenhum evento de desequilíbrio de ligação.

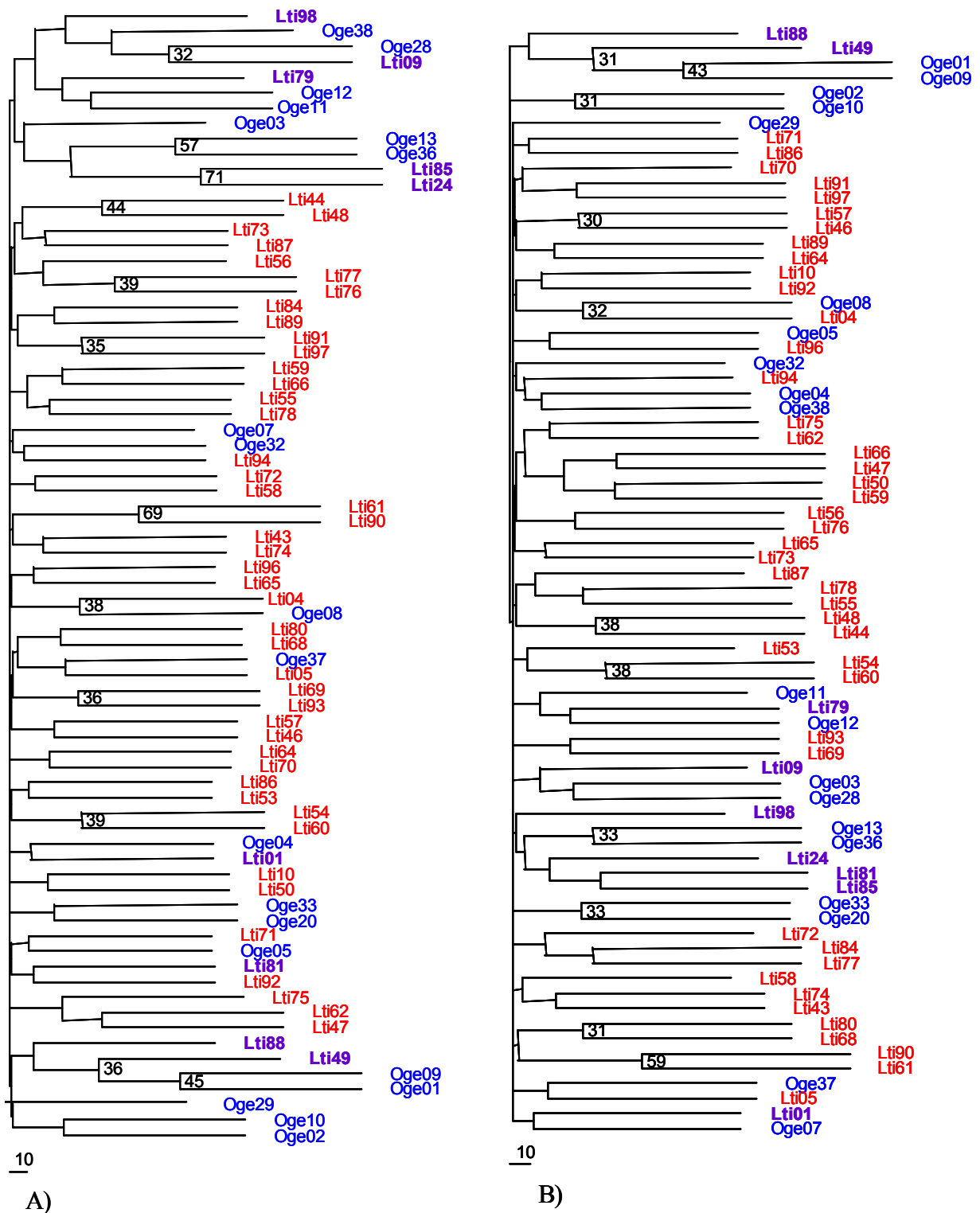


Figura 6 - Relações filogenéticas entre os oito locos de microssatélite analisados para *Leopardus tigrinus* (Lti) e *Oncifelis geoffroyi* (Oge). Os indivíduos de Lti, em roxo e negrito constituem os prováveis híbridos detectados pelo programa STRUCTURE. Árvores construídas a partir do método de Neighbour Joining com o programa NEIGHBOUR do pacote PHYLIP, através de duas estimativas de distância: A) Proporção de alelos compartilhados (Dps, opção: 1 - (ps)); B) Coeficiente de kinship (Dkf, opção: 1 - (kf)). Valores demonstrados nos ramos representam o suporte para 100 replicações “bootstraps” (somente os valores acima de 30 estão sendo exibidos).

Tabela 7 – Proporção de associação de cada população pré-definida (*Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi*) aos dois grupos inferidos pelo programa STRUCTURE. a) Amostra total de *Leopardus tigrinus* (n=54); b) Amostra de *Leopardus tigrinus* com exclusão dos possíveis híbridos (n=45).

a) População	Grupos Inferidos	
	Grupo I	Grupo II
<i>Oncifelis geoffroyi</i>	0,180	0,820
<i>Leopardus tigrinus</i>	0,659	0,341

b) População	Grupos Inferidos	
	Grupo I	Grupo II
<i>Oncifelis geoffroyi</i>	0,180	0,820
<i>Leopardus tigrinus</i>	0,725	0,275

Tabela 8- Proporção de associação (q) dos genótipos de cada indivíduo de *Leopardus tigrinus*, que demonstraram ancestralidade significativa na população de *Oncifelis geoffroyi* segundo o programa STRUCTURE. Neste caso são estimadas as probabilidades de cada indivíduo pertencer exclusivamente à população de origem fenotípica (sem ancestrais imigrantes), pertencer à outra população (imigrante) ou apresentar ancestrais nesta na primeira e na segunda geração passada.

Indivíduo	v	População <i>L. tigrinus</i>		População <i>O. geoffroyi</i>	
		Sem ancestrais imigrantes	Imigrante	Imigrantes na 1 <sup>a</sup> geração	Imigrantes na 2 <sup>a</sup> geração
Lti01	0,05	0,421	0,013	0,367	0,198
	0,1	0,220	0,019	0,502	0,258
Lti09	0,05	0,107	0,583	0,226	0,084
	0,1	0,043	0,622	0,246	0,090
Lti24	0,05	0,064	0,853	0,055	0,028
	0,1	0,022	0,900	0,053	0,025
Lti49	0,05	0,010	0,912	0,060	0,018
	0,1	0,003	0,931	0,052	0,014
Lti79	0,05	0,126	0,505	0,247	0,122
	0,1	0,050	0,543	0,276	0,131
Lti81	0,05	0,597	0,168	0,138	0,096
	0,1	0,415	0,253	0,192	0,139
Lti85	0,05	0,014	0,963	0,016	0,007
	0,1	0,003	0,981	0,012	0,004
Lti88	0,05	0,207	0,563	0,155	0,075
	0,1	0,083	0,677	0,164	0,076
Lti98	0,05	0,018	0,918	0,047	0,017
	0,1	0,005	0,941	0,041	0,013



## 4.2 Estrutura Genética de *Leopardus tigrinus*

Dois tipos de análises foram conduzidos para a definição dos padrões de distribuição geográfica da variabilidade genética em *Leopardus tigrinus*. A primeira análise envolveu a amostra total obtida para a espécie (n=54), juntamente com comparações com a amostra obtida para *Oncifelis geoffroyi*. A segunda análise diferiu da primeira, pela exclusão dos nove indivíduos de *L. tigrinus* considerados como possíveis híbridos entre as duas espécies pelo programa STRUCTURE. A retirada destes indivíduos foi realizada com intuito de se analisar com mais objetividade apenas a estrutura genética de *L. tigrinus*, procurando descartar os efeitos da possível hibridação com *O. geoffroyi* sobre sua estrutura.

Para a primeira análise incluindo todos os indivíduos de *L. tigrinus* (n=54), foi utilizado o programa STRUCTURE com a opção USEPOPINFO=0, para definição do número de populações K sem informações prévias de origem geográfica. Foram fixados valores de K=1-5 e realizadas cinco análises independentes pra cada valor de K. Ao contrário do obtido no teste do número de populações para a amostra total de *L. tigrinus* com *O. geoffroyi*, os valores resultantes para cada K variaram intensamente, não sendo possível se obter estimativas consistentes. Neste caso, o programa STRUCTURE não demonstrou-se eficiente na identificação das populações e agrupamento dos indivíduos.

A população total de *L. tigrinus* foi então testada sob quatro diferentes cenários.

O primeiro cenário consistiu de duas populações: 1) Região Sul + Região Centro-Oeste (n=29), incluindo os indivíduos provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e 2) Região Sudeste (n=25), com os indivíduos dos Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo.

O segundo cenário consistiu, também, de duas populações, apenas diferindo do primeiro com o agrupamento das amostras do Centro-Oeste com as do Sudeste.

O terceiro cenário envolveu três populações: 1) Região Sul (n=24), incluindo todos os indivíduos amostrados para os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná; 2) Região Sudeste (n=25), incluindo os indivíduos amostrados para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo e 3) Região Centro-Oeste (n=5), incluindo os indivíduos provenientes de Goiás, Mato Grosso e Mato-Grosso do Sul.

O quarto cenário incluiu quatro populações formadas por: 1) Estados do Rio Grande do Sul - RS e Santa Catarina - SC (n=17) 2) Estado do Paraná - PR (n=7), 3) Estados de São Paulo - SP, Rio de Janeiro - RJ e Espírito Santo - ES (n=25) e 4) Estados de Goiás - GO, Mato Grosso - MT e Mato Grosso do Sul - MS (n=5). A amostra proveniente de Santa Catarina, Lti44, foi testada juntamente com a população do Rio Grande do Sul em uma análise, e com a do Paraná em outra, gerando resultados semelhantes. O agrupamento com o Estado do Rio Grande do Sul, escolhido para inclusão no presente trabalho, foi definido com o auxílio das análises filogenéticas por Neighbor Joining, que em todas as opções testadas revelaram um agrupamento entre Lti44 com Lti48 do Rio Grande do Sul.

A análise de um maior número de cenários não foi possível devido ao pequeno tamanho da amostra para alguns estados.

Foram realizados testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação para todos os locos em cada uma das populações definidas para os cenários testados. Em nenhuma destas populações, houve desvios significantes para  $\alpha=0,05$ , após correção de Bonferroni (dados não exibidos).

Os resultados da AMOVA para os quatro cenários pré-definidos apresentaram resultados semelhantes, sendo os maiores valores de  $F_{st}$  e  $R_{st}$  encontrados para o

Cenário 3. O segundo valor mais alto do Rst, apesar de não ter sido significativo, foi encontrado para o Cenário 4, e o segundo maior Fst para o Cenário 1 (Tabela 9).

Tabela 9 – Resultados da AMOVA obtidos para os quatro cenários pré-definidos para a amostra total de *Leopardus tigrinus* (n=54). Cenário 1 – Região Sul + Centro-Oeste x Região Sudeste; Cenário 2 – Região Sul x Centro-Oeste + Região Sudeste; Cenário 3 – Região Sul x Região Sudeste x Região Centro – Oeste; Cenário 4 – RS/SC x PR x SP/RJ/ES x GO/MT/MS.

	Porcentagem de Variação			
	Cenário 1	Cenário 2	Cenário 3	Cenário 4
Inter-populacional	5,37 <b>2,95</b>	2,99 <b>2,81</b>	5,68 <b>12,26</b>	5,22 <b>9,92</b>
Intra-populacional	94,63 <b>97,05</b>	97,01 <b>97,19</b>	94,32 <b>87,74</b>	94,78 <b>90,08</b>
Índice de fixação	Fst = 0,0537 ** <b>Rst = 0,0295 *</b>	Fst = 0,0299 ** <b>Rst = 0,0281</b>	Fst = 0,0568 ** <b>Rst = 0,1226 *</b>	Fst = 0,0522 ** <b>Rst = 0,0992</b>

# Os valores superiores referem-se aos dados do Fst e os inferiores e em negrito aos do Rst. \*\*p<0,01, \*p<0,05

Foram realizadas comparações múltiplas entre as populações definidas para cada cenário e para *O. geoffroyi*, utilizando os dois índices de fixação: Fst e Rst. Os valores de Fst foram significantes para todas as comparações com exceção do Sul x Centro-Oeste e *O. geoffroyi* x Centro-Oeste no Cenário 3, RS/SC x PR, PR x GO/MT/MS, PR x SP/RJ/ES e GO/MT/MS x *O. geoffroyi*, no Cenário 4. Os valores de Rst foram em sua maioria não significantes, apresentando significância normalmente para comparações entre as populações das regiões Sul e Sudeste - Cenário 1 e Cenário 3 - e entre a população do RS com *O. geoffroyi* - Cenário 2 e Cenário 3 - (Tabela 10).

A ausência de significância para os valores de Fst nas comparações realizadas no Cenário 3, revela a influência dos indivíduos considerados como híbridos nestas

regiões, provocando uma homogeneização genética entre estas. No Cenário 4, a ausência de significância para os valores obtidos em todas as comparações com a subpopulação do Paraná, parecem revelar um padrão de isolamento pela distância, com a população intermediária dentro da área analisada, não apresentando-se diferenciada geneticamente das populações extremas.

Os valores encontrados de  $F_{st}$  em todas as comparações parecem, ainda, revelar uma tendência de aumento da diferenciação genética entre *L. tigrinus* e *O. geoffroyi* de acordo o aumento da distância da área de contato entre as duas espécies, tendo as populações definidas como Sudeste ou SP índices mais elevados do que as populações mais ao sul e ao centro do país (Tabela 10). Estes dados coincidem com a definição dos possíveis híbridos pelo programa STRUCTURE, sendo todos eles provenientes dos Estados do Rio Grande do Sul, Paraná, Goiás e Mato Grosso do Sul.

Tabela 10 – Resultados dos testes de diferenciação populacional utilizando os índices de fixação  $F_{st}$  e  $R_{st}$ . Comparações múltiplas entre as populações de *Leopardus tigrinus* estabelecidas para os quatro cenários pré-definidos, incluindo a amostra total (n=54), e comparações entre cada população de *Leopardus tigrinus* com *Oncifelis geoffroyi*.

Cenário 1					
	Sul/Centro-Oeste	Sudeste	<i>O. geoffroyi</i>		
Sul/Centro-Oeste	---	0,0295*	0,0517		
Sudeste	0,0537**	---	0,0408		
<i>O. geoffroyi</i>	0,0313**	0,1294**	---		

Cenário 2				
	Sul	Sudeste/Centro-Oeste	<i>O. geoffroyi</i>	
Sul	---	0,0281	0,0760**	
Sudeste/Centro-Oeste	0,0299**	---	0,0279	
<i>O. geoffroyi</i>	0,0426**	0,0944**	---	

Cenário 3				
	Sul	Sudeste	Centro-Oeste	<i>O. geoffroyi</i>
Sul	---	0,0481**	0,3089	0,0760*
Sudeste	0,0490**	---	0,1884	0,0408
Centro-Oeste	0,0373	0,1115**	---	0,0384
<i>O. geoffroyi</i>	0,0426**	0,1294**	0,0105	---

Cenário 4					
	RS/SC	PR	SP/RJ/ES	GO/MT/MS	<i>O. geoffroyi</i>
RS/SC	---	0,0023	0,0450	0,2436	0,0612
PR	0,0074	---	-0,0029	0,1419	0,0151
SP/RJ/ES	0,0584 **	0,0343*	---	0,1884	0,0408
GO/MT/MS	0,0873 *	0,0094	0,1115 **	---	0,0384
<i>O. geoffroyi</i>	0,0445 **	0,0422 *	0,1294 **	0,0105	---

# Os valores de  $R_{st}$  encontram-se acima da diagonal e os de  $F_{st}$  abaixo. Níveis de significância \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ .

Na segunda análise, onde foram retirados os indivíduos considerados como possíveis híbridos, a identificação do número de populações K pelo programa STRUCTURE, sem informações prévias de procedência geográfica, geraram resultados bem mais consistentes, com uma probabilidade maior de 0,999 da existência de apenas uma população em *Leopardus tigrinus*, ao longo da área geográfica estudada.

A análise filogenética conduzida pelo método de Neighbor Joining, com a exclusão dos possíveis híbridos, também não demonstrou forte suporte para a existência de maiores divisões filogeográficas. O padrão geral das árvores obtidas apresentou ramos curtos com pouca estrutura definida, sendo característico de uma expansão populacional relativamente recente (AVISE, 2000). Os valores de “bootstrap” obtidos foram extremamente baixos, não sustentando fortes agrupamentos. No entanto, alguns dos agrupamentos entre indivíduos de localidades próximas repetiram-se em todas as análises com as diferentes estimativas de distância utilizadas, como por exemplo Lti71 + Lti86, Lti55 + Lti78 e Lti54 + Lti60, todos de São Paulo; Lti68 + Lti80, ambos do Rio Grande do Sul; e Lti44 + Lti48, de Santa Catarina e Rio Grande do Sul, respectivamente (Figura 7).

Apesar da alta probabilidade da existência de uma única população em *L. tigrinus* ao longo da área estudada, foram definidos dois cenários diferentes de acordo com a distribuição geográfica das amostras para verificar a ocorrência de alguma estruturação que possa não ter sido detectada pelo programa STRUCTURE.

A construção dos dois cenários foi baseada na amostra com a exclusão dos nove indivíduos considerados como possíveis híbridos, além dos dois indivíduos restantes para a região Centro-Oeste, devido ao pequeno tamanho amostral resultante para esta área. A amostra utilizada nesta análise, dessa maneira, totalizou 43 indivíduos.

No primeiro cenário, a amostra foi subdividida em duas populações, de acordo com as regiões geográficas amostradas: 1) Região Sul (n=18), com os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Paraná, e 2) Região Sudeste (n=25), com os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo.

No segundo cenário, a amostra foi subdividida em estados. Como alguns dos estados amostrados apresentavam apenas um indivíduo, foram realizados diferentes agrupamentos que geraram resultados semelhantes, sendo aqui representado somente o seguinte: 1) RS/SC (n=12), 2) PR (n=6) e 3) SP/RJ/ES (n=25).

Assim como na primeira análise da diferenciação entre as populações de *L. tigrinus* com a amostra total, nenhuma das populações pré-definidas apresentou desvios significantes para Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação ( $\alpha=0,05$ , incluindo correção de Bonferroni).

Os resultados da AMOVA revelaram os maiores valores de  $F_{st}$  e  $R_{st}$  em *L. tigrinus* para o Cenário 1, sendo os dois estatisticamente significantes (Tabela 11).

Após a análise da AMOVA para os dois cenários pré-definidos, foram realizadas comparações múltiplas entre as populações de *L. tigrinus* com *O. geoffroyi*, para cada um dos cenários. Os valores de  $F_{st}$  foram significantes para todas as comparações, com exceção de RS/SC x PR e PR x SP/RJ/ES no Cenário 2. O único valor significativo para  $R_{st}$  foi o da comparação entre Sul x Sudeste para o Cenário 1 (Tabela 12).

A ausência de significância para os valores de  $F_{st}$  nas comparações do Cenário 2 sugere um padrão de isolamento pela distância, no qual a população intermediária, PR, não apresenta-se significativamente diferente das populações extremas.

A análise dos histogramas das frequências alélicas obtidas para as três populações revelaram um padrão condizente ao isolamento por distância, com a população do Paraná apresentando alelos compartilhados somente com a população do

RS/SC – 235, 150 e 179, dos locos FCA391, FCA441 e F98, respectivamente, e alelos compartilhados somente com a população de SP/RJ/ES – 164, 168 e 184 para o loco F124 e 156 para o loco F146 (Figura 8).

As populações consideradas, RS/SC, PR e SP/RJ/ES, apresentaram um total de 4, 1 e 7 alelos exclusivos respectivamente, sendo que a análise das duas primeiras em conjunto, correspondendo desta maneira ao agrupamento Sul x Sudeste, apresenta um total de 8 e 7 alelos exclusivos respectivamente (Figura 8). O número de alelos exclusivos encontrados, pode ser considerado relativamente alto, indicando uma diferenciação moderada entre as regiões consideradas.





Tabela 11 - Resultados da AMOVA obtidos para os dois cenários pré-definidos para a amostra de *Leopardus tigrinus* com exclusão dos nove indivíduos considerados como possíveis híbridos entre *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi*, e das duas amostras restantes de *L. tigrinus* provenientes da região Centro-Oeste (n=43). Cenário 1 – Região Sul x Região Sudeste; Cenário 2 – RS/SC x PR x SP/RJ/ES.

	Porcentagem de Variação	
	Cenário 1	Cenário 2
Inter-populacional	3,74 <b>5,05</b>	3,65 <b>2,88</b>
Intra-populacional	96,26 <b>94,95</b>	96,35 <b>97,12</b>
Índice de Fixação	Fst = 0,0374 ** <b>Rst = 0,0505 *</b>	Fst = 0,0366 ** <b>Rst = 0,0288</b>

# Os valores superiores referem-se aos dados do Fst e os inferiores e em negrito aos do Rst. Nível de significância \*\*p<0,01, \*p<0,05.

Tabela 12 - Resultados dos testes de diferenciação populacional utilizando os índices de fixação Fst e Rst. Comparações múltiplas entre as populações de *Leopardus tigrinus* estabelecidas para os dois cenários pré-definidos para a amostra com exclusão dos nove indivíduos considerados como possíveis híbridos entre *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi*, e dos dois indivíduos restantes de *L. tigrinus* provenientes da região Centro-Oeste (n=43) e comparações entre cada população de *L.tigrinus* com *O. geoffroyi*.

Cenário 1				
	Sul	Sudeste	<i>O. geoffroyi</i>	
Sul	---	0.0505*	0.0762	
Sudeste	0.0374**	---	0.0408	
<i>O. geoffroyi</i>	0.0851**	0.1294**	---	
Cenário 2				
	RS/SC	PR	SP/RJ/ES	<i>O. geoffroyi</i>
RS/SC	---	- 0.0085	0.0487	0.0633
PR	0.0127	---	- 0.0073	0.0101
SP/RJ/ES	0.0494 **	0.0228	---	0.0408
<i>O.geoffroyi</i>	0.0973**	0.0653**	0.1294**	---

# Os valores de Rst encontram-se acima da diagonal e os de Fst abaixo. Nível de significância \*\*p<0,01, \*p<0,05.

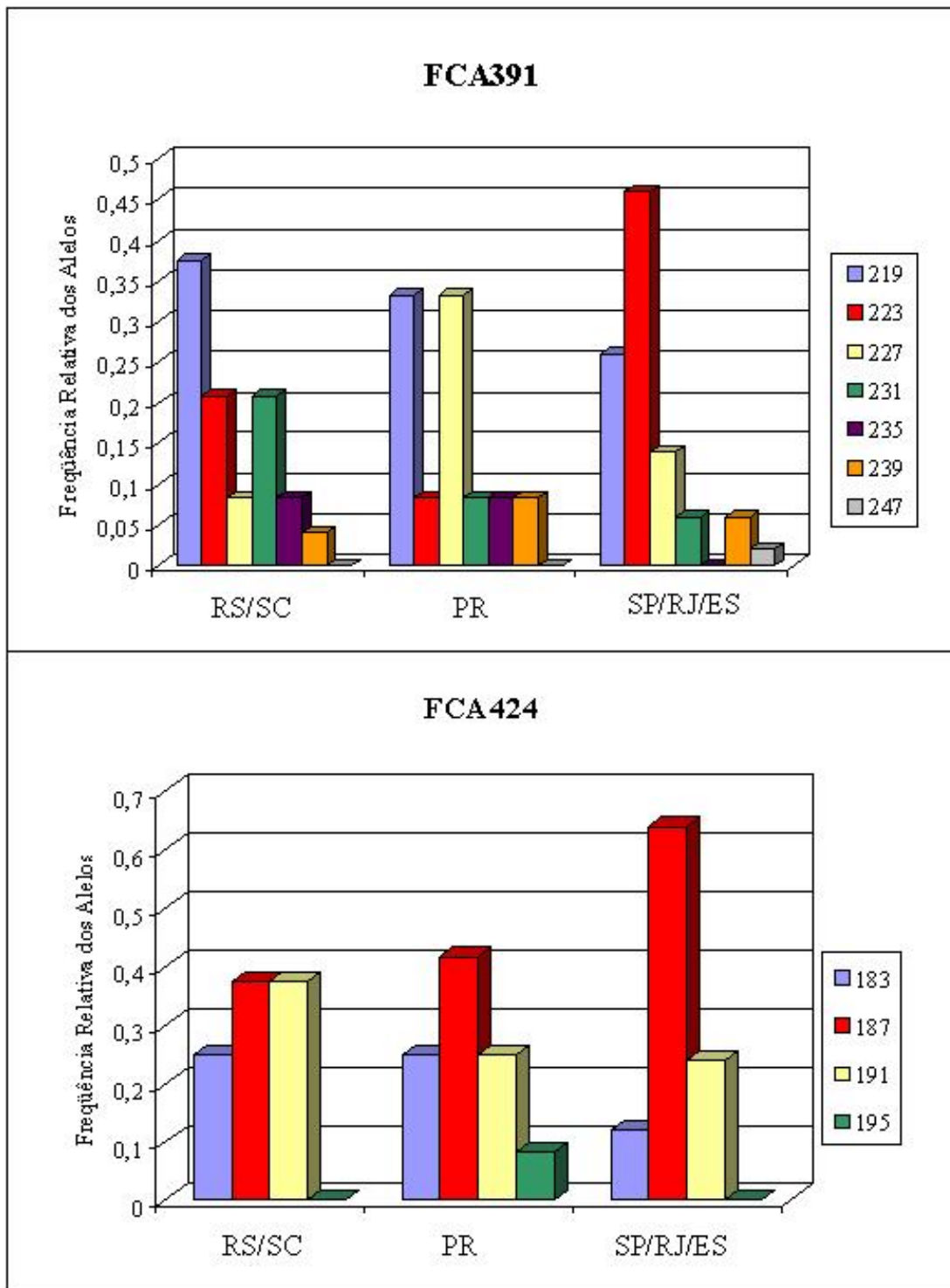


Figura 8 - Histogramas ilustrando a distribuição das frequências alélicas obtidas para cada um dos locos de microsatélite analisados em *Leopardus tigrinus*. População com a exclusão dos indivíduos considerados híbridos e dos dois indivíduos restantes para a região Centro-Oeste (n=43), dividida em estados {Rio Grande do Sul/RS e Santa Catarina/SC (n= 12); Paraná/PR (n=6); São Paulo/SP, Rio de Janeiro/RJ e Espírito Santo/ES (n= 25)}.

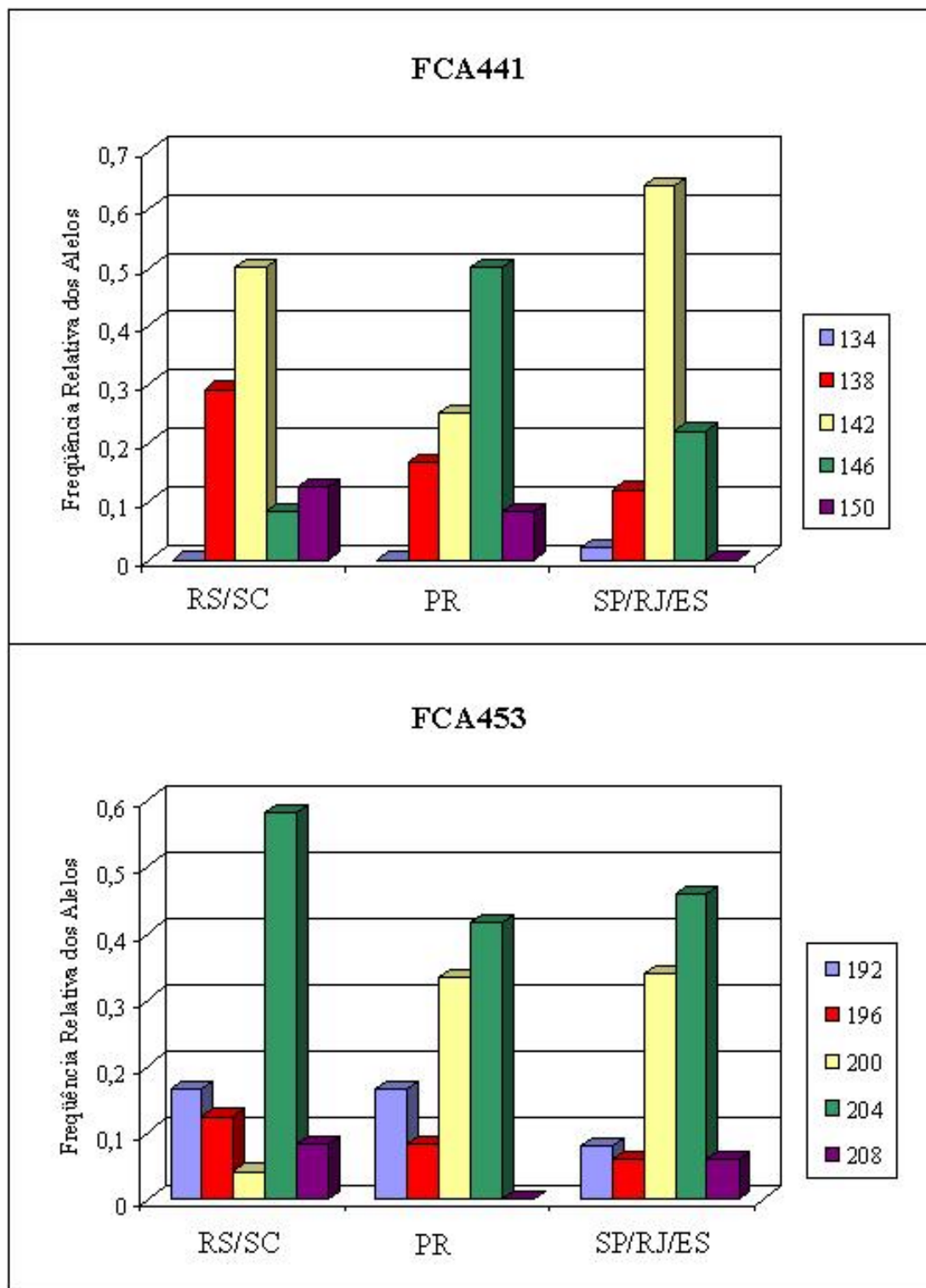


Figura 8 - Continuação

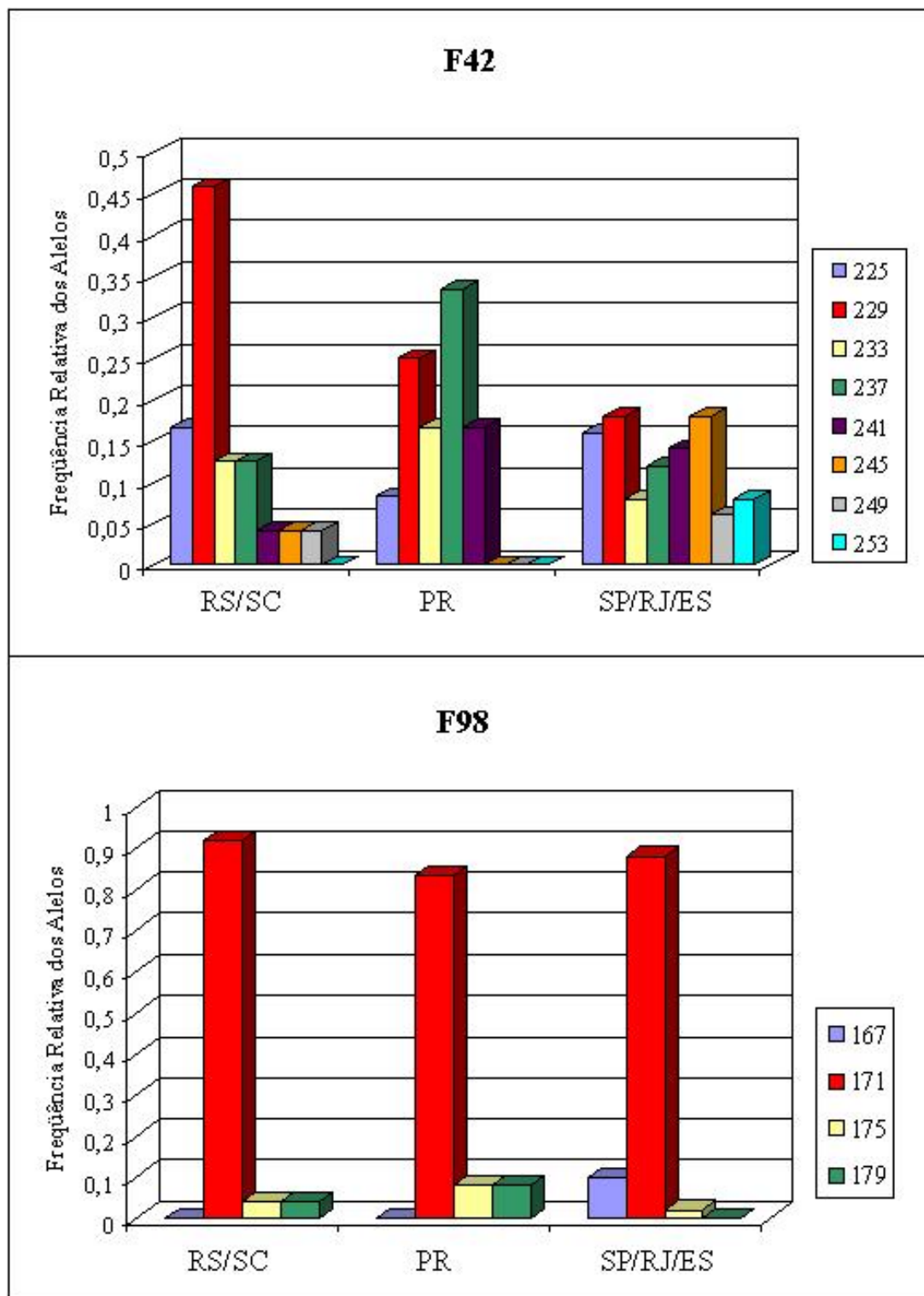


Figura 8 - Continuação

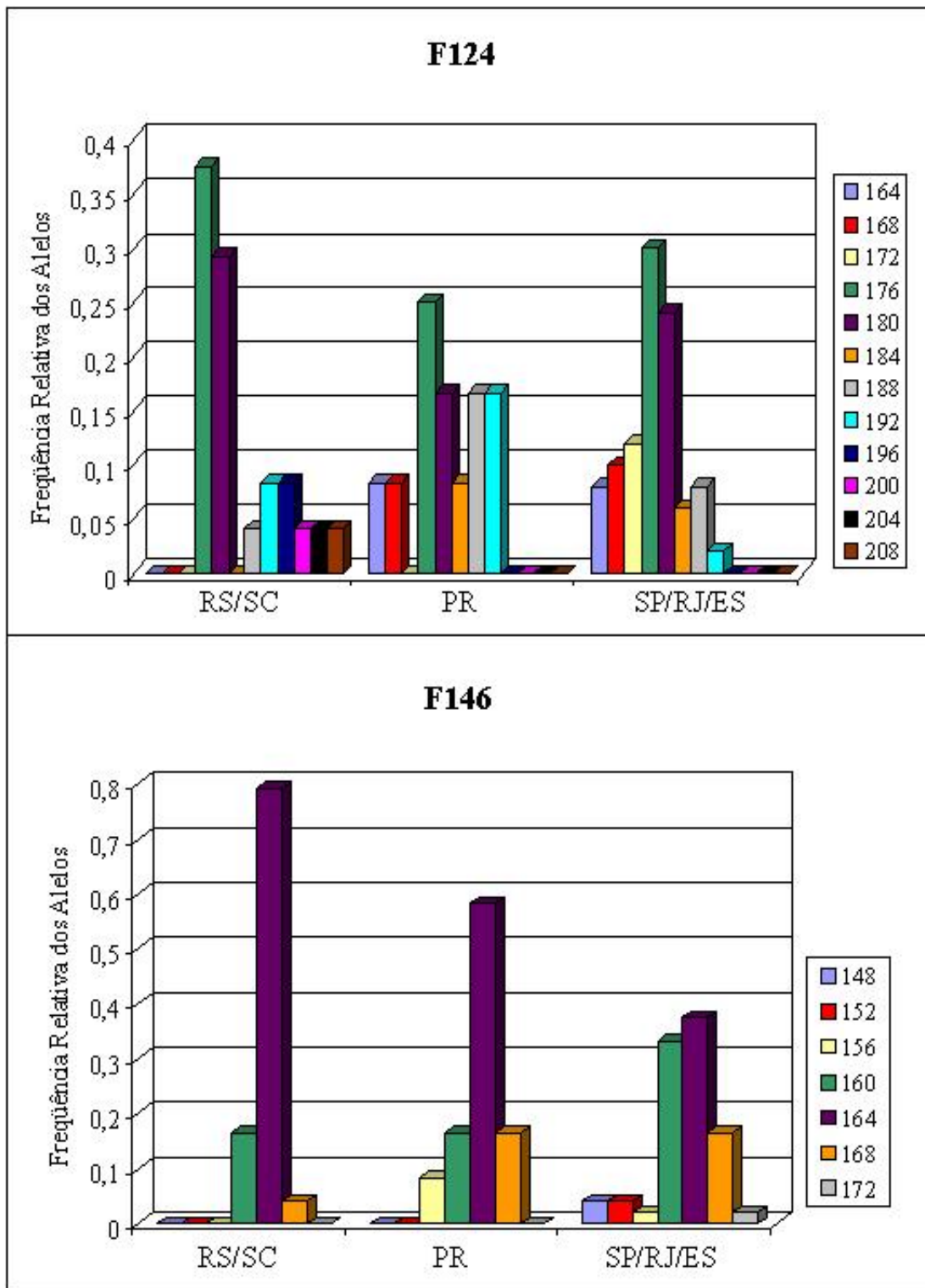


Figura 8 - Continuação

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Variabilidade Genética, Equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação em *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi*

Os níveis observados de diversidade genética nos locos de microssatélite analisados foram altos, tanto para *Leopardus tigrinus* quanto para *Oncifelis geoffroyi*, sendo estes levemente maiores para a primeira espécie. Apesar da amostra de *O. geoffroyi* ser constituída principalmente de indivíduos provenientes do estado do Rio Grande do Sul, não sendo amostrada grande parte de sua distribui o, a detec o do número de alelos para esta espécie parece ter sido bastante razoável.

Uma análise anterior de microssatélites em indivíduos de *O. geoffroyi* provenientes de grande parte de sua distribui o geográfica (JOHNSON *et al.*, 1999) compreendeu três dos oito locos analisados neste trabalho: FCA391, FCA424 e FCA441, onde foram encontrados dez, três e cinco alelos, respectivamente. Nossa amostragem permitiu a detec o de todos os alelos encontrados anteriormente por JOHNSON *et al.* (1999) para o loco FCA424, quatro para FCA441 e cinco para FCA391. A análise realizada por JOHNSON *et al.* (1999) definiu uma distribui o bastante homog nea da variabilidade genética em *O. geoffroyi* ao longo de toda sua área de ocorrência. Este padrão nos propiciou uma defini o bastante razoável dos níveis de variabilidade nesta espécie, apesar da amostra concentrada regionalmente.

Apesar da impossibilidade de se fazer compara es diretas dos níveis de variabilidade genética entre *L. tigrinus* e outras espécies de felídeos, devido ao fato de geralmente os locos analisados em diferentes trabalhos não serem os mesmos, podemos realizar avalia es mais gerais entre estas espécies. Ao compararmos os níveis de diversidade genética (heterozigosidade média observada e número médio de alelos por

loco) encontrados em *L. tigrinus* com outras espécies de felídeos também analisadas por microssatélites, encontramos níveis tão ou mais altos de diversidade para esta espécie (MENOTTI-RAYMOND & O'BRIEN, 1995; JOHNSON *et al.*, 1999; SPONG *et al.*, 2000; EIZIRIK *et al.*, 2001).

Os testes de Equilíbrio de Hardy-Weinberg revelaram a existência de desvios significativos entre a proporção de heterozigotos observada e esperada para um loco (F98) em *Leopardus tigrinus* e em nenhum dos locos para *Oncifelis geoffroyi*. No caso do loco F98, foi detectado um déficit de heterozigotos de acordo com o esperado. A deficiência no número de heterozigotos pode ser atribuída a diversas causas como a existência de seleção sob o loco em questão, a presença de alelos nulos levando a uma falsa observação do excesso de homozigotos, existência de endocruzamento e a presença de subestruturação, levando ao efeito Wahlund (MURRAY, 1996).

A presença de seleção agindo sob o loco foi, primeiramente, afastada devido a neutralidade seletiva apresentada por estes marcadores (MURRAY, 1996). No entanto, SLATKIN (1995b) demonstrou a possibilidade de existência de ligação entre locos de microssatélite a locos não neutros, que estariam sob pressão seletiva, diminuindo os níveis de variabilidade do marcador.

A existência de alelos nulos não pode ser totalmente descartada, sendo necessárias análises mais detalhadas sobre este loco para verificação desta hipótese, envolvendo, por exemplo, a análise de pedigrees conhecidos (MURRAY, 1996).

A ocorrência de endocruzamento foi afastada em favor da hipótese de existência de uma subestruturação populacional. Se houver uma subestruturação natural e considerarmos a amostra como uma única população, um déficit de heterozigotos pode ser encontrado mesmo que cada subpopulação encontre-se em equilíbrio de Hardy-Weinberg, evento conhecido como Efeito Wahlund (NEI, 1987).



Esta possibilidade torna-se extremamente plausível devido à detecção de indivíduos identificados fenotipicamente como *L. tigrinus* com ancestralidade significativa em *O. geoffroyi*. A análise posterior do teste de Equilíbrio de Hardy-Weinberg, com exclusão destes indivíduos (não mais revelando desvios significantes entre a proporção de heterozigotos observada e esperada para nenhum dos locos) corrobora esta hipótese. Possivelmente, a existência de indivíduos de *L. tigrinus* com características genéticas de *O. geoffroyi* tenha provocado os desvios significativos, sendo a população desta espécie subestruturada em indivíduos puros e híbridos com *O. geoffroyi*.

Da mesma maneira, a existência de desequilíbrio de ligação entre locos pode ser tanto indicação de uma ligação real entre os locos, quanto gerada por artefatos de uma sub-estruturação ou endocruzamento existente entre as populações (OTHA, 1982), assim como devido a ocorrência de eventos de hibridação (ALLENDORF *et al.*, 2001). Como os locos encontrados em desequilíbrio para *L. tigrinus* encontram-se em diferentes cromossomos em *Felis catus* (MENOTTI-RAYMOND *et al.* 1999), e devido a eliminação deste evento na análise posterior com exclusão dos possíveis híbridos, possivelmente este tenha sido gerado também pela ocorrência de hibridação entre as duas espécies.

## **5.2 Reconhecimento de *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi* como Unidades Geneticamente Distintas**

Os alelos detectados para os locos de microssatélite analisados foram em sua grande maioria compartilhados entre as duas espécies, tendo *L. tigrinus* apresentado um maior número de alelos exclusivos comparados a *O. geoffroyi*. Para a maioria dos casos as frequências alélicas encontradas também foram bastante semelhantes entre as duas espécies.

A primeira análise de diferenciação genética entre as duas espécies gerou valores de  $R_{st}$  baixos e não significantes ( $p > 0,05$ ) e  $F_{st}$  significativos ( $p < 0,01$ ), mas extremamente baixos para considerações entre espécies. Valores altos normalmente são encontrados para comparações interespecíficas, como por exemplo,  $F_{st}=0,33$  e  $R_{st}=0,26$  ( $p < 0,01$ ) para lobos cinza *Canis lupus* e cães domésticos *Canis familiaris* (RANDI & LUCCHINI, 2002).

A análise filogenética entre as duas espécies através do método de Neighbor Joining, assim como a definição das proporções de atribuição destas a diferentes grupos pelo programa STRUCTURE, falharam em definir grupos completamente distintos entre elas. No entanto, o método Bayesiano utilizado pelo programa STRUCTURE mostrou-se bem mais eficiente neste agrupamento do que o método de distância empregado pela análise por Neighbor Joining. Os métodos baseados em distâncias entre os indivíduos sofrem de várias desvantagens, como a identificação dos agrupamentos, que podem ser fortemente dependentes da medida de distância utilizada e do método de representação gráfica escolhido, dificultando sua confiabilidade. Além disso, neste método a incorporação de informações adicionais como procedência geográfica ou características fenotípicas dos indivíduos torna-se complicada. Assim, métodos baseados em distâncias genéticas podem ser vistos como sendo mais apropriados para análises exploratórias dos dados do que para inferências estatísticas (PRITCHARD *et al.* 2000).

A ausência da identificação de grupos totalmente distintos entre as duas espécies pode ser devida a uma separação evolutiva incompleta entre elas; à existência de um alto número de homoplasias, saturando os locos utilizados como marcadores informativos; ou a um reflexo da existência de eventos de hibridação e introgressão.

A separação evolutiva incompleta entre as duas espécies parece pouco provável tendo em vista análises prévias sob diferentes marcadores moleculares revelando uma clara diferenciação monofilética entre estas (como por exemplo MASUDA *et al.*, 1996; JOHNSON *et al.*, 1996; JOHNSON & O'BRIEN, 1997; JOHNSON *et al.*, 1999; MATTERN & MCLENNAN, 2000).

As duas outras possibilidades não podem ser totalmente descartadas. A existência de um grande número de homoplasias realmente poderia levar a uma saturação dos locos escolhidos como marcadores informativos. O aumento do nível taxonômico a ser comparado (como interespecífico) aumenta também a quantidade de homoplasias que afetam a eficiência dos microssatélites neste tipo de comparação (MURRAY, 1996; CULVER *et al.*, 2001).

A existência de hibridação e introgressão entre as duas espécies também pode ser responsável pelo padrão observado e apresenta, segundo nossas análises, grandes indícios de veracidade. Estes indícios são principalmente devidos ao aumento nos valores de  $F_{st}$ ,  $R_{st}$  e “q” de associação das espécies aos respectivos grupos definidos pelo programa STRUCTURE, assim como pela eliminação de desvios significantes do equilíbrio de Hardy-Weinberg e Desequilíbrio de Ligação em *L. tigrinus*, após a exclusão dos nove indivíduos considerados como híbridos. Juntamente a estes fatores, podemos considerar ainda a existência de alelos compartilhados apenas por *O. geoffroyi* e as populações de origem dos possíveis híbridos identificados, podendo sugerir a existência de introgressão entre estas espécies. Além disso, os nove indivíduos identificados por nossa análise como possíveis híbridos apresentam em sua maioria procedências geográficas compatíveis a de uma zona de hibridação, sendo cinco deles provenientes do estado do Rio Grande do Sul, três da região Centro-Oeste e um do Paraná.

*Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi* apresentam distribuições basicamente parapátricas na Região Neotropical, com a primeira ocorrendo do sul da Costa Rica até o Rio Grande do Sul e nordeste da Argentina e a segunda desde a Bolívia e o chaco paraguaio até o sul do Chile, cobrindo praticamente toda a Argentina, o Uruguai e parte da região sul brasileira (OLIVEIRA, 1994; EISENBERG & REDFORD, 1999) (Anexo 1).

Segundo E. EIZIRIK (dados não publicados), as duas espécies apresentam uma fina área de sobreposição na região central do estado do Rio Grande do Sul, coincidente com as procedências de cinco indivíduos considerados como possíveis híbridos, sendo dois deles do município de Guaíba e um para cada um dos municípios de Triunfo, Cachoeira do Sul e Restinga Seca.

Além da definição desta área de sobreposição, a identificação de características fenotípicas ambíguas em indivíduos das duas espécies já havia sido observada nesta região (E. EIZIRIK, com. pes.). Os principais caracteres usados para a diferenciação entre as duas espécies, constituem o tamanho corporal e o padrão da pelagem. *L. tigrinus* apresenta um comprimento total entre 60,4 – 91,1 cm e peso de 1,75 – 3,5 kg, e sua pelagem, geralmente é ocre com manchas formando rosetas de bordas negras e centro castanho. *O. geoffroyi* apresenta um porte levemente maior com comprimento total de 67 - 105,6 cm e peso de 2 - 6 kg, sendo sua pelagem cinza, com pequenas pintas pretas sólidas e bem próximas (OLIVEIRA & CASSARO, 1999) (Anexo 2). Os indivíduos identificados como possíveis híbridos no estado do Rio Grande do Sul foram todos identificados por nossa equipe, apresentando características diagnósticas de *L. tigrinus*, sendo pelo menos para estes casos afastada a hipótese de identificação incorreta. Os indivíduos provenientes das outras áreas geográficas foram coletados por colaboradores do projeto, sendo apenas as amostras enviadas para o laboratório. No entanto, a

identificação de espécies por estes colaboradores é bastante confiável, o que dificulta a possibilidade de identificação incorreta.

A detecção de indivíduos híbridos é feita normalmente pela análise de características morfológicas, entretanto, nem toda variação morfológica apresenta uma base genética. A detecção de híbridos utilizando caracteres morfológicos geralmente assume que estes serão fenotipicamente intermediários em relação às espécies genitoras, mas muitas vezes indivíduos híbridos que contêm muitos dos genes de um dos táxons parentais são frequentemente morfológicamente indistinguíveis deste (ALLENDORF *et al.*, 2001).

A avaliação da existência de hibridação entre *O. geoffroyi* e *L. tigrinus* na região Centro-Oeste, onde foram identificados possíveis híbridos nos estados de Goiás e Mato Grosso do Sul, é dificultada pela falta de registros precisos de ocorrência da primeira espécie. Segundo a literatura, a distribuição norte de *O. geoffroyi* estende-se até o Paraguai, no entanto sua entrada em território brasileiro por estas vias permanece obscura (OLIVEIRA, 1994). A vegetação característica desta área parece ser favorável ao deslocamento e ocorrência de *O. geoffroyi* que caracteriza-se por apresentar preferências por habitats abertos (NOWELL & JACKSON, 1996). A região do Chaco Paraguaio, de ocorrência confirmada para a espécie, apresenta-se como uma continuação do cerrado característico da região Central do Brasil.

A verificação de eventos de hibridação e introgressão nesta área envolve maiores estudos tanto ecológicos quanto genéticos. Ecológicamente, é necessária a definição exata da ocorrência e possível contato entre as duas espécies nestas áreas. Geneticamente, a análise de outros marcadores moleculares, com uma maior amostragem para esta região, torna-se imprescindível, principalmente para verificação de que a identificação destes indivíduos como híbridos não constituam artefatos de

nossa análise. É possível que os indivíduos desta área apresentem características genéticas diferenciadas dos outros *L. tigrinus* analisados, que por falta de um tamanho amostral mais adequado acabaram por agrupar com *O. geoffroyi* equivocadamente.

Além destes fatores, a hipótese de procedência incorreta pelo menos para Lti24, não pode ser descartada, pois este constitui um indivíduo de cativeiro sem procedência a nível de município coletada pela instituição responsável. O mesmo ocorre para Lti88, proveniente do Paraná e considerado como um possível híbrido por nossas análises. É bastante razoável que estes indivíduos, apresentem uma procedência provável nos registros das Instituições que podem não revelar a sua verdadeira origem.

A possibilidade de hibridação entre *L. tigrinus* e *O. geoffroyi* também torna-se extremamente viável, visto a existência de registros confirmados pela análise de DNAMt e sequenciamento de genes do cromossomo Y, de casos de hibridação entre *L. tigrinus* e *Lynchailurus colocolo* nas áreas de contato entre as duas espécies (JOHNSON *et al.* 1999). É possível que a existência de eventos de hibridação, ou até mesmo de zonas híbridas, seja um fato razoavelmente comum entre os felídeos de pequeno porte da região neotropical.

A existência de uma possível hibridação entre as duas espécies pode nunca ter sido sugerida por outros estudos moleculares, devido à falta de uma amostragem mais concentrada nas regiões de contato entre as duas espécies. A confirmação exata destes eventos deve ser realizada através da caracterização genética das duas espécies pela análise de outros marcadores moleculares, como seqüências de segmentos do DNAMt e de genes localizados em diferentes autossomos e nos cromossomos X e Y, incluindo uma boa amostragem das regiões de contato entre elas, assim como de toda sua distribuição geográfica. Além da análise molecular, a avaliação de uma possível zona híbrida entre as duas espécies deve ser melhor avaliada por estudos mais aprofundados

sobre a ocorrência geográfica exata de cada uma das espécies, da amplitude das áreas de contato entre elas e de suas relações ecológicas e padrões morfológicos nestas em comparação a áreas fora do contato.

Se houver, realmente, a confirmação da existência de hibridação entre as espécies, diversas outras análises serão necessárias para um melhor entendimento deste processo como: 1) a definição do tipo de hibridação, se casual ou com a manutenção de uma zona híbrida constante; 2) a investigação da existência de processos de introgressão avançados, se unidirecionais ou bidirecionais e em que magnitude; 3) a avaliação da viabilidade dos híbridos e suas características ecológicas e reprodutivas; 4) a definição das causas deste evento, se originados durante uma divergência primária ou após um contato secundário entre as duas espécies; e 5) a investigação de se a hibridação é resultado de eventos históricos de origem natural ou recentes de origem antropogênica (HARRISON, 1993; ALLENDORF *et al.*, 2001; BARTON, 2001; HEWITT, 2001).

### **5.3 Considerações sobre os Índices de Diferenciação Genética $F_{st}$ e $R_{st}$**

Uma das medidas mais adequadas da subdivisão populacional constitui na estatística  $F$  de WRIGHT (1965). Um grande número de estimadores baseados nesta estatística tem sido desenvolvidos.

As estimativas de diferenciação genética com a utilização de microssatélites podem ser resumidas em duas categorias extremas: os estimadores baseados em modelos de evolução IAM “Infinite Alleles Model” (KIMURA & CROW, 1964) e em modelos SMM “Stepwise Mutation Model” (KIMURA & OHTA, 1978). O modelo IAM de alelos infinitos assume que cada mutação origina um novo alelo não encontrado previamente na população, a uma dada taxa  $\mu$ . Neste caso, alelos idênticos compartilham a mesma ancestralidade e são idênticos por descendência. O modelo

SMM assume que cada mutação cria um novo alelo, que já poderia estar presente previamente na população (alelos idênticos por estado), tanto pela adição quanto pela deleção de uma ou mais unidades repetitivas, com uma probabilidade  $\mu/2$  em ambas as direções. Consequentemente, alelos de tamanhos muito diferentes serão mais distantemente relacionados do que alelos similares (KIMURA & CROW, 1964; KIMURA & OHTA, 1978). Além disso, este modelo considera a existência de homoplasias de tamanho, uma condição sob a qual alelos comigrantes de mesmo tamanho não são idênticos por descendência ou em seqüência de DNA entre diferentes indivíduos (CULVER *et al.*, 2001).

Tanto estimadores baseados em modelos IAM quanto SMM têm sido utilizados em estudos de estruturas populacionais com microssatélites, não havendo um consenso quanto ao melhor modelo a ser utilizado.

Os dois estimadores utilizados no presente trabalho representam os dois modelos evolutivos, sendo o  $F_{st}$  análogo de WEIR & COKERHAM (1984), assumindo o modelo de IAM e considerando somente a variância nas frequências alélicas e a identidade dos alelos, e o  $R_{st}$  de SLATKIN (1995a), o modelo SMM, considerando a variância no número de repetições e relacionando diferenças de tamanho a distâncias evolutivas entre os alelos.

Os locos de microssatélite parecem assumir, de modo geral, uma evolução do tipo SMM (VALDEZ *et al.*, 1993). Assumindo-se este modelo, as mutações em locos de microssatélite tenderiam a resultar em alelos com número de repetições similares aos alelos dos quais se originaram, gerando eventos de homoplasia que poderiam levar a uma subestimativa da real diferenciação entre as populações (SLATKIN, 1995a; GOLDSTEIN *et al.*, 1995). Neste caso os valores obtidos para  $R_{st}$  seriam mais adequados para a interpretação dos dados, ao considerarem a ocorrência destes eventos.



No entanto, o processo mutacional dos microssatélites ainda permanece não totalmente compreendido, existindo várias controvérsias quanto ao modelo a ser assumido, sendo que nenhum deles parece se ajustar perfeitamente a todos microssatélites (ESTOUP & CORNUET, 1999; BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002).

A aplicabilidade do modelo de mutação SMM para descrever a evolução dos alelos de microssatélite permanece em aberto, e mesmo sob estritas condições de “stepwise-mutation”, os valores obtidos para  $R_{st}$  ainda podem ser menos apropriados para a interpretação da diferenciação populacional do que os de  $F_{st}$ , devido à alta variância associada àqueles. Sob um modelo estrito de SMM,  $R_{st}$  irá gerar melhores resultados que o  $F_{st}$  ao reduzir-se a variância amostral, por exemplo, pelo aumento do número de populações amostradas, do número de indivíduos por população ou do número de locos analisados (GAGGIOTTI *et al.*, 1999; BALLOUX & GOUDET, 2002).

Os valores obtidos neste trabalho para a diferenciação populacional de *L. tigrinus* mostraram-se moderadamente distintos entre os índices  $R_{st}$  e  $F_{st}$ , com o último, na maioria das vezes, indicando níveis superiores de diferenciação com valores geralmente significantes. Como não há um consenso quanto ao melhor estimador a ser utilizado, a melhor alternativa consistiu a comparação crítica dos valores obtidos para os dois índices e da situação analisada, de maneira a obter as melhores informações sobre a estrutura genética das populações em questão (BALLOUX & LUGON-MOLIN, 2002).

A tendência geral quanto à melhor avaliação dos dois estimadores é de que para períodos curtos de tempo (na ordem de dezenas a centenas de gerações), onde os efeitos das mutações são mínimos e as diferenças nas frequências alélicas são determinadas principalmente pela deriva genética, os estimadores baseados no modelo IAM seriam os mais adequados. Para períodos de tempo mais longos, onde os efeitos das mutações

umentam, os estimadores segundo modelo SMM geram as medidas mais apropriadas (SLATKIN, 1995a; GOLDSTEIN *et al.*, 1995; MURRAY, 1996).

Levando-se em conta estes aspectos e considerando *L. tigrinus* como uma espécie evolutivamente jovem, cujas populações do Sudeste e Sul do Brasil parecem ter sofrido uma expansão bastante recente com base em dados do DNAm (JOHNSON *et al.*, 1999; E. EIZIRIK, com. pes.), os valores obtidos para Fst, assumindo modelo IAM seriam os mais adequados para a interpretação da estrutura populacional de *L. tigrinus*.

Os níveis de fluxo gênico e o grau de estruturação das populações também podem ser utilizados como auxiliares na interpretação dos valores obtidos. Segundo BALLOUX & GOUDET (2002), quando as populações apresentam-se fortemente estruturadas, com um nível restrito de fluxo gênico, os efeitos da mutação podem tornar-se importantes relativos a migração gerando valores de Rst mais adequados. Todavia, quando as populações estão fracamente estruturadas, com altos níveis de fluxo gênico, diluindo os efeitos das mutações, a melhor estimativa constituiria no Fst. (BALLOUX & LUGON-MOULIN, 2002).

Novamente, os dados obtidos e as informações disponíveis para *L. tigrinus* são condizentes à interpretação dos valores de Fst. Nossos resultados, tanto pela análise filogenética quanto Bayesiana, não revelaram uma estruturação populacional acentuada dentro da área estudada, sugerindo que estas populações de *L. tigrinus* são caracterizadas por uma história evolutiva recente e altos níveis de fluxo gênico.

Outro aspecto a ser considerado constitui a avaliação dos valores de Fst e Rst obtidos. SLATKIN (1995a) sugere a comparação destes valores, sendo que, se o modelo mutacional SMM aplicar-se melhor aos locos de microssatélite utilizados, os valores de Rst encontrados tenderão a ser maiores que os de Fst. Segundo esta informação, os locos analisados neste trabalho podem assumir um modelo de evolução IAM, visto que

a maioria dos valores de  $F_{st}$  foram mais elevados que os obtidos para  $R_{st}$ . Do mesmo modo, LUGON-MOULIN *et al.* (1999) relatam a ocorrência de valores de  $F_{st}$  maiores que os de  $R_{st}$  para populações com baixos níveis de diferenciação como as de *L. tigrinus*.

O tamanho da amostra utilizada também pode influenciar a interpretação dos resultados, sendo que GAGGIOTTI *et al.* (1999), ao comparar os índices  $F_{st}$  e  $R_{st}$ , concluíram que a performance relativa destes é dependente principalmente do tamanho amostral analisado, com  $F_{st}$  sendo o melhor estimador para amostras pequenas ( $n < 50$ ), o que adequada-se a nossos dados.

#### **5.4 Estrutura Genética de *Leopardus tigrinus***

As análises da estrutura genética em *L. tigrinus* não demonstraram fortes evidências de uma subdivisão maior da espécie dentro da área estudada.

Apesar de a primeira análise de definição da estrutura populacional, realizada incluindo a amostra total ( $n=54$ ), não ter gerado resultados satisfatórios pelo programa STRUCTURE, a segunda análise com a exclusão dos híbridos, revelou uma probabilidade extremamente alta da existência de apenas uma grande população ao longo da área estudada. A falta de resolução do número de populações na primeira análise pode ter sido provocada pela influência dos indivíduos considerados como prováveis híbridos com *O. geoffroyi*. Provavelmente, a presença das características genéticas de *O. geoffroyi* nos indivíduos considerados como híbridos tenha dificultado a definição do número de populações em *L. tigrinus*.

As análises filogenéticas realizadas corroboram os resultados encontrados pelo programa STRUCTURE, não indicando agrupamentos geográficos consistentes, com exceção de poucos indivíduos de localidades próximas, sugerindo altos níveis de fluxo gênico para esta espécie. O padrão obtido nas árvores filogenéticas aproxima-se de uma

filogenia do tipo estrela, com ramos curtos e pouca estruturação, característico de uma expansão populacional relativamente recente (AVISE, 2000). Da mesma maneira, a distribuição basicamente unimodal das frequências alélicas obtidas para todos os locos analisados corroboram este padrão de expansão demográfica (REICH & GOLDSTEIN, 1998).

Apesar da ausência de diferenciações populacionais profundas dentro da área estudada, a análise de diferentes cenários construídos de acordo com a distribuição geográfica das amostras obtidas revelou alguns níveis de diferenciação.

Os valores de  $F_{st}$  foram maximizados (tanto na análise com toda a amostra quanto com a exclusão dos híbridos) nos cenários que consideram as regiões Sul e Sudeste como populações distintas. Os valores de diferenciação, obtidos para estas comparações podem ser considerados de leves a moderados ( $0 < F_{st} < 0,15$ ) (HARTL & CLARK, 1997), o mesmo ocorrendo para os cenários considerando a divisão em estados. Esta diferenciação pode também ser verificada pelo número relativamente elevado de alelos exclusivos presentes nas populações Sul e Sudeste.

Considerando-se as comparações entre estados na amostra com exclusão dos possíveis híbridos, podemos observar um padrão sugestivo de isolamento pela distância, com os extremos da distribuição analisada, RS/SC e SP/RJ/ES diferenciando-se significativamente entre si e não em relação à população intermediária PR. Na análise incluindo toda a amostra este padrão não demonstra-se tão claro, principalmente devido aos valores significantes de  $F_{st}$  entre PR e SP/RJ/ES. Este pode claramente ter sido influenciado pelo agrupamento de Lti88, identificado como possível híbrido, à amostra do PR, principalmente considerando-se o pequeno tamanho amostral desta área.

As primeiras análises geradas com toda a amostra de *L. tigrinus* demonstram claramente a influência dos possíveis híbridos na definição da estrutura genética da

espécie. As comparações entre regiões revelaram valores maiores de  $F_{st}$  entre Sul e Sudeste quando a amostra do Centro-Oeste estava adicionada ao primeiro grupo, assim como uma maior diferenciação entre Sudeste e *O. geoffroyi*. A inclusão da amostra do Centro-Oeste ao grupo da região Sudeste diluiu a diferenciação genética entre todos os grupos. Neste caso, a existência de possíveis híbridos com *O. geoffroyi* nas regiões Sul e Centro-Oeste levou a uma homogeneidade maior entre estas populações e a uma maior diferenciação com o Sudeste, onde não foi detectada a existência de nenhum híbrido.

Na segunda análise (com a exclusão dos híbridos), os valores de diferenciação entre Sul e *O. geoffroyi* tornaram-se mais elevados, sendo considerados níveis moderados de diferenciação (HARTL & CLARK, 1997). No entanto, uma maior diferenciação entre *O. geoffroyi* e Sudeste permaneceu se comparada a *O. geoffroyi* e Sul. Estes resultados podem indicar a presença de maiores níveis de hibridação e introgressão entre as duas espécies que não foram detectados por nossas análises.

Infelizmente, o tamanho amostral extremamente reduzido da amostra restante do Centro-Oeste, após a exclusão dos híbridos, impediu uma avaliação mais detalhada da relação estrutural desta região dentro de *L. tigrinus*.

Estimativas do número de migrantes por geração ( $N_m$ ) entre as populações foram realizadas a partir dos índices  $F_{st}$  e  $R_{st}$ , obtendo-se valores altos, acima de 1, para todas as comparações. Entretanto, estes valores não podem ser interpretados corretamente neste caso, como uma medida de fluxo gênico, pois podem facilmente estar sendo superestimados ao considerarmos a existência de uma origem recente comum entre estas populações (TEMPLETON, 1998).

Apesar da forte carência em estudos ecológicos em ambiente selvagem para esta espécie, sendo praticamente desconhecidos seus hábitos na natureza, densidade, relações com outras espécies e requerimento de habitats (NOWELL & JACKSON, 1996),

algumas informações existentes quanto à sua biologia são coerentes com nossa inferência de altos níveis de fluxo gênico e ausência de uma estrutura genética bem definida dentro da área estudada.

Apesar de se acreditar que a espécie ocupe predominantemente áreas de florestas úmidas tropicais e subtropicais a níveis elevados acima de 100 metros do nível do mar (NOWAK, 1999), existem registros nos mais variados ambientes, incluindo florestas secundárias, cerrados, plantações abandonadas de eucaliptos, áreas próximas a plantações, urbanizações e altamente afetadas pelo desmatamento, além de áreas bastante baixas, principalmente ao nível do mar (OLIVEIRA, 1994; NOWELL & JACKSON, 1996; OLIVEIRA & CASSARO, 1999). A existência destes registros pode sugerir uma alta capacidade de dispersão ao longo de diferentes habitats e até mesmo uma certa tolerância a alterações ambientais. Além disso, considerando-se dados para outras espécies de felídeos, normalmente os integrantes desta família apresentam-se como dispersores a longas distâncias compreendendo grandes áreas de vida (OLIVEIRA, 1994; NOWELL & JACKSON, 1996).

De modo geral, o padrão de estrutura genética observado em *L. tigrinus* pode ser interpretado como resultado de uma recente expansão populacional da espécie dentro da área estudada, com um tempo e/ou barreiras insuficientes para extensiva diferenciação genética, acompanhado por altos níveis de fluxo gênico. Provavelmente a região analisada neste estudo compreenda uma grande população, apresentando apenas um isolamento dos indivíduos de áreas extremas pela distância geográfica existente entre eles.

## 5.5 Implicações para a Conservação

Nossos resultados apresentam implicações relevantes para a conservação e o manejo de *Leopardus tigrinus* tanto em ambiente selvagem quanto em cativeiro.

Os dados obtidos não indicaram a existência de partições geográficas históricas dentro da espécie, não tendo sido possível a identificação de Unidades Evolutivamente Significativas. No entanto, a obtenção de valores moderados de  $F_{st}$  entre os indivíduos provenientes das regiões Sul e Sudeste, gerando evidências de um padrão de isolamento pela distância, podem requerer certo cuidado no manejo destas populações, principalmente no caso da possibilidade de hibridação com *O. geoffroyi* em suas áreas de contato. Este cuidado é também apropriado considerando a possibilidade da existência de adaptações locais não detectadas por nossos marcadores (LYNCH, 1996).

A partir dos resultados obtidos, sugerimos que as populações das regiões Sul e Sudeste sejam consideradas pelo menos como Unidades de Manejo distintas, sendo a reprodução de indivíduos mantidos em cativeiro provenientes dos extremos desta distribuição, assim como a translocação destes, evitada, de maneira a manter a estrutura genética observada na natureza.

De modo geral, a distribuição da variabilidade genética em *L. tigrinus* parece não apresentar barreiras geográficas ou ecológicas significativas ao fluxo gênico, sendo necessária a consideração destes aspectos na elaboração de estratégias para a conservação da espécie e de seus habitats. A manutenção e proteção das áreas florestais remanescentes ao longo desta área que podem funcionar como corredores de dispersão entre os indivíduos de localidades diferentes, associado a um estudo aprofundado dos requerimentos específicos de habitat pela espécie e seus padrões de dispersão e tolerância a alterações ambientais, são fundamentais para uma melhor estratégia de conservação.

Associado a estes aspectos, torna-se de fundamental importância a investigação minuciosa da existência de possíveis zonas híbridas entre *L. tigrinus* e *O. geoffroyi*. Nossos dados fornecem fortes evidências destes eventos, no entanto é necessário que diversos outros estudos, tanto moleculares quanto morfológicos e ecológicos, sejam conduzidas nestas duas espécies a fim de se desvendar estes processos.

Segundo ALLENDORF *et al.* (2001), dois tipos de estudo a respeito da hibridação entre espécies são de fundamental importância para sua conservação. O primeiro inclui a definição da causa destes eventos: será a hibridação entre *L. tigrinus* e *O. geoffroyi* um evento histórico e natural, ou recente e provocado pela alteração de seus habitats? A resolução desta questão pode ser complexa, mas é também crucial para a elaboração de estratégias específicas de manejo e conservação.

A hibridação ocorrendo naturalmente não necessariamente provoca impactos negativos na persistência das espécies, sendo neste caso considerada como um processo evolutivo natural, constando como parte do legado histórico das espécies (WAYNE & BROWN, 2001). Centenas de zonas híbridas têm sido documentadas em vertebrados, sendo a maioria delas de distribuição reduzida se comparada à distribuição geográfica total das espécies hibridizantes (HARRISON, 1993).

A hibridação torna-se um problema para a conservação se for provocada por mudanças no habitat ou na composição das espécies. Se realmente estes processos estiverem sendo causados por um contato secundário entre as duas espécies, provocados pela ação humana, medidas urgentes de manejo devem ser tomadas de maneira a impedir um comprometimento de suas histórias evolutivas e integridade genética (WAYNE & BROWN, 2001).

Casos de hibridação entre espécies de carnívoros provocados pela intervenção humana têm sido documentados, gerando medidas específicas de manejo, como por



exemplo, entre coiotes *Canis latrans* e lobos cinza *Canis lupus* devido a alterações em seus habitats e suas densidades relativas por programas de controle de predadores (WAYNE & BROWN, 2001).

O segundo tipo de estudo envolve a investigação da existência da fertilidade, vigor e adaptação local dos híbridos. Se estes constituírem indivíduos férteis, adaptados às condições locais, e acasalarem tanto entre si quanto com indivíduos parentais, após algumas gerações este processo pode levar a uma população na qual essencialmente todos os indivíduos são de origem híbrida. Com o avanço de sucessivas gerações na população, a proporção de indivíduos de origem híbrida pode aumentar progressivamente, enquanto que a proporção de indivíduos parentais decair, podendo levar a eventos de extinção local das populações puras (ALLENDORF *et al.*, 2001).

Como medidas imediatas para auxiliar no manejo e conservação de *O. geoffroyi* e *L. tigrinus*, sugerimos que nenhum indivíduo proveniente das áreas de contato entre as duas espécies seja utilizado em programas de reprodução em cativeiro, até que haja um maior esclarecimento desta questão. A reprodução de indivíduos provenientes destas áreas de contato com indivíduos de áreas mais distantes pode acentuar os efeitos de uma zona de hibridação, se esta for natural, o que não seria condizente com a história evolutiva das espécies. No caso de uma zona de hibridação provocada pela alteração de habitats, a realização de tais acasalamentos seria mais drástica ainda, pois estaríamos acentuando um processo não natural, de maneira irreversível e de profundas conseqüências negativas para a conservação destas espécies, como a erosão de suas integridades genéticas.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

Preocupações com a conservação da biodiversidade representam também a conservação da diversidade genética, que constitui o foco central da Genética da Conservação. Estudos realizados nesta área têm gerado informações preciosas e aplicáveis diretamente no manejo e conservação das espécies, tanto em ambiente selvagem quanto em cativeiro.

*Leopardus tigrinus* constitui uma das espécies mais desconhecidas dentre os felídeos da Região Neotropical. Atualmente, a espécie encontra-se ameaçada principalmente pela destruição dos ambientes naturais onde ocorre. Além disso, a definição de estratégias adequadas para sua conservação é dificultada pela falta de conhecimentos específicos sobre seus hábitos na natureza, densidade, estrutura populacional e requerimento específico de habitats.

Com o objetivo de se avaliar os níveis de variabilidade e estrutura genética das populações de *L. tigrinus* nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste do Brasil de maneira a auxiliar em programas de conservação da espécie, foram analisados oito locos de microssatélite em 54 indivíduos provenientes da natureza ou de cativeiro. A análise envolveu ainda 20 indivíduos de *Oncifelis geoffroyi*, espécie proximamente relacionada a *L. tigrinus*, provenientes basicamente do Estado do Rio Grande do Sul, a serem utilizados como grupo externo nas análises populacionais e como comparação dos níveis de diversidade genética interespecíficos.

Foram encontrados níveis semelhantes e relativamente altos de diversidade genética para as duas espécies, sendo estes levemente maiores para *L. tigrinus*. Nossos resultados revelaram uma grande similaridade genética nestes marcadores entre *L. tigrinus* e *O. geoffroyi*.

Análises utilizando métodos Bayesianos para alocar indivíduos a suas populações de origem, identificaram nove espécimes de *L. tigrinus* com ancestralidade significativa em *O. geoffroyi*. Estes indivíduos, considerados como possíveis híbridos entre as duas espécies, foram retirados das análises gerando uma maior diferenciação genética entre *L. tigrinus* e *O. geoffroyi*. Provavelmente, as características miscigenadas encontradas nos possíveis híbridos estariam provocando uma maior homogeneização genética entre as duas espécies.

Os nove indivíduos identificados como possíveis híbridos apresentaram em sua maioria, procedências geográficas compatíveis a uma zona de hibridação. Cinco destes foram provenientes da região central do Estado do Rio Grande do Sul, onde é comprovado o contato entre as duas espécies; três da região central do Brasil, onde a ocorrência de *O. geoffroyi* não é confirmada, mas as características da vegetação local propiciam sua dispersão; e um indivíduo proveniente do Paraná, sendo possivelmente explicado por uma procedência geográfica incorreta.

A análise da estrutura populacional de *L. tigrinus* revelou um padrão esperado para populações que sofreram com uma recente expansão demográfica, com um tempo e/ou barreiras insuficientes para gerar uma estruturação populacional extensiva. No entanto, diferenciações moderadas detectadas entre indivíduos provenientes das regiões Sul e Sudeste do Brasil indicam um padrão de isolamento pela distância dentro da área estudada. Comparações entre populações de *L. tigrinus* e *O. geoffroyi* com a exclusão dos nove indivíduos considerados como híbridos indicam ainda haver uma maior similaridade entre indivíduos provenientes da região Sul do país do que da região Sudeste a *O. geoffroyi*, sugerindo que os eventos de hibridação entre estas espécies possam apresentar maior magnitude do que a detectada neste trabalho.

Podemos concluir, a partir dos resultados obtidos, que *L. tigrinus* apresenta-se como uma espécie evolutivamente recente, com moderados níveis de variabilidade genética, altos níveis de fluxo gênico e sem uma diferenciação populacional histórica significativa. A estrutura genética dentro de *L. tigrinus* nesta área parece ser recente e provocada principalmente pelo isolamento dos indivíduos de localidades extremas pela distância geográfica, e pela influência de possíveis eventos de hibridação com *O. geoffroyi* em suas áreas de contato.

Para fins de manejo, as populações das regiões Sul e Sudeste podem ser consideradas como Unidades de Manejo distintas, sendo evitados os cruzamentos e translocações entre indivíduos provenientes das áreas extremas desta distribuição.

Para a conservação das duas espécies em questão, é extremamente necessária a condução de estudos mais aprofundados que esclareçam os padrões de hibridação entre *L. tigrinus* e *O. geoffroyi*, sendo sugerido como medida imediata que nenhum indivíduo proveniente das áreas de contato entre as duas espécies seja utilizado em programas de reprodução em cativeiro até que estes padrões estejam resolvidos de forma mais detalhada.

## 7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

Conservation of biodiversity includes conservation of the genetic diversity, which is the focus of Conservation Genetics. Studies in such discipline have provided important information that can be applied directly to the management and conservation of species in their natural environment as well as in captive state.

*Leopardus tigrinus* constitutes one of the most unknown species of Felidae in the Neotropical region. Nowadays, this species is endangered due to the destruction of its habitats. Moreover, the definition of adequate strategies for its conservation is difficult because of the lack of specific knowledge about their behavior in natural environment, population density and structure and even requirements in terms of habitat.

The main goal of the present work was to investigate the population structure and genetic variability of populations of *L. tigrinus* in the South, South-East and Middle-West regions of Brazil in order to provide informational support for programs concerning the conservation of this species. We examined eight loci of microsatellite DNA in 54 individuals. Material was collected either from specimens in their natural environment or in captive state. The analysis involved also 20 individuals from *Oncifelis geoffroyi*, species closely related to *L. tigrinus*, which were collected in Rio Grande do Sul state, and used as an outgroup in the population analysis as well as to determine the levels of interspecific genetic diversity.

We found high levels of genetic diversity that are similar for these two species, being slightly larger in *L. tigrinus*. Our results showed also that there is high genetic similarity between these molecular markers in *L. tigrinus* and *O. geoffroyi*.

Analysis using Bayesian methods to link individuals to their original populations allowed us to identify nine specimens of *L. tigrinus* with significant ancestors in common with *O. geoffroyi*. These individuals were considered as possible hybrids

between the two species and were excluded from the analyses, which caused a greater genetic differentiation between *L. tigrinus* and *O. geoffroyi*. The mixed characteristics found in the possible hybrids were probably introducing a greater genetic homogenization between the two species.

Almost all the nine individuals identified as possible hybrids came from geographic regions that are compatible to hybrid zones. Five individuals considered as hybrids came from the central region of Rio Grande do Sul, where for sure there is contact between the two species; three specimens came from the Brazilian central region, where the occurrence of *O. geoffroyi* is not confirmed, but the local vegetation provides favorable conditions for the species dispersion; finally, one exemplar was from Paraná, and is likely to have a wrong collection site recorded.

The analysis of population structure of *L. tigrinus* revealed a pattern that is typical for populations that have undergone recent population expansion, without enough time and/or barriers to restructure the population extensively. However, moderate differences detected in individuals from the Brazilian South and South-East regions indicate a distance isolation pattern. Comparison of *L. tigrinus* and *O. geoffroyi* populations (excluding the nine possible hybrids) indicate that *O. geoffroyi* has higher similarity with individuals from the South region than with southeastern specimens. This suggests that hybridization events between these species may present a larger magnitude than that was detected in this work.

Our results allow concluding that *L. tigrinus* can be considered a recent species, with moderate levels of genetic variability, high levels of gene flow and lacking a historical population differentiation. The genetic structure of *L. tigrinus* in the studied area seems to be recent and caused by the isolation of individuals in geographically

distant localities, as well as by the influence of hybridization events with *O. geoffroyi* in the contact areas.

Regarding management, populations in the South and South-East regions can be considered as Management Units, thus avoiding the contact and translocations between individuals from areas that are far from each other in this distribution.

For the conservation of these two species, further studies are needed in order to clarify the hybridization patterns between *L. tigrinus* and *O. geoffroyi*, being strongly suggested that no specimen coming from the contact areas be used in reproduction programs with captive animals until these patterns are well established.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALLENDORF, F.W.; LEARY, R.F.; SPRUELL, P. & WENBURG, J.K. 2001. The problem with hybrids: setting conservation guidelines. *Trends in Ecology and Evolution*, 16 (11): 613-622.
- AMOS, W. & BALMFORD, A. 2001. When does conservation genetics matter? *Heredity*, 87: 257-265.
- AVISE, J.C. 1994. **Molecular Markers, Natural History and Evolution**. Chapman & Hall, New York. 511p.
- AVISE, J.C. 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology* 7:371-379.
- AVISE, J.C. 2000. **Phylogeography – The History and Formation of Species**. Harvard University Press, London, England. 447p.
- BAKER, C.S. & PALUMBI, S.R. 1996. Population structure, molecular systematics, and forensic identification of whales and dolphins. 10-49p. In: AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L (Eds.) **Conservation Genetics – Case Histories from Nature**. Chapman & Hall, New York. 512p.
- BALLOUX, F. & GOUDET, J. 2002. Statistical properties of population differentiation estimators under stepwise mutation in a finite island model. *Molecular Ecology*, 11: 771- 783.
- BALLOUX, F. & LUGON-MOULIN, N. 2002. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 11: 155- 165.
- BARONE, M.A.; ROELKE, M.E.; HOWARD, J.; BROWN, J.L; ANDERSON, A.E. & WILDT, D.E. 1994. Reproductive characteristics of male florida panthers: comparative studies from Florida, Texas, Colorado, Latin America and North American zoos. *Journal of Mammalogy*, 75(1):150-162.
- BARTON, N.H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10: 551- 568.
- BEUAMONT, M.; BARRAT, E.M.; GOTTELLI, D.; KITCHENER, A.C.; DANIELS, M.J.; PRITCHARD, J.K. & BRUFORD, W. 2000. Genetic diversity and introgression in the Scottish wildcat. *Molecular Ecology*, 10: 319-336.
- BERMINGHAM, E. & MORITZ, C. 1998. Comparative phylogeography: concepts and applications. *Molecular Ecology* 7: 367- 369.



- BOWEN, B.W. & AVISE, J.C. 1996. Conservation genetics of marine turtles. 190-237p. In: AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L (Eds.) **Conservation Genetics – Case Histories from Nature**. Chapman & Hall, New York. 512p.
- BRUFORD, M.W. & WAYNE, R.K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. **Current Opinion Genetics and Development**, 3: 939-943.
- CIOFI, C. & BRUFORD, M.W. 1999. Genetic structure and gene flow among komodo dragon populations inferred by microsatellite loci analysis. **Molecular Ecology**, 8, Suppl.:S17-S30.
- COLLIER, G.E. & O'BRIEN, S.J. 1985. A molecular phylogeny of the Felidae: immunological distance. **Evolution** 39: 473-487.
- CONSTABLE, J.L.; ASHLEY, M.V.; GOODALL, J. & PUSEY, A.E. 2001. Noninvasive paternity assignment in Gombe chimpanzees. **Molecular Ecology**, 10: 1279-1300.
- CONRAD, K.F., JOHNSTON, P.V.; CROSSMAN, B.K.; ROBERTSON, R.J.; WHEELWRIGHT, N.T. & BOAG, P.T. 2001. High levels of extra-pair paternity in an isolated, low density, island population of three swallows (*Trachycineta bicolor*). **Molecular Ecology**, 10: 1301-1308.
- CRNOKRAK, P. & ROFF, D.A. 1999. Inbreeding depression in the wild. **Heredity**, 83: 260-270.
- CULVER, M.; JOHNSON, W.E.; PECON-SLATERRY, J. & O'BRIEN, S.J. 2000. Genomic ancestry of the American pumas (*Puma concolor*). **Journal of Heredity**, 91: 186-197.
- CULVER, M.; MENOTTI-RAYMOND, M.A. & O'BRIEN, S.J. 2001. Patterns of size homoplasy at 10 microsatellite loci in pumas (*Puma concolor*). **Molecular Biology and Evolution**, 18(6): 1151- 1156.
- DALLAS, J.F.; MARSHALL, F.; PIERTNEY, S.B.; BACON, P.J. & RACEY, P.A. 2002. Spatially restricted gene flow and reduced microsatellite polymorphism in the Eurasian otter *Lutra lutra* in Britain. **Conservation Genetics**, 3:15-29.
- DAVIS, L.M.; GLENN, T.C.; ELSEY, R.M.; DESSAUER, H.C. & SAWYER, R.H. 2001. Multiple paternity and mating patterns in the American alligator, *Alligator mississippiensis*. **Molecular Ecology**, 10: 1011-1024.

- DIMMICK, W.W.; GHEDOTTI, M.J.; GROSE, M.J.; MAGLIA, A.M.; MEINHARDT, D.J. & PENNOCK, D.S., 2001. The evolutionary significant unit and adaptive criteria: a response to Young. **Conservation Biology**, 15 (3): 788-790.
- DOBZHANSKY, T.; AYALA, F.J.; STEBBINS, G.L. & VALENTINE, J.W. 1977. **Evolution**. W.H. Freeman and Company, San Francisco, California. 572p.
- EISENBERG, J.F. 1989. An introduction to the Carnivora. 1-9p. In: GITTLEMAN, J.L. (Ed.) **Carnivore Behavior, Ecology and Evolution**. Cornell University Press. Ithaca, New York. 620p.
- EISENBERG, J.F. & REDFORD, K.H. 1999. **Mammals of the Neotropics – The Central Neotropics**. Vol.3. University Chicago Press, London. 609p.
- EIZIRIK, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação, e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. **Braslian Journal of Genetics** 19, Suppl.: 23-29.
- EIZIRIK, E.; BONATTO, S.L.; JOHNSON, W.E.; CRAWSHAW, P.G. Jr.; VIÉ, J.C.; BROUSSET, D.M.; O'BRIEN, S.J. & SALZANO, F.M. 1998. Phylogeographic patterns and mitochondrial DNA control region evolution in two Neotropical cats (Mammalia, Felidae). **Journal of Molecular Evolution**, 47: 613-624.
- EIZIRIK, E.; KIM, J.; MENOTTI-RAYMOND, M.; CRAWSHAW, P.G.JR; O'BRIEN, S.J. & JOHNSON, W.R. 2001. Phylogeography, population history and conservation of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). **Molecular Ecology** 10: 65-79.
- EMMONS, L.H. & FEER, F. 1997. **Neotropical Rainforest Mammals: a Field Guide**. University of Chicago Press, Chicago. 380p.
- ERNEST, H.B., PENEDO, C.T., MAY, B.P., SYVANEN, M. & BOYCE. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. **Molecular Ecology**, 9: 433-441.
- ESTOUP, A. & CORNUET, J-M. 1999. Microsatellite evolution: inferences from population data. 49-65p. In: GOLDSTEIN, D.B. & SCHLÖTTERER, C. **Microsatellites – Evolution and Applications** (Eds.). Oxford University Press, New York. 352p.
- EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. & QUATTRO, J. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, 131: 479- 491.

- FELSENSTEIN, J. 1993. **Phylip 3.5**. Washington University, Seattle.
- GAGGIOTTI, O.E.; LANGE, O.; RASSMAN, K. & GLIDDON, C.A. 1999. Comparison of two indirect methods for estimating average levels of gene flow using microsatellite data. **Molecular Ecology**, 8: 1513- 1520.
- GARCIA-RODRIGUEZ, A.I.; BOWEN, B.W.; DOMNING, D.; MIGNUCCI-GIANNONI, A.A.; MARMONTEL, M.; MONTOYA-OSPINA, R.A.; MORALES-VELA, B.; RUDIN, M.; BONDE, R.K. & MCGUIRE, P.M. 1998. Phylogeography of the West Indian manatee (*Trichechus manatus*): how many populations and how many taxa? **Molecular Ecology**, 7: 1137-1149.
- GARNIER, J.N.; BRUFORD, M.W. & GOOSSENS, B. 2001. Mating system and reproductive skew in the black rhinoceros. **Molecular Ecology**, 10:2031-2041.
- GOLDSTEIN, D.B.; LINARES, A.R.; CAVALLI-SFORZA, L.L. & FELDMAN, M.W. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. **Genetics**, 139: 463- 471.
- GRATIVOL, A.D.; BALLOU, J.D. & FLEISCHER, R.C. 2001. Microsatellite variation within and among recently fragmented populations of the golden lion tamarin (*Leontopithecus rosalia*). **Conservation Genetics**, 2: 1-9.
- GUO, S. & THOMPSON, E. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, 48: 361-372.
- HAIG, S.M. & AVISE, J.C. 1996. Avian conservation genetics. 160-189p. In: AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L (Eds.) **Conservation Genetics – Case Histories from Nature**. Chapman & Hall, New York 512p.
- HARE, M.P. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. **Trends in Ecology and Evolution**, 16(2): 700-706.
- HARRISON, R.G. 1993. **Hybrid Zones and Evolutionary Process**. Oxford University Press, New York. 364p.
- HARTL, D.L. & CLARK, J. 1997. **Principles of Populations Genetics**. Sinauer Associates, Sunderland. 448p.
- HEWITT, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. **Molecular Ecology**, 10: 536- 549.
- HILLIS, D.M.; MABLE, B.K.; LARSON, A.; DAVIS, S.K. & ZIMMER, E.A. 1996. Nucleic Acids IV: Sequencing and Cloning. 321-381p. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C. & MABLE, B.K. (Eds.). **Molecular Systematics**. 2<sup>nd</sup> edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA. 655p.

- JACKSON, P. 1992. The status and conservation of wild cats. 13-36p. In: **Felinos de Venezuela – Biología, Ecología y Conservación**. Raul Clemente Editores C.A. Valencia, Venezuela. 316p.
- JOHNSON, W.E.; DRATCH, P.A.; MARTENSON, J.S. & O'BRIEN, S.J. 1996. Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of Felidae using mitochondrial restriction fragment length polymorphism variation. **Journal of Mammalian Evolution**, 3 (2): 97-120p.
- JOHNSON, W.E. & O'BRIEN, S.J. 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. **Journal of Molecular and Evolution** 44 (Suppl 1): S98-S116.
- JOHNSON, W.E.; CULVER, M.; IRIARTE, J.A.; EIZIRIK, E.; SEYMOUR, K.L. & O'BRIEN, S.J. 1998. Tracking the evolution of the elusive andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. **The Journal of Heredity**, 89(3): 227-232.
- JOHNSON, W.E.; PECON-SLATTERY, J.; EIZIRIK, E.; KIM, J.H.; MENOTTI-RAYMOND, M.; BONACIC, C.; CAMBRE, R.; CRAWSHAW, P.; NUNES, A.; SEUÁNEZ, H.N.; MOREIRA, M.A.M.; SEYMOUR, K.L.; SIMON, F.; SWANSON, W. & O'BRIEN, S.J. 1999. Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. **Molecular Ecology**, 8, Suppl.: S79-S92.
- KASHI, Y., KING, D. & SOLLER, M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. **Trends in Genetics**, 13(2): 74-77.
- KELLER, L.F. & WALLER, D.M. 2002. Inbreeding effects in wild populations. **Trends in Ecology and Evolution**, 17(5): 230-241.
- KIM, J-H.; EIZIRIK, E.; O'BRIEN, S.J. & JOHNSON, W.E. 2001. Structure and patterns of sequence variation in the mitochondrial DNA control region of the great cats. **Mitochondrion**, 14: 279-292.
- KIMURA, M. & CROW, J.F. 1964. The number of alleles that can be maintained in a finite population. **Genetics**, 49: 725- 738.
- KIMURA, M. & OHTA, T. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 75: 2868- 2872.
- KING, T.L. & BURKE, T. 1999. Special issue on gene conservation: identification and management of genetic diversity. **Molecular Ecology** 8, S1-S3.

- KITCHENER, A. 1991. **The Natural History of the Wild Cats**. Cornell University Press. Ithaca, New York. 280p.
- LACY, R.C. 1997. Importance of genetic variation to the viability of mammalian populations. **Journal of Mammalogy**, 78 (2):320-335.
- LAIRD, P.W.; ZIJDERVELD, A.; LINDERS, K.; RUDNICKI, M.A.; JAENISCH, R.; BERNIS, A. 1991. Simplified mammalian DNA isolation procedure. **Nucleic Acids Research**, 19: 4293.
- LU, Z., JOHNSON, W.E., MENOTTI-RAYMOND, M., YUHKI, N.; MARTENSON, J.S.; MAINKA, S.; SHI-QIANG, H.; ZHIHE, Z.; LI, G.; PAN, W.; MAO, X. & O'BRIEN, S.J. 2001. Patterns of genetic diversity in remaining giant panda populations. **Conservation Biology**, 15(6): 1596-1607.
- LUGON-MOULIN, N.; BRÜNNER, H.; WYTTENBACH, A., HAUSSER, J. & GOUDET, J. 1999. Hierarchical analysis of genetic differentiation in a hybrid zone of *Sorex araneus* (Insectivora, Soricidae). **Molecular Ecology**, 8: 419- 431.
- LYNCH, M. 1996. A quantitative genetic perspective in conservation issues. 471- 501p. In: AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L. (Eds.) **Conservation Genetics – Case Histories from Nature**. Chapman & Hall, New York.
- MARTIN, L.D. 1989. Fossil history of the terrestrial carnivora. 536-568p. In: GITTLEMAN, J.L. (Ed.) **Carnivore Behavior, Ecology and Evolution**. Cornell University Press. Ithaca, New York. 620p.
- MASUDA, R.; LOPEZ, J.V.; SLATERRY, J.P.; YUHKI, N. & O'BRIEN, S.J. 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, 6 (3): 351-365.
- MATTERN, M.Y. & MCLENNAN, D.A. 2000. Phylogeny and speciation of felids. **Cladistics**, 16: 232-253.
- MEDRANO, J.F.; AASEN, E. & SHARROW, L. 1990. DNA extraction from nucleated red blood cells. **Biotechniques**, 8.
- MENOTTI-RAYMOND, M.M. & O'BRIEN, S.J. 1995. Evolutionary conservation of ten microsatellite loci in four species of Felidae. **The Journal of Heredity**, 86: 319-322.
- MENOTTI-RAYMOND, M.M.; DAVID, V.A.; LYONS, L.A.; SCHÄFFER, A.A.; TOMLIN, J.F.; HUTTON, M.K. & O'BRIEN, S.J. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). **Genomics**, 57: 9-23.

- MINCH, E. 1997. **Microsat 1.5d**. Stanford University, <http://lotka.stanford.edu/microsat.html>.
- MORIN, P.A, MOORE, J.J., CHAKRABORTY, R. JIN, L.,GOODALL, J. & WOODRUFF, D.S. 1994. Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. **Science**, 265: 1193-1201.
- MORITZ, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. **Trends in Ecology and Evolution**, 9: 373- 375.
- MORITZ, C. & FAITH, D. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. **Molecular Ecology** 7: 419-429.
- MURRAY, B.W. 1996. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. <http://helix.biology.mcmaster.ca//brent>. [Capturado]. 2 Novembro 2000.
- NADER, W., WERNER, D. & WINK, M. 1998. Genetic diversity of scarlet macaws *Ara macao* in reintroduction studies for threatened populations in Costa Rica. **Biological Conservation**, 87: 269-272.
- NESJE, M.; ROED, K.H.; LIFJELD, J.T.; LINDBERG, P. & STEENS, O.F. 2000. Genetic relationships in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. **Molecular Ecology**, 9: 53-60.
- NEI, M. 1987. **Molecular Evolutionary Genetics**. Columbia University Press, New York. 512p.
- NOWAK, R.M. 1999. **Walker’s Mammals of the World**. Vol. 2, 6<sup>th</sup> edition. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. 1936p.
- NOWELL, K. & JACKSON, P. 1996. **Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan**. IUCN, Gland, Switzerland. 406p.
- O’BRIEN, S.J.; WILDT, D.E.; GOLDMAN, D.; MERRIL, C.R. & BUSH, M. 1983. The cheetah is depauperate in genetic variation. **Science**, 221: 459-462.
- O’BRIEN, S.J.; ROELKE, M.E.; MARKER, L.; NEWMAN, A.; WINKLER, C.A.; MELTZER, D.; COLLY, L. EVERMANN, J.F. BUSH, M. & WILDT, D.E. 1985. Genetic basis for species vulnerability in the cheetah. **Science**, 227: 1428-1434.
- O’BRIEN, S.J.; WILDT, D.E. & BUSH, M. 1986. The cheetah in genetic peril. **Scientific American**, 254: 68-76.
- O’BRIEN, S.J.; MARTENSON, J.S.; PACKER,C.; HERBST, L.; DE VOS, V.; JOSLIN, P.; OTT-JOSLIN, J.; WILDT, D.E. & BUSH, M. 1987. Biochemical

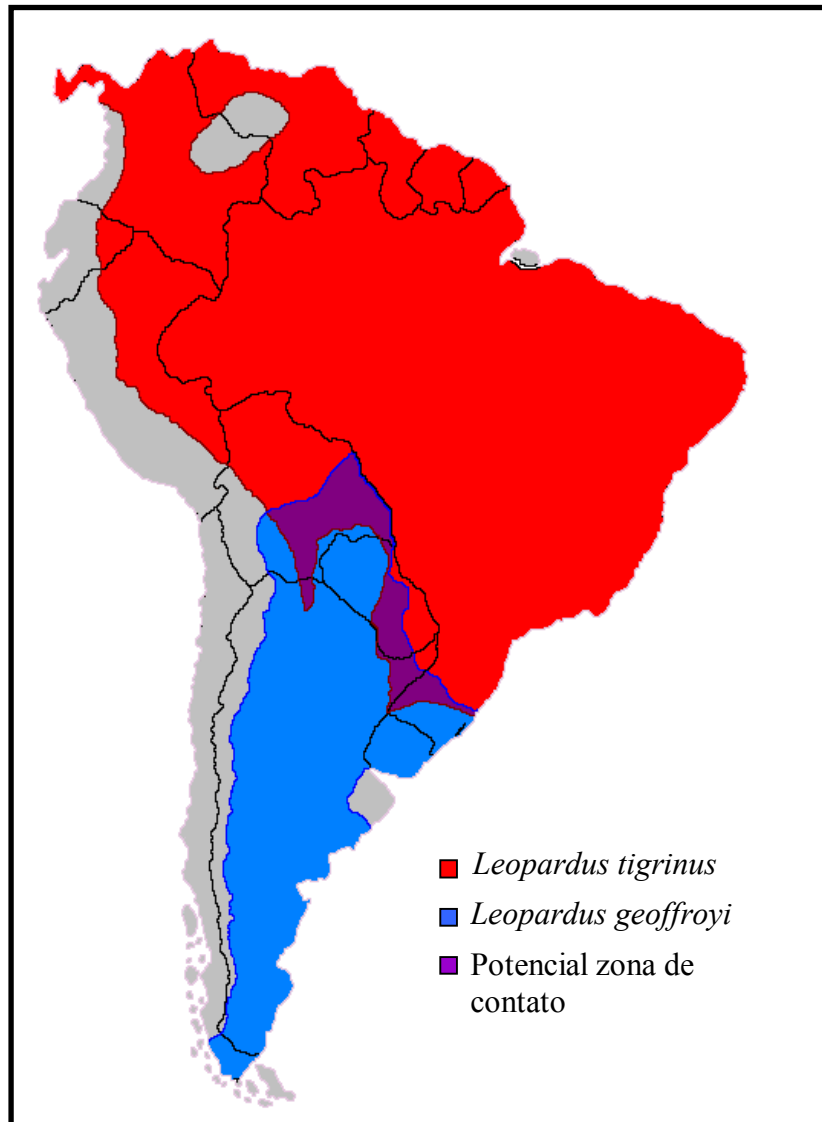
- genetic variation in geographic isolates of african and asiatic lions. **National Geographic Research**, 3(1): 114-124.
- O'BRIEN, S.J. & MAYR, E. 1991. Bureaucratic mischief: reconizing endangered species and subspecies. **Science**, 251: 1187-1188.
- O'BRIEN, S.J. 1994. Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. **Annual Review of Genetics**, 28: 467-489.
- OLIVEIRA, T.G. 1994. **Neotropical Cats: Ecology and Conservation**. EDUFMA, São Luís. 244p.
- OLIVEIRA, T.G. & CASSARO, K. 1999. **Guia de Identificação dos Felinos Brasileiros**. 2<sup>a</sup> ed. Sociedade de Zoológicos do Brasil, São Paulo. 60p.
- OTHA, T. 1982. Linkage disequilibrium due to random genetic drift in finite subdivided populations. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA**, 79: 1940- 1944.
- PALUMBI, S.; MARTIN, A.; ROMANO, S.; McMILLAN, W.O.; STICE, L.; GRABOWSKI, G. 1991. **The simple fool's guide to PCR, version 2.0**. Dept. of Zoology, University of Hawaii, Honolulu.
- PALUMBI, S.R. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. 205-247p. In: HILLIS, D.M.; MORITZ, C. & MABLE, B.K (Eds.). **Molecular Systematics**. 2<sup>nd</sup> edition. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, USA.
- PECON-SLATERRY, J.; JOHNSON, W.E.; GOLDMAN, D. & O'BRIEN, S.J. 1994. Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. **Journal of Molecular Evolution**, 39: 296-305.
- PECON-SLATERRY, J. & O'BRIEN, S.J. 1998. Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. **Genetics**, 148: 1245-1255.
- POSADAS, P.; ESQUIVEL, D.R.M. & CRISCI, J.V. 2001. Using phylogenetic diversity measures to set priorities in conservation: an example from southern South America. **Conservation Biology**, 15 (5): 1325-1334.
- PRIMACK, R.B. & RODRIGUES, E. 2001. **Biologia da Conservação**. Gráfica e Editora Midiograf, Londrina, Paraná. 327p.
- PRITCHARD, J.K.; STEPHENS, M. & DONNELLY, P.J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155: 945-959.
- RANDI, E. & LUCCHINI, V. 2002. Detecting rare introgression of domestic dog genes into wild wolf (*Canis lupus*) populations by Bayesian admixture analyses of microsatellite variation. **Conservation Genetics**, 3: 31-45.

- RAYMOND, M. & ROUSSET, F. 1995. Genepop (version 1.2): Population genetics software for exact test and ecumenicism. **Journal of Heredity**, 86: 248-249.
- REICH, D.E. & GOLDSTEIN, D.B. 1998. Genetic evidence for a paleolithic human population expansion in Africa. **Proceedings of the national Academy of Sciences of the USA**, 95: 8119- 8123.
- RICE, W.R. 1989. Analysing tables of statistical tests. **Evolution**, 43:223-225.
- RODRIGUES, A.S.L. & GASTON, K.J. 2002. Maximising phylogenetic diversity in the selection of networks of conservation areas. **Biological Conservation**, 105: 103-111.
- SAITOU, N. & NEI, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. **Molecular Biology and Evolution**, 4: 406-425.
- SANDELL, M. 1989. The mating tactics and spacing patterns of solitary carnivores. 164-182p. In: GITTLEMAN, J.L. (Ed.) **Carnivore behavior, ecology and evolution**. Cornell University Press. Ithaca, New York. 620p.
- SCHLÖTHERER, C. 1998. Microsatellites. 237-261p. In: HOELZEL, A.R. (Eds.). **Molecular Genetic Analysis of Populations: a Practical Approach**. 2<sup>nd</sup> ed. Oxford University Press Inc., New York. 445p.
- SCHNEIDER, S.; KUEFFER, J.M.; ROESLI, D. & EXCOFFIER, L. 2000. **Arlequin ver. 2.1: A software for population genetic data analysis**. Genetic and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- SCHONEWALD-COX, C.M.; CHAMBERS, S.M.; MACBRYDE, B. & THOMAS, L. (Eds). 1983. **Genetics and Conservation – A Reference for Managing Wild Animal and Plant Populations**. Benjamin/Cummings, Menlo Park, California. 721p.
- SLATKIN, M., 1994. Gene flow and population structure. In: REAL, L.A. (Ed). **Ecological Genetics**. Princeton University Press. 238p.
- SLATKIN, M. 1995a. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. **Genetics**, 139: 457-462.
- SLATKIN, M. 1995b. Hitchhiking and associative overdominance at a microsatellite locus. **Molecular Biology and Evolution**, 47: 264-279.
- SPONG, G.; HELLBORG, L. & CREEL, S. 2000. Sex ratio of leopards taken in trophy hunting: genetic data from Tanzania. **Conservation Genetics**, 1: 169-171.



- SUCHENTRUNK, F.; HALLER, H. & RATTI, P. 1999. Gene pool variability of a eagle (*Aquila chrysaetos*) population from the Swiss Alps. **Biological Conservation**, 90: 151-155.
- TAYLOR, B.L. & DIZON, A.E. 1999. First policy then science: why management unit based solely on genetic criteria cannot work. **Molecular Ecology**, 8, Suppl.: S11-S16.
- TEGELSTROM, H. 1992. Detection of mitochondrial DNA fragments. 89-113p. In: HOELZEL, A.R. (Ed.) **Molecular Genetic Analysis of Populations**. IRL Press, Oxford. 445p.
- TEMPLETON, A.R. 1998. Nested clade analysis of phylogeographic data: testing hypotheses about gene flow and population history. **Molecular Ecology**, 7: 381-397.
- ÚJVÁRI, B.; MADSEN, T.; KOTENKO, T.; OLSSON, M.; SHINE, R. & WITZELL, H. 2002. Low genetic diversity threatens imminent extinction for the Hungarian meadow viper (*Vipera ursinii rakosiensis*). **Biological Conservation**, 105: 127-130.
- VALDEZ, A.M.; SLATKIN, M. & FREIMER, N.B. 1993. Allele frequencies at microsatellite loci: the stepwise mutation model revisited. **Genetics**, 133: 737-749.
- VILÀ, C.; AMORIM, I.R.; LEONARD, J.A.; POSADA, D.; CASTROVIEJO, J.; PETRUCCI-FONSECA, F.; CRANDALL, K.A.; ELLEGREN, H. & WAYNE, R.K. 1999. Mitochondrial DNA phylogeography and population history of the grey wolf *Canis lupus*. **Molecular Ecology** 8: 2089-2103.
- WAITS, L., TABERLET, P., SWENSON, J.E., SANDEGREN, F. & FRANZEN, R. 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctus*). **Molecular Ecology**, 9: 421-431.
- WAYNE, R.K., BENVENISTE, R.E., JANCZEWSKI, D.N. & O'BRIEN, S.J. 1989. Molecular and biochemical evolution of the Carnivora. 465-494p. In: GITTLEMAN, J.L. (Ed.) **Carnivore Behavior, Ecology and Evolution**. Cornell University Press. Ithaca, New York. 620p.
- WAYNE, R.K. 1996. Conservation genetics in the Canidae. 75-118p. In: AVISE, J.C. & HAMRICK, J.L (Eds.) **Conservation Genetics – Case Histories from Nature**. Chapman & Hall, New York. 512p.

- WAYNE, R.K. & BROWN, D.M. 2001. Hybridization and conservation of carnivores. 145-162p. In: GITTLEMAN, J.L.; FUNK, S.M. MacDONALD, D. & WAYNE, R.K. **Carnivore Conservation**. Cambridge University Press, Cambridge. 675p.
- WEIR, B.S. & COCKERHAM, C.C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38(6): 1358-1370.
- WILDT, D.E., BUSH, M., GOODROWE, K.L., PACKER, C., PUSEY, A.E., BROWN, J.L., JOSLIN, P. & O'BRIEN, S.J. 1987. Reproductive and genetic consequences of founding isolated lions populations. **Nature**, 329: 328-331.
- WOZENCRAFT, W.C. 1993. Felidae. 288-300p. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. (Eds.). **Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference**. 2<sup>nd</sup>. edition. Smithsonian Institution Press/American Society of Mammalogists, Washington. 1207p.
- WRIGHT, S. 1965. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating. **Evolution**, 19: 395- 420.
- WRIGHT, S., 1978. **Evolution and the Genetics of Populations**. The University of Chicago Press, London.
- WURSTER-HILL, D.H. & CENTERWALL, W.R. 1982. The interrelationships of chromosome banding patterns in canids, mustelids, hyena, and felids. **Cytogenetics Cell Genetics**. 34:178-192.



Anexo 1 – Distribuição geográfica de *Leopardus tigrinus* e *Oncifelis geoffroyi*.  
Modificado a partir de OLIVEIRA (1994) e EISENBERG & REDFORD (1999).

A)

Foto: Tadeu G. de Oliveira



B)

Foto: Cibele B. Indrusiak



Anexo 2 - A) *Leopardus tigrinus*; B) *Oncifelis geoffroyi*.