

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

**FILOGEOGRAFIA DE *Puma concolor* (CARNIVORA,  
FELIDAE) NA AMÉRICA DO SUL**

Eunice Moara Matte

**Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação  
em Genética e Biologia Molecular da  
Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
como requisito parcial do grau de Doutor em  
Ciências (Genética e Biologia Molecular).**

Orientador: Dr. Eduardo Eizirik

Co-orientador: Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Porto Alegre

Maio de 2012

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da Faculdade de Biociências da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul com apoio do Laboratório de Citogenética e Evolução do Departamento de Genética e Biologia Molecular do Instituto de Biociências da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e pela Companhia Energética de São Paulo (CESP).

Aos meus pais, Dulci e Nestor, por tudo que  
representam, por todo amor, carinho, força, apoio e  
confiança.

## **Agradecimentos**

Muito obrigada ao meu orientador Eduardo Eizirik, ou simplesmente Duda, pela oportunidade de trabalhar com os pumas, pela confiança, pela empolgação em cada vez que conversávamos sobre a pesquisa, pela força, pelo interesse e, principalmente, por acreditar em mim.

Obrigada ao Thales R. O. de Freitas, meu co-orientador, que acreditou no meu trabalho e que me acompanhou desde o final da graduação.

À Camila Castilho, Renata Miotto e Dênis Sana, meu agradecimento pelo apoio e parceria na pesquisa.

Agradeço ao Elmo pela inestimável amizade, atenção e solicitude em todos os momentos de pedido de ajuda. À Lucia Andréia Nunes e à Ellen Mezzeck, que também foram sempre muito atenciosas e muito parceiras.

Aos meus pais, Dulci e Nestor, por todo o exemplo de luta, de caráter, de confiança, de respeito, de amor pelos animais, pela vivência em laboratório quando pequena (algumas vezes quebrando as lâminas de exames) e pelo contato com pesquisa e com o ambiente acadêmico. Obrigada por toda a confiança, “injeções” de ânimo e por todo o suporte que precisei: muitíssimo obrigada. Amo vocês!

Ao Marcelo Giovano da Silva, ou Celo, meu namorado, obrigada por tudo: pelo carinho, pelo amor, pela parceria, pela paciência, por me ensinar a reclamar menos da vida e enfrentar as dificuldades sem muita lamentação e enrolação, pela força e confiança na minha capacidade e no meu trabalho, por todos os momentos de descontração e por todos os momentos de cobrança. Te amo!

À minha irmã Luciara, minha grande amiga, meu cunhado Rodrigo e meus

sobrinhos lindos e superespertos, Mariano e Murilo: obrigada por estarem sempre ao meu lado quando precisei! Talvez vocês não saibam da importância que tiveram em certos momentos da minha vida, além de já serem inerentemente importantes. E desculpem-me pela ausência no dia-a-dia e em muitos momentos importantes da vida.

Agradeço à Oma Wenita pelo exemplo de luta e de alegria. Oma, tu és um dos meus maiores exemplos!

À Vó Hilda (*in memoriam*) também pelo exemplo de luta e de amor ao próximo e por todo o tempo que passou cuidando de mim: muito obrigada!

Ao Opa Ernesto (*in memoriam*), obrigada pelo exemplo de persistência, de ir atrás dos sonhos e realizá-los.

Obrigada à minha família, pelo apoio, pelo carinho e por entender a ausência em muitos momentos. Obrigada Clóvis, Néssy, Lê, Fabi, Marcelinho, Dinda, Ney, Tia Laine, Tio Rui, Cristian, Eco, Sô...

À Nina, minha cadela e à Gilda, minha gata, ambas maluquinhas, obrigada por existirem. À Ucha e à Mintsi também.

Às pessoas mais que especiais, meus amigos-irmãos: Juliane Schiefelbain, Maíra Fortes Prates e Gabriel Macedo, obrigada por tudo: pela amizade, pelo carinho, por entender a ausência, por me dar energias, por tudo mesmo! Obrigada por existirem. Ah, e Ju, valeu por me aguentar! Valeu mesmo!

À família do Celo: D. Rose, Seu Chico, Lígia e Marcos, obrigada por todo o carinho.

Obrigada a todos os amigos de longa e “média” data: Bruna Racoski, Raquel Baraciol, Cristiane Wagner Goulart, Alois, Lu, D. Margarida, Gati, Karin, D. Iraci, Iran, Nini, Michele, Daia, Kátia, Suzy e Odon.

Aos amigos Aline Cardoso, Daniela Dalamico, Karina Lorenzatto, Daniel, Jô, Gilson, Sandra, Bruno, Seco, Matias, Major e o resto do povo: obrigada pela parceria, viagens e cervejas.

Aos amigos e colegas de ambos os laboratórios ao longo de todos esses anos: do Laboratório de Citogenética e Evolução da UFRGS: Camila Castilho, Tatiane Noviski, Rodrigo Fornel, Gabriela Fernandez, Tatiane Trigo, Gisele Sana Rebelato, Simone Ximenes, Gislene Lopes, Carla Lopes, Márcia Bozzetti Moreira, Elise Giacomoni, Lilian Sander Hoffmann, Darlise Lopes, Pedro Estrela, Fabiano Fernandes; e do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS: Tielli Magnus, Paola Pulido, Larissa da Rosa, Fernanda Britto, Taiz Lopes, Mirian Tsuchiya Jerep, Flávia Tirelli, Vanessa Dias, Anelise Torres Hahn, Manoel Rodrigues, Lucas Gonçalves, Priscilla Zamberlan, Carla Pires, Renata Bornholdt, Ana Carolina Garcia Escobar, Christian Cramer, Filipe Grazziotin, André Schnnor (in memoriam), Cladinara Roberts Saturni e Taiana Haag, obrigada pela parceria, convivência e ajuda em laboratório.

Agradeço a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar nesse momento tão importante.

## Sumário

Resumo .....	1
Abstract.....	3
<b>Capítulo I: Introdução</b> .....	<b>5</b>
Relações Evolutivas na Família Felidae .....	5
A Espécie <i>Puma concolor</i> .....	9
Filogeografia e Biologia da Conservação .....	17
Marcador Molecular: mtDNA.....	19
Objetivos .....	21
Gerais .....	21
Específicos .....	21
<b>Capítulo II: Artigo: Molecular evidence of a recent demographic expansion in the puma</b> <b>(<i>Puma concolor</i>) (Mammalia: Felidae)</b> .....	<b>22</b>
Abstract.....	23
Introduction.....	24
Material and Methods .....	27
Results.....	32
Discussion.....	36
Acknowledgments.....	42
References.....	43
Tables and Figures.....	49
Supplementary material .....	59
<b>Capítulo III: Dados Adicionais: Inferências a partir de dois outros segmentos do DNA</b> <b>mitocondrial: <i>ATP8</i> e Região Controladora</b> .....	<b>73</b>

Material e Métodos .....	73
Resultados .....	75
Tabelas e Figuras .....	78
<b>Capítulo IV: Discussão Geral</b> .....	<b>87</b>
Referências Bibliográficas.....	90
Material Suplementar .....	100



## Resumo

O felino *Puma concolor*, também conhecido por puma entre tantos outros nomes, é uma espécie de ampla distribuição no continente americano e está entre as 10 espécies de felídeos existentes na região Neotropical. Sua ampla distribuição e a história geológica das diferentes regiões ocupadas pela espécie ao longo de sua evolução agem diretamente na sua história evolutiva e demográfica. E muito do que aconteceu com a espécie, como expansões ou drásticas reduções demográficas, isolamento geográfico, intensidade de fluxo entre populações e outras informações como índices de variabilidade genética podem ser identificados pelo uso dos diferentes recursos disponibilizados pela genética molecular.

A América do Sul possui uma grande diversidade de espécies e uma alta variabilidade genética intraespecífica para diversas espécies quando comparadas a populações das mesmas nas Américas do Norte e Central, como já identificado para a espécie em questão. Para conhecer um pouco mais sobre o puma, sua história evolutiva e sua dinâmica populacional no subcontinente sul-americano e identificar possíveis barreiras geográficas para a movimentação da espécie realizamos as análises em três fragmentos de DNA mitocondrial (*ND5*, *ATP8* e Região Controladora) em 156 amostras de indivíduos distribuídos pela América do Sul adicionados de 30 amostras provenientes de indivíduos das Américas do Norte e Central. Constatamos que os pumas sul-americanos possuem uma grande variabilidade genética e uma complexa, mas recente história evolutiva. Os melhores resultados para análises de fluxo gênico foram encontrados quando amostras foram divididas em 7 grupos dentro de 3 grupos maiores, sendo 5 grupos num grupo maior sul-americano, um centro-americano sul e um centro norte e norte-americano, chegando a valores de  $\Phi_{st}$  de 0,6729 ( $p= 0,000 \pm 0,000$ ) para a amostragem total e de 0,3599 ( $p= 0,000$

$\pm 0,000$ ) para os pumas sul-americanos. Entre os rios testados como barreiras, o rio Amazonas foi indicado como um importante limite para o fluxo gênico entre populações, já o rio Paraná não se mostrou uma barreira de alto impacto para os pumas. A variabilidade genética encontrada nos pumas da América do Sul nos indica um ancestral comum mais recente (MRCA) tendo existido entre 90 mil e 350 mil anos atrás. Já as análises demográficas nos mostram que houve uma expansão bastante recente, há aproximadamente 8.000 anos, após o término do último período glacial (110.000 – 10.000 anos atrás), que coincidiu também com o período posterior à extinção de diversos grupos de mamíferos (~12.000 anos atrás), entre eles alguns felídeos que habitavam as Américas, incluindo possivelmente os pumas que habitavam a América do Norte.

## *Abstract*

The felid *Puma concolor*, popularly known as puma, cougar and several other names, is a species with a broad geographical distribution within the American continent. It is one of the ten felid species that currently occur in the Neotropical region. The broad distribution and the geological history of the different regions occupied by the species throughout its evolution have likely had a direct impact on its demographic history. Much of what has happened to the species, such as demographic expansions and reductions, geographic isolation, gene flow among populations, as well as other types of information about its populations, such as their current genetic variability, can be identified by the various approaches available in the field of molecular genetics.

South America exhibits a remarkable diversity of living species, as well as high intraspecific genetic for several taxa, including the puma. To obtain more knowledge about the puma, its evolutionary history and its population dynamics in the South American subcontinent, and to identify possible geographical barriers affecting the species, we analyzed three mitochondrial DNA fragments (*ND5*, *ATP8* and the control region) of 156 individuals sampled from throughout South America plus 30 individuals from North and Central America. It was found that South American pumas have high genetic variability and a complex, but recent, evolutionary history. The best results for the analysis of gene flow were found when the sample was divided into 7 groups contained in three major groups: 5 South American groups, one southern Central American group, and one northern Central American + North American group, reaching  $\Phi_{st}$  values of 0.6729 ( $p=0.000 \pm 0.000$ ) for the total sample and 0.3599 ( $p= 0.000 \pm 0.000$ ) for South American pumas. Of the rivers tested as barriers, the Amazon was found to be an important historical barrier for

the gene flow among populations. The genetic variability found in South American pumas indicates that their Most Recent Common Ancestor (MRCA) existed between 90 and 350 thousands years ago. Demographic analyses indicated that there was a recent demographic expansion approximately 8,000 years ago, after the end of the last glacial period (110,000 - 10,000 years ago), a time which was immediately subsequent to the extinction of many mammalian groups (~12.000 years ago), such as additional felids that lived in the Americas, possibly including earlier populations of North American pumas.

# CAPÍTULO I

## INTRODUÇÃO

### **Relações Evolutivas na Família Felidae**

A definição das relações evolutivas entre as espécies pertencentes à família Felidae é um ponto essencial para programas de conservação destas (O'Brien 1994), visto que até hoje há uma grande controvérsia em relação à classificação, principalmente se tratando de subfamílias e gêneros, além de algumas espécies e subespécies. A versão atual da classificação da família (Johnson *et al.* 2006), que apresentou várias modificações, tende a ser a mais aceita.

A existência de um grande número de autapomorfias e simplesiomorfias, padrão típico de grupos que sofreram uma diversificação relativamente rápida e recente em sua história evolutiva (Johnson & O'Brien 1997, Mattern & McLennan 2000, Flynn 2005) torna a filogenia dos felídeos difícil de ser esclarecida. Segundo o registro fóssil, o gênero que possivelmente representa o “estoque” basal dos verdadeiros felídeos, *Pseudaelurus*, da América do Norte e Europa, surgiu há apenas 20 milhões de anos (MA), durante o Mioceno. Este gênero parece ter sido a base da radiação e diversificação dos felídeos atuais (Martin 1989, Kitchener 1991). Os gêneros de felídeos modernos somente começaram a aparecer no registro fóssil no final do Mioceno, há cerca de 10 milhões de anos na Eurásia (Kitchener 1991).

A família Felidae apresenta um grupo diverso de espécies divididas inicialmente em vários clados ou linhagens (Ewer 1973, Collier & O'Brien 1985, O'Brien *et al.* 1996, Salles 1992, Wozencraft 1993). Uma descrição relativamente aceita até 2005, dos três maiores clados (Wayne *et al.* 1989, seguindo a nomenclatura científica proposta por Ewer 1973) reúne na primeira linhagem, conhecida como linhagem da jaguatirica, as espécies do gênero *Leopardus* (*L. pardalis*, *L. wiedii* e *L. tigrinus*), o gato-palheiro (*Lynchailurus colocolo*), o gênero *Oncifelis* (*O. geoffroyi* e *O. guigna*) e provavelmente o gato-andino (*Oreailurus jacobita*); na segunda linhagem, a do gato doméstico, inclui o gênero *Felis* (*F. catus*, *F. libyca*, *F. silvestris*, *F. margarita*, *F. nigripes* e *F. chaus*) e o gato-de-Pallas (*Otocolobus manul*); e na terceira, a linhagem dos panteríneos, inclui o gênero *Panthera* (*P. leo*, *P. onca*, *P. tigris*, *P. uncia* e *P. pardus*) e provavelmente o leopardo nebuloso (*Neofelis nebulosa*) juntamente com o puma (*Puma concolor*), o guepardo (*Acinonyx jubatus*), o jaguarundi (*Herpailurus yagouaroundi*) e as espécies do gênero *Lynx* (*L. rufus*, *L. lynx*, *L. canadensis* e *L. pardinus*). Pesquisas posteriores corroboraram hipóteses não confirmadas pela descrição de Wayne *et al.* 1989, como o posicionamento da espécie *Neofelis nebulosa* na linhagem dos panteríneos (Johnson & O'Brien 1997) e de *Oreailurus jacobita* na linhagem da jaguatirica (Johnson *et al.* 1998). Outras questões abordadas sugeriram modificações na classificação de algumas espécies em novos clados menores (Johnson & O'Brien 1997), questão que será discutida a seguir.

Uma análise filogenética sobre as três maiores linhagens de Felidae (da jaguatirica, do gato doméstico e da pantera), usando RFLP do DNA mitocondrial (Johnson *et al.* 1996), corroborou seus diferentes padrões de história evolutiva, mantendo a sugestão de Wayne *et al.* (1989). E em outra pesquisa realizada posteriormente (Johnson & O'Brien 1997) foram mantidos os três clados maiores, mas definidos outros grupos como o do puma (agrupando

o puma, o guepardo e o jaguarundi); do lince (as diferentes espécies do gênero); do gato-leopardo-asiático (*Prionailurus bengalensis*), reunindo-o com *Ictailurus planiceps* (gato-de-cabeça-chata) e *Prionailurus viverrinus* (gato-pescador); do gato-vermelho-de-Bornéu (*Pardofelis badia*), sendo este agrupado com *Profelis temmincki* (gato-dourado-asiático); e algumas espécies permaneceram sem classificação como o serval (*Leptailurus serval*), gato-vermelho-malhado (*Prionailurus rubiginosa*) e gato-marmorado (*Pardofelis marmorata*).

A pesquisa mais recente sobre a irradiação dos felídeos (Johnson *et al.* 2006) trouxe mais mudanças na classificação, definindo de forma mais clara um total de oito grupos: a primeira divergência identificada, que teria ocorrido há cerca de 10.8 MA, é a do grupo dos panteríneos que reúne todas as espécies do gênero *Panthera* e a espécie *Neofelis nebulosa*; a segunda, há cerca de 9.4 MA teria separado o gênero *Pardofelis* (definido agora para as espécies *P. badia*, *P. temminckii* e *P. marmorata*); a terceira, com cerca de 8.5 MA de divergência, forma a linhagem do caracal (*Caracal caracal* reunindo com *C. aurata* anteriormente conhecido como *Profelis aurata*, e *C. serval*, conhecida anteriormente como *Leptailurus serval*); a quarta linhagem, a da jaguatirica, composta agora pelas seguintes espécies: *Leopardus pardalis*, *L. wiedii*, *L. jacobita*, *L. colocolo*, *L. geoffroyi*, *L. guigna* e *L. tigrinus*, teriam divergido há cerca de 8 MA; seguindo, a linhagem do Lince, reunindo as quatro espécies já definidas, há 7.2 MA; há aproximadamente 6.7 MA a linhagem do puma, agora colocando o jaguarundi dentro do gênero *Puma*; e as duas últimas linhagens, que teriam divergido há aproximadamente 6.2 MA, a do gato-leopardo-asiático (*Otocolobus manul*, *Prionailurus rubiginosus*, *P. bengalensis*, *P. viverrinus* e *P. planiceps*) e a do gato doméstico, reunindo as sete espécies conhecidas do gênero *Felis*.

Na América do Sul existem 10 espécies reconhecidas, pertencentes a três grupos

evolutivamente distintos (do puma, da jaguatirica e da pantera), que têm sido estudadas usando diversas técnicas de genética molecular (p.ex. estudos filogenéticos: Collier & O'Brien 1985, Johnson & O'Brien 1997, Masuda *et al.* 1996, O'Brien 1997, Pecon-Slattery *et al.* 1994; filogeográficos: ex. Driscoll *et al.* 2002; de hibridização: ex. Trigo *et al.* 2008; populacionais: ex. Haag *et al.* 2010, de genética de paisagens: ex. Castilho *et al.* 2011). A linhagem de nosso interesse, que compreende o puma, o jaguarundi, e o guepardo (inexistente no continente americano) aparentemente divergiu na América do Norte de um ancestral comum com outras espécies da família há cerca de 6.7 MA (com intervalo de confiança entre 5.27 e 9.20 MA) (Johnson *et al.* 2006).

Embora o guepardo seja atualmente restrito à África e ao Irã, espécimes fósseis (2-3 MA atrás) encontrados na América do Norte (Sunquist & Sunquist 2002) sugerem a ligação entre essas espécies (Adams 1979). Entre esses táxons fósseis está *Miracinonyx trumani*, conhecido como o guepardo americano, que pela sua morfologia foi por muito tempo descrito como mais proximamente relacionado ao guepardo africano, apesar de controvérsias. Entretanto, recentemente um estudo molecular identificou que *M. trumani* é a espécie evolutivamente mais próxima do puma, inclusive mais do que o jaguarundi, até então considerada a espécie irmã do puma. Estima-se que divergência entre essa espécie já extinta e o puma tenha ocorrido entre 3.86 e 8.71 MA, considerando o *Proailurus* como primeiro felídeo, e entre 2.38 e 5.89 MA, considerando o *Prionailurus* como primeiro felídeo (Barnett *et al.* 2005).

A rápida irradiação da família Felidae, que levou a uma substancial diferenciação genética abaixo do nível de espécies, pode também ser inferida pelo grande número de subespécies descritas em puma, leopardo e tigre (Janczewski *et al.* 1995, Miththapala *et al.* 1996, Culver *et al.* 2000, Luo *et al.* 2004). A compreensão dessa complexa hierarquia



filogenética deve ser de grande uso na identificação e cuidado em classificar as unidades de conservação na família Felidae (Janczewski *et al.* 1995).

### **A Espécie *Puma concolor***

Conhecida comumente por diversos nomes como puma, leão-baio, onça-parda, suçuarana, leão-da-montanha ou *cougar*, a espécie *P. concolor* (Figura I.1) foi descrita por *Linnaeus* em 1771. Espécimes fósseis indicam sua existência de 0.4 MA (Van Valkenburgh *et al.* 1990), mas dados moleculares e estudos morfológicos sugerem que a origem da espécie seja datada entre o Mioceno Tardio e o Plioceno (intervalo de confiança entre 3.16 e 6.01 MA) quando a espécie evoluiu de um ancestral comum com a espécie vivente mais proximamente relacionada, o jaguarundi (*Puma yagouaroundi*) (Johnson *et al.* 2006).

A principal hipótese sobre o surgimento da espécie é de que tenha ocorrido na América do Norte e a expansão para América do Sul teria acontecido durante o "grande intercâmbio biótico americano" (GABI), após a ligação geológica do Istmo do Panamá há cerca de 2,5 – 3,5 MA (Webb & Marshall 1981, Marshall *et al.* 1982, Stehli & Webb 1985, Webb 1991, Webb & Rancy 1996, Van Valkenburgh 1999, Hunt 2004, MacFadden 2006, Woodburne *et al.* 2010). Apesar da falta de informações paleontológicas na América do Sul, não se elimina a hipótese de que a espécie tenha surgido na América do Sul e posteriormente migrado para as Américas Central e do Norte.

Na América do Norte, durante o Pleistoceno e o Holoceno inicial, o puma coexistiu com outros grandes felídeos: *Panthera atrox* (leão americano), *Miracinonyx trumani* (guepardo americano) e *Smilodon fatalis* (tigre dente de sabre) (Turner & Ánton 1997). E

na mesma época em que essas espécies foram extintas, assim como outros grandes mamíferos, é possível que o puma também tenha chegado perto da extinção, talvez tendo sido extinto na América do Norte, sobrevivendo apenas as populações da América do Sul (Culver *et al.* 2000). Na América do Sul, o puma provavelmente coexistiu com ao menos espécie de tigre dente-de-sabre (*Smilodon fatalis* e *S. populator*), além da onça-pintada (*Panthera onca*), ainda existente (Turner & Ánton 1997).



Figura I.1. Exemplar de *Puma concolor* (Carnivora, Felidae). Foto: Camila S. Castilho

Na América do Sul o puma é a segunda maior espécie de felídeo, apenas menor que *P. onca*. O animal adulto pode pesar entre 30 e 70 kg, (havendo registros de machos adultos com até 120 kg) (Banfield 1974, Machado *et al.* 1998) e o comprimento total pode

chegar a 2 metros. A cabeça é pequena em relação ao corpo, o pescoço e a cauda são longos, a face é curta e as orelhas são pequenas, curtas e arredondadas. A espécie apresenta um padrão de coloração monocromática, que pode variar entre o amarelo-claro ao avermelhado em algumas regiões de sua área de ocorrência, já os filhotes apresentam manchas escuras na pelagem e olhos azuis até aproximadamente seis meses de vida. Os machos são significativamente maiores que as fêmeas, (Gay & Best 1995) e a média do tamanho corporal varia, aumentando de acordo com a proximidade dos polos geográficos (Redford & Eisenberg 1992).

Sua distribuição é uma das mais amplas entre os mamíferos terrestres (Nowak 1999) (Figura I.2), ocorrendo desde o Canadá até a Patagônia e desde o nível do mar até 5.000m de altitude, nas regiões andinas (Figura I.2). Ocupa todos os tipos de habitats florestais e de savanas, dos mais úmidos e mais quentes, como florestas pluviais, aos mais secos e frios, como a Patagônia Argentina (Franklin *et al* 1999, Diaz & Ojeda 2000, Fontana *et al.* 2003 Hood & Neufeld 2004, Kelly *et al.* 2008, Monroy-Vilchis *et al.* 2009, Johnson *et al.* 2010, Mazzolli 2012). Sua dieta é ampla e inclui ratos (*Proechimys spp.*), cotias (*Dasyprocta variegata*), pacas (*Agouti paca*), capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*), tatus (*Dasytus spp.*), tamanduás (*Tamandua tetradactyla*), veados (*Mazama spp.*), lagartos, serpentes e aves de acordo com sua região de ocorrência e disponibilidade de presas. E sob circunstâncias em que há escassez de presas silvestres, os animais domésticos passam a fazer parte de sua dieta (Currier 1983, Nowak 1999, Mazzolli *et al.* 2002).

O puma tem hábito tanto noturno quanto diurno e é solitário, convivendo com outros indivíduos apenas na época de acasalamento e período de cuidado com a prole pela mãe (Emmons 1990). Como refúgio utiliza cavernas, tocas na vegetação cerrada e árvores

altas (Silva 1984). A densidade média pode variar de 0.09/100 km<sup>2</sup> a 6.8/100 km<sup>2</sup> (Castilho *et al.* 2011, Kelly *et al.* 2008), podendo a área individual variar entre 31 km<sup>2</sup> a 293 km<sup>2</sup>. Há pouca sobreposição de território ocupado por machos adultos residentes, mas áreas de fêmeas residentes frequentemente sobrepõem-se completamente e são sobrepostas por machos adultos. Para marcação de território tem costume de urinar em árvores, arranhar troncos e solos e defecar em locais conspícuos, tais como trilhas e sobre pedras. São ágeis, têm grande poder de impulso, facilidade para nadar, mas evitam entrar na água. A visão é o sentido mais aguçado, seguida pela audição (Nowak 1999).

Sua situação mundial é considerada de mínima preocupação (*Least Concern*) por ser uma espécie de ampla distribuição (IUCN 2011). Na CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) três subespécies estão inclusas no anexo I (perigo de extinção) da CITES: *P. c. coryi*, *P. c. costaricensis* e *P. c. cougar*, já todas as outras subespécies fazem parte do anexo II (controle de comércio). Nas definições sobre o risco de ameaça de extinção da espécie dentre alguns dos países sul-americanos há diferenças: na Bolívia foi considerada espécie de menor preocupação e retirada do último livro vermelho da fauna ameaçada no país. No Brasil a espécie não faz parte da lista de animais ameaçados, mas duas de suas subespécies sim. Na Argentina, assim como na Colômbia, Peru e Venezuela, é considerada quase ameaçada, já no Equador é considerada vulnerável, no Uruguai é criticamente ameaçada, enquanto no Chile é uma espécie deficiente em dados (Arcos *et al.* 2011, CONAMA 2011, Diaz & Ojeda 2000, Machado *et al.* 2005, Martinez *et al.* 2010, MMAA 2009, Rodriguez-Mehecha *et al.* 2006, Rodríguez & Rojas-Suárez 2008, SERNANP 2004). É uma espécie que sofreu e ainda sofre com a fragmentação de seu hábitat, com a caça clandestina e legalizada (por exemplo, em partes da Argentina e Estados Unidos), e possivelmente sua área de

ocorrência tenha sofrido uma significativa retração (Mazzolli 2012). No entanto, em algumas regiões, como no Rio Grande do Sul, parece que a espécie está gradualmente se recuperando durante os últimos 20 ou 30 anos, talvez devido a áreas de silvicultura e coibição da caça ou ainda por causa da extinção da onça-pintada na quase totalidade de sua área de ocorrência original no Estado (Mazzolli 2012).

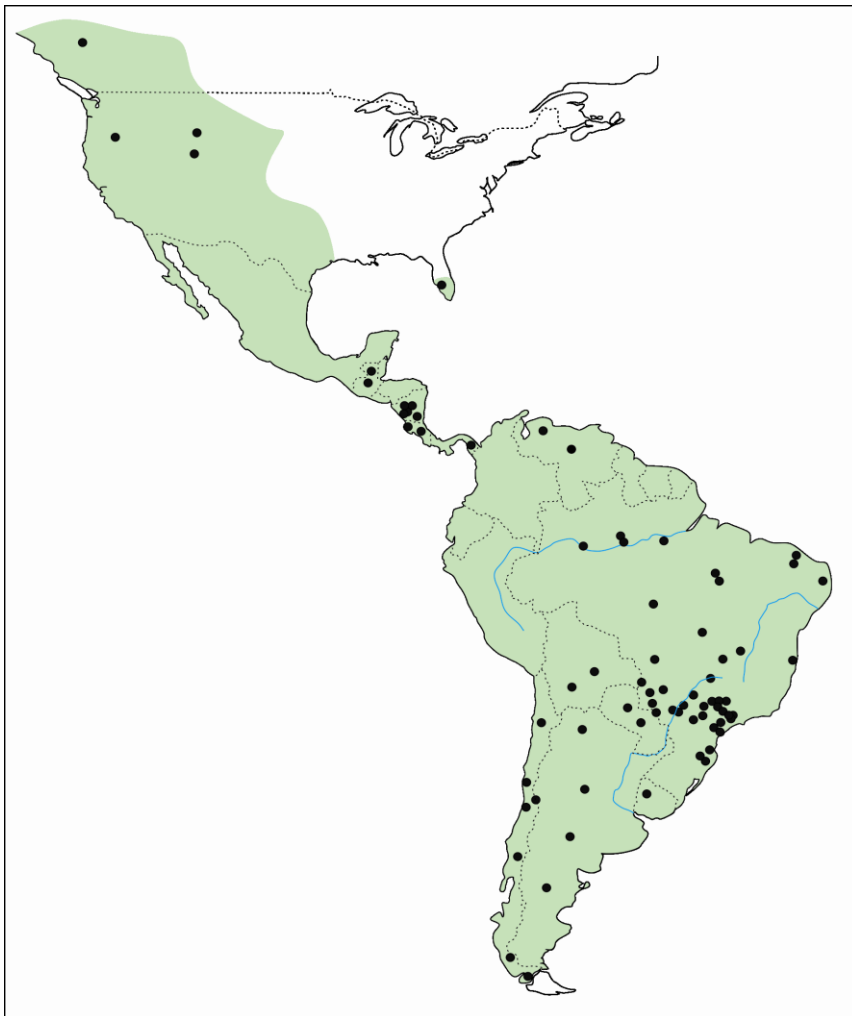


Figura I.2: Distribuição de *Puma concolor* (Carnivora, Felidae). Em verde claro a distribuição atual da espécie. As linhas tracejadas representam a divisão política dos países; as linhas azuis representam três grandes rios (de cima para baixo: Rio Amazonas, Rio São Francisco e Rio Paraná); os pontos pretos representam os locais amostrados no presente estudo (Tabela 1, Cap. II).

Pesquisas utilizando como ferramentas a genética e a biologia molecular em *P. concolor* estão cada vez recebendo mais atenção e mais esforços. Em Sinclair *et al.* (2001) estimativas do fluxo gênico em populações de Utah, EUA, foram utilizadas com fins de manejo e conservação na região. Uma segunda pesquisa (Ernest *et al.* 2003) analisou a estrutura genética de populações da Califórnia, EUA, mostrando haver uma estruturação entre regiões, e subestruturações dentro de regiões. Outra pesquisa (McRae *et al.* 2005) examinou a limitação de fluxo gênico entre populações do sudoeste dos Estados Unidos por possíveis barreiras geográficas e sugeriu, através do uso de marcadores moleculares, que a grande diferença na variabilidade genética entre pumas do norte e do sul do continente norte-americano esteja refletindo um evento histórico e não contemporâneo, primeiro, pelo fato de no norte o número de alelos encontrados ser muito menor do que o encontrado no sul e, em segundo lugar, a análise de valores de  $F_{st}$  sugere que os pumas do norte tenham sofrido uma forte deriva genética, seguindo subdivisão de uma população ancestral.

Na América do Sul, ainda são poucos os estudos moleculares direcionados à espécie, os quais têm utilizado principalmente microssatélites e focado a diversidade genética e estrutura populacional (p.ex. Miotto *et al.* 2011), e genética de paisagens (p.ex. Castilho *et al.* 2011, Miotto *et al.* 2012). Em Miotto *et al.* (2011) foram analisadas populações ocorrentes em regiões com muita fragmentação de habitat, no sudeste do Brasil. Em Castilho *et al.* (2011), foram estimadas a densidade populacional e a diversidade genética de populações do sul do Brasil, relacionando estes parâmetros a elementos da paisagem e avaliando possíveis áreas de conectividade e fluxo gênico.

De forma geral, a pesquisa anterior mais significativa para o presente estudo (Culver *et al.* 2000), avaliou a ancestralidade genômica da espécie ao longo de toda sua

distribuição através da análise de marcadores de DNA mitocondrial, de microssatélites e do cromossomo Y, sugerindo uma redefinição no número de subespécies que, de acordo com a taxonomia clássica, seriam 32 com base em critérios geográficos, morfométricos e comportamentais (Neff 1983, Young & Goldman 1946) (Tabela I.1). Foi sugerida, então, uma nova classificação com seis subespécies filogeográficas. Esse estudo apresentou, através da combinação dos marcadores mitocondriais e com o uso de diferentes análises, uma topologia com 14 haplótipos distribuídos por todo o continente americano. A maioria deles está presente na América do Sul (10), um dos quais é compartilhado com a América Central. Esta região, por sua vez, apresentou outros dois haplótipos, um exclusivo e outro amplamente compartilhado com a América do Norte, a qual exibiu apenas um haplótipo adicional exclusivo.

Das subespécies definidas pela taxonomia clássica, 16 se encontram na América do Sul; considerando a sugestão de Culver *et al.* (2000), seriam reduzidas a quatro. No Brasil, dentre as subespécies de puma presentes (considerando a taxonomia clássica), duas estão na lista de espécies ameaçadas do IBAMA (*P. c. capricornensis* e *P. c. greeni*) (Machado *et al.* 2008), mas de acordo com o verificado em pesquisa com diferentes marcadores moleculares (Culver *et al.* 2000) seriam duas as subespécies existentes em território brasileiro, *P. c. capricornensis* (que reuniria *P. c. acrocodia*, *P. c. borbensis*, *P. c. capricornensis* e *P. c. greeni*) e *P. c. concolor*, indicando a retirada das duas subespécies da lista de espécies ameaçadas, pois ambas estariam incluídas em uma única subespécie. Neste sentido, a investigação da história evolutiva e dos padrões filogeográficos desta espécie tem implicações relevantes para a definição das unidades taxonômicas a serem consideradas no Brasil no âmbito da avaliação de táxons ameaçados.

Tabela I.1: Subespécies de *Puma concolor* descritas através da taxonomia clássica versus taxonomia molecular, com suas respectivas localizações.

Subespécies (taxonomia clássica)	Países	Subespécie segundo Culver <i>et al.</i> 2000 (taxonomia molecular)
<b>Américas do Norte e Central</b>		
<i>P. c. azteca</i>	EUA, México	<i>P. c. cougar</i>
<i>P. c. browni</i>	EUA, México	
<i>P. c. californica</i>	EUA	
<i>P. c. coryi</i>	EUA	
<i>P. c. cougar</i>	Canadá, EUA	
<i>P. c. hipolestes</i>	EUA	
<i>P. c. improcera</i>	México	
<i>P. c. kaibabensis</i>	EUA	
<i>P. c. mayensis</i>	México, Guatemala, Honduras, San Salvador	
<i>P. c. missoulensis</i>	Canadá, EUA	
<i>P. c. olympus</i>	EUA	
<i>P. c. oregonensis</i>	Canadá, EUA	
<i>P. c. schorgeri</i>	Canadá, EUA	
<i>P. c. stanleyana</i>	EUA, México	
<i>P. c. vancouverensis</i>	Canadá	
<i>P. c. costaricensis</i>	Nicarágua, Costa Rica, Panamá	<i>P. c. costaricensis</i>
<b>América do Sul</b>		
<i>P. c. cabreræ</i>	Argentina	<i>P. c. cabreræ</i>
<i>P. c. hudsoni</i>	Argentina	
<i>P. c. acrocodia</i>	Brasil, Bolívia, Paraguai	<i>P. c. capricornensis</i>
<i>P. c. borbensis</i>	Brasil	
<i>P. c. capricornensis</i>	Brasil, Uruguai	
<i>P. c. greeni</i>	Brasil	<i>P. c. concolor</i>
<i>P. c. anthonyi</i>	Venezuela	
<i>P. c. bangsi</i>	Colômbia	
<i>P. c. concolor</i>	Guiana Francesa, Guiana, Suriname, Venezuela	
<i>P. c. incarum</i>	Brasil, Equador, Peru	
<i>P. c. osgoodi</i>	Bolívia	
<i>P. c. sodestromi</i>	Colômbia, Equador	<i>P. c. puma</i>
<i>P. c. araucanus</i>	Argentina, Chile	
<i>P. c. patagonica</i>	Chile	



## Filogeografia e Biologia da Conservação

O termo ‘Filogeografia’ foi cunhado em 1987 por Avise e colaboradores, mas antes disso, em meados dos anos 1970, o uso de DNA mitocondrial fez com que as análises genealógicas, principalmente em nível intraespecífico sofressem mudanças significativas (Avise *et al.* 1987; Avise 1998).

A Filogeografia, como uma parte importante da Biologia da Conservação que une a Filogenia com a Genética de Populações, é uma área de pesquisa que tem crescido muito pela necessidade de se conhecer a biodiversidade e sua diversidade genética ao longo de sua geografia e assim, poder desenvolver meios de preservá-la. Como Avise define em seu livro “Phylogeography” (Avise, 2000), “a Filogeografia é um campo de estudo preocupado com os princípios e processos que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas, especialmente aquelas dentro e entre espécies proximamente relacionadas. Em outras palavras, tempo e espaço são conjuntamente considerados como os eixos da filogeografia, no qual (de maneira ideal) são mapeadas genealogias de genes de interesse”. Este é um campo de estudos que reúne muitas áreas complementares, como genética molecular, genética de populações, etologia, demografia, filogenética, estatística, paleontologia, geologia e geografia histórica para investigar a intrincada relação entre processos macro e microevolutivos (Avise 2000, Hickerson *et al.* 2010).

Essa recente área de pesquisa tem sido incansavelmente aplicada para os mais diferentes grupos e entre eles os carnívoros em geral, por ser um grupo que teve uma irradiação rápida e que possui muitas questões ainda a serem respondidas, principalmente em nível infra-específico (p.ex. *Vulpes vulpes* - Aubry *et al.* 2009; *Acinonyx jubatus* - Charruau *et al.* 2011; *Panthera onca* – Eizirik *et al.* 2001; *Ursus arctos* - Talbot & Shields

1996; *Cerdocyon thous* - Tchaicka *et al.* 2007).

A incorporação de definições precisas para unidades taxonômicas na legislação da vida silvestre tem necessitado uma reavaliação da taxonomia das espécies ameaçadas ou em perigo de extinção (p.ex. Avise & Nelson 1989, Daugherty *et al.* 1990, Miththapala *et al.* 1996, Johnson *et al.* 2004). A definição de subespécies, uma categoria taxonômica abaixo do nível de espécie que reconhece subdivisões geográficas e temporais (Mayr 1982) tem sido um ponto de muitas controvérsias durante décadas.

Até agora, as subdivisões taxonômicas baseadas em aspectos morfológicos, comportamentais e geográficos ainda são primeiramente usadas para a definição de subespécies, até que se justifique outra estruturação, a partir de pesquisas incluindo métodos moleculares. Em felídeos vemos essa mesma situação, em que as espécies permanecem subdivididas em várias subespécies por diferenças morfológicas e regiões de ocorrência e muitas vezes, quando analisada a variabilidade genética, não são verificadas diferenças evolutivas significativas para serem consideradas tantas subespécies, ou organizadas de tal forma (Miththapala *et al.* 1996, Culver *et al.* 2000, Eizirik *et al.* 2001).

Uma definição de subespécies proposta e muito aceita é a de que membros de uma subespécie devam ocorrer em um determinado local geográfico, ter um grupo de características fenotípicas concordantes e uma história evolutiva única em relação a outras subdivisões da mesma espécie (O'Brien & Mayr 1991). Embora subespécies não sejam reprodutivamente isoladas, elas normalmente são alopátricas e exibem uma partição filogenética claramente visível. Além disso, distinções filogenéticas de subespécies devem ser providas de múltiplas linhas independentes de evidência concordantes, representadas por características que tenham base genética (Avise & Ball 1990).

Um conceito relacionado, e desenvolvido recentemente no contexto da controvérsia

que afeta a definição de subespécie, é o das ‘Unidades Evolutivamente Significativas’ (ou UES). As UES são uma forma de definir unidades em que há uma história evolutiva única, mas que não necessariamente pode ser considerada uma subespécie. “Assim como no caso das subespécies, diferentes UES ocupam áreas geográficas distintas. Ao representarem diferenciação filogeográfica significativa entre si, as UES representariam uma porção muito importante da diversidade genética contida em cada espécie, tendo o potencial de seguirem no processo de divergência até a formação de novas espécies” (Eizirik *et al.* in Morato *et al.* 2006).

O aumento no número de pesquisas enfocando a ancestralidade e diversidade genômica de espécies tem corroborado a necessidade de uma revisão nas questões taxonômicas infra-específicas e, como consequência embasar de forma adequada o esforço para a conservação das mesmas.

### **Marcador Molecular: DNA Mitocondrial (mtDNA)**

O DNA mitocondrial tem sido amplamente utilizado em investigações genéticas de relações inter- e intra-específicas, estrutura populacional, história evolutiva e reconstrução da história demográfica e da história de dispersão das mais diversas espécies (Avice *et al.* 1987, Forster 2004, Charruau *et al.* 2011).

A crescente aplicação desses marcadores também tem sido utilizada para definir partições genéticas entre populações isoladas geograficamente para definir Unidades Evolutivamente Significativas abaixo do nível de espécies para propostas de manejo e conservação, além da já citada revisão das tradicionais designações de espécies e

subespécies (p.ex. Avise & Ball 1990, Luo *et al.* 2004).

Características como herança matrilinear, falta de recombinação, genoma haplóide, evolução rápida e alto polimorfismo intraespecífico (Avise *et al.* 1987), fazem com que o DNA mitocondrial sirva como um ótimo marcador para diversas aplicações, especialmente estudos filogeográficos (Moore 1995, Zink & Barrowclogh 2008). Por ser uniparental, apresenta uma maior sensibilidade em relação aos marcadores autossômicos na identificação de processos demográficos históricos, além de que a comparação de seus padrões evolutivos permite uma reconstrução mais detalhada da história dos organismos pesquisados (Avise *et al.* 1987, Moore 1995, Avise 2000).

Segmentos do DNA mitocondrial, como por exemplo, o gene *NADH desidrogenase subunidade 5 (ND5)*, *ATPase-8 (ATP8)* e Região Controladora (*CR*), tem sido amplamente utilizados em carnívoros e principalmente em felinos para inferir relações filogenéticas e a história evolutiva de diferentes espécies (p.ex. Janczewski *et al.* 1995; Masuda *et al.* 1996; Johnson & O'Brien 1997; Mattern & McLennan 2000; Johnson *et al.* 1999, 2006), e padrões de variação molecular intraespecíficos (p.ex. *Panthera pardus* – Miththapala *et al.* 1996 e Uphyrkina *et al.* 2001, 2002; *Leopardus pardalis* e *L. wiedii* – Eizirik *et al.* 1998; *Puma concolor* – Culver *et al.* 2000; *Panthera onca* – Eizirik *et al.* 2001; *Panthera tigris* – Luo *et al.* 2004; *Lynx lynx* – Hellborg *et al.* 2002, *L. pardinus* - Johnson *et al.* 2004; *Acinonyx jubatus* - Charruau *et al.* 2011).

## **Objetivos**

### **Gerais**

Aumentar o conhecimento sobre a diversidade genética de *Puma concolor* e suas grandes unidades taxonômicas infraespecíficas através da análise da variabilidade genética da espécie a partir de marcadores de DNA mitocondrial, fazendo uma análise filogeográfica da espécie em toda a sua distribuição e uma tentativa de reconstrução de sua história demográfica, ambos focando especialmente na América do Sul.

### **Específicos**

- 1) Descrever variabilidade genética de *P. concolor* em segmentos dos genes *ATPase-8* (*ATP8*) e *NADH desidrogenase subunidade 5* (*ND5*), bem como a Região Controladora (*CR*) do DNA mitocondrial;
- 2) Utilizar o conjunto total de marcadores para confirmar, quantificar e caracterizar os diferentes grupos genéticos presentes na América do Sul, incluindo inferências sobre a história evolutiva da espécie;
- 3) Identificar possíveis barreiras geográficas históricas ao fluxo gênico nesta espécie.

## CAPÍTULO II

### ARTIGO

Molecular evidence of a recent demographic expansion in the puma (*Puma concolor*)

(Mammalia: Felidae)

Eunice M. Matte<sup>1,2</sup>, Camila S. Castilho<sup>1</sup>, Renata A. Miotto<sup>3</sup>, Denis A. Sana<sup>4,5</sup>, Warren E. Johnson<sup>6</sup>, Stephen J. O'Brien<sup>7</sup>, Thales R. O. de Freitas<sup>1</sup>, Eduardo Eizirik<sup>2,4</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Citogenética e Evolução, Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>3</sup> Laboratório de Biodiversidade Molecular e Citogenética, Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos (UFSCar).

<sup>4</sup> Instituto Pró-Carnívoros, Atibaia, SP, Brazil.

<sup>5</sup> PPG Ecologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

<sup>6</sup> Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, National Institutes of Health, Frederick, MD, USA.

<sup>7</sup> Theodosius Dobzhansky Center for Genome Bioinformatics, St. Petersburg State University, St. Petersburg, Russia.

Running Head: Puma demographic history

Keywords: *Puma concolor*, mtDNA, *ND5*, demographic history, South America

Submetido

Genetics and Molecular Biology

## Abstract

The puma is an iconic predator that ranges throughout the Americas, occupying diverse habitats. Previous phylogeographic analyses have revealed that it exhibits moderate levels of genetic structure across its range, with few of the classically-recognized subspecies being supported as distinct demographic units. Moreover, most of the species' molecular diversity was found to be in South America. To further investigate the phylogeographic structure and demographic history of pumas, we analyzed mtDNA sequences from 186 individuals sampled throughout their range, with emphasis on South America. Our objectives were to refine the phylogeographic assessment within South America and to investigate the demographic history of pumas using a coalescent approach. Our results extend previous phylogeographic findings, reassessing the delimitation of historical population units in South America and demonstrating that this species experienced a considerable demographic expansion in the Holocene, *ca.* 8,000 years ago. Our analyses indicate that this expansion occurred in South America, prior to the hypothesized re-colonization of North America, which was therefore inferred to be even more recent. The estimated demographic history supports the interpretation that pumas suffered a severe demographic decline in the Late Pleistocene throughout their distribution, followed by population expansion and re-colonization of the range, initiating from South America.

Keywords: mtDNA, *ND5*, *Puma concolor*, demographic history, evolution, South America

## Introduction

The puma (*Puma concolor* Linnaeus, 1771) is a large felid that ranges throughout the Americas, exhibiting the broadest latitudinal distribution of any terrestrial mammal (Nowak *et al.*, 1999). Pumas have remarkable dispersal capabilities (Maehr *et al.*, 2002; Beier *et al.*, 2003) and successfully occupy a diverse array of habitats, illustrating their potential to adapt to the breadth of environmental conditions occurring across the continent, from tropical forests and marshes to dry scrubland and cold Andean or Patagonian biomes (Redford & Eisenberg, 1992; Nowak *et al.*, 1999). Pumas are solitary and territorial, with large home ranges. Females tend to occupy smaller areas and disperse shorter distances, thus being more philopatric than males (Logan & Sweanor, 2001; Maehr *et al.*, 2002). Overall, the species' ecological flexibility and dispersal capabilities have the potential to induce broad genetic connectivity across large geographic areas, unless historical barriers have limited gene flow among populations.

Fossil evidence indicates that pumas were already present in North America (NA) 0.4 million years ago (MYA) (Kurtén & Anderson, 1980). In parallel, molecular data (Johnson *et al.*, 2006) have led to an estimate of its divergence from its sister-species *P. yagouaroundi* of 4.17 MYA (C.I.: 3.16 - 6.01MYA), suggesting a much longer history as a distinct evolutionary lineage. The speciation event that separated these lineages may have occurred in North or South America, with the molecular dating estimate supporting the former, as it predates the Great American Biotic Interchange (GABI) (*ca.* 2.5 – 3.5 MYA) and the implied colonization of South America (SA) by any felid (Woodburne *et al.*, 2010; Eizirik, in press). However, since the credibility interval of this estimate slightly overlaps the timing of the GABI, this issue is still not fully settled. Interestingly, Barnett *et al.*



(2005) provided molecular evidence indicating that the extinct North American felid *Miracinonyx trumani* is the puma's closest relative, with a divergence time estimated at 3.19 MYA. This finding would support the hypothesis of a North American origin for the puma, with subsequent colonization of South America by this species, in parallel with that of the jaguarundi.

In a thorough study of puma phylogeography, Culver *et al.* (2000) assessed the current and historical genetic diversity present in this species, based on a large sampling of individuals from across its range. That study indicated that most of the 32 classical puma subspecies did not correspond to definable genetic units and reduced the number of recognized subspecies to six. Four of these subspecies were distributed in South America, indicating that most of the species' historical subdivision occurred in that sub-continent. In addition, the genetic diversity within South America was found to be larger than in Central and North America, suggesting that pumas from the latter subcontinent actually derive from a recent re-colonization event, following extinction in North America in the Late Pleistocene (*ca.* 10,000 – 12,000 years ago).

Mitochondrial DNA (mtDNA) markers have been extensively used in evolutionary studies of felids (e.g. Eizirik *et al.*, 1998, 2001; Trigo *et al.*, 2008). Although limited because it reveals only matrilineal history and contains a single realization of the stochastic processes of coalescence and lineage sorting (Avise, 1998), it is still a powerful molecular tool to investigate recent phylogeographic patterns and demographic history. Given that felids tend to have male-biased gene flow (Pusey & Packer, 1987; Smith, 1993; Logan & Sweanor, 2001), mtDNA assessments of phylogeography are expected to provide more refined patterns of geographic structuring due to historical processes than nuclear markers. They are therefore relevant benchmarks for maximum historical structuring, serving as

baselines against which nuclear data sets may be compared. In addition, due to their four-fold lower effective population sizes ( $N_e$ ) relative to autosomal markers, mtDNA segments should be more sensitive to the effect of historical genetic drift. In combination with their relatively high substitution rates, these features render these markers potentially more sensitive to recent historical processes of population subdivision than equivalent segments of the nuclear genome.

Within the mtDNA, the *NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5)* gene has been successfully used in phylogenetic and phylogeographic studies of felids and other carnivores (e.g. Culver *et al.*, 2000; Trinca *et al.*, 2012). In a previous study focusing on pumas (Culver *et al.*, 2000), three mtDNA segments were employed (*ND5*, *16S* and *ATP8*). Of these, *ND5* showed the highest polymorphic content in this species, based on a segment spanning 318 bp. A new primer set for this gene was designed specifically for carnivores (Trigo *et al.*, 2008), amplifying a longer fragment (*ca.* 750 bp) and exhibiting successful amplification across several families (e.g. Felidae, Mustelidae, Mephitidae, Procyonidae [unpublished data]).

In the present study we employ this longer *ND5* segment to investigate the evolutionary history of *P. concolor*, with emphasis on South American populations, which were previously found to harbor high levels of diversity and inferred to have played a key role in the historical demography of this species (Culver *et al.*, 2000). Given that the geographic sampling of South American pumas was limited in that first study, we aimed here to expand the representation of the various regions of this sub-continent, so as to allow refined inferences of population structure, maternal gene flow and demographic history. In addition to expanding the geographic coverage of South American regions to refine inferences on patterns of matrilineal subdivision, we have performed novel analyses

on puma demographic history, which revealed consistent evidence of a recent population expansion in South America, prior to re-colonization of North America.

## **Material and Methods**

### *Sample collection and laboratory procedures*

We obtained blood and tissue samples from 77 pumas including wild individuals captured during field-ecology projects, caught by farmers or road-killed, as well as captive animals with known geographic origin (Table S1). In addition, we included 109 DNA samples collected previously, some of which had been used in earlier genetic studies (Culver *et al.*, 2000; Castilho *et al.*, 2010; Miotto *et al.*, 2011, 2012), for a total of 186 individuals. These samples originated from a diverse array of geographic regions throughout most of the puma range, with greater emphasis on South America (see Table S1). Two samples of *Puma yagouaroundi* were included to be used as outgroups for some analyses.

To select a marker that would provide suitable information levels, we initially examined the mtDNA fragments used in previous studies, especially those involving Neotropical felids (e.g. Eizirik *et al.*, 1998, 2001; Johnson *et al.*, 1998, 1999; Culver *et al.*, 2000). We selected the the *ca.* 700-bp long segment of the *ND5* gene reported by Trigo *et al.* (2008), thus considerably increasing the information content derived from this marker relative to the previous phylogeographic study of the puma (Culver *et al.*, 2000). Finally, the availability of *ND5* sequences for the extinct felid *Miracinonyx trumani* (Barnett *et al.*, 2005), was an additional asset of this segment, allowing the inclusion of this fossil taxon in some analyses.

In the case of new biological samples, DNA was extracted using either a standard phenol-chloroform protocol (Sambrook *et al.*, 1989) or a CTAB protocol (Doyle & Doyle, 1987). For all samples, a fragment of the mtDNA *ND5* gene was amplified by the Polymerase Chain Reaction (PCR) (Saiki *et al.*, 1985) using the primers *ND5-DF1* and *ND5-DR1* (Trigo *et al.*, 2008). PCR reactions were performed in a total volume of 20 $\mu$ l containing 2 $\mu$ l of empirically diluted DNA, 1X buffer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 $\mu$ M of each primer, 0.2mM dNTPs and 0.5 U Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen), with a thermocycling profile as described by Tchaicka *et al.* (2007). PCR products were visualized on a 1% agarose gel stained with GelRed (Biotium), purified with the enzymes Exonuclease I and Shrimp Alkaline Phosphatase (Exo-SAP, GE Healthcare) and sequenced in both directions using the DYEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit for MegaBACE 1000 (GE Healthcare).

#### *Data Analysis*

Sequence electropherograms were visually inspected and edited using Chromas Lite 2.01 (<http://www.technelysium.com.au>) or FinchTV 1.4.0 (<http://www.geospiza.com>). Sequences were aligned with the CLUSTALW algorithm (Higgins *et al.*, 1996) implemented in MEGA 4 (Tamura *et al.*, 2007), followed by manual verification and editing. Nucleotide and haplotype (gene) diversity indices were estimated with DnaSP 5.10 (Librado & Rozas, 2009) for the total sample, as well as for a sample set restricted to South America. In addition, we estimated diversity indices for geographic subsets identified as distinct historical units (see below).

To investigate the evolutionary relationships among puma mtDNA lineages, haplotype networks were built using the median-joining approach (Bandelt *et al.*, 1999), as

implemented in the software Network 4.5.1.6 ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)). We explored two outgroup options for rooting the network, one with the *P. yagouaroundi* sequences generated here, and the other employing *M. trumani* sequences (Barnett *et al.*, 2005).

We also performed an Analysis of Molecular Variance (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992) with Arlequin 3.5.1.2 (Excoffier & Lischer, 2010) to assess the differentiation among geographic populations, using samples from 174 individuals. Twelve samples were excluded (see Table S1) due to insufficient information on local provenance, i.e. cases where the original geographic information was absent (the case of some zoo animals) or too broad, such as a large country. This subset was also used in all other analyses that required precise geographic provenance, such as all AMOVAs, Mantel tests, regional neutrality tests, mismatch distribution and Bayesian skyline plots (see below for other details).

AMOVA analyses were performed using  $\Phi_{st}$  computed from a pairwise matrix based on  $p$ -distances. Statistical significance of  $\Phi_{st}$  values was tested using 10,000 permutations. We tested a variety of scenarios of geographic subdivision, attempting to identify the best possible way to represent historical population structure (i.e. the one that maximizes the estimated  $\Phi_{st}$ ). These AMOVAs were based on two sample sets: (1) South America (SA) only: and (2) the full sample of SA, Central America (CA) and North America (NA).

Within sample set 1, we assessed the following scenarios: 1a) the four SA subspecies suggested by Culver *et al.* (2000); 1b) grouping samples according to their biomes of origin (adapted from IBGE, 2010; and Olson *et al.*, 2001) while sequentially joining adjacent populations that exhibited non-significant  $\Phi_{st}$  values; 1c) a sequential

approach in which samples were initially grouped by immediate geographic proximity, then merged with other groups when they exhibited non-significant p-values for their pairwise  $\Phi_{st}$ , and subsequently joined to additional contiguous populations with which the  $\Phi_{st}$  estimate was low. For strategies 1b and 1c, the overall  $\Phi_{st}$  value was monitored at every sequential step and the successive grouping strategy was maintained until a peak was observed. In this process, when we observed non-significant p-values between population groups, we still tested the effect of changing individuals from one adjacent unit to the other, so as to fine-tune the estimate that maximized the overall  $\Phi_{st}$  value for this sample set.

In the second round of AMOVAs, based on sample set 2 (full sample), we employed the following strategies: 2a) the six subspecies suggested by Culver *et al.* (2000); 2b) incorporating the best grouping for SA identified in strategy 1c and adding the CA and NA samples as additional populations; 2c) testing the overall division into three subcontinents, including an additional adjustment separating Central America into two subgroups (northern and southern); 2d) a two-level hierarchical analysis considering subcontinents (best scenario found in 2c) as broader groups, within which we placed the regional populations identified with strategy 1c.

A third round of AMOVAs was performed to test the hypotheses raised by Culver *et al.* (2000), who postulated that major South American rivers could act as historical barriers to gene flow in this species. This was performed separately for the Amazon and Paraná rivers, by considering populations on either side of each river as distinct geographic units. Only populations located near the respective river were considered here. Given the available sampling on both sides of each river, we established an arbitrary cutoff of  $\leq 610$  km on each side of the Paraná, and  $\leq 1340$  km for the Amazon, so as to include a

reasonable number of individuals and localities in both assessments.

Additionally, to investigate spatial patterns of genetic structure in pumas we assessed the correlation between genetic and geographic distances for all pairs of sampled individuals using a Mantel test (Mantel, 1967). This was performed with the program Alleles in Space (AIS) (Miller, 2005), employing 10,000 permutations to assess statistical significance.

Finally, we conducted a set of analyses to investigate the demographic history of pumas. We performed neutrality tests (Tajima's  $D$ , Fu & Li'  $D^*$  and  $F^*$ , Fu's  $F_s$ ) with DnaSP, as well as a mismatch distribution analysis (Rogers & Harpending, 1992; Schneider & Excoffier, 1999) with Arlequin. In addition, we used the program Beast 1.6.1 (Drummond & Rambaut, 2007) to perform estimates of coalescence times and past demography. We defined the best model of nucleotide substitution for our data set, which was the HKY (Hasegawa *et al.*, 1985) + G model, using the Akaike Information Criterion (AIC, Akaike, 1974) implemented in jModelTest 0.1 (Posada, 2008). Our first set of Beast runs was aimed at estimating the molecular clock rate for our segment in puma haplotypes. We assumed a Yule Process for the tree prior and incorporated an uncorrelated lognormal relaxed molecular clock. In order to fit the expectations of the Yule process, we only included five divergent puma haplotypes, along with the two jaguarundi sequences generated here. To calibrate the molecular clock, we assumed that pumas and jaguarundis diverged between 3.16 and 6.01 MYA (95% HPD of the estimate reported by Johnson *et al.* [2006] using a nuclear supermatrix). We applied a uniform prior using these ages as conservative minimum and maximum boundaries, respectively. The final run was based on  $10^8$  generations, with samples taken every  $10^4$  steps, and the first  $10^4$  steps removed as burn-in.

The second set of Beast analyses aimed to infer the time of the most recent common ancestor ( $t_{MRCA}$ ) of different groups of samples, as well as to reconstruct the demographic history of pumas by estimating past fluctuations in population size via the Bayesian Skyline Plot (BSP) approach (Drummond *et al.*, 2005). We assumed a Bayesian skyline tree prior and a strict molecular clock, whose evolutionary rate was based on the estimate derived from the first round of analyses. We assessed the  $t_{MRCA}$  for four different sample sets: (i) complete sample; (ii) South America only; (iii) North and Central Americas (NA+NCA); and (iv) a subset of 24 NA+NCA samples that formed a regionally endemic subclade in the haplotype network, suggestive of autochthonous diversification (see Results). BSP analyses were performed only for sets (i) and (ii), as their larger sample size allowed for more robust demographic inferences. MCMC parameters were the same as in the first set of Beast analyses.

## Results

Double-stranded sequences for a 669 bp fragment of the mtDNA *ND5* gene were obtained for 156 puma individuals sampled in South America, 17 from Central America, and 13 from North America (Table S1, Figure 1). Additional sequences of the same fragment were obtained for two *P. yagouaroundi* individuals to be used as outgroups in haplotype network analyses.

The puma data set contained 33 variable sites (32 transitions and one transversion), 25 of which were phylogenetically informative (Table 1). Overall, there were 28 haplotypes, 22 of which occurred in South America (H01-H22), one of them (H09) being shared with Central America (Figure 2a). Moderate to high levels of haplotype diversity were observed, while nucleotide diversity was rather low (Table 2).



Evolutionary relationships among haplotypes were inferred using the median-joining network approach (Figure 2a), which showed a clear separation between lineages from South America (H01 – H08, H10 – H22) and those from North America and most of the haplotypes from Central America (H23 – H28). The main exception was a haplotype (H09) found in southern Central America (Costa Rica), which is also common in central South America and is equidistant (5 mutational steps) from the two closest haplotypes found in Central and North America (H23 and H24).

Among the 22 South American haplotypes, two (H16 and H20) were found north of the Amazon River (Brazil and Venezuela), with H16 also being sampled in one individual from southern Brazil. We observed very high levels of genetic diversity in central South America (including Bolivia, Paraguay, Uruguay, northern Argentina and the central-western, southeastern and southern regions of Brazil), where 15 distinct haplotypes were sampled (H01 - H12, H14, H15 and H21). Among these, some haplotypes exhibited a localized distribution, such as H05, H08 and H12, which were found only in the Pantanal biome. A peculiar case was that of haplotype H03, sampled east and southeast of the São Francisco River (see Figure 1), and also in one individual from the Brazilian central-western region. This haplotype is five mutational steps away from its closest relatives, a distance which is equal to or larger than that observed between South American lineages and most of those sampled in North and Central America (4 mutational steps: H23 and H24; 5 mutational steps: H25, H26, H27 and H28). Individuals sampled along the Andes harbored two different haplotypes (H18 and H19), with H18 being more broadly distributed across the central and southern Cordillera, all the way to its extreme south in Patagonia.

In contrast, a single main haplotype (H23) was sampled in all surveyed countries

from North and Central Americas (see Figure 2a). Four other haplotypes were connected to this common sequence by a single mutational step each, leading to a star-like appearance of this portion of the network. Among these haplotypes related to H23, H25 was found in the Florida peninsula (USA), H27 in Nicaragua, H28 in Guatemala, and H26 was sampled in both of the latter countries. Another haplotype (H24) found in Central and North America (Panama, Costa Rica and Florida peninsula [USA]) was quite distinct, differing by 8 mutational steps from H23, and by 4 steps from its closest relative, the common South American haplotype H02.

When the *P. yagouaroundi* sequences were used as outgroups in the network (Figure 2a), they were connected by 85 mutational steps to puma haplotype H01, supporting this position for the puma mtDNA root. Haplotype H01 is found in central South America (Paraguay, as well as Brazilian states MS, SP and MG), differing by at least six mutational steps from the main North and Central American haplotypes. When the *M. trumani* sequence was included in the network (Figure 2b), the sequence alignment length was reduced to 286 bp to match the segment available for this outgroup. Due to this reduction in the number of sites, the network became less resolved, but the results still suggested that the outgroup was connected more closely to South American and southern Central American pumas than to northern Central and North American haplotypes.

To investigate the population genetic structure in more quantitative detail, we performed several rounds of AMOVA, employing different geographic clustering strategies. In the first stage, when only South American pumas were analyzed,  $\Phi_{st}$  values were quite high and statistically significant, with strategy 1c yielding the highest overall  $\Phi_{st}$  (Table 3). In the second round of AMOVA, using the full sample set, we found even higher  $\Phi_{st}$  values. The highest overall value was obtained with strategy 2d, employing a

two-level AMOVA (Table 3). Central America was best represented as two distinct groups, northern and southern, with the former being merged with North America. In the best two-level scenario (see Table 3), we also noted that the  $\Phi_{sc}$  and  $\Phi_{ct}$  were 0.41904 ( $p = 0.000 \pm 0.000$ ) and 0.43693 ( $p = 0.01871 + -0.00135$ ), respectively. Pairwise estimates of  $\Phi_{st}$  were carried out at the various spatial scales tested in these scenarios, and helped assess the distinctiveness of large-scale as well as regional population units (Tables S4 and S5).

Finally, we performed a third round of AMOVA to test two large rivers as possible barriers to historical gene flow in this species. We observed high  $\Phi_{st}$  values when the Amazon River was assessed (see Table 3). The  $\Phi_{st}$  value found for the Parana River was rather low (0.09), although still statistically significant.

Mantel Tests (Figure S1) revealed a significant correlation between genetic and geographic distances for the total geographic sample ( $r = 0.48$ ;  $p < 0.001$ ), indicating that isolation by distance plays a relevant role in the genetic structuring of this species. As for the analysis of South American samples alone, the resulting value was 0.085 ( $p = 0.09347$ ), which suggests that within this subcontinent there is no significant influence of isolation by distance.

Another front of analyses pertained to demographic history assessments. When we conducted a Mismatch Distribution analysis, the results indicated a unimodal pattern for both data sets (full sample and South American samples only) (Figure 3) compatible with a scenario of recent demographic expansion. In addition, the neutrality tests yielded negative values for all indices, with those of Fu's  $F_s$  being significantly negative with respect to neutral expectations for both data sets (Table 4).

The Bayesian analyses performed with Beast further helped shed light onto the

historical demography pumas as revealed by the mtDNA. In the first round of analyses, using five individuals with the most divergent haplotypes and two jaguarundis, we estimated the substitution rate of the analyzed *ND5* segment to be 2.054% per million years (MY). Applying this substitution rate in the second set of analyses, we inferred the mean  $t_{MRC A}$  of pumas to be 0.237 MYA (95% HPD: 0.105 – 0.391 MYA). For South American pumas, the mean  $t_{MRC A}$  was estimated to be 0.211 (0.091 – 0.353) MYA. When North American (NA) and Central American (CA) samples were analyzed separately, their mean estimated  $t_{MRC A}$  was 0.231 (0.102 – 0.387) MYA. Finally, we estimated the  $t_{MRC A}$  for a subset of 24 NA+CA samples that formed an endemic monophyletic cluster (see Figure 2a), yielding a value of 0.037 (0.006 – 0.077) MYA.

The Bayesian skyline plot analysis revealed evidence of a very recent (*ca.* 8,000 years ago) demographic expansion in pumas (Figure 4). The signal for this expansion was apparent with both data sets (full sample and South American pumas only), with only minor differences in the estimated parameters.

## **Discussion**

### *mtDNA diversity and genealogical history*

The mtDNA data set analyzed in this study allowed a deeper understanding of the matrilineal history of pumas, refining, extending and in some cases adjusting the inferences previously put forth by Culver *et al.* (2000). Our initial observation was that *ND5* is indeed a very informative coding mtDNA segment for phylogeographic studies of felids, and that the longer segment employed here (relative to the one reported by Culver *et al.*, 2000) does provide useful additional information regarding this species' evolutionary history.

Pumas exhibited moderate to high levels of diversity, which could be directly compared to only two other felid species that have so far been sequenced for the same mtDNA segment (Trigo *et al.*, 2008). Both of these Neotropical cats, *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi*, were sequenced for a slightly shorter fragment, so we adjusted our alignment to include only the matching 567 bp and thus allow an exact comparison (Table S3). This assessment revealed that pumas possess higher gene diversity than either of these other species, as well as slightly higher nucleotide diversity. Indeed, the observed levels of haplotype (gene) diversity in pumas were quite high, while nucleotide diversity was more modest, suggestive of rather recent mtDNA coalescence in this species.

When subcontinental or regional groups of pumas were compared, we observed that haplotype and nucleotide diversity indices were consistently higher for South and Central America, relative to those estimated for North America (Table 2). Gene diversity was highest for South America, while nucleotide diversity reached a maximum in Central America. North American pumas presented low values for both indices, which were at least two-fold lower than those of the other sub-continental groups. When the South American regional groups defined by the AMOVA (see Figure 1 and Table 3 for their definition) were assessed, we observed that the CNESA and CSSA groups exhibited the highest haplotype diversity, with the SWSA and NSA groups also presenting high values (Table 2).

The high gene diversity estimated for pumas could be examined in more detail with the use of haplotype networks (Figure 2a), which depicted intricate relationships among sequences, especially in South America. Such a pattern is indicative of a complex evolutionary history, with some suggestion of geographic structuring but no clear-cut separation of well-defined clades. Some portions of the network are suggestive of a recent

population expansion involving South American lineages, with central haplotypes giving rise to multiple derived sequences differing by a single mutational step each. Central America was also observed to bear a complex mixture of haplotypic lineages, with more than one connection to basal South American sequences and evidence of internal structure (see Figure 2a and Table 3). In contrast, the lineages sampled in North America exhibited a much simpler pattern, dominated by a common haplotype (H23) shared with Central America, from which four other lineages have recently evolved. This shape is indicative of a recent population expansion involving these haplotypes, whose sampling locales indicate a present distribution across North America and also in Central America, especially in the northern portion of the latter (Figures 1 and 2).

In North America, an unusual pattern was observed in an individual from Florida (USA) that carried haplotype H24, which is shared with animals from southern Central America (Panama and Costa Rica) and is genetically distant from the other lineages found throughout North America. Given the record of human-induced introgression of puma mtDNA lineages from Central America to Florida in the 1960s (O'Brien *et al.*, 1990), it is possible that this individual descends from a female translocated during that period, implying that such haplotype sharing may be a human-induced artifact. If this was indeed the case, our results would in fact be an underestimate of the differentiation between SCA and NA+NCA, since haplotype H24 may only naturally occur in the former.

Central America and northern South America (NSA) did not share haplotypes, implying no evidence of historical matrilineal gene flow between these regions. Possible barriers include the northernmost Andean Cordillera or the Darien Straits in Panama, as suggested for jaguars (Eizirik *et al.*, 2001). Detailed sampling in that region would be required to distinguish between these two hypotheses. Although no haplotype was shared

between Central America and northern South America, we did observe a shared haplotype (H09) between southern Central America (Costa Rica) and the central region of South America. This suggests some continued matrilineal connectivity between these areas (necessarily going through northern South America), or the retention of an ancestral polymorphism that predates the implicated phylogeographic subdivision. Since the available sampling for northern South America is still modest (see Figure 1), both hypotheses remain viable and should be the focus of additional scrutiny.

The network root based on the outgroup *Puma yagouaroundi* indicates that the most ancestral lineage of current pumas is located primarily in central South America. When we considered *M. trumani* as the outgroup, once again the rooting was placed primarily in South America, reasserting the area of occurrence of the earliest ancestor of the current lineages and helping reveal the direction of evolution of pumas throughout their distribution.

#### *Population structure*

The AMOVA results revealed extremely high  $\Phi_{st}$  values in many of the assessed scenarios (see Table 3). The highest  $\Phi_{st}$  value, used to define the scenario that best explains the current partitioning of mtDNA diversity, was found when a 2-level AMOVA was conducted. The first level separated “subcontinents” as major units (NA+NCA, SCA and SA), while the second level identified subdivisions within the “subcontinents”. Several analyses, following the steps outlined in the AMOVA strategy 2b (data not shown), demonstrated that other possible groupings were almost as good, indicating that there is no clear-cut definition of the structure in central South America, but demonstrating that this region is a genetic hotspot for this species, with considerable structure but complex

historical relationships.

Our next step was to assess the role of major rivers as historical barriers to female gene flow. Our sampling allowed a test of two riverine barriers proposed by Culver *et al.* (2000), which postulated that the Amazon and Paraná rivers might have induced the differentiation of historical population units. Our results supported an important role for the Amazon River, corroborating the hypothesis previously raised for pumas (Culver *et al.*, 2000), and showing a pattern consistent with inferences made for other Neotropical felids such as *Leopardus pardalis*, *L. wiedii* and *Panthera onca* (Eizirik *et al.*, 1998, 2001). On the other hand, the influence of the Paraná River appears to be much lower than previously hypothesized, although we still observed significant  $\Phi_{st}$  values when we compared populations separated by this watercourse. Although they were significant, the magnitude of the differentiation was considerably lower than that estimated for the Amazon River (see Table 3), and several AMOVA assessments comparing regional populations on the same side of the Paraná River yielded higher  $\Phi_{st}$  values than those obtained in the comparison between the two sides. These findings suggest that, although this river may play a role in limiting regional maternal gene flow in pumas, it does not induce major differentiation between clear-cut historical units. Such an observation has implications for the definition and delimitation of puma subspecies, two of which (*P. c. cabreræ* and *P. c. capricornensis*) have been suggested to be separated by this river (Culver *et al.*, 2000).

#### *Demographic history*

The  $t_{MRCA}$  estimates derived from both data sets were very similar, indicating that the age of the common ancestor for all samples was essentially the same as that for the South American subset. Taken together with the other results (e.g. network, diversity



indices), this finding supports the inference that most of the extant diversity of the puma mtDNA resides in South America, and that the deepest history of coalescence of its lineages is fully represented in this subcontinent.

The signal of demographic expansion on both subcontinents suggests that this process seems to have occurred simultaneously, after the last glacial maximum. This inference is consistent with the hypothesis raised by Culver *et al.* (2000), of an extinction of North American pumas in the late Pleistocene, followed by re-colonization from South America. Our results corroborate and extend this hypothesis, showing evidence for a substantial and very recent demographic expansion in South America, which likely preceded or included the re-colonization of North America. Such a pattern was not clearly observed in previous studies, and sheds light onto the historical demography of present-day puma lineages. Our findings indicate that pumas were substantially affected by faunal changes induced by the Late Pleistocene extinction of large mammals, likely disappearing from North America, as previously postulated, with subsequent recolonization from the south. What is new in our results is the inference of a substantial demographic expansion in South America *ca.* 8,000 years ago, possibly induced by release from competitive interactions with other large carnivores that went extinct during the Late Pleistocene event. We see no evidence of a secondary expansion in North America, as the full data set mirrors the results observed with South America alone. We thus conclude that pumas likely re-colonized North America spurred by this Holocene demographic expansion stemming from South America. If corroborated by additional genetic markers and more refined sampling, especially in northern South America, this hypothesis would provide a useful demographic framework for pumas against which local patterns of genetic structure, genomic variation and population connectivity can be assessed.

## **Acknowledgments**

We thank C. R. Sarturi, A. Schnorr, A. C. G. Escobar, C. B. Pires, A. T. Hahn, F. Britto, F. G. Grazziotin, T. Haag, T. C. Trigo and T. L. L. Simão for laboratory assistance and helpful discussions regarding data analysis and interpretation, as well as J. Schiefelbain and M. G. da Silva for additional support. This work was funded by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, and Companhia Energética de São Paulo (CESP), Brazil. Part of this research was also supported by funds from the Intramural Research Program of the National Institutes of Health, National Cancer Institute, USA awarded to WEJ and SJO.

## References

- Akaike H (1974) A new look at the statistical model identification. *IEEE Trans AutomContr.* 19:716-723.
- Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol Ecol.* 7:371-379.
- Bandelt HJ, Forster P and Röhl A (1999) Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Mol Biol Evol.* 16(1):37–48.
- Barnett R, Barnes I, Phillips MJ, Martin LD, Harington CR, Leonard JA and Cooper A (2005) Evolution of the extinct Sabretooths and the American cheetah-like cat. *Curr Biol.* 15(15):R589-R590.
- Beier P, Vaughan MR, Conroy MJ and Quigley H (2003) A review of literature related to the Florida panther. Bureau of Wildlife Diversity Conservation - Florida Fish and Wildlife Conservation Commission.
- Castilho CS, Marins-Sá LG, Benedet RC and Freitas TO (2011) Landscape genetics of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. *Mammal Biol.* 76(4): 476-483.
- Culver M, Johnson WE, Pecon-Slattery J and O'Brien SJ (2000) Genomic ancestry of the American Puma (*Puma concolor*). *J Hered.* 91: 186-197.
- Delisle I and Strobeck C (2005) A phylogeny of the Caniformia (order Carnivora) based on 12 complete protein-coding mitochondrial genes *Mol Phylogenet Evol* 37:192–201.
- Doyle JJ and Doyle JL (1987) A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem Bull.* 19:11-15.
- Driscoll CA, Yamaguchi N, Bar-Gal GK, Roca AL, Luo S, Macdonald DW and O'Brien SJ (2009) Mitochondrial phylogeography illuminates the origin of the extinct caspian tiger

and its relationship to the amur tiger. *PLoS One*. 4(1):e4125.

Drummond AJ and Rambaut A (2007) BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC Evol Biol*. 7:214.

Drummond AJ, Rambaut A, Shapiro B and Pybus OG (2005) Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. *Mol Biol Evol*. 22(5):1185-1192.

Eizirik E (in press). A Molecular View on the Evolutionary History and Biogeography of Neotropical Carnivores (Mammalia, Carnivora). In: B.D. Patterson and L. P. Costa (eds.). *Bones, clones, and biomes: an extended history of recent Neotropical mammals*. Chicago: University of Chicago Press.

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

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

Excoffier L and Lischer H (2010) Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Mol Ecol Resources*. 10(3): 564-567.

Excoffier L, Smouse PE and Quattro JM (1992) Analysis of Molecular Variance Inferred From Metric Distances Among DNA Haplotypes: Application to Human Mitochondrial DNA Restriction Data. *Genetics*. 131:479-491.

Hasegawa M, Kishino H and Yano T (1985) Dating of human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J Mol Evol*. 22:160-174.

- Higgins DG, Thompson JD and Gibson TJ (1996) Using CLUSTAL for multiple sequence alignments. *Methods in enzymology*. 266: 383-402.
- Johnson WE, Culver M, Iriarte JA, Eizirik E, Seymour KL and O'Brien SJ (1998) Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *J Hered.* 89: 227-232.
- Johnson WE, Pecon-Slattery J, Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Bonacic C, Cambre R, Crawshaw P, Nunes A, O'Brien SJ *et al.* (1999) Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Mol Ecol.* 8:S79-S92.
- Johnson WE, Eizirik E, Pecon-Slattery J, Murphy WJ, Antunes A, Teeling E and O'Brien SJ (2006) The late Miocene radiation of modern Felidae: a genetic assessment. *Science*. 311:73-77.
- Kurtén B and Anderson E (1980) *Pleistocene Mammals of North America*. Columbia University Press, New York, 442 pp.
- Librado P and Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics Applications Note* Vol. 25 no. 11: 1451–1452.
- Logan KA and LL Swenor (2001) *Desert puma: evolutionary ecology and conservation of an enduring carnivore*. Island Press, Washington, D.C., USA.
- Maehr DS, Land ED, Shindle DB, Bass OL and Hockett TS (2002) Florida panther dispersal and conservation. *Biol Conserv.* 106:187-197.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Res.* 27:209-220.
- Miller MP (2005) Alleles in Space (AIS): Computer Software for the Joint Analysis of interindividual spatial and genetic information. *J. Hered.* 96(6):722-724.

- Miotto RA, Cervini M, Figueiredo MG, Begotti RA and Galetti Jr PM (2011) Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. *Conserv. Genet.* 12:1447–1455.
- Miotto RA, Cervini M, Begotti RA and Galetti Jr PM (2012) Monitoring a puma (*Puma concolor*) population in a fragmented landscape in southeast Brazil. *Biotropica* 44(1): 98–104.
- Nowak RM (1999) Walker's Mammals of the World. Vol. 2. 6th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore. Pp. 818-820.
- O'Brien SJ, Roelke M, Yuhki N, Richards KW, Johnson WE, Franklin WL, Anderson AE, Bass Jr. OL, Belden RC and Martenson JS (1990) Genetic Introgression within the Florida Panther *Felis concolor coryi*. *Natl Geog Res.* 6(4):485-494.
- Olson DM, Dinerstein E, Wikramanayake ED, Burgess ND, Powell GVN, Underwood EC, D'Amico JA, Itoua I, Strand HE, Kassem KR *et al.* (2001) Terrestrial Ecoregions of the World: A new map of life on earth. *BioScience.* 51(11):933-938.
- Posada D (2008) jModelTest: Phylogenetic Model Averaging. *Mol Biol Evol.* 25: 1253-1256.
- Pusey AE and Packer C (1987) The evolution of sex-biased dispersal in lions. *Behaviour.* 101(4):275-310.
- Redford KH and Eisenberg JF (1992) Mammals of the Neotropics. Vol. 2, The southern cone. Chicago: University of Chicago Press.
- Rogers AR and Harpending H (1992) Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Mol Biol Evol* 9(3):552-569.
- Saiki RK, Scharf S, Fallona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA and Arnheim N (1985)

Enzymatic amplification of  $\beta$ -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle-cell anemia. *Science*. 230: 1350-1354.

Sambrook E, Fritsch F and Maniatis T (1989) *Molecular Cloning*. 2nd edition. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.

Schneider S and Excoffier L (1999) Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics* 152:1079–1089.

Smith JLD (1993) The role of dispersal in structuring the Chitwan tiger population. *Behaviour* 124:165–195.

Tamura K, Dudley J, Nei M and Kumar S (2007) MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) Software Version 4.0. *Mol Biol Evol*. 24:1596-1599.

Tchaicka L, Eizirik E, Oliveira TG, Candido Jr. F and Freitas TRO (2007) Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Mol Ecol*. 16:819-838.

Trigo TC, Freitas TRO, Kunzler G, Cardoso L, Silva JCR, Johnson WE, O'Brien SJ, Bonatto SL and Eizirik E (2008) Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Mol Ecol*. 17:4317-4333.

Trinca CS, De Thoisy B, Rosas FCW, Waldemarin HF, Koepfli KP, Vianna JA and Eizirik E (2012) Phylogeography and demographic history of the Neotropical otter (*Lontra longicaudis*). *J. Hered.* 103(4):479-492.

Woodburne MO (2010) The Great American Biotic Interchange: Dispersals, Tectonics, Climate, Sea Level and Holding Pens. *J Mammal Evol*. 17:245–264.

*Internet Resources*

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, <http://www.ibge.gov.br> (april 30, 2012)

Chromas Lite 2.01 Program (<http://www.technelysium.com.au>) (march 12, 2011)

FinchTV 1.4.0 Program (<http://www.geospiza.com>) (march 12, 2011)

Network 4.5.1.6 Program ([www.fluxus-engineering.com](http://www.fluxus-engineering.com)) (april 3, 2011)



Tables and Figures:

Table 1: Variable sites (33) observed among the 28 haplotypes detected in a 669-bp fragment of the mtDNA *ND5* gene in *Puma concolor* samples (n= 174), along with their respective geographic groups of occurrence as defined by the AMOVA.

Haplotype	Variable sites <sup>a</sup>																																	N	Geographic groups <sup>b</sup>						
	0	1	1	1	1	1	2	2	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5	6	6	6	
H01	T	A	C	A	C	C	G	A	T	C	A	G	C	T	C	C	T	T	G	A	T	C	G	T	C	G	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C		
H02	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H03	.	.	.	.	.	.	A	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H04	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T
H05	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H06	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H07	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H08	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H09	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H10	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H11	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H13	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H14	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H15	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H16	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H17	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H18	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
H19	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H20	.	.	.	.	.	.	A	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H21	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
H22	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T	
H23	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
H24	.	.	.	.	.	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
H25	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
H26	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
H27	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		
H28	.	G	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	T		

<sup>a</sup> Asterisks indicate phylogenetically informative sites.

<sup>b</sup> Geographic group codes are as follows: NCA+NA: Northern Central America + North America; SCA: Southern Central America; NSA: Northern South America; CNESA: Central-North-Eastern South America; ESA: Eastern South America; CSSA: Central-Southern South America; SWSA: Southwestern

South America (see Figure 1 and Supplementary Table S2 for details on the distribution of each group).

Sub-Continent	N <sup>b</sup>	Nucleotide Diversity ( $\pm$ SE) Per site	Gene Diversity ( $\pm$ SE)	Haplotypes
North America	13	0.00217 (0.00158)	0.295 (0.156)	H23- H25
Central America	17	0.00523 (0.00114)	0.794 (0.075)	H09, H23, H24, H26 - H28
South America	156	0.00428 (0.00027)	0.904 (0,011)	H01 - H22
Total	186	0.00547 (0.00029)	0.920 (0.008)	
<b>Geographic region<sup>a</sup></b>				
NA+NCA	24	0.00179 (0.00094)	0.496 (0.119)	H23 - H28
SCA	6	0.00608 (0.00155)	0.733 (0.155)	H09, H23, H24
NSA	6	0.00104 (0.00067)	0.333 (0.215)	H16, H20
CNESA	97	0.00315 (0.00027)	0.828 (0.027)	H01 - H04, H06, H07, H09 - H11, H13 - H17, H21, H22
ESA	6	0.00000 (0.00000)	0.000 (0.000)	H03
CSSA	15	0.00246 (0.00047)	0.810 (0.078)	H05 - H09, H12
SWSA	20	0.00334 (0.00032)	0.595 (0.073)	H07, H18, H19
Total	174	0.00553 (0.00030)	0.919 (0.010)	

Table 2: Nucleotide and gene diversity levels observed in *Puma concolor ND5* sequences. Geographic groups were defined on the basis of the AMOVA results (see text and Tables 1 and 3).

<sup>a</sup> Geographic acronyms are as in Table 1.

<sup>b</sup> N = number of individuals sampled for each continent/region. All samples (n=186) were used for the sub-continental analysis, while 12 individuals lacking detailed geographic information were excluded from the regional analysis, resulting in a sample of 174 animals.

Table 3: Best  $\Phi_{st}$  values for different population structure scenarios in *Puma concolor*, as assessed with an AMOVA approach.

Group	$\Phi_{st}$
<b>1. South America only</b> (144 individuals)	
a) 4 SA subspecies proposed by Culver et al. (2000)	0.22001*
b) Grouped biomes from SA <sup>a</sup>	0.25871*
c) Five groups from SA (NSA, CNESA, ESA, CSSA and CWSA) <sup>b</sup>	0.35993*
<b>2. Total sample</b> (174 individuals)	
a) 6 subspecies proposed by Culver et al. (2000)	0.42353*
b) 7 groups [(NA+NCA), SCA, NSA, CNESA, ESA, CSSA and CWSA] <sup>b</sup>	0.57314*
c) NA+NCA x SCA x SA subcontinents <sup>c</sup>	0.55740*
d) 2-level [(NA+NCA) x SCA x (NSA + CNESA + ESA + CSSA + CWSA)] <sup>d</sup>	0.67290*
<b>3. Barriers</b>	
Amazon River acting as a barrier <sup>e</sup>	0.34739*
Paraná River acting as a barrier <sup>e</sup>	0.09041*

\* Significant  $\Phi_{st}$  ( $p < 0.01$ )

<sup>a</sup> 3 groups: 1<sup>st</sup> – northern Amazon Rainforest (Tropical Moist Broadleaf Forests), Tropical Dry Broadleaf Forests and Tropical Grasslands, Savannas and Shrublands in Venezuela; 2<sup>nd</sup> – southern Amazon Rainforest and Atlantic Forests (Tropical and Subtropical Moist Broadleaf Forests), Pantanal (Flooded Grasslands and Shrublands), Caatinga (Xeric Shrublands), Cerrado, Pampas, Gran Chaco and Beni Savanna (Tropical and Subtropical Grasslands, Savannas and Shrublands), Patagonian Pampas (Temperate Grasslands, Savannas and Shrublands) and tropical dry broadleaf forests in Bolivia; 3<sup>rd</sup> – Andean biomes: Temperate Broadleaf and Mixed Forests, Montane Grasslands and Shrublands, Desert and Xeric Shrublands and Mediterranean Forests, Woodlands and Scrubs (Olson *et al.* 2001; IBGE 2010).

<sup>b</sup> Acronyms for geographic groups are as defined in Table 1 and Figure 1.

<sup>c</sup> Central America was divided into two separate groups, northern (NCA) and southern (SCA).

<sup>d</sup> 1<sup>st</sup> level: 3 groups: NA+NCA (2 populations), SCA (1 population), SA (5 populations); 2<sup>nd</sup> level: 7 populations ([NA + NCA] x [SCA] x [NSA + CNESA + ESA + CSSA + CWSA]);

<sup>e</sup> Considering only samples collected near the river (see text for details).

Table 4: Neutrality tests for *Puma concolor* ND5 sequences, considering both the ‘Total’ and ‘South American’ (SA) sample sets.

	Total	SA
Tajima’s D	-1.16291	-0.98375
Fu and Li’s D*	-0.82174	-0.39340
Fu and Li’s F*	-1.15989	-0.75225
Fu’s Fs	-9.322 <sup>a</sup>	-7.283 <sup>a</sup>

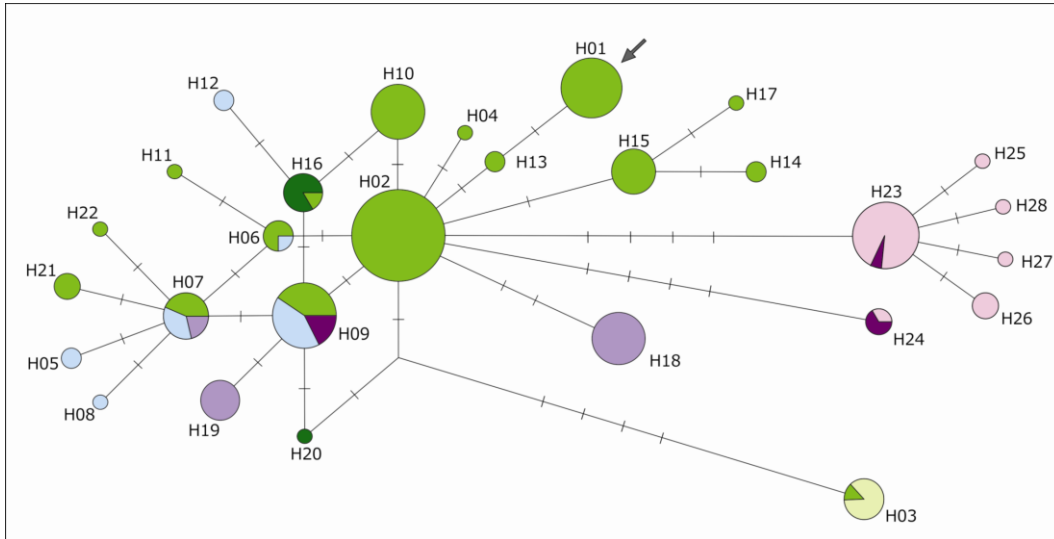
<sup>a</sup> Significant values ( $P < 0.02$ ).



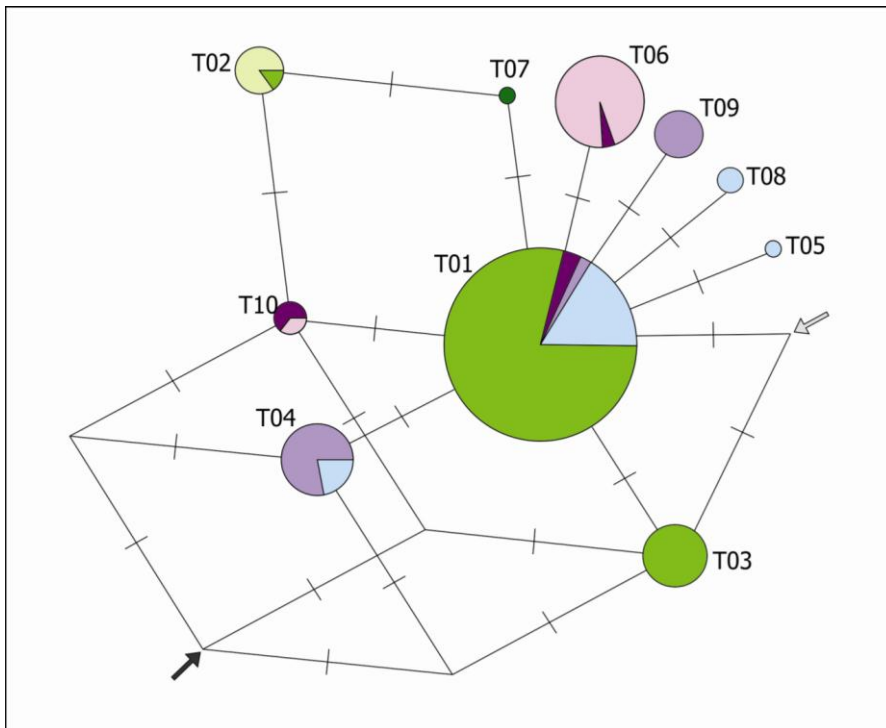
Figure 1. Geographic distribution of the *Puma concolor* samples analyzed here. Blue lines indicate three major rivers. The different colors indicate the seven groups identified with the AMOVA (see text and Table 3 for details): Northern Central America + North America (NCA+NA, in light pink), Southern Central America (SCA, in dark pink), Northern South America (NSA, in dark green), Central-North-Eastern South America (CNESA, in medium green), Eastern South America (ESA, in light green), Central-Southern South America (CSSA, in light blue) and Southwestern South America (SWSA, in lilac).



2.a)



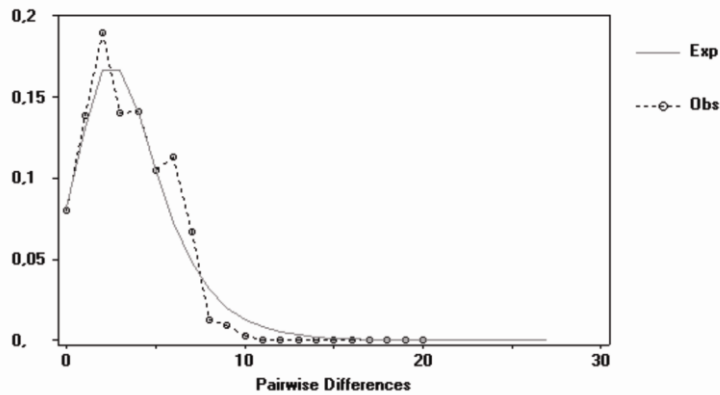
2.b)



2. Median-joining networks based on puma *ND5* haplotypes. The area of each circle is proportional to the haplotype frequency. The relative frequency of populations in each

haplotype is indicated by the proportion of different colors (coded as in Figure 1). a) Analysis of the full data set (669 bp). The arrow indicates the point where the outgroup *P. yagouaroundsi* is connected. b) Analysis of a subset of the nucleotide sites that overlap with the *Miracinonyx trumani* sequence (286 bp). Arrows indicate the points where the outgroup taxa join the network: *P. yagouaroundsi* (in gray; 32 mutational steps from the connection point), and *M. trumani* (in black; 19 steps from the connection point).

3.a)



3.b)

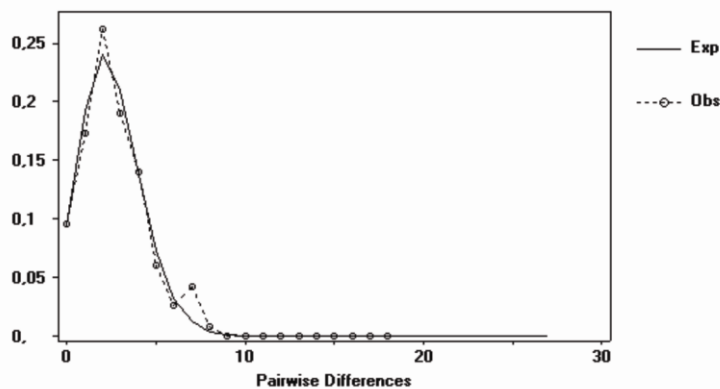
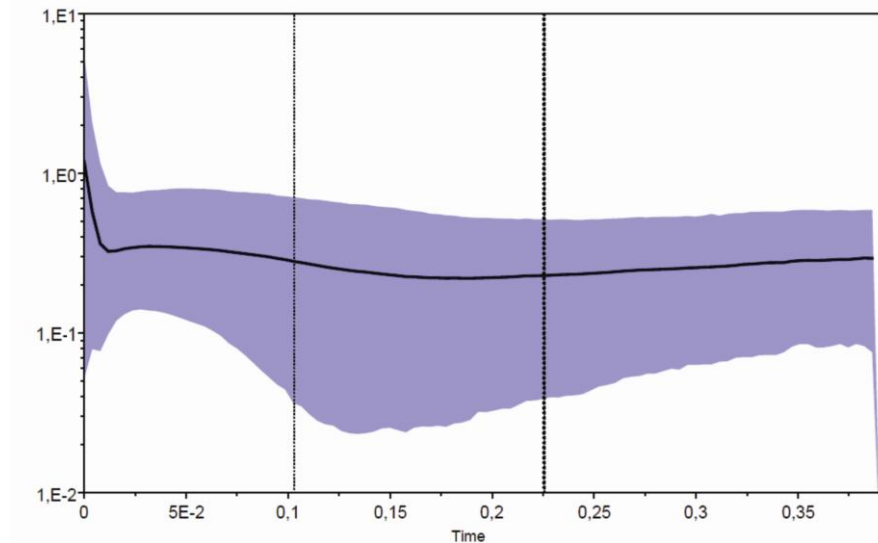


Figure 3. Graphs depicting the results of the Mismatch Distribution analysis for the total



sample (a) and South American samples alone (b). The analysis was performed with 669 bp of *P. concolor* *ND5* sequences (excluding all sites with missing information or gaps). The dashed line represents the observed pattern, while the continuous line depicts the pattern expected under a model of sudden demographic expansion.

4.a)



4.b)

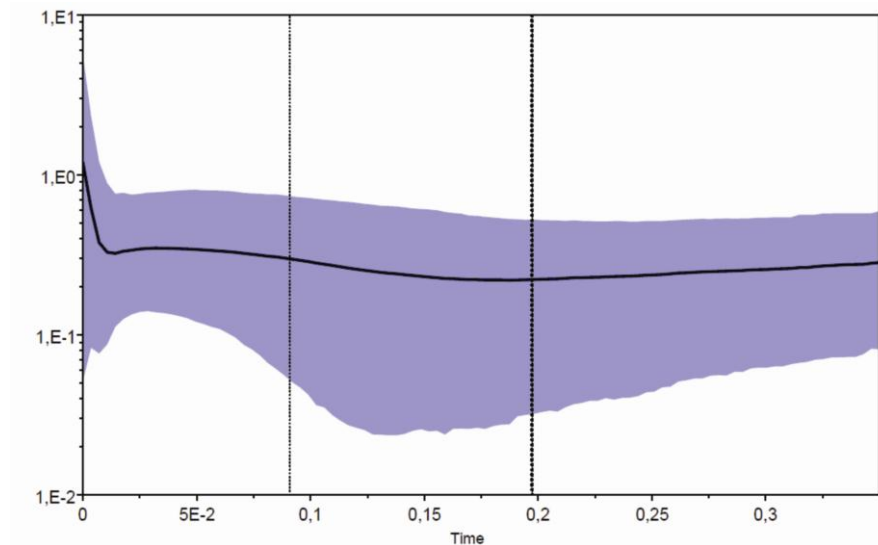


Figure 4. Bayesian Skyline plots derived from an alignment of puma *ND5* sequences. In (a)

the analysis was run for all puma samples, and in (b) for South American pumas only. The thick solid line represents the mean, while the 95% HPD (highest posterior density) limits are shown by the blue areas. The vertical dashed lines refer to the  $t_{MRC A}$ , with the thin line indicating the lower 95% HPD limit, and the thick line representing the mean. The x-axis is depicted on a scale of millions of years (myr). The y-axis represents the effective population size ( $N_e$ ) multiplied by the generation time (also in myr). Assuming a generation time of 5 years, the numbers on this axis should be multiplied by 200,000 to yield interpretable values.

## Supplementary Material

The following online material is available for this article:

Table S1: Geographic locales included in this study, including the individuals sampled at each site, and the source of the biological material analyzed here.

Site Name (Region, Country)	Individuals No.	Individuals Name	Geographic Coordinates (Lat/ Long)	Contact and/or Institution
British Columbia, Canada	3	Pco242, Pco258, Pco357	54.9,-124.5	LGD/NCI
Oregon, USA	1	Pco007	43.935833,-120.575	LGD/NCI
Idaho, USA	1	Pco340	43.7,-116	LGD/NCI
Yellowstone National Park, USA	2	Pco372, Pco377	44.460556,-110.827778	LGD/NCI
Texas, USA	4	Pco036, Pco037, Pco128, Pco356	25.833333,-93.516667	LGD/NCI
Florida, USA	2	Pco077, Pco348	24.5,-79.8	LGD/NCI
El Petén, Guatemala	2	Pco556, Pco446	16.9,-89.9	LGD/NCI
Northern Central Guatemala	1	Pco555	15.5,-90.25	LGD/NCI
Southern Guatemala	1	Pco557	15.5,-90.25	LGD/NCI
Granada, Nicaragua	1	Pco549	11.933333,-85.95	LGD/NCI
Chontales, Nicaragua	1	Pco550	12.083333,-85.4	LGD/NCI
Matagalpa, Nicaragua	1	Pco552	12.916667,-85.916667	LGD/NCI
Northern Nicaragua	2	Pco554, Pco551	12.904167,-84.921944	LGD/NCI
Nueva Guinea, Nicaragua	1	Pco553	11.683333,-84.45	LGD/NCI
Costa Rica	4	Pco545, Pco547, Pco548, Pco546	10,-84	LGD/NCI
Guanacaste, Costa Rica	1	Pco544	10.433333,-85.4	LGD/NCI
Darién, Panama	2	Pco541, Pco542	8.408333,-77.915	LGD/NCI
Falcón, Venezuela	2	Pco704, Pco703	8,-66	LGD/NCI
Barquisimeto, Venezuela	1	Pco705	10.066667,-69.316667	LGD/NCI
Tefé, AM, BR	1	bPco358	-3.353889,-64.710833	Diogo Faria/ CETAS/IBAMA/ Pró-Carnívoros
Presidente Figueiredo, AM, BR	1	bPco342	-2.017222,-60.025	Diogo Faria/ CETAS/IBAMA/ Pró-Carnívoros
Rio Preto da Eva, AM, BR	1	bPco343	-2.698889,-59.7	Diogo Faria/ CETAS/IBAMA/ Pró-Carnívoros
Antofagasta, Chile	1	Pco214	-24.616667,-69.533333	LGD/NCI
Vicuña, Chile	1	Pco208	-33,-71.516667	LGD/NCI
Ovalle, Chile	2	Pco207, Pco215	-30.6,-71.2	LGD/NCI
Mendoza, Argentina	3	Pco570, Pco573	-32.88,-69.00	LGD/NCI
Santiago, Chile/ Mendoza, Argentina	10	Pco201, Pco209, Pco210, Pco211, Pco212, Pco216, Pco217, Pco564, Pco570, Pco573	-33.073131,-70.059814	LGD/NCI
Angol/Coñaripe, Chile	1	Pco213	-32.653056,-70.011944	LGD/NCI
Villarica, Chile	1	Pco218	-39.266667,-72.216667	LGD/NCI
Torres Del Paine National Park, Chile	1	Pco200	-50.983056,-72.966389	LGD/NCI
Punta Arenas, Chile	1	Pco202	-53.15,-70.916667	LGD/NCI

Chubut, Argentina	1	Pco567	-45.8,-67.5333	LGD/NCI
La Pampa, Argentina	1	Pco565	-36.833333,-66	LGD/NCI
Cordoba, Argentina	1	Pco577	-31.416667,-64.183333	LGD/NCI
Northern Argentina	1	Pco562	-23.408333,-64.427778	LGD/NCI
Uruguay	2	Pco580, Pco582	-31.683333,-55.416667	LGD/NCI
Chaco, Paraguay	3	Pco699, Pco701, Pco581	-23.0,-58.0	LGD/NCI
Potosí, Bolivia	3	Pco706, Pco709, Pco710	-19.583333,-65.75	LGD/NCI
Santa Cruz, Bolivia	2	Pco707, Pco708	-17.8,-63.166667	LGD/NCI
Ponta Porã, MS, BR	2	bPco327, bPco039	-22.535833,-55.725833	Ronaldo Morato/ Pró-Carnívoros
Jardim, MS, BR	2	bPco035, bPco040	-21.48,-56.137778	Ronaldo Morato/ Pró-Carnívoros
Miranda, MS, BR	3	bPco063, bPco064, bPco062	-20.240833,-56.377778	Fernando Azevedo/ Projeto Gadonça
Corumbá, MS, BR	2	bPco037, bPco038	-19.008889,-57.652778	Ronaldo Morato/ Pró-Carnívoros
Corguinho, MS, BR	1	bPco326	-19.831944,-54.828889	Roberta Humberg/ CRAS
Barão de Melgaço, MT, BR	11	bPco024, bPco025, bPco029, bPco031, bPco032, bPco026, bPco027, bPco028, bPco030, bPco033, bPco036	-16.278889,-55.957778	Rodrigo Jorge/ Pró-Carnívoros
Alta Floresta, MT, BR	1	bPco041	-9.875556,-56.086111	Fernanda Michalski /Pró- Carnívoros
Santarém, PA, BR	1	bPco082	-2.442778,-54.707778	Glauca Pontes
Guaramiranga, CE, BR	1	bPco069	-4.262778,-38.932778	Marcos Renato Mattos
Quixeramobim, CE, BR	1	bPco070	-5.198889,-39.292778	Marcos Renato Mattos
Campina Grande, PB, BR	1	Pco700	-7.230556,-35.881111	LGD/NCI
Araguaína, TO, BR	1	Pco601	-7.190833,-48.206944	LGD/NCI
São Geraldo Araguaia, PA	1	bPco346	-6.400833,-48.555	Joares May/ Inst. Biotrópicos
Araguaia, GO, BR	1	Pco697	-13.275,-50.162778	LGD/NCI
Chapada Gaúcha, MG, BR	2	bPco337; bPco338	-15.305833,-45.617778	Joares May, Edsel Amorim Jr/ Inst. Biotrópicos
Luziânia, GO, BR	1	bPco333	-16.318611,-47.78	COFAU
Goiás, BR	2	bPco316; Pco602	-15.933889,-50.14	Ivaldo M. Carvalho/ Pró- Carnívoros; LGD/NCI
Bataguassu, MS, BR	1	bPco001	-21.713889,-52.421944	Projeto Porto Primavera
MS, BR	1	bPco019	-20.442778,-54.645833	Pró-Carnívoros
Anaurilândia, MS, BR	16	bPco020, bPco021, bPco022, bPco023, bPco044, bPco045, bPco046, bPco047, bPco048, bPco049, bPco054, bPco056, bPco057, bPco058, bPco059, bPco067, bPco043, Pco712	-22.187778,-52.717778	Dênis Sana/ Pró- Carnívoros
Batayporã, MS, BR	2	bPco043, Pco712	-22.295,-53.270833	Dênis Sana/ Pró-Carnívoros/ LGD/NCI
Ivinhema, MS, BR	7	bPco050, bPco051, bPco052, bPco053,	-22.305,-53.815	Dênis Sana/ Pró-Carnívoros

		bPco055, bPco060, bPco066		
Ilha Solteira, SP, BR	2	bPco319, bPco320	-20.432778,-51.342778	Rodrigo Jorge/ Pró-Carnívoros
Porto Primavera, MS, BR	2	bPco002, Pco702	-22.58,-53.058889	LGD/NCI
Bataguassu, MS, BR	1	bPco042	-21.713889,-52.421944	Dênis Sana/ Pró-Carnívoros
Parque Nacional do Monte Pascoal, Porto Seguro, BA, BR	1	bPco349	-16.45,-39.065	Sandra Becker
Centralina, MG, BR	1	bPco071	-18.583889,-49.198889	Frederico Genésio Lemos and Hugo C. M. Costa
P. E. Cantareira, SP, BR	1	bPco034	-23.318889,-46.586944	Pró-Carnívoros
Extrema, MG, BR	1	bPco331	-22.855,-46.317778	Pró-Carnívoros
Getulina, SP, BR	1	bPco351	-21.798889,-49.928889	Alexandre Vogliotti and Javier A. /NUPECCE
Cananéia, SP, BR	1	bPco014	-25.015,-47.926944	Fábio Olmos
Analândia, SP, BR	2	bPco317, Pco dot-d25	-22.125833,-47.662778	Renata Miotto/ UFSCar
Rio Claro/Iracemápolis, SP, BR	1	Pco dot-d23	-22.540278,-47.593611	Renata Miotto/ UFSCar
Paulínia, SP, BR	1	Pco dot-d45	-22.761111,-47.154167	Renata Miotto/ UFSCar
Sertãozinho, SP, BR	1	Pco dot-d51	-21.198611,-48.170278	Renata Miotto/ UFSCar
Northwestern SP, BR	1	Pco599	-20.512778,-50.351944	LGD/NCI
Ribeirão Branco, SP, BR	1	bPco318	-24.220833,-48.765833	Ronaldo Morato/ Pró-Carnívoros
Itapetininga, SP, BR	1	bPco302	-23.591944,-48.052778	Ronaldo Morato/ Pró-Carnívoros
Ribeirão Preto, SP, BR	1	bPco332	-21.177778,-47.81	Jorge Bin/ Pró-Carnívoros
Itirapina, SP, BR	1	Pco dot-d29	-22.240556,-47.806667	Renata Miotto/ UFSCar
Itirapina, SP, BR	1	Pco dot-d99	-22.351944,-47.915278	Renata Miotto/ UFSCar
Matão, SP, BR	1	Pco dot-d42	-21.585833,-48.446944	Renata Miotto/ UFSCar
Catanduva, SP, BR	1	Pco dot-d43	-21.142222,-49.00833	Renata Miotto/ UFSCar
Cajuru, SP, BR	1	Pco dot-d44	-21.17,-47.294167	Renata Miotto/ UFSCar
Araraquara, SP, BR	1	Pco dot-d70	-21.736389,-48.170278	Renata Miotto/ UFSCar
Ibirarema, SP, BR	1	bPco315	-22.817778,-50.072778	Elizeu P. Ribeiro/ IBAMA
Londrina, PR, BR	1	bPco080	-23.31,-51.162778	Fernando Jerep
Blumenau, SC, BR	2	PC26cc, PC27cc	-26.908889,-49.072222	Camila S. Castilho/ Projeto Leão Baio
Lages, SC, BR	6	PC08cc, PC10cc, PC15cc, PC18cc, PC19cc, PC23cc	-28.815833,-50.325000	Camila S. Castilho/ Projeto Leão Baio
Ponta Alta, SC, BR	1	PC11cc	-27.484167,-50.380278	Camila S. Castilho/ Projeto Leão Baio
São Joaquim, SC, BR	2	PC20cc, PC49cc	-28.293889,-49.931667	Camila S. Castilho/ Projeto Leão Baio
Urubici, SC, BR	6	PC01cc, PC03cc, PC04cc, PC06cc, PC07cc, PC22cc	-28.015000,-49.591667	Camila S. Castilho/ Projeto Leão Baio

USA= United States of America, BR= Brazil, AM= Amazonas State, BA= Bahia State, CE= Ceará State, GO= Goiás State, MG= Minas Gerais State, MS= Mato Grosso do Sul State, MT= Mato Grosso State, PA= Pará State, PB= Paraíba State, PR= Paraná State, SC= Santa Catarina State, SP= São Paulo State. LGD/NCI: Laboratory of Genomic Diversity, National Cancer Institute, USA; CETAS: Centro de Triagem de Animais Silvestres; COFAU: Coordenação de Proteção de Espécies da Fauna; CRAS: Centro de Reabilitação de Animais Silvestres; IBAMA: Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis; NUPECCE: Núcleo de Pesquisa e Conservação em Cervídeos.

Table S2: *Puma concolor* samples analyzed in this study, including their locale of origin, biome (South American samples only), ND5 haplotype and affiliation in the geographic groups defined by the AMOVA (see text for details).

Individual	Sampling Locale	Biome	Haplotype	AMOVA group
bPco001	Bataguassu, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco002	Usina de Porto Primavera, MS, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
bPco014	Cananéia, SP, BR	Atlantic Forest	H03	ESA
bPco019	MS, BR	Atlantic Forest / Cerrado/ Pantanal	H01	CNESA
bPco020	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
bPco021	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco022	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H14	CNESA
bPco023	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco024	Barão de Melgaço, MT, BR	Pantanal	H02	CNESA
bPco025	Pantanal - MT, BR	Pantanal	H02	CNESA
bPco026	Barão de Melgaço, MT, BR	Pantanal	H03	CNESA
bPco027	Barão de Melgaço, MT, BR	Pantanal	H21	CNESA
bPco028	Pantanal, MT, BR	Pantanal	H21	CNESA
bPco029	Barão de Melgaço, MT, BR	Pantanal	H02	CNESA
bPco030	Barão de Melgaço, MT, BR	Pantanal	H21	CNESA
bPco031	Barão de Melgaço, MT, BR	Pantanal	H02	CNESA
bPco032	Pantanal, MT, BR	Pantanal	H02	CNESA
bPco033	Pantanal, MT, BR	Pantanal	H06	CNESA
bPco034	PE Cantareira, SP, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco035	Jardim, MS, BR	Cerrado	H07	CNESA
bPco036	Pantanal - MS ou MT, BR	Pantanal	H06	CNESA
bPco037	Corumbá, MS, BR	Pantanal	H05	CSSA
bPco038	Corumbá, MS, BR	Pantanal	H05	CSSA
bPco039	Ponta Porã, MS, BR	Cerrado	H09	CNESA

bPco040	Jardim, MS, BR	Cerrado	H10	CNESA
bPco041	Alta Floresta, MT, BR	Amazon Forest	H11	CNESA
bPco042	Bataguassu, MS, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
bPco043	Batayporã, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco044	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco045	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco046	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
bPco047	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H07	CNESA
bPco048	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
bPco049	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco050	Ivinhema, MS, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
bPco051	Ivinhema, MS, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
bPco052	Ivinhema, MS, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
bPco053	Ivinhema, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco054	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H09	CNESA
bPco055	Ivinhema, MS, BR	Atlantic Forest	H14	CNESA
bPco056	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco057	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H09	CNESA
bPco058	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
bPco059	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
bPco060	Ivinhema, MS, BR	Atlantic Forest	H07	CNESA
bPco062	Miranda_MS_BR	Pantanal	H12	CSSA
bPco063	Miranda_MS_BR	Pantanal	H07	CSSA
bPco064	Miranda_MS_BR	Pantanal	H12	CSSA
bPco066	Ivinhema, MS, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco067	Anaurilândia, MS, BR	Atlantic Forest	H09	CNESA
bPco069	Guaramiranga, CE, BR	Caatinga (Xeric Shrublands)	H13	CNESA
bPco070	Quixeramobim, CE, BR	Caatinga (Xeric Shrublands)	H13	CNESA



bPco071	Centralina, MG, BR	Atlantic Forest	H03	ESA
bPco080	Londrina, PR, BR	Atlantic Forest	H09	CNESA
bPco082	Santarém, PA, BR	Amazon Forest	H22	CNESA
bPco302	Itapetininga, SP, BR	Atlantic Forest / Cerrado	H04	CNESA
bPco315	Ibirarema, SP, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
bPco316	GO, BR	Cerrado	H09	CNESA
bPco317	Analândia, SP, BR	Cerrado	H02	CNESA
bPco318	Ribeirão Branco, SP, BR	Atlantic Forest	H09	CNESA
bPco319	SP, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco320	SP, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
bPco326	Corguinho, MS, BR	Atlantic Forest	H09	CSSA
bPco327	Ponta Porã, MS, BR	Cerrado	H06	CNESA
bPco331	Extrema, MG, BR	Atlantic Forest	H01	CNESA
bPco332	Ribeirão Preto, SP, BR	Cerrado	H15	ESA
bPco333	Luziânia, GO, BR	Cerrado	H02	CNESA
bPco337	Chapada Gaúcha, MG, BR	Cerrado	H02	CNESA
bPco338	Chapada Gaúcha_MG_BR	Cerrado	H02	CNESA
bPco342	Presidente Figueiredo, AM, BR	Amazon Forest	H16	NSA
bPco343	Rio Preto da Eva, AM, BR	Amazon Forest	H16	NSA
bPco346	São Geraldo do Araguaia, PA	Amazon Forest	H17	CNESA
bPco349	ParNA Montel Pascoal, BA, BR	Atlantic Forest	H03	ESA
bPco351	Getulina, SP, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
bPco358	Tefé, AM, BR	Amazon Forest	H16	NSA
d23	Rio Claro, SP, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
d25	Analândia, SP, BR	Cerrado	H02	CNESA
d29	Itirapina, SP, BR	Cerrado	H15	CNESA
d42	Matão, SP, BR	Cerrado	H15	ESA
d43	Catanduva, SP, BR	Atlantic Forest	H15	ESA

d44	Cajuru, SP, BR	Atlantic Forest / Cerrado	H02	ESA
d45	Paulínia, SP, BR	Atlantic Forest	H03	ESA
d51	Sertãozinho, SP, BR	Cerrado	H03	CNESA
d70	Araraquara, SP, BR	Cerrado	H15	ESA
d99	Itirapina, SP, BR	Cerrado	H15	ESA
PC01cc	Urubici, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC03cc	Urubici, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC04cc	Urubici, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC06cc	Urubici, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC07cc	Urubici, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC08cc	Lages, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC10cc	Lages, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC11cc	Ponta Alta, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC15cc	Lages, SC, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
PC18cc	Lages, SC, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
PC19cc	Lages, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC20cc	São Joaquim, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC22cc	Urubici, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
PC23cc	Lages, SC, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
PC26cc	Blumenau, SC, BR	Atlantic Forest	H10	CNESA
PC27cc	Blumenau, SC, BR	Atlantic Forest	H16	CNESA
PC49cc	São Joaquim, SC, BR	Atlantic Forest	H02	CNESA
Pco007	Oregon, USA		H23	NCA+NA
Pco036	Texas, USA		H23	NCA+NA
Pco037	Texas, USA		H23	NCA+NA
Pco077	Florida, USA		H24	NCA+NA
Pco128	Texas, USA		H23	NCA+NA
Pco200	Torres Del Paine NP, Chile	Temperate grasslands and Shrublands	H18	SWSA

Pco201	Chile	Mediterranean scrub, montane grasslands, Desert and xeric Shrublands	H18	SWSA
Pco202	Punta Arenas, Chile	Patagonian Pampas (Temperate Grasslands, Savannas and Shrublands)	H18	SWSA
Pco207	Ovalle, IV region, Chile	Mediterranean scrub	H19	SWSA
Pco208	Vicuña, IV region, Chile	Mediterranean scrub	H18	SWSA
Pco209	Chile	Mediterranean scrub, montane grasslands, Desert and xeric Shrublands	H19	SWSA
Pco210	Chile	Mediterranean scrub, montane grasslands, Desert and xeric Shrublands	H19	SWSA
Pco211	Chile	Mediterranean scrub, montane grasslands, Desert and xeric Shrublands	H19	SWSA
Pco212	Cordillheiras Santiago, Chile/Mendoza, Argentina	Montane grasslands	H18	SWSA
Pco213	Angol/Coñaripe, Chile	Mediterranean scrub	H18	SWSA
Pco214	Antofagasta, Chile	Mediterranean scrub	H18	SWSA
Pco215	Ovalle, Chile	Mediterranean scrub	H19	SWSA
Pco216	Chile	Mediterranean scrub, montane grasslands, Desert and xeric Shrublands	H19	SWSA
Pco217	Chile	Mediterranean scrub, montane grasslands, Desert and xeric Shrublands	H19	SWSA
Pco218	Villarica, Chile	Mediterranean scrub	H18	SWSA
Pco242	British Columbia, Canada		H23	NCA+NA
Pco258	British Columbia, Canada		H23	NCA+NA
Pco340	Idaho, USA		H23	NCA+NA
Pco348	Florida, USA		H25	NCA+NA
Pco356	Texas, USA		H23	NCA+NA
Pco357	British Columbia, Canada		H23	NCA+NA
Pco372	Yellowstone NP, USA		H23	NCA+NA
Pco377	Yellowstone NP, USA		H23	NCA+NA
Pco446	El Petén, Guatemala		H26	NCA+NA
Pco541	Darién, Panama		H23	SCA
Pco542	Darién, Panama		H24	SCA
Pco544	Guanacaste, Costa Rica		H23	NCA+NA
Pco545	Costa Rica		H09	SCA

Pco546	Costa Rica		H24	SCA
Pco547	Costa Rica		H09	SCA
Pco548	Costa Rica		H09	SCA
Pco549	Granada, Nicaragua		H23	NCA+NA
Pco550	Chontales, Nicaragua		H23	NCA+NA
Pco551	Nicaragua		H27	NCA+NA
Pco552	Matagalpa, Nicaragua		H23	NCA+NA
Pco553	Nueva Guinea, Nicaragua		H26	NCA+NA
Pco554	North Nicaragua		H23	NCA+NA
Pco555	Central-North Guatemala		H26	NCA+NA
Pco556	El Petén, Guatemala		H23	NCA+NA
Pco557	Sul Guatemala		H28	NCA+NA
Pco562	North Argentina	Montane grasslands, trop. and subtrop. moist forests, trop. and subtrop. grasslands and shrublands, trop. and subtrop. dry forests	H07	CSSA
Pco564	Foothills of Andes, Argentina	Montane grasslands	H07	SWSA
Pco565	La Pampa, Argentina	Patagonian Pampas (Temperate Grasslands, Savannas and Shrublands)	H18	SWSA
Pco567	Chubut, Argentina	Patagonian Pampas (Temperate Grasslands, Savannas and Shrublands)	H07	SWSA
Pco570	Mendoza, Argentina	Montane grasslands	H18	SWSA
Pco573	Mendoza, Argentina	Montane grasslands	H18	SWSA
Pco577	Córdoba, Argentina	Patagonian Pampas (Temperate Grasslands, Savannas and Shrublands)	H07	CSSA
Pco580	Mercedes Zoo, Uruguay	Pampa (tropical and subtropical grasslands and shrublands)	H09	CSSA
Pco581	Paraguay	Tropical and subtrop. grasslands and shrublands, trop. and subtrop. dry forest, chaco	H07	CNESA
Pco582	Zoo Durazno, Uruguay	Pampa (tropical and subtropical grasslands and shrublands)	H09	CSSA
Pco599	Northwest SP, BR	Atlantic Forest/ Cerrado	H03	ESA
Pco601	Araguaína, TO, BR	Cerrado	H10	CNESA
Pco602	Goiás, BR	Cerrado	H02	CNESA
Pco697	Araguaia, GO, BR	Cerrado	H02	CNESA
Pco699	Chaco Paraguay	Pantanal (Chaco)	H02	CNESA
Pco700	Campina Grande, PB, BR	Caatinga (Xeric Shrublands)	H02	CNESA

Pco701	Paraguay	Tropical and subtrop. grasslands and shrublands, trop. and subtrop. dry forest, chaco	H01	CNESA
Pco702	Usina de Porto Primavera, MS, BR	Atlantic Forest	H15	CNESA
Pco703	Venezuela	Trop. and subtrop. moist forests, trop. and subtrop. grasslands and shrublands, trop. and subtrop. dry forest	H20	NSA
Pco704	Falcón, Venezuela	Coriano System	H16	NSA
Pco705	Barquisimeto, Venezuela	Coriano System	H16	NSA
Pco706	Potosí, Bolivia	Montane grasslands	H09	CSSA
Pco707	Santa Cruz, Bolivia	Beni Savanna, Tropical and subtrop. dry broadleaf forest/Amazon Rainforest (trop. moist forests)	H06	CSSA
Pco708	Santa Cruz, Bolivia	Tropical and subtrop. dry broadleaf forest/Amazon Rainforest (trop. moist forests)	H09	CSSA
Pco709	Potosí, Bolivia	Montane grasslands	H09	CSSA
Pco710	Potosí, Bolivia	Montane grasslands	H08	CSSA
Pco712	Batayporã, MS, BR	Atlantic Forest	H09	CNESA
bPco015*	Campinas Zoo, BR		-	-
bPco016*	Campinas Zoo, BR		-	-
Pco558*	Argentina		-	-
Pco559*	Argentina		-	-
Pco560*	Argentina		-	-
Pco561*	Argentina		-	-
Pco571*	Mendoza Zoo, Argentina		-	-
Pco574*	Mendoza Zoo, Argentina		-	-
Pco575*	Mendoza Zoo, Argentina		-	-
Pco578*	Cordoba Zoo, Argentina		-	-
Pco579*	Cordoba Zoo, Argentina		-	-
Pco600*	Sorocaba Zoo, SP, BR		-	-

\* Samples included only in general estimates of genetic diversity indices and neutrality tests.

Table S3 Nucleotide and gene diversity levels observed in *Puma concolor* mtDNA *ND5* sequences, compared to estimates for *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi* based on a shared 567 bp-long *ND5* fragment.

Species	N	Nucleotide Diversity ( $\pm$ SE) per site	Gene Diversity ( $\pm$ SE)
<i>Puma concolor</i>	186	0.00547 (0.00029)	0.9200 (0.008)
<i>P. concolor</i> in the Neotropical ecozone	173	0.00523 (0.00034)	0.9130 (0.010)
<i>Leopardus tigrinus</i>	46	0.00310 (0.0004)	0.7590 (0.0450)
<i>L. geoffroyi</i>	32	0.00390 (0.0004)	0.8250 (0.0450)

Table S4: Pairwise  $\Phi_{st}$  values among subcontinental groups groups of *Puma concolor*, estimated on the basis of p-distances (see text for details).

	SA	SCA
SCA	0.61042*	
NCA+NA	0.12353*	0.63855*

Obs.: \* significant  $\Phi_{st}$  ( $p < 0.05$ ). Acronyms are as follows: SA (156 individuals): South America; SCA (6 individuals): Southern Central America; NA+ NCA (24 individuals): North America + Northern Central America.

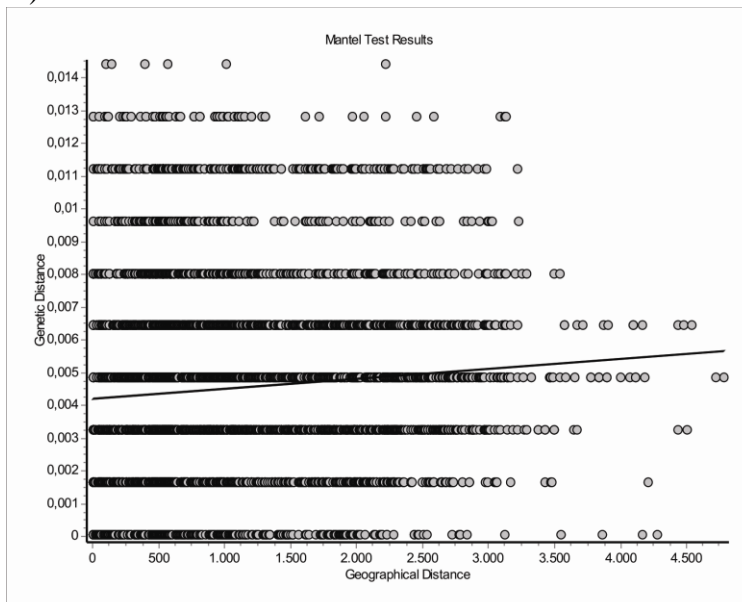
Table S5: Pairwise  $\Phi_{st}$  values among seven major groups of *Puma concolor*, estimated on the basis of p-distances (see text for details)

	NA+NCA	SCA	NSA	CNESA	ESA	CSSA
SCA	0.63855*					
NSA	0.83374*	0.32381*				
CNESA	0.67477*	0.21589*	0.36745*			
ESA	0.89971*	0.67027*	0.95000*	0.71996*		
CSSA	0.78669*	0.25650*	0.32328*	0.27647*	0.84102*	
SWSA	0.73617*	0.27918*	0.44948*	0.28448*	0.76492*	0.34911*

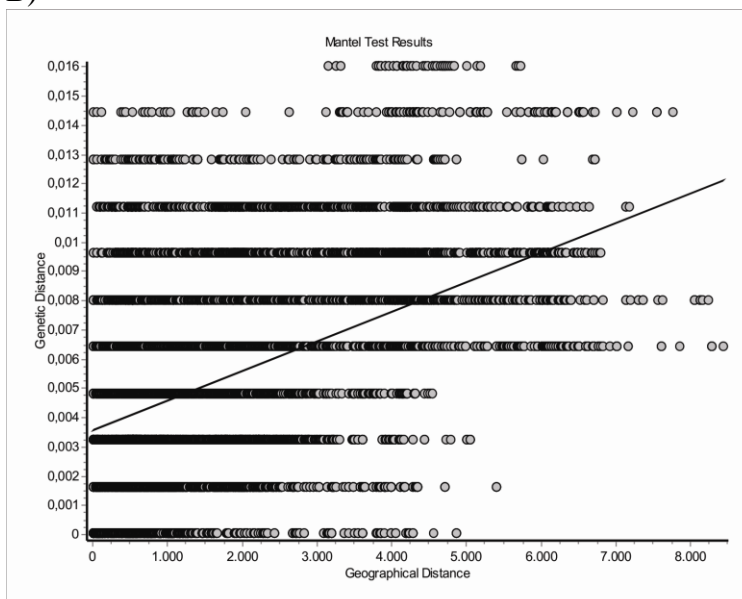
Obs.: \* significant  $\Phi_{st}$  ( $p < 0.05$ ). Acronyms are as follows: NSA (6 samples): Northern South America (Northern Brazil + Venezuela); CNESA (97 samples): Central-North-Eastern South America [eastern MS + South + Northeast, Brazil]; ESA (13 samples): Eastern Brazil (SP, BA and MG); CSSA (15 samples): North-Central region of Argentina + Uruguay + Bolivia + western MS; NSWSA (20 samples): Chile + Southern and Western Argentina (20 samples); SCA (6 samples): Southern Central America (Costa Rica and Panama); NA+NCA (24 samples): North America + Northern Central America (Northern Costa Rica, Nicaragua, Guatemala, USA and Canada).

Figure S1. Graph depicting the correlation between genetic and geographic distances calculated for *P. concolor* ND5 mtDNA sequences. (A) South America only. (B) Total sample.

A)



B)



This material is available as part of the online article from <http://www.scielo.br/gmb>



## CAPÍTULO III

### Dados Adicionais:

#### Inferências a partir de dois outros segmentos do DNA mitocondrial:

#### *ATP8 e Região Controladora*

### Material e Métodos

#### *Amplificação e Sequenciamento*

Dois segmentos de DNA mitocondrial adicionais foram amplificados via PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) para diferentes conjuntos de amostras amplificadas anteriormente para um segmento do gene *ND5*. Foram amplificados fragmentos do gene *ATP8* e da porção 5' do primeiro segmento hipervariável (HVS-I) da Região Controladora do DNA mitocondrial. Para o *ATP8* foram utilizados os *primers* *ATP8-DF1* e *ATP6-DR1* (Trigo *et al.* 2008) e para a Região Controladora foram utilizados os *primers* *MTLPRO2* e *CCR-DR1* (Tchaicka *et al.* 2007). Todas as reações foram realizadas com um volume final de 20µl contendo 1X Buffer, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs, 0,2 µM de cada *primer*, 0,5 U de TaqDNA polimerase Platinum (Invitrogen) e 2 µl de DNA empiricamente diluído (para resultar em uma amplificação com concentração do DNA variando entre 20 e 150 ng).

As condições do PCR para ambos os segmentos seguiram aquelas utilizadas por Tchaicka *et al.* (2007), e consistiram dos seguintes passos: 3 minutos a 94°C, seguidos de 10 ciclos de *touchdown* de 45 segundos a 94°C para desnaturação, 45 segundos para

anelamento de 60°C a 51°C (com decréscimo de 1°C a cada ciclo) e 72°C por 1 minuto e 30 segundos para extensão. Em seguida, 30 ciclos de 45 segundos a 94°C, 30 segundos a 50°C e 1 minuto e 30 segundos a 72°C. Para finalizar, 3 minutos a 72°C. Os produtos de PCR foram verificados em gel de Agarose 1% com corante *GelRed* (Biotium).

Os produtos amplificados foram purificados com as enzimas Exonuclease I e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (Exo-SAP, GE Helthcare). Posteriormente os fragmentos purificados foram sequenciados utilizando o *kit* de sequenciamento *DYEnamic™ ET Dye Terminator Cycle* (MegaBACE™) (GE Helthcare) e subsequentemente analisados em um sequenciador automático MegaBACE 1000.

#### *Análise de Dados*

Foram geradas sequências na direção direta (*forward*) e reversa (*reverse*), sendo que para o segmento *ATP8* foi possível gerar sequências-consenso com auxílio do programa Phred/Phrap, seguido de verificação manual. Já para a Região Controladora não foi possível fazer as sequências-consenso devido à presença de uma região repetitiva longa no interior do segmento (Lopez *et al.* 1994; Eizirik *et al.* 1998), a qual geralmente inviabiliza o seqüenciamento dos flancos em ambas as direções. Neste caso, alinhamentos distintos foram gerados para os dois flancos da região repetitiva, os quais foram designados MTLPRO2 e CCR-DR1, com base nos *primers* direto e reverso utilizados para o seu respectivo seqüenciamento.

Todos os cromatogramas resultantes foram verificados visualmente através dos programas Chromas Lite 2.01 e FinchTV 1.4.0 e corrigidos manualmente para então realizarmos os alinhamentos das sequências. Os alinhamentos foram realizados pelo

programa ClustalW como implementado no programa MEGA 4 (Tamura *et al.* 2007), seguido por verificação e edição manual dos alinhamentos.

Índices de diversidade genética como diversidades nucleotídica ( $\pi$ ) e haplotípica (Hd), além de índices de neutralidade (D de Tajima, D\* e F\* de Fu e Li, Fs de Fu) foram estimados com o programa DnaSP 5.10. Os índices de diversidade e neutralidade também foram realizados considerando apenas a América do Sul, para termos uma comparação com a variabilidade total da espécie.

Redes de haplótipos foram estimadas através do método *median-joining*, como implementado no programa Network 4.5.1.6. Para os segmentos *ATP8*, *CCR-DR1* e combinações envolvendo o segmento *ND5*, foi utilizada a espécie *P. yagouaroundi* como grupo externo. Para o segmento *ATP8*, foi utilizada sequência de jaguarundi de Culver *et al.* (2000) disponível no GenBank (número de acesso: AF241813.1) e para *CCR-DR1* foram utilizadas duas sequências geradas por Carla Pires do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS. Já no caso do segmento direto da Região Controladora (MTLPRO2) e combinações com o *ND5* e com o segmento reverso da região controladora (*CCR-DR1*) foram utilizadas sequências de *A. jubatus* (Burger *et al.* 2004) disponíveis no GenBank (número de acesso: NC\_005212.1).

## **Resultados**

Foi amplificado e sequenciado um fragmento de *ATP8* de 370 pb para 53 indivíduos de boa parte da área de ocorrência da espécie. Cada uma das sequências geradas também foi concatenada com a sequência de *ND5* da respectiva amostra (Tabela III.1).

Para a região controladora foram geradas sequências das extremidades direta e

reversa do fragmento, retirando as regiões repetitivas localizadas no centro do fragmento. O fragmento MTLPRO2 originou sequências de 142 pb para 51 indivíduos que puderam ser, em sua maioria, concatenadas com sequências de *ND5* das respectivas amostras (Tabela III.1).

Para o fragmento reverso (CCR-DR1), foram geradas 65 sequências de 373 pb. Essas sequências puderam ser concatenadas com dados de *ND5* e MTLPRO2 (Tabela III.1). Para finalizar, foi ainda possível a concatenação dos segmentos de *ND5* com MTLPRO2 e CCR-DR1 para um grupo menor de amostras, resultando em um fragmento de 1184 pb (Tabela III.1).

As amostras amplificadas para *ATP8* não foram as mesmas amplificadas para os segmentos da Região Controladora, impossibilitando a concatenação, comparação e análises com os mesmos grupos de dados.

Os dados de diversidade haplotípica se mostraram altos e de diversidade nucleotídica se mostraram baixos (Tabela III.1).

Nos testes de neutralidade, apenas o valor de  $F_s$  de  $F_u$  para o CCR-DR1 da Região Controladora para a amostragem total se mostrou significativo dentre todos os grupos amostrais e/ou concatenação de segmentos (Tabela III.1).

As diversas redes de haplótipos geradas pelos diferentes segmentos e suas concatenações separaram sempre os animais da América do Sul dos animais das Américas do Norte e Central (Figuras III.4 a III.8). Considerando-se os grupos genéticos previamente definidos pela AMOVA com base no segmento *ND5*, observou-se a presença de haplótipos compartilhados entre estas unidades geográficas. Ambos os grupos externos, *P. yagouaroundi* e *A. jubatus* se ligaram principalmente a haplótipos da América do Sul, exceto na rede de MTLPRO2 (Fig. III.3) em que o grupo externo também se liga a um

haplótipo da América Central (o qual está distante dos demais encontrados na América Central).

Nas redes construídas com base nos diferentes segmentos e concatenações, sempre se observou um haplótipo da América Central bem distante dos outros haplótipos das Américas do Norte e Central, e muito próximo aos haplótipos da América do Sul (Fig. III.1 - A09; Fig. III.2 - B17; Fig. III.3 – M08; Fig. III.6 – F17; Fig. III.7 – D22; Fig. III.4 – C22; e Fig. III.5- E19; sendo que nessas duas últimas figuras os haplótipos estão tão distantes dos haplótipos sul-americanos quanto os outros haplótipos norte e centro-americanos).

## Tabelas e Figuras – Dados adicionais

III.1. Estatísticas básicas e índices de diversidade e neutralidade em *Puma concolor* obtidos para segmentos do gene *ATP8* e da Região Controladora (MTLPRO2 e CCR-DR1), além de combinações com um segmento do gene *ND5*. Em (a) a amostragem total, em (b) a amostragem da América do Sul.

### III.1a.

Índices	<i>ATP8</i>	<i>ATP8</i> + <i>ND5</i>	MTLPRO2	CCR-DR1	MTLPRO2 + CCR-DR1	<i>ND5</i> + MTLPRO2	<i>ND5</i> + CCR-DR1	<i>ND5</i> + MTLPRO2 + CCR-DR1
Tamanho fragmento (pb)	370	1039	142	373	515	811	1042	1184
N	53	53	51	65	40	49	64	39
Sítios variáveis	11	40	9	23	32	31	44	52
Haplótipos	10	23	8	28	24	19	28	24
Hd	0.846 (0.018)	0.933 (0.018)	0.667 (0.049)	0.946 (0.015)	0.963 (0.016)	0.918 (0.023)	0.945 (0.016)	0.9636 (0.016)
$\Pi$	0.00547 (0.00041)	0.00626 (0.00036)	0.00891 (0.00149)	0.02823 (0.00134)	0.02295 (0.00153)	0.00528 (0.00062)	0.01115 (0.00052)	0.01128 (0.00078)
D Tajima	-0.76122	-1.09247	-1.36076	0.93162	0.24525	-1.435993	0.11324	-0.33641
D* Fu and Li	-2.05592	-1.07946	-0.63556	0.69191	0.63544	-0.49260	0.52197	0.39710
F* Fu and Li	-1.91809	-1.29267	-1.02718	0.92752	0.59483	-0.98358	0.43950	0.16861
Fs Fu	-2.326	-5.917	-2.874	-8.671* <sup>1</sup>	-6.810	-6.078	-4.223	-4.322

N= Tamanho amostral; Hd= Diversidade haplotípica;  $\pi$  = Diversidade Nucleotídica ( $\pm$  desvio padrão);\*<sup>1</sup> = Significante (P<0,05).

### III.1b.

Índices	<i>ATP8</i>	<i>ATP8</i> + <i>ND5</i>	MTLPRO2	CCR-DR1	MTLPRO2 + CCR-DR1	<i>ND5</i> + MTLPRO2	<i>ND5</i> + CCR-DR1	<i>ND5</i> + MTLPRO2 + CCR-DR1
N	40	40	48	58	36	45	59	35
Sítios variáveis	7	26	7	21	28	25	44	44
Haplótipos	7	16	6	23	20	17	25	20
Hd	0,808 (0,026)	0,9038 (0,029)	0,624 (0,049)	0,934 (0,019)	0,954 (0,019)	0,906 (0,027)	0,937 (0,018)	0,955 (0,019)
$\Pi$	0,00459 (0,00036)	0,00483 (0,00034)	0,00880 (0,00167)	0,02655 (0,00141)	0,02164 (0,00161)	0,00471 (0,00060)	0,01066 (0,00055)	0,01045 (0,00078)
D Tajima	-0,15668	-0,80966	-0,95517	0,99385	0,45756	-1,26466	-0,09701	-0,11422
D* Fu and Li	-0,97624	-0,20351	-0,30060	0,60247	0,74145	-0,64533	0,54387	0,33564
F* Fu and Li	-0,84380	-0,48464	-0,59724	0,88101	0,76453	-1,01922	0,36439	0,21719
Fs Fu	-0,813	-3,182	-1,044	-5,233	-4,134	-5,386	-3,108	-2,468

N= Tamanho amostral; Hd= Diversidade haplotípica;  $\pi$ = Diversidade Nucleotídica ( $\pm$  desvio padrão).

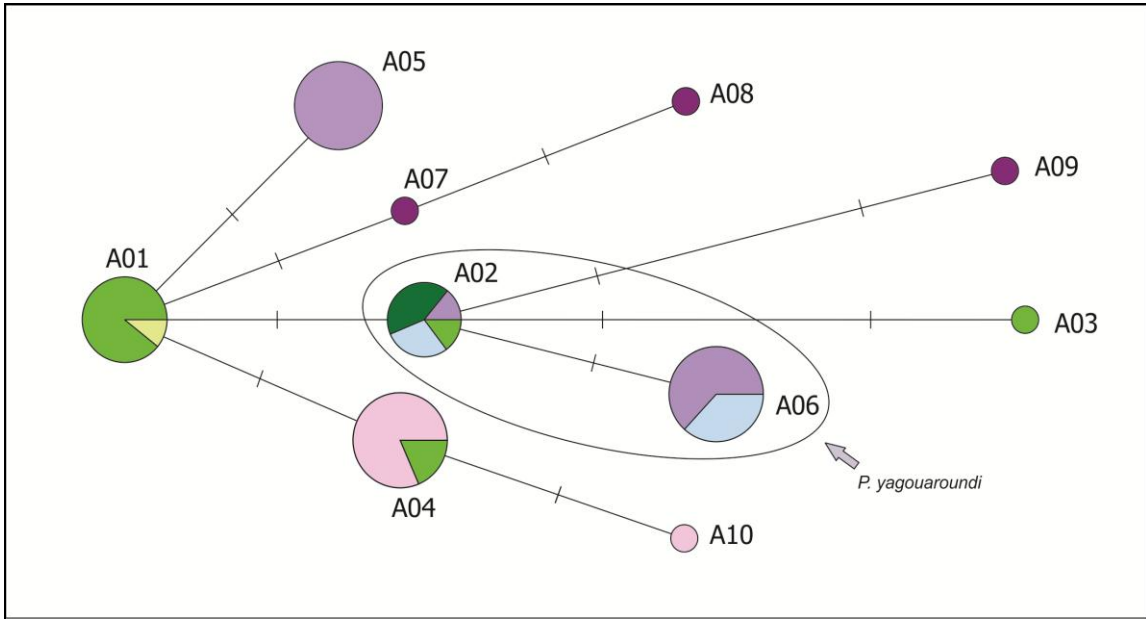


Figura III.1: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos de fragmento do gene *ATP8* do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises do gene *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta indica a quais haplótipos (circulados) o grupo externo *P. yagouaroundi* e se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.

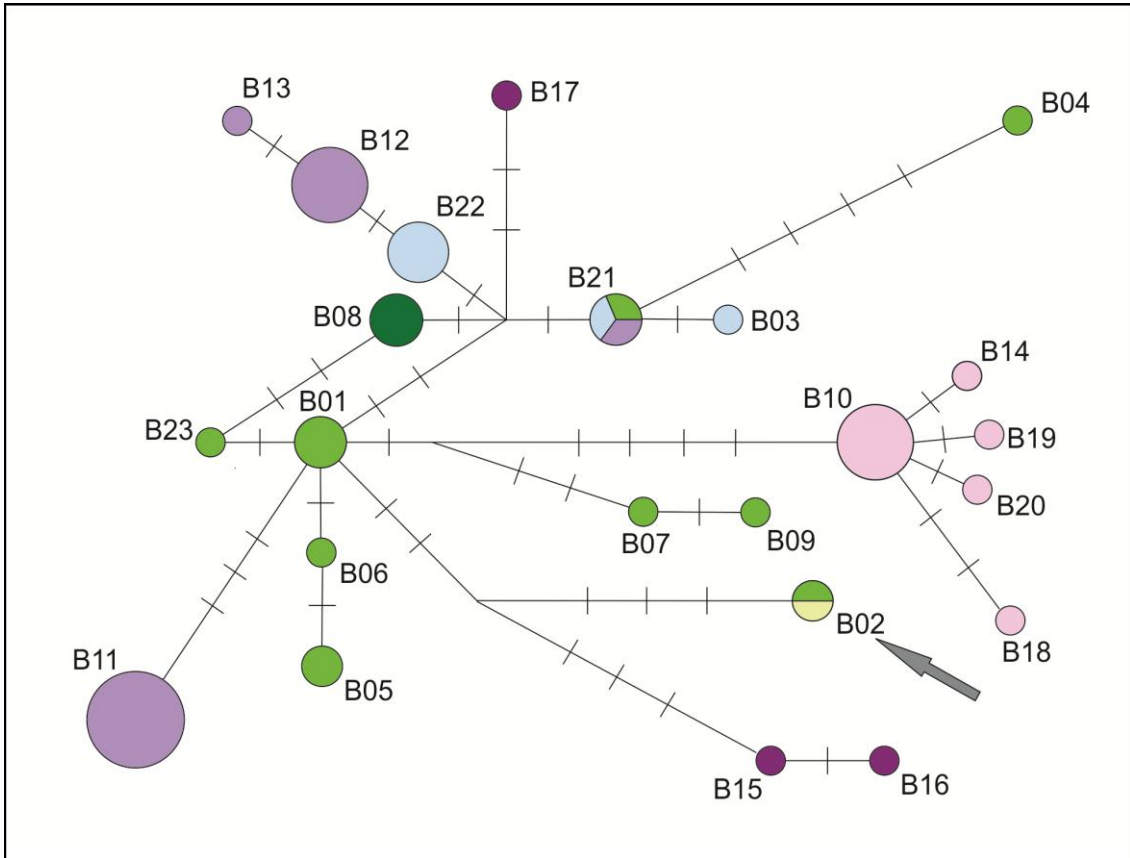


Figura III.2: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos da combinação de fragmentos dos genes *ATP8* e *ND5* do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises do gene *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta indica a qual haplótipo o grupo externo *P. yagouaroundi* se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.



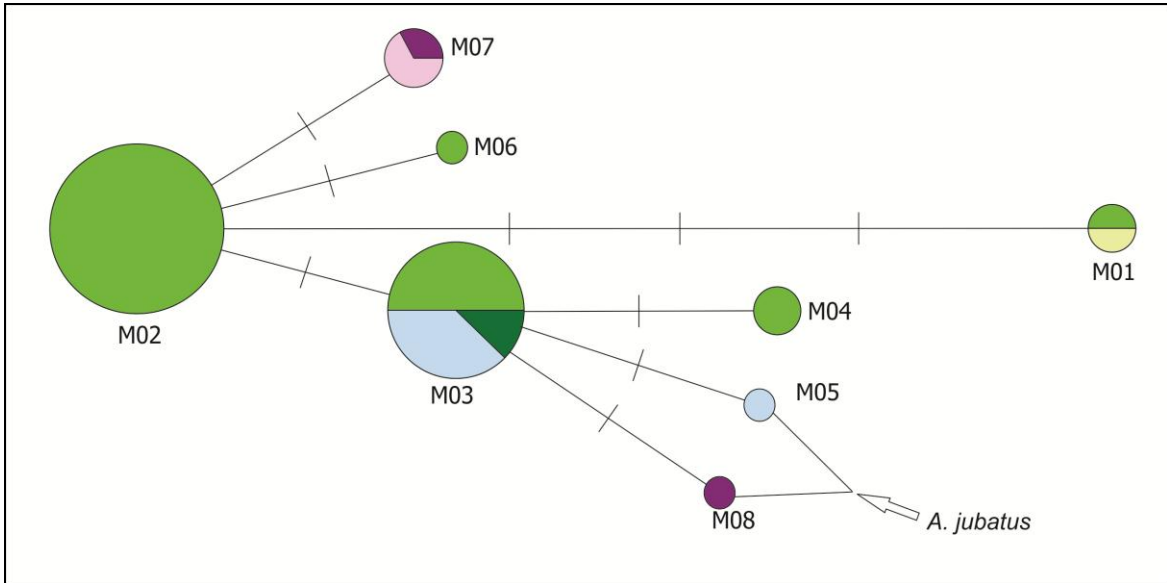


Figura III.3: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos de fragmento denominado MTLPRO2 da Região Controladora do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises de *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta indica a quais haplótipos o grupo externo *Acinonyx jubatus* se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.

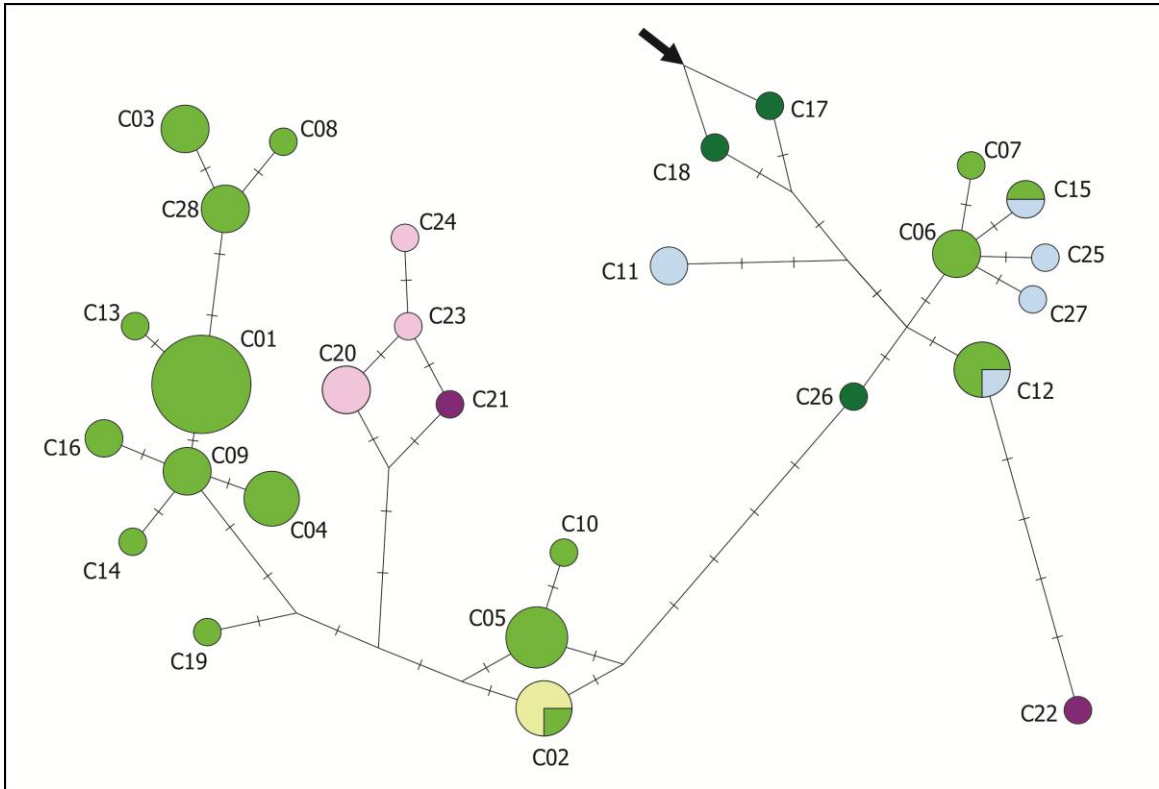


Figura III.4: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos de fragmento denominado CCR-DR1 da Região Controladora do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises de *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta indica a quais haplótipos o grupo externo *P. yagouaroundi* se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.

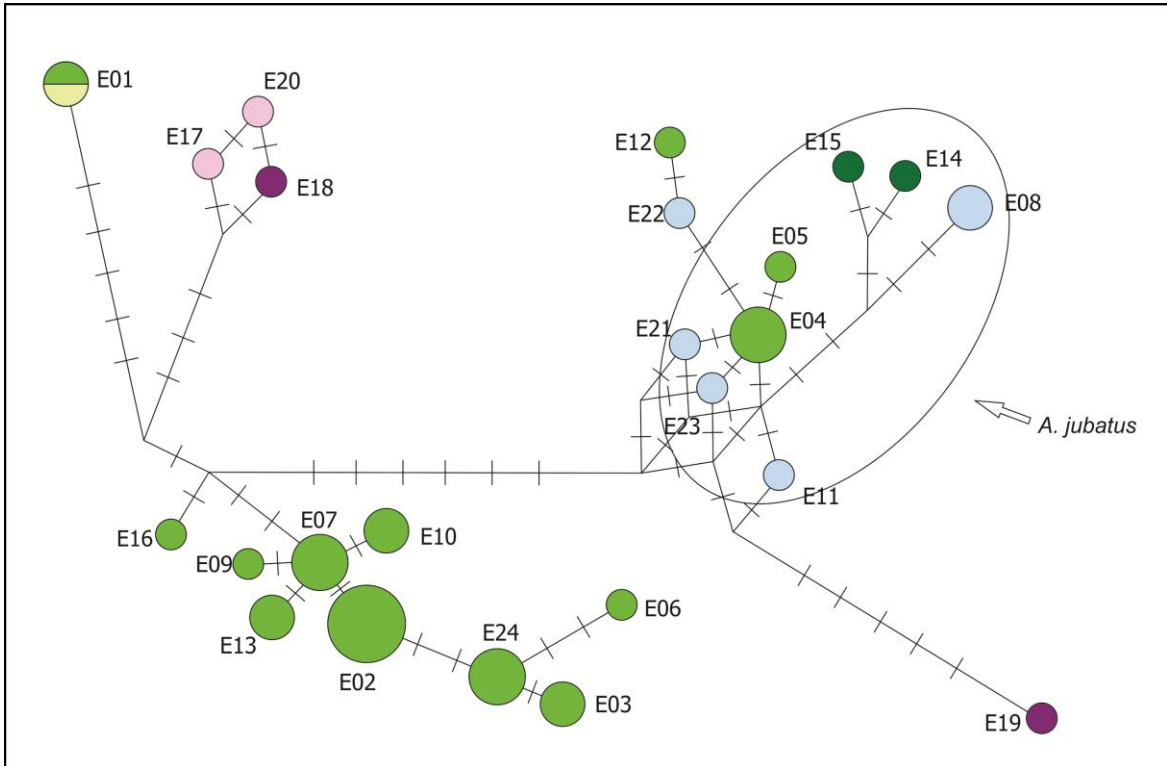


Figura III.5: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos da combinação dos fragmentos denominados MTLPRO2 e CCR-DR1 da Região Controladora do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises de *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta sinalizando a área circulada indica a quais haplótipos o grupo externo *Acinonyx jubatus* se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.

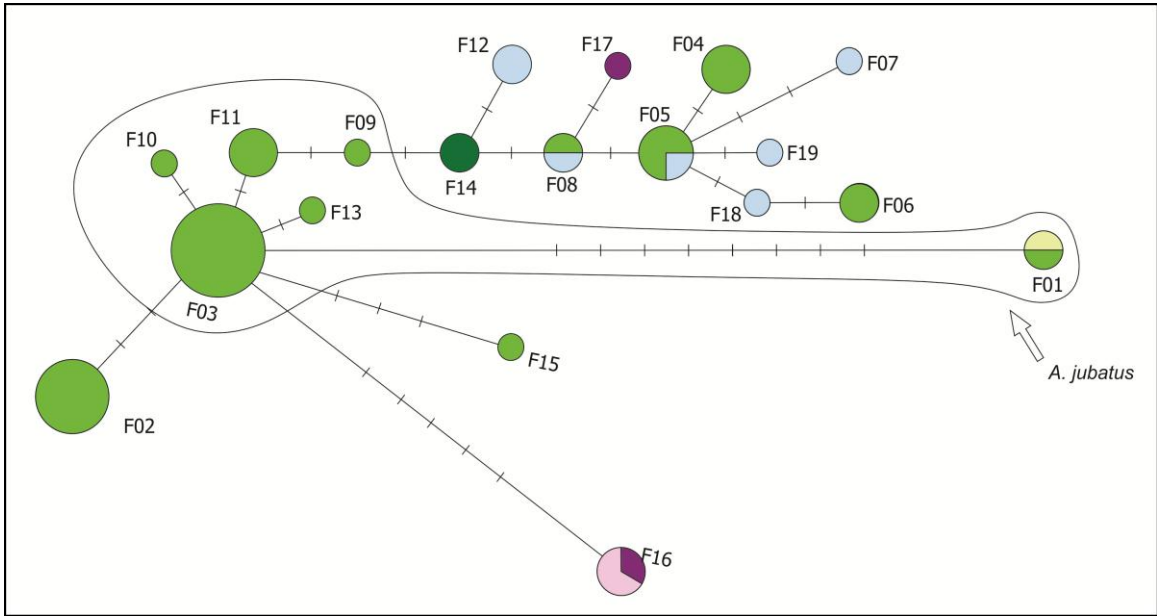


Figura III.6: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos da combinação dos fragmentos da Região Controladora (denominado MTLPRO2) e do gene *ND5* do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises de *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta sinalizando a área circulada indica a quais haplótipos o grupo externo *Acinonyx jubatus* se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.

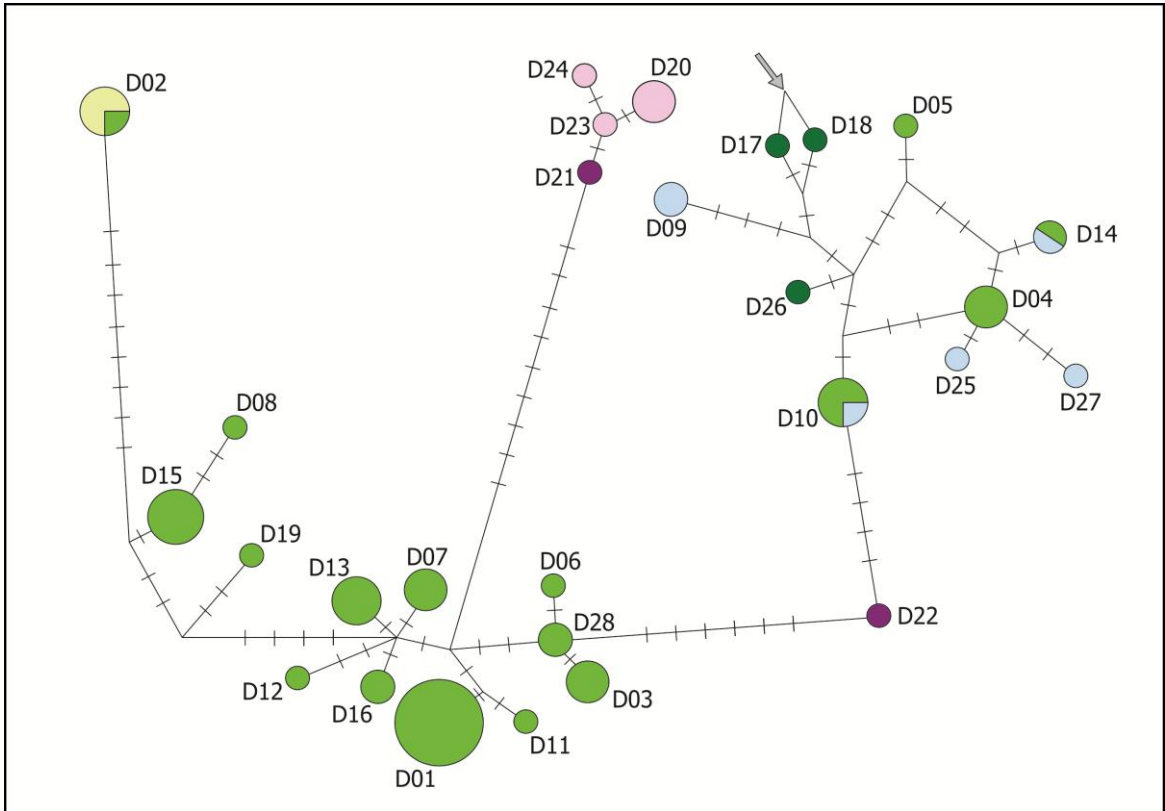


Figura III.7: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos da combinação de um fragmento da Região Controladora (denominado CCR-DR1) e um do gene *ND5* do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises de *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta indica a quais haplótipos o grupo externo *P. yagouaroundi* se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.

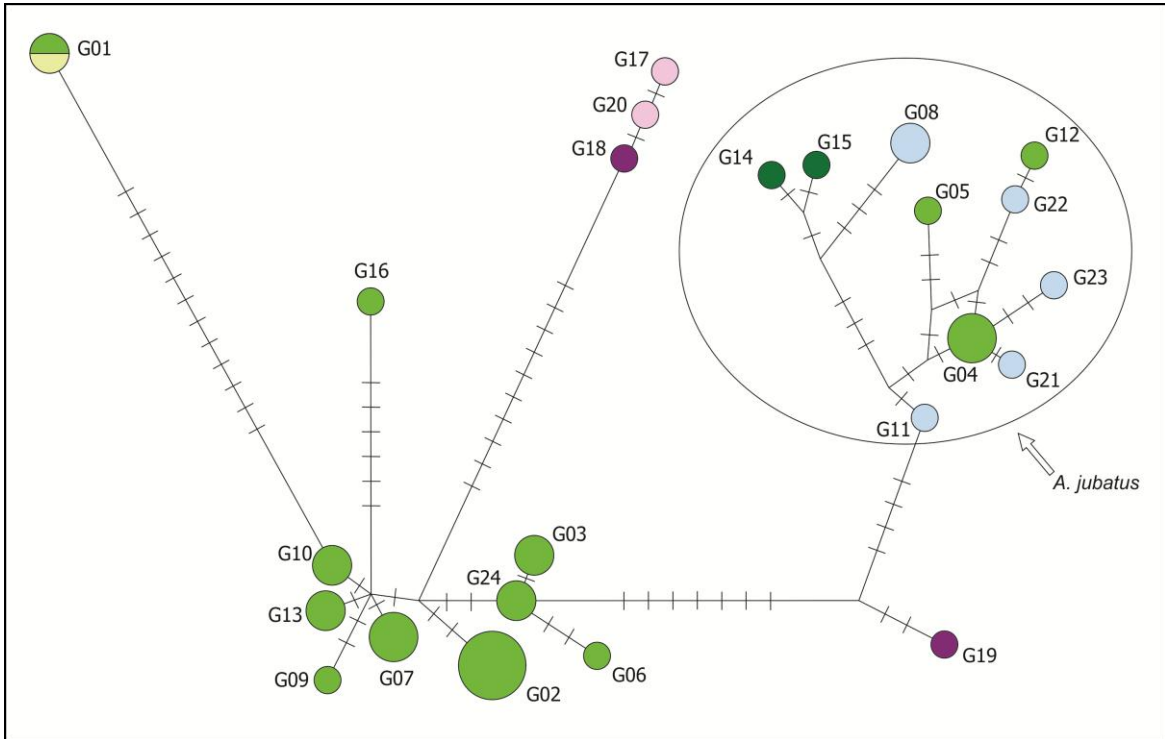


Figura III.8: Rede (*Median-joining network*) dos haplótipos da combinação dos fragmentos denominados MTLPRO2 e CCR-DR1 da Região Controladora e um fragmento do gene *ND5* do mtDNA de *Puma concolor*. A área de cada círculo é proporcional à frequência de cada haplótipo. As diferentes cores indicam a frequência relativa de cada haplótipo na amostra dos diferentes grupos genéticos identificados a partir das análises de *ND5* (ver Fig. I.1 e I.2 e Tab. 3 do capítulo II). A seta sinalizando a área circulada indica a quais haplótipos o grupo externo *Acinonyx jubatus* se liga, sugerindo a posição de enraizamento da rede de haplótipos de *P. concolor*.

## CAPÍTULO IV

### Discussão Geral

O conjunto de dados obtidos permitiu-nos aprofundar o conhecimento sobre a filogeografia e a história demográfica de *Puma concolor* na América do Sul e algumas relações com as populações desta espécie nas Américas Central e do Norte. Nossa escolha pelos marcadores matrilineares para contar a história filogeográfica e demográfica de uma espécie com filopatria das fêmeas e grande dispersão dos machos se mostrou bastante viável e possibilitou-nos analisar, avaliar e interpretar com certa tranquilidade os dados obtidos, de forma a gerar conclusões bastante embasadas.

Os padrões observados nas diversas redes de haplótipos, como as relações evolutivas entre as sequências, a distribuição dos haplótipos mais comuns, o enraizamento dos grupos externos, a inferência dos haplótipos mais ancestrais, a direção de expansão dos haplótipos e a quantidade de mutações entre os haplótipos indicam que a variabilidade existente nos pumas atuais ao longo de toda sua distribuição é derivada de um ancestral sul-americano.

Existem grupos geneticamente distintos dentro da espécie, separando claramente a América do Sul da maior parte da América Central e toda a América do Norte. Mas dentro de cada região não há separações geográficas claras entre os grupos, apesar de os dados sugerirem uma rasa estruturação.

A região central da América do Sul, que inclui centro-oeste do Brasil, Bolívia, Norte da Argentina, e Paraguai, foi identificada como sendo o centro da diversidade

genética dos pumas, região que compartilha vários haplótipos com outras áreas, ao mesmo tempo em que possui outros vários que são exclusivos em certas localidades. Esta região, desta forma, pode ser considerada um “hotspot” em que ocorreu a origem de múltiplas linhagens, e/ou uma área em que convergem diferentes linhagens provenientes de biomas adjacentes.

A região de divisa entre Panamá e Venezuela se apresenta como um limite entre dois diferentes grupos genéticos, sem haver barreira geográfica evidente. Visto que a espécie ocorre em todos os biomas daquela área, e que as cordilheiras não mostraram ser um limite para a espécie, ao menos pelo que se pode observar em áreas mais meridionais do continente. Já foi sugerido que possa ser uma questão comportamental (O’Brien and Johnson 2005), mas não podemos descartar a possibilidade de que em algum momento as cordilheiras tenham atuado como uma barreira ao fluxo gênico da espécie. Para maiores esclarecimentos será importante aumentar o número de amostras, a cobertura espacial de pontos amostrais nessas regiões, e talvez também o número e diversidade de marcadores genéticos.

Os rios Amazonas e Paraná se mostraram como barreiras históricas ao fluxo gênico nesta espécie. O primeiro parece ser uma barreira mais efetiva, induzindo diferenciação substancial entre as duas margens, enquanto o rio Paraná, apesar de ter se apresentado como uma barreira significativa, possui maior variabilidade em cada lado do rio do que entre ambos os lados. Para entender um pouco mais sobre a atuação de rios como barreiras sobre a conectividade histórica entre populações de pumas, também será necessário que outros grandes rios sejam analisados, como o rio São Francisco que nasce no sudeste e deságua no nordeste brasileiro, no Oceano Atlântico; e o Rio Negro, já testado por Culver *et al.* (2000), que nasce no centro da Patagônia argentina e deságua ainda na região



patagônica, também no Oceano Atlântico. O rio Negro já teve sua importância como barreira sugerida por Culver *et al.* (2000), mas o impacto efetivo deve ser verificado com uma amostragem considerável ao longo do rio, além de uma maior diversificação dos marcadores moleculares utilizados.

Toda a diversidade ao longo dos subcontinentes nos levou a uma estimativa média de tempo para o ancestral comum mais recente ( $t_{MRCA}$ ) da espécie de aproximadamente 237.000 anos (95% I.C.: 105.000 a 391.000 anos), o que corrobora a sugestão de Culver *et al.* (2000), que estima a ancestralidade da diversidade existente atualmente entre 200 e 300 mil anos. A estimativa de  $t_{MRCA}$  para a variabilidade na América do Sul se aproximou da estimativa da amostragem de toda a distribuição: 211.000 anos (95% I.C.: 91.000 – 353.000 anos), também dentro da faixa sugerida por Culver *et al.* (2000).

Existem registros fósseis na América do Norte mais antigos do que esta faixa de tempo (de aproximadamente 400.000 anos). Além disso, a época de surgimento da espécie foi estimado por análises moleculares como sendo entre 3,86 e 8,71 MA, considerando sua separação de *M. trumani*, quando calibrado a partir de fósseis de *Proailurus* como primeiro ancestral dos felídeos (Barnett *et al.* 2005), ou de aproximadamente 4,17 MA considerando a sua separação de *P. yagouaroundi* (Johnson *et al.* 2006). Tal idade, muito anterior à coalescência das linhagens atuais, estimada no presente estudo, nos leva à conclusão de que ocorreu uma extinção de linhagens mais antigas, ao menos no que tange ao mtDNA. A partir das linhagens remanescentes, inferimos que tenha havido uma expansão geográfica muito recente, dando origem à diversidade atualmente observada nesta espécie. Tal inferência abre caminho para novas investigações da história evolutiva do puma, incluindo seu processo de expansão e adaptação aos diferentes ambientes em que ocorre atualmente.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams DB (1979) The cheetah: Native American. *Science* 205:1155-1158.

Arcos DR, Tirira DG y Zapata R G (2011) Puma (*Puma concolor*). En: Libro Rojo de los mamíferos del Ecuador. 2 ed. Versión 1 (2011). Fundación Mamíferos y Conservación, Pontificia Universidad Católica del Ecuador y Ministerio del Ambiente del Ecuador, Quito. <http://www.librorojo.mamiferosdelecuador.com/index.php> (junio, 2011).

Aubry KB, Statham MJ, Sacks BN, Perrine JD and Wisely SM (2009) Phylogeography of the North American red fox: vicariance in Pleistocene forest refugia. *Mol Ecol* 18:2668-2686.

Avise JC (1998) The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Mol Ecol* 7:371-379.

Avise JC (2000) *Phylogeography*. Harvard University Press, Cambridge, 447 pp.

Avise JC and Ball RM (1990) Principles of genealogical concordance in species concepts and biological taxonomy. *Oxford Surveys in Evol Biol* 7:45-67.

Avise JC and Nelson WS (1989) Molecular genetic relationships of the extinct Dusky Seaside Sparrow. *Science* 243:643-648.

Avise JC, Arnold J, Ball RM, Bermingham E, Lamb T, Neigel JE, Reeb CA and Saunders NC (1987) Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. *Annu Rev Ecol Syst* 18:489-522.

Banfield AW (1974) *The Mammals of Canada*. University Toronto Press, 438 pp.

Barnett R, Barnes I, Phillips MJ, Martin LD, Harington CR, Leonard JA and Cooper A (2005) Evolution of the extinct Sabretooths and the American Cheetahlike cat. *Curr Biol* 15(15):R589-R590.

Bertrand AS, Kenn S, Gallant D, Tremblay E, Vasseur L and Wissink R (2006) mtDNA analyses on hair samples confirm Cougar, *Puma concolor*, presence in southern New

Brunswick, eastern Canada. *Canadian Field Nat* 120(4):438–442.

Burger PA, Steinborn R, Walzer C, Petit T, Mueller M and Schwarzenberger F (2004) Analysis of the mitochondrial genome of cheetahs (*Acinonyx jubatus*) with neurodegenerative disease. *Gene* 338(1):111-119.

Castilho CS, Marins-Sá LG, Benedet RC and Freitas TO (2011) Landscape genetics of mountain lions (*Puma concolor*) in southern Brazil. *Mammal Biol* 76(4): 476-483.

Charruau P, Fernandes C, Orozco-TERWengel P, Peters J, Hunter L, Ziaie H, Jourabchian A, Jowkar H, Schaller G, Ostrowski S *et al.* (2011) Phylogeography, genetic structure and population divergence time of cheetahs in Africa and Asia: evidence for long-term geographic isolates. *Mol Ecol* 20:706-724.

CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) 2011. [www.cites.org](http://www.cites.org). july 2011.

Collier GE and O'Brien SJ (1985) A molecular phylogeny of the Felidae: Immunological distance. *Evolution* 39:437-487.

CONAMA (2011) Ministerio del Medio Ambiente, Gobierno del Chile <http://www.conama.cl/clasificacionespecies/> (junio, 2011)

Culver M, Johnson WE, Pecon-Slattery J and O'Brien SJ (2000) Genomic ancestry of the American Puma (*Puma concolor*). *J Hered* 91:186-197.

Currier MJP (1983) *Felis concolor*. *Mammals Species*. 200:1-7.

Daugherty CH, Cree A, Hay JM and Thompson MB (1990) Neglected taxonomy and continuing extinctions of tuatara (*Sphenodon*). *Nature* 347:177-179.

Díaz GB y Ojeda RA (eds) (2000) Libro rojo: mamíferos amenazados de la Argentina. Soc. Argentina para el Estudio de los Mamíferos, Buenos Aires. 106 pp.

Driscoll CA, Menotti-Raymond M, Nelson G, Goldstein D and O'Brien SJ (2002) Genomic Microsatellites as Evolutionary Chronometers: A Test in Wild Cats. *Genome Res*.12:414–423

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

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

Emmons LH (1990) Neotropical rainforest mammals: a field guide. University of Chicago Press, Chicago, 281 pp.

Ernest HB, Boyce WM, Bleich VC, May B, Stiver SJ and Torres SG (2003) Genetic structure of mountain lion (*Puma concolor*) populations in California. *Conserv Genet* 4:353-366.

Ewer RS (1973) *The Carnivores*. Cornell University Press, Ithaca, New York, 500 pp.

Flynn JJ, Finarelli JA, Zehr S Hsu J and Nedbal MA (2005) Molecular phylogeny of the Carnivora (Mammalia): assessing the impact of increased sampling on resolving enigmatic relationships. *Syst Biol* 54(2):317-337.

Fontana CS, Bencke GA e Reis RE (2003) Livro Vermelho da Fauna Ameaçada de extinção no Rio Grande do Sul. EDIPUCRS, Porto Alegre, pp 523-525.

Forster P (2004) Ice Ages and the mitochondrial DNA chronology of human dispersals: a review. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359:255–264.

Gay SW and Best TL (1995) Geographic variation in sexual dimorphism of the puma (*Puma concolor*) in north and south America. *Southwest Nat* 40(2):148-159.

Haag T, Santos AS, Sana DA, Morato RG, Cullen Jr L, Crawshaw Jr PG, De Angelo C, Di Bitetti MS, Salzano FM and Eizirik E (2010) The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Mol Ecol* 19(22):4906-4921.

Hellborg L, Walker CW, Rueness EK, Stacy JE, Kojola I, Valdman, H, Vila C,

Zimmermann B, Jakobsen KS and Ellegren H (2002) Differentiation and levels of genetic variation in northern European lynx (*Lynx lynx*) population revealed by microsatellites and mitochondrial DNA analysis. *Conserv Genet* 3:97-111.

Hickerson MJ, Carstens BC, Cavender-Bares J, Crandall KA, Graham CH, Johnson JB, Rissler L, Victoriano PF and Yoder AD (2010) Phylogeography's past, present, and future: 10 years after Avise, 2000. *Mol Phylogenet Evol* 54:291-301.

Hood GA Neufeld T (2004) First record of mountain lions, *Puma concolor*, in Elk Island National Park, Alberta. *The Canadian Field-Naturalist* 118:605-607.

Hunt Jr RM (2004) Chapter 11: Global climate and the evolution of large mammalian carnivores during the later Cenozoic in North America. *Bull Am Mus Nat Hist* 285:139-156.

IUCN 2011. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2011.1. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org) (june, 2011).

Janczewski DN, Modi, WS, Stephens JC and O'Brien SJ (1995) Molecular evolution of mitochondrial 12S rRNA and cytochrome b sequences in the pantherine lineage of Felidae. *Mol Biol Evol* 12(4):690-707.

Johnson WE and O'Brien SJ (1997) Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *J Mol Evol* 44(1):S89-S116.

Johnson WE, Dratch PA, Maternson JS and O'Brien (1996) Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of Felidae using mitochondrial restriction fragment length polymorphism variation. *J Mamm Evol* 3:97-120.

Johnson WE, Culver M, Iriarte JA, Eizirik E, Seymour KL and O'Brien SJ (1998) Tracking the evolution of the elusive Andean mountain cat (*Oreailurus jacobita*) from mitochondrial DNA. *J Hered* 89:227-232.

Johnson WE, Pecon-Slattery J, Eizirik E, Kim JH, Menotti-Raymond M, Bonacic C, Cambre R, Crawshaw P, Nunes A, Seuánez HN *et al.* (1999) Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Mol Ecol* 8(s1):S79-S92.

Johnson WE, Godoy JA, Palomares F, Delibes M, Fernandes M, Revilla E and O'Brien SJ (2004) Phylogenetic and phylogeographic analysis of Iberian Lynx populations. *J Hered* 95(1):19-28.

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

Johnson WE, Onorato DP, Roelke ME, Land ED, Cunningham M, Belden RC, McBride R, Jansen D, Lotz M, Shindle *et al.* (2010) Genetic restoration of the florida panther. *Sci* 329:1641-1645.

Kelly MJ, Noss AJ, Di Bitetti MS, Maffei L, Arispe RL, Paviolo A, De Angelo CD and Di Blanco YE (2008) Estimating puma densities from camera trapping across three study sites: Bolivia, Argentina, and Belize. *J Mammal* 89(2):408-418.

Kitchener A (1991) *The Natural History of the Wild Cats*. Cornell University Press, Ithaca, New York. 280 pp.

Lopez JV, Yuhki N, Masuda R, Modi W and O'Brien (1994) Numt, a recent transfer and tandem amplification of mitochondrial DNA to the nuclear genome of the domestic cat. *J Mol Evol* 39:174-190.

Luo SJ, Kim JH, Johnson WE, Van der Walt J, Maternson J, Yuhki N, Miquelle DG, Uphyrkina O, Goodrich JM, Quigley HB *et al.* (2004) Phylogeography and genetic ancestry of tigers (*Panthera tigris*). *PLoS Biol* 2(12):2275-2293.

MacFadden BJ (2006) Extinct mammalian biodiversity of the ancient new world tropics. *Trends Ecol Evol* 21(3):157-165.

Machado ABM, Fonseca GAB, Machado RB, Aguiar LMS e Lins LV (eds.) (1998) *Livro Vermelho das Espécies Ameaçadas de Extinção da Fauna de Minas Gerais*. Fundação Biodiversitas, Belo Horizonte, Minas Gerais, pp 129-132.

Machado ABM, Martins IB e Drummond GM (eds.) (2005) *Lista da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Incluindo as espécies quase ameaçadas e deficiente em dados*. Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 160pp.

Machado ABM, Drummond GM e Paglia AP (eds.) (2008) Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 1a. ed., MMA; Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. 2v,1420 pp.

Marshall LG, Webb SD, Sepkoski JJ and Raup DM (1982) Mammalian evolution and the Great American Interchange. *Science* 215(4538):1351-1357.

Martin LD (1989) Fossil history of the terrestrial carnivora. In: Gittleman JL (ed.) *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*. Cornell University Press. Ithaca, New York. 536-568p.

Martinez JA, Rudolf JC and Queirolo D (2010) *Puma concolor* (Carnivora, Felidae) en Uruguay: Situación local y contexto regional. *Mastozoología Neotropical* 17(1):153-159.

Masuda R, Lopez JV, Slaterry JP, Yuhki N and O'Brien SJ (1996) Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. *Mol Phylogenet Evol* 6:351-365.

Mattern MY and McLennan DA (2000) Phylogeny and speciation of felids. *Cladistics* 16:232-253.

Mayr E (1982) Of what use are subspecies? *Auk* 99:593-595.

Mazzolli M, Graipel ME and Dunstone N (2002) Mountain lion depredation in southern Brazil. *Biol Conserv* 105:43-51.

Mazzolli M (2012) Natural recolonization and suburban presence of pumas (*Puma concolor*) in Brazil. *J Ecol Nat Environm* 4(14):344-361.

McRae BH, Beier P, Dewald LE, Huynh LY and Keim P (2005) Habitat barriers limit gene flow and illuminate historical events in a wide-ranging carnivore, the American puma. *Mol Ecol* 14:1965-1977. Miotto RA, Cervini M, Figueiredo MG, Begotti RA, Galetti Jr PM, 2011. Genetic diversity and population structure of pumas (*Puma concolor*) in southeastern Brazil: implications for conservation in a human-dominated landscape. *Conserv. Genet.* 12:1447-1455.

Miththapala S, Seidensticker J and O'Brien SJ (1996) Phylogeographic subspecies

recognition in leopards (*Panthera pardus*): molecular genetic variation. *Conserv Biol* 10(4):1115-1132.

MMAA (Ministerio de Medio Ambiente y Agua) (2009) Libro rojo de la fauna Silvestre de vertebrados de Bolivia. MMAA, La Paz, Bolivia, 571 pp.

Monroy-Vilchis O, Gómez Y, Janczur M and Urios V (2009) Food niche of *Puma concolor* in Central Mexico. *Wildlife Biol* 15(01):97-105.

Moore WS (1995) Inferring Phylogenies from mtDNA Variation: Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. *Evolution* 49(4):718-726.

Morato RG, Rodrigues FHG, Eizirik E, Mangini PR, Azevedo FCC e Marinho-Filho J (eds.) (2006) Manejo e Conservação de Carnívoros Neotropicais. I Workshop de Pesquisa para Conservação de Carnívoros Neotropicais. IBAMA, São Paulo. 396 pp.

Neff N (1983) *The Big Cats: the paintings of Guy Coheleach*. New York: Harry N Abrams.

Nowak RM (1999) *Walker's Mammals of the World*. Vol. 2. 6th ed. The Johns Hopkins University Press, Baltimore, pp 818-820.

O'Brien SJ (1994) Genetic and phylogenetic analyses of endangered species. *Annu Rev Genet* 28:467-489.

O'Brien SJ (1997) Comparative anchor tagged sequences (CATS) for integrative mapping of mammalian genomes. *Nat Genet* 15: 47-56.

O'Brien SJ and Johnson WE (2005) Big cat genomics. *Annu Rev Genomics Hum Genet* 6: pp 407-429.

O'Brien SJ and Mayr E (1991) Bureaucratic mischief: Recognizing endangered species and subspecies. *Science* 251:1149-1280.

O'Brien SJ, Martenson JS, Johnson WE, Miththapala S, Janczewski DN, Pecon-Slattery J, Gilbert DA, Packer C, Roelke ME, Bush M and Wildt DE (1996) Conservation genetics of the Felidae. In: *Awise JC and Hamrick (eds.) Conservation genetics of rare and endangered*



species. Chapman and Hall, NY, pp 50-74.

Pecon-Slattery J and O'Brien SJ (1998) Patterns of Y and X chromosome DNA sequence divergence during the Felidae radiation. *Genetics* 148:1245-1255.

Pecon-Slattery J, Johnson WE, Goldman D and O'Brien SJ (1994) Phylogenetic reconstruction of South American felids defined by protein electrophoresis. *J Mol Evol* 39:296-305.

Redford KH and Eisenberg JF (1992) *Mammals of the Neotropics, Vol. 2: The southern cone*. University of Chicago Press, USA 440 pp.

Rodriguez-Mahecha JV, Alberico M, Trujillo F y Jorgenson J (2006) *Libro Rojo de los Mamíferos de Colombia. Serie Libros Rojos de Especies Amenazadas de Colombia. Conservación Internacional Colombia y Ministerio de Ambiente, vivienda y Desarrollo Territorial, Bogota, Colombia, 430 pp.*

Rodríguez JP & Rojas-Suárez F (eds.) (2008) *Libro Rojo de la Fauna Venezolana. 3ª ed.* Provita y Shell Venezuela, S.A., Caracas, Venezuela. 364 pp.

Salles LO (1992) Felid phylogenetics: extant taxa and skull morphology (Felidae, Aeluroidea). *Am Mus Novit* 3047:1-67.

SERNANP 2011 (Servicio Nacional de Áreas Naturales Protegidas por el Estado), Ministerio del Ambiente, Gobierno del Peru. <http://www.sernanp.gob.pe/sernanp/archivos/imagenes/vida/listado%20fauna%20amenaza%20da.pdf> (junio, 2011)

Silva F (1984) *Mamíferos silvestres – Rio Grande do Sul*. Porto Alegre, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul.

Sinclair EA, Swenson EL, Wolfe ML, Choate DC, Bates B and Crandall KA (2001) Gene flow estimates in Utah's cougars imply management beyond Utah. *Anim Conserv* 4:257-264.

Stehli PG and Webb SD (1985) *The Great American Biotic Interchange*. NY, Plenum Press.

- Sunquist M and Sunquist F (2002) Wild Cats of the World. University of Chicago Press. Chicago, 416 pp.0
- Talbot SL and Shields GF (1996) Phylogeography of Brown Bears (*Ursus arctos*) of Alaska and Paraphyly within the Ursidae. Mol Phylogenet Evol 5(3):477-494.
- Tchaicka L, Eizirik E, Oliveira TG, Candido Jr. F, Freitas TRO (2007) Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). Mol Ecol 16:819-838.
- Trigo TC, Freitas TRO, Kunzler G, Cardoso L, Silva JCR, Johnson WE, O'Brien SJ, Bonatto SL and Eizirik E (2008) Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. Mol Ecol 17(19):4317-4333.
- Turner A and Antón M (1997) The Big Cats and their Fossil Relatives. Columbia University Press, New York, 234 pp.
- Uphyrkina O, Johnson WE, Quigley H, Miquelle D, Marker L, Bush M and O'Brien SJ (2001) Phylogenetics, genome diversity and origin of modern leopard, *Panthera pardus*. Mol Ecol 10:2617-2633.
- Uphyrkina O, Miquelle D, Quigley H, Driscoll C and O'Brien SJ (2002) Conservation genetics of the far eastern leopard (*Panthera pardus orientalis*). J Hered 93:303-311.
- Van Valkenburgh B (1999) Major patterns in the history of carnivorous mammals. Annu Rev Earth Planet Sci 27:463-493.
- Van Valkenburgh B, Grady F and Kurten B (1990) The plio-pleistocene cheetah-like cat *Miracinonyx inexpectatus* of North America. J Vert Paleo 10:434-454.
- Wayne RK, Benveniste RE, Janczewski DN and O'Brien SJ (1989) Molecular and biochemical evolution of the Carnivora. In: Gittleman JL (ed.) Carnivore Behavior, Ecology and Evolution. Cornell University Press. Ithaca, New York. pp 465-494.
- Webb SD and Marshall LG (1981) Historical biogeography of recent South American land mammals. In: Mares MA and Genoways HH (eds.) Mammalian biology in South America, special publication series. Pymatuning Laboratory of Ecology, University of Pittsburgh,

Pennsylvania, 39-52.

Webb SD and Rancy A (1996) Late Cenozoic evolution of the neotropical mammal fauna. In: Evolution and environment in tropical America. Jackson JB, Budd AF and Coates AG (eds.) University of Chicago Press, Chicago, pp 335-358.

Wozencraft WC (1993) Felidae. 288-300p. In: Mammal Species of the World: a Taxonomic and Geographic Reference. Wilson DE and Reeder DM (eds.) 2nd ed., Smithsonian Institution Press/American Society of Mammalogists, Washington, 1207 pp.

Young SP and Goldman EA (1946) The puma: mysterious American cat. American Wildlife Institute, Washington D.C. 358 pp.

Zink RM and Barrowclough GF (2008) Mitochondrial DNA under siege in avian phylogeography. Mol Ecol 17:2107-2121.

## Material Suplementar

Tabela S1: Segmentos de mtDNA utilizados nas análises adicionais em *Puma concolor*.

Segmento	Foward	Reverse
<i>ATP8</i>	DF1* <sup>1</sup> : AGAAGCTAAATAAGCATTAAACCTTTTA	DR2: TGGATGGACAGTATTTGTTTTGAT
Região Controladora	MTLPRO2* <sup>2</sup> : CACTATCAGCACCCAAAGCTG	CCR-DR1* <sup>2</sup> : CCTGTGACCATTGACTGACTGAATAGC

\*<sup>1</sup> = Trigo *et al.* 2008.

\*<sup>2</sup> = Tchaicka *et al.* 2007.

Tabela S2: Amostras de *Puma concolor* utilizadas nas análises, com descrição dos biomas para amostras da América do Sul, e uma listagem dos haplótipos encontrados nas amostras para os diferentes segmentos de mtDNA analisados, bem como a indicação dos agrupamentos definidos pela AMOVA com base no segmento de mtDNA *ND5*.

Indivíduo	Localização 01	Loc02	Bioma	ND5	ATP8	ND5 + ATP8	MTLPRO 2	CCR-DR1	MTLPRO 2 + CCR-DR1	ND5 + MTLPRO 2	ND5 + CCR-DR1	ND5 + MTLPRO2 + CCRDR1	Grupos AMOVA
bPco001	Bataguassu, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	-	C01	-	-	D01	-	CNESA
bPco002	Usina de Porto Primavera, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco014	Cananéia, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H03	-	-	M01	C02	E01	F01	D02	G01	ESA
bPco019	MS, BR	Brasil	Mata Atlântica/ Cerrado/ Pantanal	H01	-	-	M02	C01	E02	F02	D01	G02	CNESA
bPco020	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	M02	C03	E03	F03	D03	G03	CNESA
bPco021	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	M02	-	-	F02	-	-	CNESA
bPco022	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H14	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco023	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco024	Barão de Melgaço, MT, BR	Brasil	Pantanal	H02	-	-	M02	-	-	F03	-	-	CNESA
bPco025	Pantanal - MT, BR	Brasil	Pantanal	H02	A01	B01	M02	C03	E03	F03	D03	G03	CNESA
bPco026	Barão de Melgaço, MT, BR	Brasil	Pantanal	H03	A01	B02	M01	C02	E01	F01	D02	G01	CNESA
bPco027	Barão de Melgaço, MT, BR	Brasil	Pantanal	H21	-	-	M03	-	-	F04	-	-	CNESA
bPco028	Pantanal, MT, BR	Brasil	Pantanal	H21	-	-	M03	-	-	F04	-	-	CNESA
bPco029	Barão de Melgaço, MT, BR	Brasil	Pantanal	H02	-	-	M02	-	-	F03	-	-	CNESA
bPco030	Barão de Melgaço, MT, BR	Brasil	Pantanal	H21	-	-	M03	-	-	F04	-	-	CNESA
bPco031	Barão de Melgaço, MT, BR	Brasil	Pantanal	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco032	Pantanal, MT, BR	Brasil	Pantanal	H02	-	-	M02	-	-	F03	-	-	CNESA
bPco033	Pantanal, MT, BR	Brasil	Pantanal	H06	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco034	PE Cantareira, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	M02	C01	E02	F02	D01	G02	CNESA
bPco035	Jardim, MS, BR	Brasil	Cerrado	H07	-	-	M03	C04	E04	F05	D04	G04	CNESA
bPco036	Pantanal - MS ou MT, BR	Brasil	Pantanal	H06	-	-	M04	-	-	F06	-	-	CNESA
bPco037	Corumbá, MS, BR	Brasil	Pantanal	H05	A02	B03	M05	-	-	F07	-	-	CSSA

bPco038	Corumbá, MS, BR	Brasil	Pantanal	H05	-	-	-	-	-	-	-	-	CSSA
bPco039	Ponta Porã, MS, BR	Brasil	Cerrado	H09	-	-	M03	-	-	F08	-	-	CNESA
bPco040	Jardim, MS, BR	Brasil	Cerrado	H10	-	-	M03	C04	E05	F09	D05	G05	CNESA
bPco041	Alta Floresta, MT, BR	Brasil	Floresta Amazônica	H11	A03	B04	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco042	Bataguassu, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	M06	C05	E06	F10	D06	G06	CNESA
bPco043	Batayporã, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	-	C01	-	-	D01	-	CNESA
bPco044	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	-	C01	-	-	D01	-	CNESA
bPco045	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	M02	C01	E02	F02	D01	G02	CNESA
bPco046	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	C03	-	-	D03	-	CNESA
bPco047	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H07	-	-	M03	C04	E04	F05	D04	G04	CNESA
bPco048	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	M02	C06	E07	F11	D07	G07	CNESA
bPco049	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	M02	C01	E02	F02	D01	G02	CNESA
bPco050	Ivinhema, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco051	Ivinhema, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	M02	C06	E07	F11	D07	G07	CNESA
bPco052	Ivinhema, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	M02	C06	E07	F11	D07	G07	CNESA
bPco053	Ivinhema, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	A01	B05	-	C01	-	-	D01	-	CNESA
bPco054	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H09	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco055	Ivinhema, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H14	-	-	-	C07	-	-	D08	-	CNESA
bPco056	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	-	C01	-	-	D01	-	CNESA
bPco057	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H09	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco058	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco059	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco060	Ivinhema, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H07	-	-	M03	C04	E04	F05	D04	G04	CNESA
bPco062	Miranda_MS_BR	Brasil	Pantanal	H12	-	-	M03	C08	E08	F12	D09	G08	CSSA
bPco063	Miranda_MS_BR	Brasil	Pantanal	H07	-	-	-	-	-	-	-	-	CSSA
bPco064	Miranda_MS_BR	Brasil	Pantanal	H12	-	-	M03	C08	E08	F12	D09	G08	CSSA
bPco066	Ivinhema, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	M02	C01	E02	F02	D01	G02	CNESA
bPco067	Anaurilândia, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H09	-	-	-	C09	-	-	D10	-	CNESA

bPco069	Guaramiranga, CE, BR	Brasil	Caatinga	H13	-	-	-	C10	-	-	-	-	CNESA
bPco070	Quixeramobim, CE, BR	Brasil	Caatinga	H13	A01	B06	-	-	-	-	D11	-	CNESA
bPco071	Centralina, MG, BR	Brasil	Mata Atlântica	H03	-	-	-	C02	-	-	D02	-	ESA
bPco080	Londrina, PR, BR	Brasil	Mata Atlântica	H09	-	-	-	C09	-	-	D10	-	CNESA
bPco082	Santarém, PA, BR	Brasil	Floresta Amazônica	H22	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco302	Itapetinga, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica/ Cerrado	H04	-	-	M02	C11	E09	F13	D12	G09	CNESA
bPco315	Ibirarema, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	M02	C12	E10	F03	D13	G10	CNESA
bPco316	GO, BR	Brasil	Cerrado	H09	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco317	Analândia, SP, BR	Brasil	Cerrado	H02	-	-	-	C12	-	-	D13	-	CNESA
bPco318	Ribeirão Branco, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H09	-	-	-	C09	-	-	D10	-	CNESA
bPco319	SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	-	-	M02	C01	E02	F02	D01	G02	CNESA
bPco320	SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco326	Corguinho, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H09	-	-	M03	C09	E11	F08	D10	G11	CSSA
bPco327	Ponta Porã, MS, BR	Brasil	Cerrado	H06	-	-	M04	C13	E12	F06	D14	G12	CNESA
bPco331	Extrema, MG, BR	Brasil	Mata Atlântica	H01	A01	B05	-	C01	-	-	D01	-	CNESA
bPco332	Ribeirão Preto, SP, BR	Brasil	Cerrado	H15	A04	B07	-	C14	-	-	D15	-	ESA
bPco333	Luziânia, GO, BR	Brasil	Cerrado	H02	A01	B01	M02	C15	E13	F03	D16	G13	CNESA
bPco337	Chapada Gaúcha, MG, BR	Brasil	Cerrado	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco338	Chapada Gaúcha_MG_BR	Brasil	Cerrado	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco342	Presidente Figueiredo, AM, BR	Brasil	Floresta Amazônica	H16	A02	B08	M03	C16	E14	F14	D17	G14	NSA
bPco343	Rio Preto da Eva, AM, BR	Brasil	Floresta Amazônica	H16	-	-	M03	C17	E15	F14	D18	G15	NSA
bPco346	São Geraldo do Araguaia, PA	Brasil	Floresta Amazônica	H17	A04	B09	M02	C18	E16	F15	D19	G16	CNESA
bPco349	ParNA Montel Pascoal, BA, BR	Brasil	Mata Atlântica	H03	A01	B02	-	C02	-	-	D02	-	ESA
bPco351	Getulina, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	M02	C12	E10	F03	D13	G10	CNESA
bPco358	Tefé, AM, BR	Brasil	Floresta Amazônica	H16	-	-	-	-	-	-	-	-	NSA
d23	Rio Claro, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA

d25	Analândia, SP, BR	Brasil	Cerrado	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
d29	Itirapina, SP, BR	Brasil	Cerrado	H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
d42	Matão, SP, BR	Brasil	Cerrado	H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ESA
d43	Catanduva, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ESA
d44	Cajuru, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica/ Cerrado	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ESA
d45	Paulínia, SP, BR	Brasil	Mata Atlântica	H03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ESA
d51	Sertãozinho, SP, BR	Brasil	Cerrado	H03	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
d70	Araraquara, SP, BR	Brasil	Cerrado	H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ESA
d99	Itirapina, SP, BR	Brasil	Cerrado	H15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	ESA
PC01cc	Urubici, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC03cc	Urubici, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC04cc	Urubici, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC06cc	Urubici, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC07cc	Urubici, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC08cc	Lages, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	M02	C28	E24	F03	D29	G24	-	CNESA
PC10cc	Lages, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC11cc	Ponta Alta, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC15cc	Lages, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC18cc	Lages, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC19cc	Lages, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC20cc	São Joaquim, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC22cc	Urubici, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC23cc	Lages, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC26cc	Blumenau, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC27cc	Blumenau, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
PC49cc	São Joaquim, SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	H02	-	-	M02	C28	E24	F03	D29	G24	-	CNESA
PC60cc	SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PC61cc	SC, BR	Brasil	Mata Atlântica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-



Pco007	Oregon, USA	USA		H23	-	-	-	C19	-	-	D20	-	NCA+NA
Pco036	Texas, USA	USA		H23	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco037	Texas, USA	USA		H23	A04	B10	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco077	Florida, USA	USA		H24	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco128	Texas, USA	USA		H23	A04	B10	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco200	Torres Del Paine NP, Chile	Chile	Campos e matagais temperados	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco201	Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea, Campos de Altitude, Deserto e matagais xéricos	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco202	Punta Arenas, Chile	Chile	Campos e matagais temperados	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco207	Ovalle, Ivregion, Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea	H19	A06	B12	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco208	Vicuña, Ivregion, Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco209	Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea, Campos de Altitude, Deserto e matagais xéricos	H19	A06	B12	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco210	Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea, Campos de Altitude, Deserto e matagais xéricos	H19	A06	B12	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco211	Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea, Campos de Altitude, Deserto e matagais xéricos	H19	A06	B12	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco212	Cordillheiras Santiago, Chile/Mendoza, Argentina	Chile_ Argentina	Campos de Altitude	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco213	Angol/Coñaripe, Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco214	Antofagasta, Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea	H18	-	-	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco215	Ovalle, Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea	H19	A06	B13	-	-	-	-	-	-	SWSA

Pco216	Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea, Campos de Altitude, Deserto e matagais xéricos	H19	A06	B12	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco217	Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea, Campos de Altitude, Deserto e matagais xéricos	H19	A06	B12	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco218	Villarica, Chile	Chile	Floresta arbustiva mediterrânea	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco242	British Columbia, Canadá	Canada		H23	A04	B10	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco258	British Columbia, Canadá	Canada		H23	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco340	Idaho, USA	USA		H23	A04	B10	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco348	Florida, USA	USA		H25	A04	B14	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco356	Texas, USA	USA		H23	A04	B10	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco357	British Columbia, Canadá	Canada		H23	-	-	M07	C19	E17	F16	D20	G17	NCA+NA
Pco372	Yellowstone NP, USA	USA		H23	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco377	Yellowstone NP, USA	USA		H23	-	-	-	C19	-	-	D20	-	NCA+NA
Pco446	El Petén, Guatemala	Guatemala		H26	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco541	Darién, Panamá	Panamá		H23	-	-	M07	C20	E18	F16	D21	G18	SCA
Pco542	Darién, Panamá	Panamá		H24	A07	B15	-	-	-	-	-	-	SCA
Pco544	Guanacaste, Costa Rica	Costa Rica		H23	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco545	Costa Rica	Costa Rica		H09	-	-	M08	C21	E19	F17	D22	G19	SCA
Pco546	Costa Rica	Costa Rica		H24	A08	B16	-	-	-	-	-	-	SCA
Pco547	Costa Rica	Costa Rica		H09	A09	B17	-	-	-	-	-	-	SCA
Pco548	Costa Rica	Costa Rica		H09	-	-	-	-	-	-	-	-	SCA
Pco549	Granada, Nicarágua	Nicarágua		H23	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco550	Chontales, Nicarágua	Nicarágua		H23	-	-	M07	C22	E20	F16	D23	G20	NCA+NA
Pco551	Nicaragua	Nicaragua		H27	A10	B18	-	-	-	-	-	-	NCA+NA

Pco552	Matagalpa, Nicarágua	Nicarágua		H23	A04	B10	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco553	Nueva Guínea, Nicarágua	Nicarágua		H26	A04	B19	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco554	Norte Nicarágua	Nicarágua		H23	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco555	Centro-Norte Guatemala	Guatemala		H26	-	-	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco556	ElPetén, Guatemala	Guatemala		H23	-	-	-	C23	-	-	D24	-	NCA+NA
Pco557	Sul Guatemala	Guatemala		H28	A04	B20	-	-	-	-	-	-	NCA+NA
Pco562	Norte Argentina	Argentina	Campos de Altitude, Florestas úmidas Trop. e Subtrop., Campos e matagais Trop. e Subtrop, Florestas Secas Trop. e Subtrop.	H07	-	-	M03	C24	E21	F05	D25	G21	CSSA
Pco564	Sopé dos Andes, Argentina	Argentina	Campos de Altitude	H07	-	-	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco565	La Pampa, Argentina	Argentina	Campos e matagais temperados	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco567	Chubut, Argentina	Argentina	Campos e matagais temperados	H07	A02	B21	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco570	Mendoza, Argentina	Argentina	Campos de Altitude	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco573	Mendoza, Argentina	Argentina	Campos de Altitude	H18	A05	B11	-	-	-	-	-	-	SWSA
Pco577	Córdoba, Argentina	Argentina	Campos e matagais temperados	H07	A02	B21	-	-	-	-	-	-	CSSA
Pco580	Zoo Mercedes, Uruguai	Uruguai	Pampa (campos e matagais tropicais e subtropicais)	H09	A06	B22	-	-	-	-	-	-	CSSA
Pco581	Paraguai	Paraguai	Campos e matagais Trop. e Subtrop., Florestas Secas Trop. e Subtrop., Chaco	H07	A02	B21	-	-	-	-	-	-	CNESA
Pco582	Zoo Durazno, Uruguai	Uruguai	Pampa (campos e matagais tropicais e subtropicais)	H09	A06	B22	-	-	-	-	-	-	CSSA
Pco599	Noroeste SP, BR	Brasil	Mata Atlântica/ Cerrado	H03	-	-	-	-	-	-	-	-	ESA

Pco601	Araguaína, TO, BR	Brasil	Cerrado	H10	A01	B23	-	-	-	-	-	-	CNESA
Pco602	Goiás, BR	Brasil	Cerrado	H02	A01	B01	-	-	-	-	-	-	CNESA
Pco697	Araguaia, GO, BR	Brasil	Cerrado	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
Pco699	Chaco Paraguai	Paraguai	Pantanal (Chaco)	H02	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
Pco700	Campina Grande, PB, BR	Brasil	Caatinga	H02	-	-	M02	C15	E13	F03	D16	G13	CNESA
Pco701	Paraguai	Paraguai	Campos e matagais Trop. e Subtrop., Florestas Secas Trop. e Subtrop., Chaco	H01	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
Pco702	Usina de Porto Primavera, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H15	-	-	-	C14	-	-	D15	-	CNESA
Pco703	Venezuela	Venezuela	Florestas Úmidas Tropicais, campos e matagais trop. e florestas secas trop.	H20	-	-	-	-	-	-	-	-	NSA
Pco704	Falcón, Venezuela	Venezuela	Sist. Coriano	H16	A02	B08	-	C26	-	-	D27	-	NSA
Pco705	Barquisimeto, Venezuela	Venezuela	Sist. Coriano	H16	A02	B08	-	-	-	-	-	-	NSA
Pco706	Potosí, Bolívia	Bolívia	Campos de Altitude	H09	-	-	-	-	-	-	-	-	CSSA
Pco707	Santa Cruz, Bolívia	Bolívia	Florestas Secas Trop./Florestas Úmidas (Fl. Amazônica)	H06	-	-	M03	C13	E22	F18	D14	G22	CSSA
Pco708	Santa Cruz, Bolívia	Bolívia	Florestas Secas Trop./Florestas Úmidas (Fl. Amazônica)	H09	A06	B22	-	-	-	-	-	-	CSSA
Pco709	Potosí, Bolívia	Bolívia	Campos de Altitude	H09	A06	B22	-	-	-	-	-	-	CSSA
Pco710	Potosí, Bolívia	Bolívia	Campos de Altitude	H08	-	-	M03	C27	E23	F19	D28	G23	CSSA
Pco712	Batayporã, MS, BR	Brasil	Mata Atlântica	H09	-	-	-	-	-	-	-	-	CNESA
bPco015	Zoo Campinas, BR	Brasil		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
bPco016	Zoo Campinas, BR	Brasil		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco558	Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Pco559	Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco560	Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco561	Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco571	Zoo Mendoza, Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco574	Zoo Mendoza, Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco575	Zoo Mendoza, Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco578	Zoo Cordoba, Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco579	Zoo Cordoba, Argentina	Argentina		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pco600	Zoo Sorocaba, SP, BR	Brasil		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-