

INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA,
CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – GCBEv

Testando limites interespecíficos entre *Leopardus pardalis* e *L. wiedii* na Amazônia

Guilherme Fernandes Dias

MANAUS, Amazonas
Agosto, 2013

GUILHERME FERNANDES DIAS

Testando limites interespecíficos entre *Leopardus pardalis* e *L. wiedii* na Amazônia

Orientadora: DRA. IZENI PIRES FARIAS
Coorientador: Dr. Tomas Hrbek

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Financiamento: Projeto SISBIOTA – Rede BIOPHAM

MANAUS, Amazonas
Agosto, 2013

FICHA CATALOGRÁFICA

D541 Dias, Guilherme Fernandes
Testando limites interespecíficos entre *Leopardus pardalis* e *L. wiedii* na Amazônia. / Guilherme Fernandes Dias. --- Manaus : [s.n], 2014.
--, -- f. : il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2014.

Orientador : Izeni Pires Farias.

Coorientador : Tomas Hrbek.

Área de concentração : Biologia Evolutiva.

1. *Leopardus pardalis*. 2. *L. wiedii*. 3. Filogeografia. I. Título.

CDD 599.74428

Sinopse:

Para acessar os limites interespecíficos entre *Leopardus pardalis* e *L. wiedii* no bioma Amazônia foram utilizadas sequências parciais da região controle do DNA mitocondrial e do gene mitocondrial Citocromo B de indivíduos das duas espécies. Para se verificar eventos de hibridização foram utilizados marcadores nucleares de microssatélites. Com os marcadores do genoma mitocondrial foram observadas linhagens evolutivas significantes para cada espécie, presentes nas regiões do escudo guianense, onde o rio Amazonas claramente limita suas distribuições. Com os marcadores microssatélites verificou-se eventos de hibridização unidirecional no sentido de *Leopardus pardalis* para *L. wiedii* com frequências significantes na região das savanas de Beni, nas proximidades dos municípios de Riberalta e Guajará-Mirim.

Palavras-chave: *Leopardus pardalis*; *L. wiedii*; Filogeografia; Hibridação.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Rubens e Silzete, que independente das circunstâncias não mediram esforços para realizar os meus sonhos. Obrigado pelos incentivos, apoio e coragem. Sem vocês certamente eu não teria chegado até aqui.

Ao meu irmão, Fabrício, por se preocupar comigo e ser um verdadeiro irmão, me fazendo sorrir quando isso era o que eu menos queria.

À minha namorada, Isabella, pela paciência que teve comigo nos momentos mais difíceis desta trajetória e por sempre estar ao meu lado ajudando e apoiando.

À minha orientadora, professora Izeni Pires Farias. Pela oportunidade de realizar este trabalho. Sua dedicação, entusiasmo e amor àquilo que faz com certeza é um exemplo a ser seguido.

Ao meu coorientador, professor Tomas Hrbek, por compartilhar humildemente seus enormes conhecimentos, pela paciência e pela disponibilidade.

Aos amigos de longa data, Lucas e Hugo, por compartilharem seus conhecimentos, alegrias e experiências. Vocês são muito importantes.

Ao Emanuell, grande amigo, por toda a ajuda e companheirismo durante esses anos do Mestrado.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia pela oportunidade de aprendizado e aperfeiçoamento que me ofereceram.

A todos os colegas do laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL, por compartilharem de seus conhecimentos, alegrias, nervosismos e até mesmo dificuldades, tudo isso contribuiu muito com a minha formação. Obrigado pela ajuda de muitos, em especial àqueles que de alguma contribuíram com este estudo: Emanuell, Concy, Mário, Waleska e Gabi.

A todas as pessoas que contribuíram com doações de amostras para este estudo: Gislene, Tânica Sanaiotti, Valéria, Waleska, Emanuell, Rossano, Fabinho, Adam e Nicole,

Ao, laboratório de zoologia da UFAM e ao IBAMA, por também contribuírem com doações de amostras.

Ao CNPq e a FAPEAM pelo financiamento do projeto SISBIOTA – Rede BIOPHAM que subsidiou esse trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas, pelo apoio logístico através do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL)

À CAPES pelo financiamento da bolsa de estudo.

Resumo

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e o gato maracajá (*Leopardus wiedii*) são espécies irmãs de Felídeos neotropicais que evoluíram a partir de uma linhagem que migrou para a América do Sul durante a formação do Istmo do Panamá, a cerca de 2-3 milhões de anos. Ambas as espécies possuem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em simpatria na maior parte dela. Estas espécies são importantes componentes ecológicos dos ecossistemas, pois atuam como reguladores das populações de presas, no entanto, encontram-se ameaças de extinção, principalmente devido à fragmentação de seus habitats, caça e atropelamentos. Considerando que os conhecimentos genéticos e evolutivos sobre estas espécies são escassos, e que, dentro do gênero *Leopardus* já se tem caracterizado eventos de hibridização entre algumas espécies, utilizamos oito loci microssatélites para avaliar uma possível ocorrência de hibridação e introgessão genética entre *L. pardalis* e *L. wiedii* na Amazônia. Adicionalmente, de sequências mitocondriais parciais da região controle (d-loop) e do citocromo B (*cytB*) foram utilizadas para determinar o padrão de distribuição da variabilidade genética da espécie e avaliar barreiras físicas ou históricas ao fluxo gênico entre suas populações. Análises Bayesianas forneceram evidências claras da ocorrência de hibridação entre *L. pardalis* e *L. wiedii*, os resultados ainda mostram a introgessão gênica de *L. wiedii* em *L. pardalis*. Todos os indivíduos híbridos (n=6) identificados no presente estudo são, geograficamente, pertencentes a região do Cerrado Beniano (Nordeste da Bolívia) uma área caracterizada pela convergência de três diferentes áreas geográficas (Amazônia, Cerrado e Gran Chaco) e pela dinâmica de inundação durante a estação chuvosa. Análises filogenéticas das sequencias mitocôndrias feitas pelo critério de Máxima Verossimilhança revelaram a existência, bem suportada, de quatro linhagens principais, duas de *L. pardalis* (Lp1 e Lp2) e duas de *L. wiedii* (Lw1 e Lw2), suportando claramente a hipótese de rios como barreiras, sendo as linhagens Lp1 e Lw1 agrupadas ao norte do Rio Amazonas e Lp2 e Lw2 ao sul, com poucos indivíduos das linhagens Lp2 e Lw2 ocorrendo ao norte. A partir destes resultados foi possível concluir que dentro de ambas as espécies existem unidades evolutivamente distintas, que devem ser conservadas e manejadas como entidades separadas.

Abstract

The ocelot (*Leopardus pardalis*) and the margay (*Leopardus wiedii*) are sister groups of Neotropical felids that evolved from a lineages that migrated to South America following the formation of the Isthmus of Panama 2-3 million years ago. Both species are widely distributed, and to a large extent occur sympatrically. These species are important ecological components of ecosystems, because they act as regulators of prey populations, however, are threatened with extinction, mainly due to the fragmentation of their habitats, hunting and road kills. Given that our knowledge of the evolutionary history of these species is scarce, and given that within the genus *Leopardus* hybridization events between some species have already been observed, we used eight microsatellite loci to assess the possible occurrence of hybridization and genetic introgression between *L. pardalis* and *L. wiedii* in the Amazon basin. Together with the microsatellite data, we also used the mitochondrial control region (d-loop) and the cytochrome B gene (cytB) to determine the distribution pattern of genetic variability and evaluating historical or physical barriers to gene flow among populations. Bayesian analysis provided clear evidence of the occurrence of hybridization between *L. pardalis* and *L. wiedii*, with a directional introgression from *L. wiedii* into *L. pardalis*. All hybrid individuals (n = 6) identified in this study are geographically restricted to the Beni Cerrado (northeast of Bolivia) an area characterized by the convergence of three different geographic areas (Amazon, Cerrado and Gran Chaco) and by flood dynamic during the rainy season. Phylogenetic analyzes of mitochondrial sequences obtained under the Maximum Likelihood criterion revealed the existence of four, well-supported, major lineages, two of *L. pardalis* (Lp1 and Lp2) and two of *L. wiedii* (Lw1 and Lw2), clearly supporting the hypothesis of rivers as barriers. The lineages Lp1 and Lw1 grouped north of the Amazon River and Lp2 and Lw2 to the south with few individuals of Lp2 and Lw2 also being found north. From these results it was concluded that within species exists distinct evolutionary units which must be maintained and managed as independent entities.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
1. Introdução geral.....	1
1.1. Biodiversidade da amazônia e Filogeografia.....	1
1.2 Família Felidae e o gênero <i>Leopardus</i>	2
1.3. Caracterização das espécies.....	4
1.3.1. <i>Leopardus pardalis</i>	4
1.3.2. <i>Leopardus wiedii</i>	5
1.4. Hibridação, introgressão e zonas híbridas.....	7
1.5. Marcadores Moleculares.....	9
1.6. Região controle do DNA mitocondrial (D-loop).....	10
1.7. Microssatélites.....	11
2. Problema.....	12
3. Objetivos.....	13
3.1. Objetivo geral.....	13
3.2. Objetivos específicos.....	13
4. Material e métodos.....	14
4.1 Área de estudo e obtenção das amostras.....	14
4.2. Extração de DNA.....	17
4.3. Amplificação DNAm.....	17
4.4. Amplificação dos microssatélites.....	17
5. Análise de dados.....	18
5.1. Identificação morfológica.....	18
5.2. DNAm.....	19
5.3. Microssatélites.....	20
6. Resultados.....	21
6.1. Identificação morfológica.....	21
6.2. DNA mitocondrial.....	22
6.3. Relações filogeográficas entre as espécies.....	23
6.4. Microssatélites.....	28
7. Discussão.....	32
7.1. Rios como barreira.....	32
7.2. Hibridação entre <i>L. pardalis</i> e <i>L. wiedii</i>	34
8. Conclusão.....	37
9. Referências bibliográficas.....	38
Anexo I.....	48
Anexo II.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Espécimes analisados no presente estudo.....	15
Tabela 2. Diversidade genética (Região controle do DNAmt e gene Citocromo B) izados no estudo. (H) número de haplótipos, (Hd) diversidade haplotípica, (Pi) diversidade nucleotídica.....	23
Tabela 3. Estimativas de divergência evolutiva, com sequencias de d-loop, entre os grupos estudados.....	25
Tabela 4. Estimativas de divergência evolutiva, com sequencias de <i>cytB</i> , entre os grupos estudados.....	25
Tabela 5. Padrões de diversidade gênica dos 8 microssatélites utilizados no estudo. (NA) número de alelos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada.....	28
Tabela 6. Proporção de associação dos haplótipos e/ou genótipos de cada indivíduo aos <i>clusters</i> inferidos pela análise Bayesiana do programa STRUCTURE. Cada coluna contém o valor de “q” para cada indivíduo em cada <i>cluster</i> populacional . O asterisco (*) indica os indivíduos híbridos identificados no presente estudo.....	30

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>Leopardus pardalis</i> . Fonte: WWF. Foto: Adriano Gambarini.....	06
Figura 2. Exemplar de <i>Leopardus wiedii</i> . Fonte: www.arkive.org. Foto: Wendy Shattil & Bob Rozinski.....	06
Figura 3. Distribuição geográfica de <i>Leopardus pardalis</i> . Fonte: IUCN, 2008.....	07
Figura 4. Distribuição geográfica de <i>Leopardus wiedii</i> . Fonte: IUCN, 2008.....	07
Figura 5. Mapa esquemático dos pontos amostrados para <i>Leopardus pardalis</i> (quadrados vermelhos) e <i>Leopardus wiedii</i> (triângulos azuis) no presente estudo. Para alguns pontos tem-se mais de um indivíduo registrado.....	16
Figura 6. Fotos das peles de três exemplares estudados. Em (A) um <i>L. pardalis</i> , (B) <i>L. wiedii</i> e (C) indivíduo de padrão intermediário.....	22
Figura 7. Mapa esquemático com a distribuição das linhagens mitocondriais. Linhagem Lp1 (quadrado amarelo), Linhagem Lp2 (quadrado vermelho), Linhagem Lw1 (triângulo verde) e linhagem Lw2 (triângulo azul).....	25
Figura 8. Relações filogenéticas entre <i>L. pardalis</i> e <i>L. wiedii</i> baseadas nas análises das sequencias do gene mitocondrial <i>d-loop</i>	26
Figura 9. Relações filogenéticas entre <i>L. pardalis</i> e <i>L. wiedii</i> baseadas nas análises das sequencias do gene mitocondrial <i>cytB</i>	27
Figura 10. Gráfico de barras gerado pelo programa STRUCTURE. Cada coluna (linha vertical) representa um indivíduo. Cada cor representa grupos ou espécies diferentes (<i>clusters</i>) e a proporção das cores em cada coluna representa a probabilidade que cada indivíduo tem de pertencer a uma das espécies.....	30
Figura 11. Mapa evidenciando a região das savanas de Beni, nas proximidades dos municípios de Riberalta e Guajará-Mirim.....	35

1. Introdução geral

1.1. Biodiversidade da amazônia e Filogeografia

A Amazônia é a maior e mais diversa floresta tropical do mundo, possui uma superfície de aproximadamente 8 milhões de km², abrangendo oito países da América Latina, sendo eles, Brasil, Bolívia, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela, Guiana e Suriname (Da Silva *et al.*, 2005). Neste território encontra-se a maior bacia hidrográfica do mundo e, cerca de 40% do total de florestas tropicais remanescentes no planeta (Brasil, 2008).

Esta região possui uma extraordinária heterogeneidade ambiental, abrigando entre 10 e 20% de todas as espécies viventes na Terra (Brasil, 2008). Compilações recentes indicam que a Amazônia abriga pelo menos 40.000 espécies de plantas, 399 de mamíferos, 1.300 de aves, 378 de répteis, 305 de anfíbios e cerca de 3.000 espécies de peixes (Rylands *et al.*, 2002; Mittermeier *et al.*, 2003, Fonseca *et al.*, 2012; Ávila-Pires *et al.*, 2007). Números esses considerados atualmente bastante subestimado, uma vez que a região amazônica é responsável por um grande número de novas espécies descritas, devido principalmente a extensas áreas ainda inexploradas.

Os padrões de composição e distribuição biótica na Amazônia têm sido influenciados por uma série de características ambientais inter-relacionadas que moldaram o desenvolvimento da paisagem deste Bioma ao longo de sua história geológica (Hoorn *et al.*, 2010). Inúmeras hipóteses biogeográficas, têm sido propostas na tentativa de explicar os padrões geográficos, nos quais se organiza a diversidade biológica na região amazônica. Dentre essas estão a hipótese da especiação alopátrica via barreiras fluviais (Wallace, 1852), dos refúgios de florestas (Haffer, 1969; Haffer, 1997), das incursões marinhas (Nores, 1999; Webb, 1995), da influência da formação de cadeias de montanhas (Räsänen *et al.*, 1990), ou das mudanças climáticas (Bush, 1994; Colinvaux *et al.*, 1996; Colinvaux, 1998), assim como especiação parapátrica causada por seleção divergente ao longo de gradientes ecológicos (Endler, 1977).

Sabe-se que a distribuição de alguns mamíferos amazônicos, por exemplo,

tem como importante fator delimitante a presença dos grandes rios, que formam barreiras para o deslocamento de muitas espécies, principalmente no caso de espécies de roedores e marsupiais e de espécies de primatas (Emmons & Feer, 1998; Ayres & Clutton-Brock, 1992).

Neste contexto, a filogeografia, ramo da ciência que estuda os processos e padrões que governam a distribuição geográfica de linhagens genealógicas (Avise, 2000), é uma eficaz ferramenta na compreensão dos padrões filogeográficos intraespecíficos possibilitando a caracterização da história demográfica e estrutura geográfica de populações naturais (Eizirik *et al.* 2001). As bases históricas dessa ciência estão intimamente ligadas a estudos com o DNA mitocondrial de animais, aproximadamente 70% dos estudos (Avise, 2000), suprindo uma ponte empírica e conceitual entre a genética de populações e a filogenia.

1.2 Família Felidae e o gênero *Leopardus*

A Família Felidae é composta por 36 espécies (Wozencraft, 2005) distribuídas por quase todo o planeta, a exceção dos Polos, Austrália, Nova Zelândia, Madagascar e Caribe (Nowak, 1999). A maioria dos estudos tem apontado uma subdivisão da Família Felidae em oito linhagens monofiléticas. No entanto somente com o recente trabalho conduzido por Johnson *et al.* (2006), o tempo de divergência de cada linhagem, suas relações e exata composição de espécies foi esclarecida.

Segundo este estudo, o primeiro clado se ramificou há 10,8 milhões de anos na Ásia, produzindo a linhagem *Panthera*. Uma segunda ramificação, cerca de 1,4 milhão de anos mais tarde, também na Ásia, levou à formação da linhagem do *Bay Cat*. A separação seguinte ocorreu, há 8,5 milhões de anos, com a formação da linhagem do *Caracal*, participando da primeira migração intercontinental. Nesse período o nível dos oceanos desceu aproximadamente 60 metros abaixo do atual, descobrindo pontes de terra nas extremidades do Mar Vermelho, e ligando a África à Península de Arábia, facilitando assim a migração desses animais para o continente africano. Quando alcançaram a África, os felinos asiáticos ao mesmo tempo espalharam-se por seu continente e atravessaram o Estreito de *Bering* chegando ao

que hoje é o Alasca.

Após o estabelecimento de felinos nos continentes: africano, europeu, asiático e norte-americano, os níveis dos oceanos voltaram a subir, com o isolamento e as mudanças de habitat, novas espécies foram surgindo. Na América do Norte, as linhagens do *Ocelot* e do *Lynx* divergiram entre 8,0 e 7,2 milhões de anos. Posteriormente, também na América, ramificou a linhagem do *Puma* há cerca de 6,7 milhões de anos. Finalmente a sétima e oitava linhagens, que são representadas pelos pequenos gatos do velho mundo, que deram origem às linhagens do *Leopard Cat* e do *Domestic Cat*, divergiram-se há cerca de 6,2 milhões de anos.

Entre 2 e 3 milhões de anos atrás atividades tectônicas e um novo período glacial, que fez com que os oceanos recuassem mais uma vez, promovendo a conexão das Américas do Sul e do Norte através do Istmo do Panamá. Consequentemente alguns felinos migraram para o sul, onde encontraram um ambiente propício para sua sobrevivência e diversificação. Um exemplo desse processo migratório é o da linhagem da Jaguatirica que se diversificou na América do Sul, originando as sete espécies do gênero *Leopardus*.

Como o último período glacial tinha terminado há cerca de 10 mil anos, as camadas de gelo que cobriam todo o Canadá e a parte norte dos Estados Unidos foram derretendo lentamente. Após o degelo, um cataclismo dizimou 40 espécies de mamíferos da América do Norte, entre eles os felinos dente-de-sabre, pumas e guepardos, os pumas escaparam da extinção em refúgios na América do Sul e voltaram a povoar a América do Norte muitas gerações depois.

Atualmente na Região Neotropical ocorrem 10 espécies de felídeos, sendo elas: gato-mourisco (*Puma yagouaroundi*), onça-parda (*Puma concolor*), onça-pintada (*Panthera onca*), e as sete espécies do gênero *Leopardus* que compõem a linhagem do *Ocelot*, o gato-do-mato-grande (*Leopardus geoffroyi*), gato-do-mato-pequeno (*Leopardus tigrinus*), gato-maracajá (*Leopardus wiedii*), gato-palheiro (*Leopardus colocolo*), gato andino (*Leopardus jacobita*), gato chileno (*Leopardus guigna*) e a jaguatirica (*Leopardus pardalis*) (MacDonald & Loveridge, 2010).

1.3. Caracterização das espécies

A jaguatirica (*Leopardus pardalis*) e gato-maracajá (*L. wiedii*) são espécies irmãs de felídeos neotropicais que evoluíram a partir de uma linhagem que migrou para a América do Sul durante a formação do Istmo do Panamá, há cerca de 2-3 milhões de anos atrás (Johnson *et al.*, 2006). Ambas espécies possuem uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo em simpatria na maior parte dela.

1.3.1. *Leopardus pardalis*

A jaguatirica é uma espécie de porte médio, a maior entre os considerados pequenos felídeos neotropicais, com comprimento da cabeça e corpo variando de 67,0 a 101,5 cm e cauda proporcionalmente curta, com média de 35,4 cm. Os machos podem pesar de 8,0 a 16,6 kg e as fêmeas de 7,2 a 9,0 kg (Emmons & Feer, 1997; Rocha *et al.* 2004; Oliveira & Cassaro, 1999; Oliveira & Cassaro, 2005).

O padrão de pelagem de *L. pardalis* pode variar de cinza-amarelado bem pálido ao castanho com as mais diversas tonalidades intermediárias; na região ventral a coloração é esbranquiçada e as machas negras tendem a formar rosetas abertas que se unem formando bandas longitudinais nas laterais do corpo (Emmons & Feer, 1997; Oliveira & Cassaro, 1999; Oliveira & Cassaro, 2005) (Figura 1.). Recentemente, McBride & Giordano (2010) registraram um indivíduo de jaguatirica com padrão de pelagem branca (albina) no estado de Boqueron, Paraguai.

A jaguatirica ocorre desde o México através da América Central e do Sul, até o Norte da Argentina e sul do Brasil e Uruguai, é encontrada em todos os países sul-americanos, exceto no Chile (IUCN, 2008) (Figura 3.). Uma pequena população remanescente ainda é encontrada ao norte do Rio Grande, nos Estados Unidos, estimada em 80-120 animais (Sunquist & Sunquist, 2002). E no México, desapareceu de grande parte da sua distribuição histórica na costa oeste (IUCN, 2008).

Esta espécie apresenta hábitos solitários e terrestres, e a atividade é predominantemente noturna (Di Bitetti *et al.*, 2006). Costuma habitar ambientes

bastante variados, tais como, cerrado, pantanal, caatinga, mas habita principalmente florestas tropicais e subtropicais (Oliveira & Cassaro, 1999), evitando áreas mais abertas ou com pouca cobertura vegetal (Murray & Gardner, 1997).

Diversos estudos tem mostrado que a dieta da jaguatirica é composta predominantemente de pequenos mamíferos, tais como roedores e marsupiais menores que 1 kg, podendo se alimentar também de outros vertebrados como anfíbios, répteis e aves (Bisbal, 1986; Emmons, 1987; Chinchilla, 1997; Oliveira & Cassaro, 1999; Farrell *et al.*, 2000; Meza *et al.*, 2002; Wang, 2002; Bianchi & Mendes, 2007; Martins *et al.*, 2008).

1.3.2. *Leopardus wiedii*

O gato-maracajá caracteriza-se por ser uma espécie de porte pequeno, com comprimento da cabeça e corpo variando de 46 a 62 cm, cauda longa, geralmente maior que a metade do comprimento do corpo (37,6 cm) e peso entre 2,3 a 4,9 kg. Possui olhos grandes, focinho saliente e patas grandes (Oliveira, 1994; Emmons & Feer, 1997; Oliveira & Cassaro, 1999; Oliveira & Cassaro, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Oliveira, 2008). Sua coloração pode variar do amarelo-acinzentado ao castanho, com manchas de variados padrões, como pintas sólidas, bandas longitudinais e rosetas largas, completas e bem espaçadas nas laterais (Oliveira & Cassaro, 2005) (Figura 2.).

Sua distribuição vai desde as planícies costeiras do México, através da bacia amazônica, até o sul do Brasil e Paraguai (Nowell & Jackson, 1996). Ocorre também marginalmente ao norte da Argentina e no Uruguai (Dotta *et al.*, 2007) (Figura 4.). Possui hábitos solitários e geralmente noturnos. Habita predominantemente florestas, inclusive matas de galeria do Cerrado (Oliveira & Cassaro, 1999). É extremamente adaptado à vida arbórea e bastante ágil no solo, sendo assim considerado um animal escansorial (Konecny, 1989; Fonseca *et al.*, 1996).

Em reflexo aos seus hábitos escansoriais, sua dieta inclui aves e pequenos mamíferos arborícolas; entretanto, é formada principalmente por pequenos mamíferos terrestres podendo apresentar répteis, anfíbios e mamíferos de médio

porte (Konecny, 1989; Wang, 2002; Oliveira & Cassaro, 2005; Rocha-Mendes, 2005; Oliveira, 2008).



Figura 1. Exemplar de *Leopardus pardalis*. Fonte: WWF. Foto: Adriano Gambarini.



Figura 2. Exemplar de *Leopardus wiedii*. Fonte: www.arkive.org. Foto: Wendy Shattil & Bob Rozinski.



Figura 3. Distribuição geográfica de *Leopardus pardalis*. Fonte: IUCN, 2008.

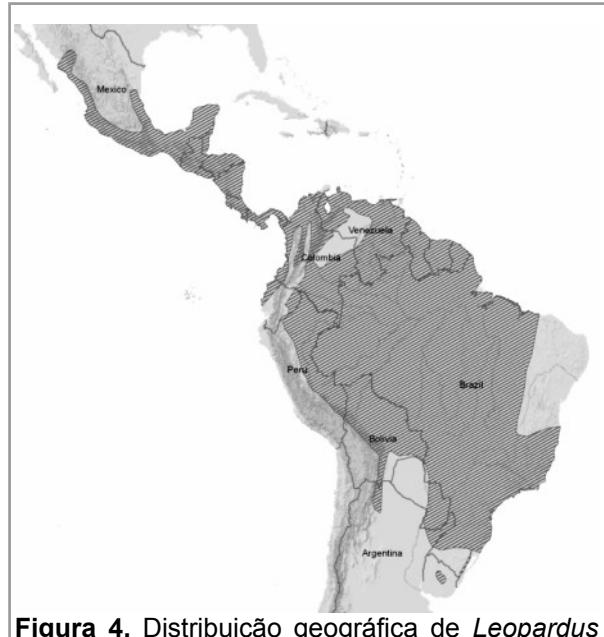


Figura 4. Distribuição geográfica de *Leopardus wiedii*. Fonte: IUCN, 2008.

1.4. Hibridação, introgessão e zonas híbridas

Uma característica interessante e de grande importância evolutiva observada em indivíduos do gênero *Leopardus* é a ocorrência de hibridação. Como já foi documentado para *L. tigrinus* com duas espécies distintas, *L. geoffroyi* e *L. colocolo* (Johnson *et al.*, 1999; Trigo *et al.*, 2008). Estudar os processos de hibridação é essencial para compreender a natureza das diferenças entre as espécies, bem como os mecanismos que originaram o seu isolamento reprodutivo.

A hibridação é definida como um processo em que há a reprodução, em condições naturais, de indivíduos pertencentes a populações geneticamente distintas (Barton & Hewitt, 1985). Este fenômeno tem despertado o interesse de cientistas durante muitas décadas e em vários contextos biológicos (por exemplo, Darwin, 1862; Haldane, 1922; Dobzhansky, 1937; Mayr, 1946; Anderson, 1949; Hewitt, 1996; Mallet, 2005). No entanto, apesar dos esforços nas pesquisas sobre hibridação, muitas questões permanecem em aberto, algumas das quais só agora podem ser resolvidas devido à rápida melhoria na tecnologia de sequenciamento.

Um evento que pode acontecer em consequência da hibridação é a introgessão. Também conhecida como hibridação introgessiva, este processo se

refere à incorporação gradual de genes de uma espécie para outra, mediante cruzamento entre dois progenitores, gerando um híbrido que é retrocruzado, diversas vezes, com uma das espécies parentais (Rhymer & Simberloff, 1996). A hibridação necessariamente não está acompanhada por introgessão, por exemplo, a prole de acasalamentos híbridos pode ser estéril. Além disso, introgessão pode ser unidirecional, com acasalamentos dos híbridos ocorrendo apenas com um dos parentais (Rhymer & Simberloff, 1996).

O evento de hibridação introgessiva, ocorre não só entre formas parentais com diferentes níveis de divergência genética, mas também em muitos contextos espaciais diferentes (Aboott *et al.*, 2013). Alguns destes têm sido intensamente estudados, principalmente no que diz respeito a formação de zonas híbridas, além dos aspectos demográficos, comportamentais e evolutivos envolvidos na origem, manutenção e destino destas (Harrison, 1993).

Zonas híbridas são, classicamente, definidas como estreitas regiões geográficas onde populações geneticamente distintas entram em contato, acasalam e produzem pelo menos algum descendente viável (Barton & Hewitt 1985). Os modelos conceituais sobre a origem das zonas de hibridação foram desenvolvidos durante as primeiras décadas do século XX. Dobzhansky (1940) e Mayr (1942) consideraram que as áreas de hibridação ocorrem pelo contato secundário entre populações que se diferenciaram em alopatria (isolamento geográfico), e que posteriormente sofrem quaisquer alterações nas suas áreas de distribuição, provocando alguma forma de sobreposição. Como resultado, se formam as chamadas áreas de hibridação secundária. Ainda segundo estes autores, quando ocorre divergência entre as populações em condições alopátricas, se dá a aquisição, através da seleção natural, de combinações distintas de genes, o que constituem a base da adaptação ao ambiente desigual. Por isso, hibridação por contato secundário, poderia resultar na interrupção de genótipos coadaptados dos progenitores, e, consequentemente, uma redução na adaptação dos híbridos. Nesta perspectiva, as áreas de hibridação são fenômenos evolutivamente transitórios, o que leva ao reforço das barreiras reprodutiva (principalmente pré-zigóticas) porque, neste caso, a seleção é contra a hibridação (Howard, 1993).

A hibridação pode gerar um grande número de possíveis resultados,

dependendo da constituição genética, demográfica, ecológica e da distribuição espacial das espécies envolvidas, todos os quais são altamente variáveis (Abbott *et al.*, 2013). O quadro multidimensional em que este evento ocorre e o fato de que as relações de hibridação são geralmente assimétricas entre os táxons e sexos envolvidos (Wirtz, 1999; Groning & Hochkirch, 2008) cria um elevado número de possíveis interações e continuará a ser um desafio separar a contribuição de cada fator para a dinâmica de hibridação. Neste contexto os marcadores moleculares nos permitem um amplo espectro de investigações sobre os padrões de hibridação e introgressão existentes em cada caso específico, e suas possíveis consequências na estrutura genética e evolução das espécies envolvidas.

1.5. Marcadores Moleculares

A variabilidade genética tem sido utilizada como um instrumento de investigação muito importante para os pesquisadores em seus estudos quando desejam verificar afinidades e limites entre as espécies, detectar modos de reprodução e estrutura familiar, estimar níveis de migração e dispersão nas populações e até mesmo para ajudar na identificação de espécies ameaçadas de extinção (Matioli & Passos-Bueno, 2001). Os dados básicos para esses estudos, denominados marcadores moleculares, são locos gênicos que apresentam alguma variabilidade.

Com o desenvolvimento da técnica da Reação em Cadeia da Polimerase (*PCR – Polymerase Chain Reaction*) (Mullis & Falloona, 1987; Saiki *et al.*, 1988), um grande número de marcadores moleculares tornou-se disponível a estudos genéticos ao nível populacional (Parker *et al.*, 1998; Sunnucks, 2000) como, por exemplo, RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*), minissatélites (*VNTR – Variable Number of Tandem Repeats*) e microssatélites (*SSR – Short Sequence Repeats*) (Ferreira & Gratacaglia, 1995). A reação de PCR se baseia na reassociação e extensão enzimática de um par de *primers* que delimitam uma sequência específica do DNA, os *primers* são sintetizados artificialmente e são complementares às regiões que flanqueiam a região alvo. Cada ciclo de PCR envolve três etapas, desnaturação

através da elevação da temperatura de 92°C para 95°C, reassociação, em que a temperatura é rapidamente reduzida para 35°C a 60°C, e extensão que ocorre quando a temperatura é elevada para 72°C. Este ciclo é repetido por várias vezes e, ao final da reação, há uma grande quantidade de DNA de uma sequência específica de interesse. Os produtos da PCR podem ser visualizados em gel de agarose. Esta visualização é possível com auxílio de substâncias intercalantes, que quando presente no gel se intercala entre as bases nitrogenadas no DNA e o torna visível com absorção de um comprimento de onda menor e emissão de um comprimento de onda maior de luz ultravioleta (Mullis & Falloona, 1987).

O gene mitocondrial *D-loop*, além dos locos microssatélites serão os marcadores moleculares utilizados como ferramenta neste estudo, então para melhor entendimento da metodologia adotada e das formas de análises, estes serão abordados de forma mais detalhada a seguir.

1.6. Região controle do DNA mitocondrial (*D-loop*)

Análises do genoma mitocondrial constituem uma importante ferramenta para a investigação de processos evolutivos, filogeográficos, filogenéticos, além de estudos de genética populacional (Rokas *et al.*, 2003).

O DNA mitocondrial, em animais, caracteriza-se por ser uma molécula de DNA pequena e circular, com tamanho variável (14 a 40kb). Não possui histonas, tampouco sistema de reparo, ficando exposto à ação degenerativa de radicais livres de oxigênio gerados pelo processo de fosforilação oxidativa (Chinnery *et al.*, 2000). Apresenta uma organização genômica compacta, ausência de íntrons, poucas regiões intergênicas, haploidia, ausência de recombinação e raramente apresenta sequências nucleotídicas duplicadas e sequências não codificadoras (Meyer, 1994; Boore, 1999; Garesse *et al.*, 1997).

A região controle é a maior região não codificadora e também a mais variável do genoma mitocondrial dos animais. É caracterizado pelo *displacement loop* (*D-loop*), que corresponde à região de origem de replicação da fita H do DNAmt (Meyer, 1994). A taxa de evolução da região controle é de duas a cinco vezes mais alta do

que a dos genes que codificam proteínas mitocondriais, acumulando mutações principalmente na extremidade 5'. Portanto, a região controle tem sido a principal sequência do DNAmt utilizada em estudos da variação genética inter e intraespecífica e para a avaliação do parentesco entre espécies filogeneticamente muito próximas (Meyer, 1994; Faber & Stepien, 1997; Sivasundar *et al.*, 2001; Prioli *et al.*, 2002; Rognon & Guyomard, 2003).

Alguns trabalhos têm tentado elucidar os processos evolutivos que moldaram os atuais padrões filogeográficos dos felídeos neotropicais, usando para isso a região controle do DNAmt como ferramenta molecular. Dentre eles podemos destacar o trabalho de Eizirik *et al.*, (1998) que abrangeu a distribuição de *L. pardalis* e *L. wiedii* na América Central e do Sul. Utilizando o sequenciamento da região controle do *DNAmt*. Os resultados mostraram níveis significativos de estruturação genética, o que possivelmente pode ter sido moldado por uma distribuição fragmentada por alterações recentes do habitat ou por barreiras pré-históricas. Foi visto ainda que dentro de ambas as espécies existem unidades evolutivamente distintas, que devem ser conservadas e manejadas como entidades separadas.

1.7. Microssatélites

A origem termo *SSR – Simple Sequence Repeats*, ou *STR – Short Tandem Repeats*, mais tarde chamados de microssatélites, se deu devido ao fato dos genomas dos eucariotos serem densamente povoados por diferentes classes, mais ou menos complexas, de sequências repetidas (Hamada *et al.*, 1982; Tautz & Renz, 1984). Basicamente, os microssatélites consistem em sequências de 1 a 6 nucleotídeos repetidas lado a lado (Goldstein & Schlötterer, 1999).

Estes marcadores estão entre as regiões genômicas com maior taxa de evolução (Goldstein & Schlötterer, 1999). Isto faz com que microssatélites tenham vários alelos em cada loco, o que permite uma identificação individual acurada e estimativas populacionais precisas. Além disso, por apresentarem tamanho pequeno, estes marcadores podem ser recuperados de amostras com DNA degradado, como pêlos, ossos e fezes (Taberlet *et al.*, 2001).

Apesar das sequências microssatélites variarem de um indivíduo para o outro, as sequências de DNA que as flanqueiam são bastante conservadas entre indivíduos da mesma espécie. Conhecendo essas regiões é possível desenhar *primers* específicos para essas regiões adjacentes às sequências microssatélites, possibilitando a amplificação via PCR dos fragmentos que contêm o DNA repetitivo em diferentes genótipos. Observa-se ainda que, pelo menos em genomas animais, ocorre conservação dessas regiões entre espécies relacionadas, tornando possível, em alguns casos, a utilização desses marcadores entre espécies, gêneros ou até famílias, usando-se *primers* heterólogos (Burland *et al.*, 2001; Williamson *et al.*, 2002; Garner *et al.*, 2004; Lau *et al.*, 2004; Roth *et al.*, 2006; Miotto *et al.*, 2007).

Os produtos da amplificação podem ser visualizados em gel de poliacrilamida desnaturante ou não desnaturante, em gel de agarose de alta resolução ou por meio de *primers* fluorescentes em sequenciador automático, e o polimorfismo entre as bandas será decorrente dos tamanhos diferentes de elementos simples repetidos. Cada segmento de DNA representa um alelo daquele loco específico (Souza, 2001; Alves, 2002; Borém & Caixeta, 2006). O alto poder discriminatório deste marcador é uma característica importante que merece destaque, motivo pelo qual é amplamente utilizado em estudos de genética de populações, análises de paternidade e forense (Oliveira *et al.*, 2006).

2. Problema

Predadores de topo de cadeia alimentar, como a jaguatirica e gato-maracajá, são importantes componentes ecológicos dos ecossistemas, pois atuam como reguladores das populações de presas. Porém essas espécies se encontram ameaçadas de extinção principalmente devido à fragmentação de seus habitats, caça e atropelamentos. Considerando-se que dentro das espécies de felinos do gênero *Leopardus* já se tem caracterizado eventos de hibridação entre algumas espécies, o presente estudo fez-se necessário no sentido de se ampliar os conhecimentos da biologia das espécies em questão e investigar a ocorrência ou não deste evento em *L. pardalis* e *L. wiedii* na Amazônia. Podendo desta forma

responder a futuras questões acerca de como conservar essas espécies ou populações.

Neste sentido, o presente trabalho, utilizando-se além de uma ampla amostragem, uma abordagem multiloci, testou as seguintes hipóteses:

- ✓ O Rio Amazonas é uma barreira ao fluxo gênico em *L. pardalis* e *L. wiedii*;
- ✓ Não existe introgessão ou hibridação entre as espécies *L. pardalis* e *L. wiedii*;

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Este estudo teve como objetivo testar o efeito do Rio Amazonas como barreira ao fluxo gênico em *L. pardalis* e *L. wiedii*, e a possível ocorrência de hibridação e introgessão genética entre as mesmas. Gerando, desta forma, novas informações sobre as relações genéticas e evolutivas entre *L. pardalis* e *L. wiedii* na natureza.

3.2. Objetivos específicos

- Correlacionar a filogenia com a distribuição geográfica em *L. pardalis* e *L. wiedii*;
- Verificar a presença ou não de compartilhamento de haplótipos por introgessão genética entre *L. pardalis* e *L. Wiedii*;
- Identificar genótipos híbridos e possíveis zonas de hibridização nas populações amostradas;
- Ampliar os conhecimentos da biologia destas espécies e contribuir para a elaboração de programas de manejo e conservação adequados.

4. Material e métodos

4.1 Área de estudo e obtenção das amostras

Amostras de tecidos (couro/pêlos) provenientes de caça ilegal, museus (coleções zoológicas científicas), atropelamentos e doações do IBAMA foram coletadas entre os anos de 2004 e 2013, totalizando 75 amostras, sendo 49 de *L. pardalis* e 26 de *L. wiedii*, as quais estão distribuídas, em 23 pontos amostrais, por toda a região amazônica (Figura 5.). Estas amostras foram coletadas de forma oportunista durante expedições de campo, realizadas por membros do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), para outros projetos de pesquisa. Durante estes trabalhos, ribeirinhos e comunitários foram questionados quanto a posse de couros de felinos mantidos por membros das comunidades. Ao detentor do material biológico também se obteve dados do local exato da coleta, e sempre que possível as peles foram fotografadas. É importante ressaltar que, apesar de ilegal, a caça desses animais ainda é uma prática muito frequente entre populações ribeirinhas de diversas regiões da Amazônia.

As amostras utilizadas neste estudo encontram-se depositadas no Banco de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e têm sido acondicionadas em sacos plásticos *zip lock* devidamente identificados, e colocadas em *freezer* para evitar a proliferação de fungos.

Tabela 1. Lista dos indivíduos analisados no presente estudo, com dados de procedência geográfica e instituição coletora.

Identificação da amostra	Procedência	Instituição
<i>Leopardus wiedii</i>		
Lwi3	Tefé – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi8	Itacoatiara – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi13, Lwi14, Lwi15	São Gabriel da Cachoeira – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi29, Lwi101, Lwi103, Lwi107, Lwi110, Lwi111, Lwi116	Guajará-Mirim – RO, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi30	Médio Rio Purus – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi37	Presidente Figueiredo – AM, Brasil	IBAMA
Lwi50, Lwi51	Bela Vista – RR, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi82, Lwi87, Lwi91, Lwi95, Lwi96, Lwi97	Riberalta – Beni, Bolívia	Universidade Federal do Amazonas
Lwi129	Tefé – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi131	Localidade desconhecida	IBAMA
Lwi144	Juruá – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lwi156	Jutaí – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
<i>Leopardus pardalis</i>		
Lpa4, Lpa55, Lpa139	Rio Preto da Eva – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa5	Itaituba – PA, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa6	Baixo Rio Juruá – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa11, Lpa16, Lpa17, Lpa18	São Gabriel da Cachoeira – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa20	Presidente Figueiredo – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa24	Coari – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa27, Lpa28, Lpa104, Lpa105, Lpa106, Lpa112, Lpa113, Lpa115, Lpa117, Lpa147	Guajará-Mirim – RO, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa33, Lpa73, Lpa74	Localidade desconhecida	IBAMA
Lpa35, Lpa36, Lpa146, Lpa154	Careiro da Várzea – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa38	Manicoré – AM, Brasil	IBAMA

Lpa49	Bela Vista – RR, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa83, Lpa84, Lpa86, Lpa88, Lpa89, Lpa90, Lpa92, Lpa93, Lpa98, Lpa99, Lpa100	Riberalta – Beni, Bolívia	Universidade Federal do Amazonas
Lpa128	Lago Jaraqui (Rio Negro) – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa130	Tabatinga – AM, Brasil	IBAMA
Lpa133	Nhamundá – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa140, Lpa141	Humaitá – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa155	Alto Rio Jatapú – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa157	Jutaí – AM, Brasil	Universidade Federal do Amazonas
Lpa162	Rio Branco – AC, Brasil	IBAMA

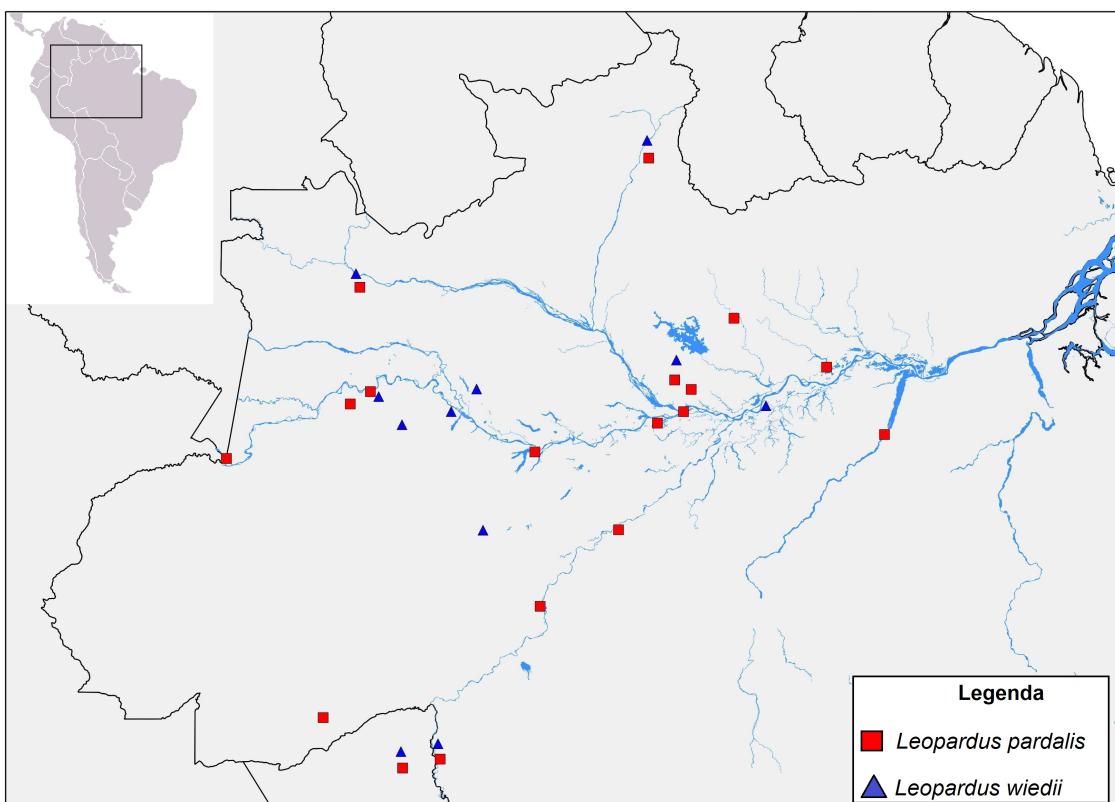


Figura 5. Mapa esquemático dos pontos amostrados para *Leopardus pardalis* (quadrados vermelhos) e *Leopardus wiedii* (triângulos azuis) no presente estudo. Para vários pontos tem-se mais de um indivíduo registrado.

4.2. Extração de DNA

A extração de DNA genômico destas amostras foi realizada através do uso do kit comercial “*DNeasy Tissue Kit – Qiagen Peqlab*”, seguido as instruções sugeridas pelo fabricante. E alternativamente, em alguns casos, devido ao fato das extrações de DNA com o kit comercial gerarem produtos com baixa quantidade e concentração de DNA, foi utilizado o protocolo padrão de fenol/clorofórmio (Sambrook *et al.*, 1989).

4.3. Amplificação DNAm

O DNA extraído foi amplificado por meio da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) utilizando um par de *primers* que flanqueiam parte da região controle do DNA mitocondrial, desenvolvidos para o presente estudo a partir de sequências de *L. pardalis* e *L. wiedii* depositadas no GenBank. A amplificação da região controle foi realizada nas seguintes condições: 35-43 ciclos de 45 s a 94 ° C, 45 s a 52 ° C e 1 min 30 s a 72 ° C.

O produto da amplificação foi purificado (para a remoção de reagentes não utilizados durante a amplificação) e precipitado com etanol, de acordo com recomendações do fabricante (*Applied Biosystems*), ressuspensionado em 10µl de formamida deionizada e posteriormente injetado e resolvido no sequenciador automático ABI 3130xl, sendo utilizado, na reação, *primer forward* marcado com cauda M13.

4.4. Amplificação dos microssatélites

Foram usados oito locos microssatélites (FCA043, FCA075, FCA077, FCA094, FCA293, FCA441, FCA453 e FCA678), desenvolvidos por Menotti-Raymond *et al.* (1999) para o gato doméstico (*Felis catus*), mas que têm sido frequentemente utilizados como primers heterólogos em diversos trabalhos envolvendo espécies de felídeos silvestres (por exemplo, Johnson, *et al.*, 1999; Ernest, *et al.*, 2003; Moreno *et al.*, 2006; Trigo *et al.*, 2008; Uphyrkkina, *et al.*, 2001).

Estes loci foram selecionados por suas posições em diferentes cromossomos, para que assim se possa evitar qualquer efeito causado por desequilíbrio de ligação, e pelo fato de terem se mostrado polimórficos em estudos prévios com outras espécies de felídeos.

Para facilitar a etapa de genotipagem, foram incorporadas caudas M13(-21) a extremidade 5' do primer *forward* dos marcadores microssatélites (método de Schuelke, 2000). As condições da reação de PCR consistiram num ciclo inicial de 5 min a 94°C para a desnaturação do DNA; 35 ciclos de: 94°C por 30 segundos, temperatura de anelamento de 55°C por 1 min, 72° por 1 min. O ciclo de amplificação encerra após uma extensão final por 10 min a 72°. Para confirmar o sucesso da amplificação, o produto amplificado foi analisado em gel de agarose (1%) corado com o intercalante de DNA Gel/Red (Biotum).

Os produtos da PCR foram diluídos 10X em sua concentração. Em 3 μ l de cada produto diluído foi adicionado 7 μ l de uma mistura de formamida e ET-400 Rox (marcador de tamanho) para serem resolvidos em sequenciador automático ABI 3130xl (*Applied Biosystem*). Os resultados obtidos foram analisados no software *GeneMapper* v4.0. visando identificar o genótipo de todos os locos para cada indivíduo. De acordo com a necessidade, esse processo foi repetido uma ou duas vezes para alguns locos microssatélites, objetivando conhecer com exatidão o genótipo de cada indivíduo amostrado. Após a construção da matriz de dados individual para cada loco genotipado foram feitas as análises estatísticas.

5. Análise de dados

5.1. Identificação morfológica

A identificação morfológica dos espécimes constituiu-se basicamente na análise da morfologia externa das peles, onde foram observados (1) os padrões de manchas e pintas, (2) e o comprimento da cauda em relação ao corpo, sendo estas, características diagnósticas para a diferenciação das duas espécies. O tamanho do corpo não foi levado em consideração pois indivíduos subadultos de *L. pardalis*

podem assemelhar-se muito a exemplares de *L. wiedii*, inclusive apresentando as mesmas proporções corporais (Oliveira & Cassaro, 2005).

A jaguatirica possui um padrão de manchas com bandas longitudinais, de tamanho variado e que usualmente são bem distintas. Apresenta ainda uma cauda proporcionalmente curta em relação ao tamanho do corpo (Oliveira & Cassaro, 2005). Já o gato-maracajá se caracteriza por apresentar um padrão de manchas com grande pintas sólidas e bandas longitudinais, entretanto, as rosetas são tipicamente largas, completas e bem espaçadas nas laterais. Além disto, a cauda é proporcionalmente longa em relação ao corpo (Oliveira & Cassaro, 2005).

5.2. DNAmt

As sequências obtidas foram editadas manualmente no programa *Bioedit* (Hall, 1999) e alinhadas com o auxílio da ferramenta Clustal W (Thompson *et al.*, 1994) a fim de determinar a ordem exata dos nucleotídeos de cada amostra. Todas as regiões inserções e deleções foram excluídas manualmente, afim de analisar somente as regiões informativas das sequências.

Em complementação aos dados morfológicos, as sequências do gene mitocondrial *d-loop* foram inicialmente utilizadas na identificação molecular dos espécimes amostrados. Esse processo foi baseado na comparação das sequências obtidas, com as depositadas no banco de dados do GenBank, por meio da ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

O programa DNAsp (Rozas *et al.*, 2003) foi utilizado para estimar alguns parâmetros estatísticos de diversidade genética, tais como: diversidade nucleotídica (Pi), número de haplotipos (H), diversidade haplotípica (Hd).

O *d-loop* foi basicamente o marcador utilizado nas análises filogeográficas. No entanto, o *cityB* foi utilizado para verificarmos se obteríamos os mesmos resultados do *d-loop* utilizando um gene codificador de proteína, e assim poder ser utilizado como controle do DNAmt; uma vez que com *d-loop* poderíamos correr o risco de obter resultados de cópia nucleares e não de linhagem mitocondrial.

Para acessar as relações filogenéticas entre os indivíduos de *L. pardalis* e *L. wiedii* foi utilizado o programa Treefinder (Jobb *et al.*, 2004), onde as relações foram construídas utilizando-se o critério de Máxima Verossimilhança utilizando as sequencias dos genes *d-loop* e *cytB* (Anexo I e II), com robustez de 1000 replicas não paramétricas de *bootstrap*. Para esta análise se utilizou o modelo evolutivo selecionado pelo programa jMODELTEST (Posada, 2008).

As distâncias genéticas entre as linhagens foram obtidas pelo programa MEGA 5 (Tamura *et al.*, 2011) utilizando-se o modelo evolutivo de máxima verossimilhança (Tamura & Kumar, 2004).

5.3. Microssatélites

Para o banco de dados de microssatélites, o cálculo da heterozigosidade observada (H_o) e esperada (H_e), do desequilíbrio de ligação entre os pares de loci e o teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg foi utilizado o programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Os níveis de significância foram corrigidos utilizando o método de Bonferroni (Rice, 1989).

O programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000) foi utilizado para identificar a presença de indivíduos híbridos dentro das espécies estudadas. O método assume Equilíbrio de Hardy-Weinberg para cada loco e Equilíbrio de Ligação entre os locos dentro de cada população, sendo que a existência de desvios do equilíbrio leva a população a ser dividida em subpopulações, às quais os indivíduos são alocados.

Neste método, cada indivíduo amostrado foi designado probabilisticamente para uma população de acordo com as linhagens previamente estabelecidas a partir dos dados de filogenia. Foi então testado o valor de K (número de populações) com maior probabilidade de inferir corretamente o número de populações contidas na amostragem. Para o valor de K selecionado, foi avaliada a proporção média de adesão (Q) das populações amostradas (*L. pardalis* e *L. wiedii*) para os *clusters* inferidos, e a proporção da participação de cada indivíduo nas espécies estudadas (q).

As análises foram realizadas usando o modelo de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) de 50.000 interações após um período de *burn-in* de 100.000 interações, utilizando o modelo “*admixture*” assumindo frequências alélicas correlacionadas.

Adicionalmente o programa R foi utilizado para testar a probabilidade das linhagens mitocondriais obtidas estarem distribuídas aleatoriamente na região amazônica. Também foi testada a probabilidade dos indivíduos híbridos serem encontrados de forma aleatória ou de estarem restritos a apenas uma única região geográfica da Amazônia. Para estes cálculos foi utilizado o Teste Exato de Fisher, que faz uso de tabelas de contingência 2X2, para se comparar 2 grupos. Determinando assim, a probabilidade exata de ocorrência de uma frequência observada.

6. Resultados

6.1. Identificação morfológica

A partir da análise dos padrões de manchas e pintas, e do comprimento da cauda em relação ao corpo, foi possível identificar morfológicamente os espécimes estudados, sendo 49 indivíduos de *L. pardalis* e 26 de *L. wiedii*.

No entanto alguns indivíduos apresentaram características intermediárias entre *L. pardalis* e *L. wiedii* (Figura 6.), o que dificultou a identificação morfológica de todos os indivíduos. Para estes e aqueles que não possuíam registros fotográficos, a identificação molecular, a partir das sequências de *DNAmt*, auxiliou na definição exata dos espécimes estudados.

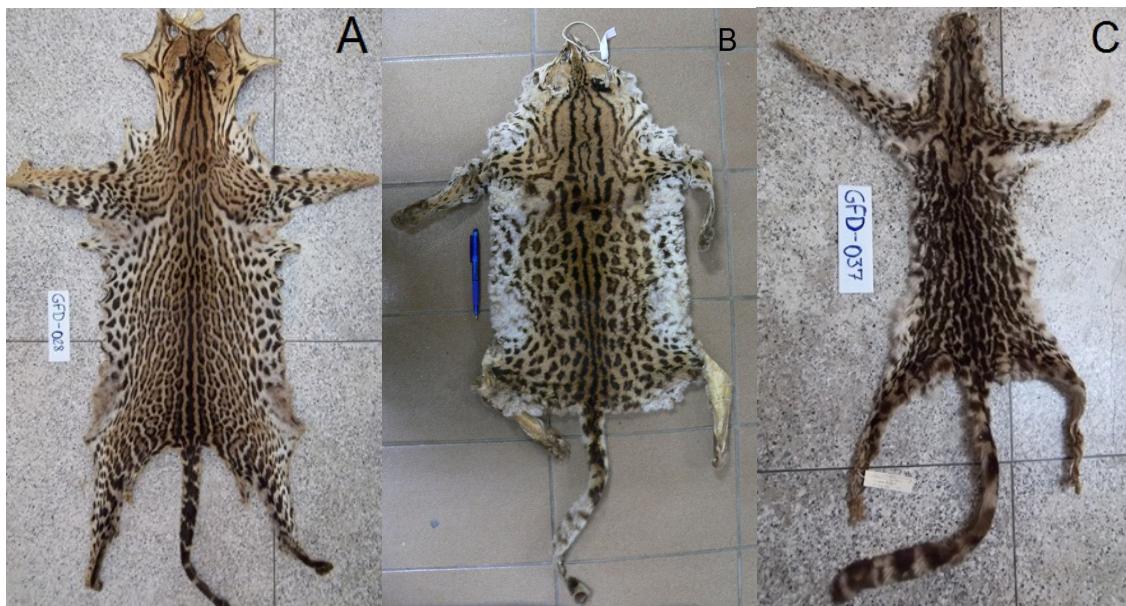


Figura 6. Fotos das peles de três exemplares estudados. Em (A) um *L. pardalis*, (B) *L. wiedii* e (C) indivíduo de padrão intermediário.

6.2. DNA mitocondrial

Produtos de PCR da Região Controle do DNAm (d-loop) foram sequenciados para 49 indivíduos de *L. pardalis* e 26 indivíduos de *L. wiedii*, obtendo um banco de dados de sequencias de 482pb, destes 174 foram polimórficos e 103 foram informativos para parcimônia nas duas espécies. Para o gene *cytB* foram obtidas sequencias de 458pb para 16 indivíduos de *L. pardalis* e 13 de *L. wiedii*, destes 103 foram polimórficos e 83 foram informativos para parcimônia nas duas espécies.

Para cada banco de dados foram estimados os parâmetros de diversidade genética que podem ser visualizados na Tabela 2.

Tabela 2. Informações de diversidade genética dos 2 genes mitocondriais utilizados no estudo. (H) número de haplótipos, (Hd) diversidade haplotípica, (Pi) diversidade nucleotídica.

	<i>Leopardus pardalis</i>			<i>Leopardus wiedii</i>		
	H	Hd	Pi	H	Hd	Pi
<i>d-loop</i>	16	0,762	0,02442	19	0,960	0,05418
<i>cytB</i>	13	0,950	0,02667	09	0,949	0,01508

6.3. Relações filogeográficas entre as espécies

Análises filogenéticas baseadas no método de Máxima Verossimilhança (MV) das sequencias de *d-loop* e *cytB* apresentaram resultados similares, com partições geográficas claras nas árvores das duas espécies. O modelo evolutivo de Hasegawa – Kishino – Yano (HKY85), foi o modelo evolutivo selecionado pelo programa jMODELTEST (Posada, 2008), e considera a composição molecular desigual entre as bases e diferenças na taxa de substituição nucleotídica (transição e transversão). Este modelo foi usado nas análises de MV. As árvores de MV obtidas para as sequencias de *d-loop* e *CytB* podem ser visualizadas nas figuras 8 e 9, respectivamente.

Ambas as árvores revelaram a existência, bem suportada, de quatro linhagens distintas ao longo de toda distribuição amostral. As linhagens obtidas foram representadas por Lp1, Lp2, Lw1 e Lw2.

Os espécimes de *L. pardalis* foram agrupados em dois clados bem suportados: Lp1 (norte do Rio Amazonas) e Lp2 (sul do Rio Amazonas), os quais apresentaram suporte de *bootstrap* de 99% e 79%, respectivamente, baseado nos dados de *d-loop* e *bootstrap* de 91% e 98%, respectivamente, baseado nos dados do gene *cytB*. Já os espécimes de *L. wiedii* foram agrupados em outros dois clados: Lw1 (norte do Rio Amazonas) e Lw2 (sul do Rio Amazonas), estes por sua vez apresentaram suporte de *bootstrap* de 96% e 89%, respectivamente, baseado nos dados de *d-loop* e *bootstrap* de 58% e 64%, respectivamente, baseado nos dados do gene *cytB*.

A linhagem Lp1 apresentou uma estruturação filogeográfica restrita a microrregião Amazônica do Rio Negro e a linhagem Lw1 estruturou-se filogeograficamente nas microrregiões Amazônicas do Japurá e Rio Negro. Similarmente as linhagens Lp2 e Lw2 se concentraram ao sul do Rio Amazonas, porém ambas não apresentaram nenhuma estruturação filogeográfica específica. Todos os clados foram identificados como reciprocamente monofiléticos, exceto para o clado Lp1, que foi retratado como parafilético em relação a Lp2.

As distâncias genéticas entre as linhagens variaram de 5,6%, entre Lw1 e Lw2, a 10%, entre Lw1 e Lp2, para *d-loop* e de 2%, entre Lw1 e Lw2, a 7%, entre Lp1 e Lw2, para o gene *cytB*. Estes resultados podem ser melhor visualizados nas tabelas 2 e 3.

Tabela 3. Estimativas de divergência evolutiva com sequências de *d-loop* entre os grupos estudados.

	Lp1	Lp2	Lw1	Lw2
Lp1	-			
Lp2	0,076	-		
Lw1	0,080	0,103	-	
Lw2	0,065	0,083	0,056	-

Tabela 4. Estimativas de divergência evolutiva com sequências de *cytB* entre os grupos estudados.

	Lp1	Lp2	Lw1	Lw2
Lp1	-			
Lp2	0,047	-		
Lw1	0,063	0,053	-	
Lw2	0,065	0,053	0,020	-

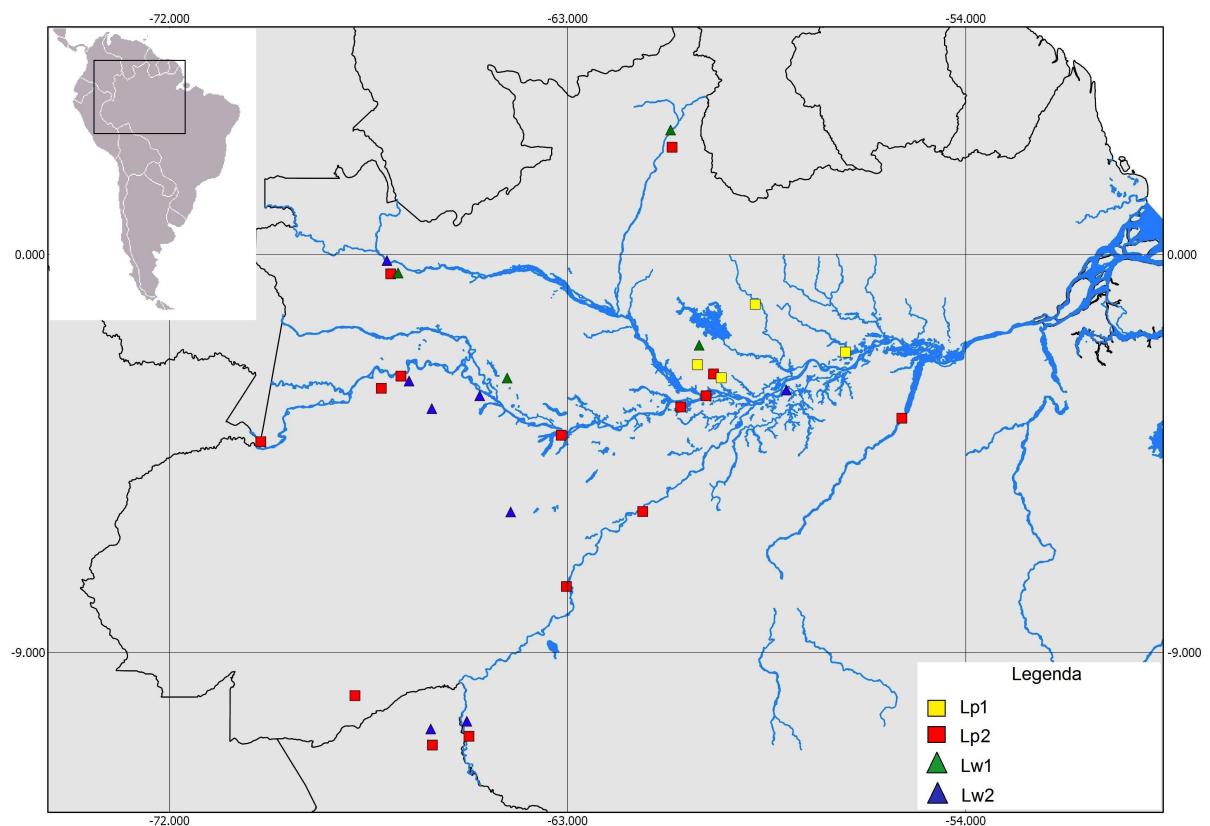


Figura 7. Mapa esquemático com a distribuição das linhagens mitocondriais. Linhagem Lp1 (quadradinho amarelo), linhagem Lp2 (quadradinho vermelho), linhagem Lw1 (triângulo verde) e linhagem Lw2 (triângulo azul).

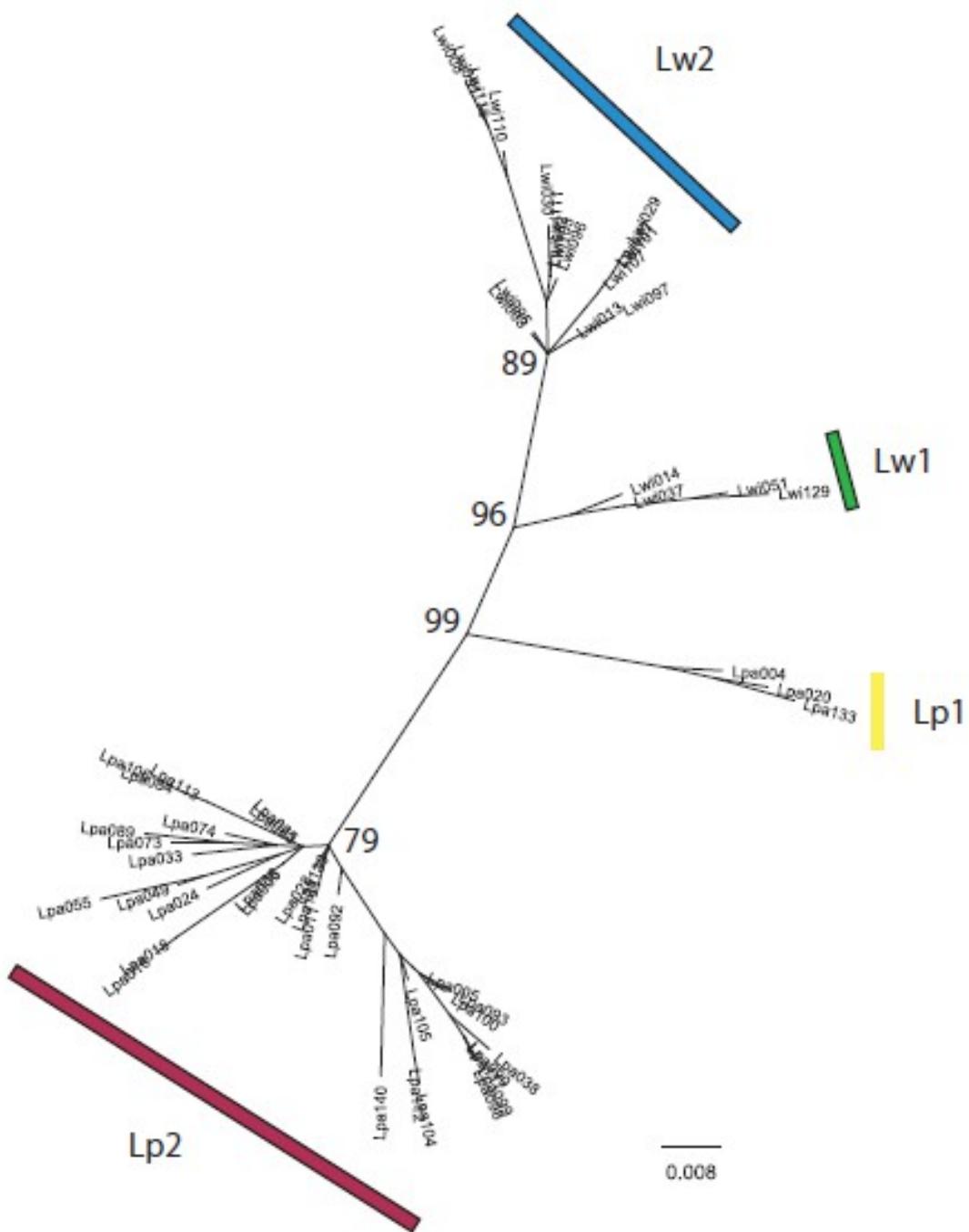


Figura 8. Relações filogenéticas entre *L. pardalis* e *L. wiedii* baseadas nas análises das sequências do gene mitocondrial *d-loop*.

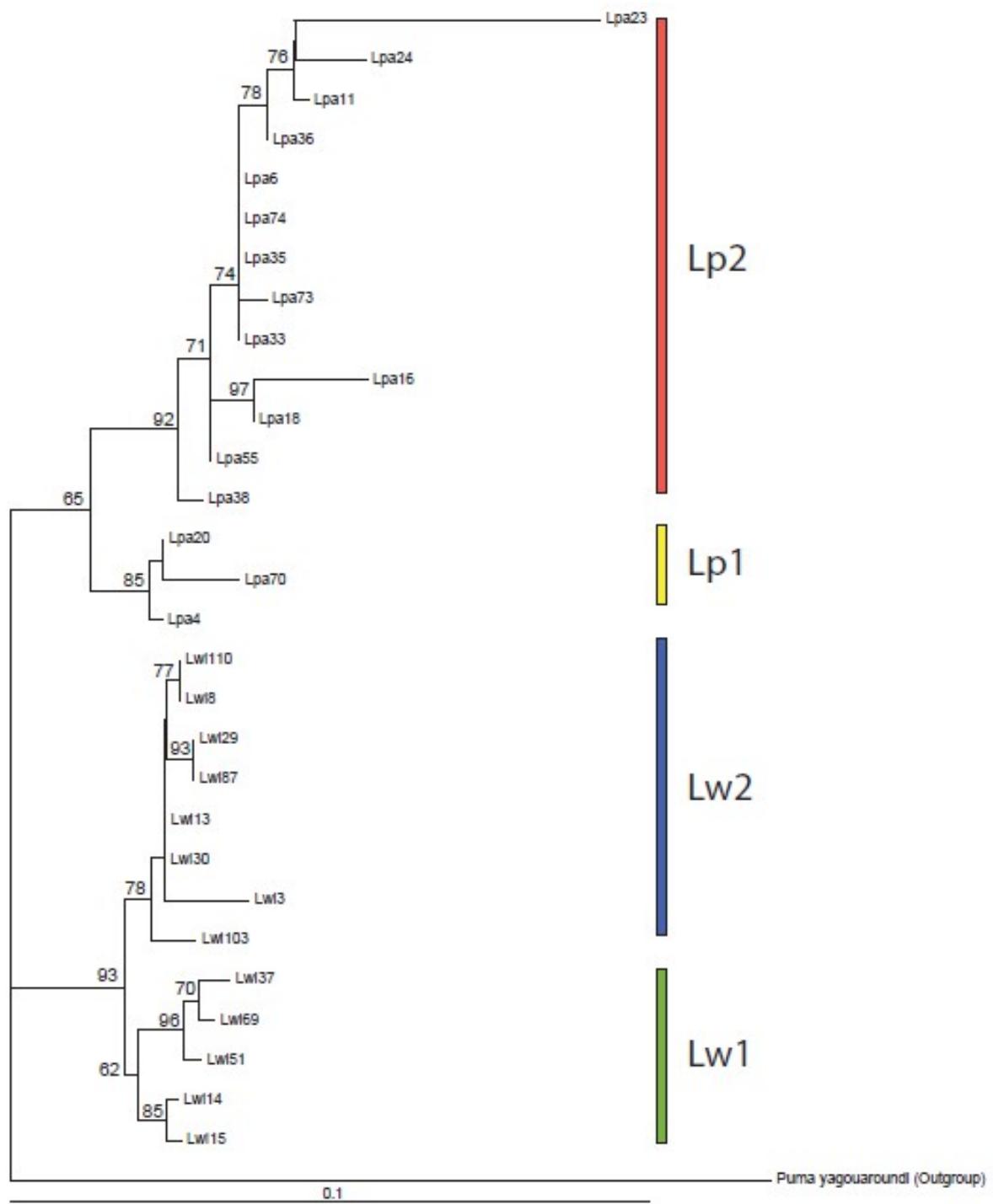


Figura 9. Relações filogenéticas entre *L. pardalis* e *L. wiedii* baseadas nas análises das sequencias do gene mitocondrial *cytB*.

6.4. Microssatélites

Foram analisados oito loci autossômicos microssatélites para 44 indivíduos de *L. pardalis* e 25 indivíduos de *L. wiedii*. Todos os loci foram polimórficos para as duas espécies, com um elevado número de alelos por locus (Tabela 4.).

Tabela 5. Informações sobre os 8 microssatélites utilizados no estudo. (NA) número de alelos, (He) heterozigosidade esperada, (Ho) heterozigosidade observada.

	<i>Leopardus pardalis</i>			<i>Leopardus wiedii</i>		
	NA	He	Ho	NA	He	Ho
FCA043	12	0,86834	0,77273	13	0,90122	0,80000
FCA075	14	0,90361	0,84091	14	0,89306	0,56000
FCA077	13	0,91614	0,84091	10	0,88408	0,76000
FCA094	16	0,91902	0,75000	12	0,90449	0,64000
FCA293	07	0,80747	0,47727	07	0,73959	0,36000
FCA441	06	0,65831	0,45455	07	0,65633	0,56000
FCA453	08	0,74660	0,68182	05	0,80408	0,84000
FCA678	03	0,43391	0,02273	09	0,70449	0,48000

Através da análise dos dados microssatélites pelo método bayesiano implementado no software STRUCTURE v. 2.3.4, verificou-se que o número de populações geneticamente distintas com maior probabilidade média foi de K=2. Onde cada uma das duas espécies, divididas a priori em quatro populações mitocondriais (Lp1, Lp2, Lw1 e Lw2), foi associada predominantemente a um dos 2 clusters, apresentando altos valores de associação. As duas populações de *L. pardalis* foram atribuídas ao cluster 2, com a proporção média de adesão sendo de Q= 0,9681 para Lp1 e de Q=0.8709 para Lp2, e as duas populações de *L. wiedii* foram agrupadas no cluster 1, com proporções de adesão sendo de Q=0.9803 para Lw1 e de Q=0,9907 para Lw2.

Tanto os 6 indivíduos pertencentes a linhagem Lw1 quanto os 19 indivíduos da linhagem Lw2, todos previamente identificados, com base nas sequências de DNAmt, como sendo *L. wiedii*, foram agrupados ao *cluster* 1 com $q \geq 0.94$. Dos indivíduos previamente identificados como *L. pardalis*, foram associados ao *cluster* 2 todos os 5 pertencentes a linhagem Lp1, com proporção de participação $q \geq 0.95$, e 33 dos 39 indivíduos da linhagem Lp2 com $q \geq 0.93$.

Os 6 indivíduos restantes da linhagem Lp2 apresentaram proporções < 0.90 de participação ao *cluster* 2. Destes, 4 (Lpa28, Lpa86, Lpa88 e Lpa92) tiverem uma alta probabilidade ($q \geq 0.50$) de associação ao *cluster* 1, e os dois indivíduos restantes, Lpa90 e Lpa113, apresentaram proporções relativamente baixas ($q=0.15$ e $q=0.16$, respectivamente), porém significativas, de participação ao *cluster* 1. Assumindo um valor q de 0.90 como o limite aceitável para distinguir indivíduos puros de híbridos, como tem sido proposto em estudos similares de hibridação (Flamand *et al.*, 2003, Lancaster *et al.*, 2006, Vähä & Primmer, 2006) podemos considerar, segundo os marcadores utilizados, um total de 6 *L. pardalis* híbridos na amostragem total, todos, geograficamente, pertencentes à região do Cerrado Beniano, nas proximidades dos municípios de Guajará – Mirim (Rondônia, Brasil) e Riberalta (Beni, Bolívia).

De forma complementar, os testes de probabilidade realizados no programa R revelaram que a probabilidade das linhagens de *L. wiedii* (Lw1 e Lw2) e de *L. pardalis* (Lp1 e Lp2) serem distribuídas de maneira aleatória na Amazônia é de $p=0.000005201$ e $p=0.002948$ respectivamente. Já para os 6 indivíduos híbridos identificados, a probabilidade deles serem encontrados de maneira aleatória na Amazônia é de $p=0.003563$.

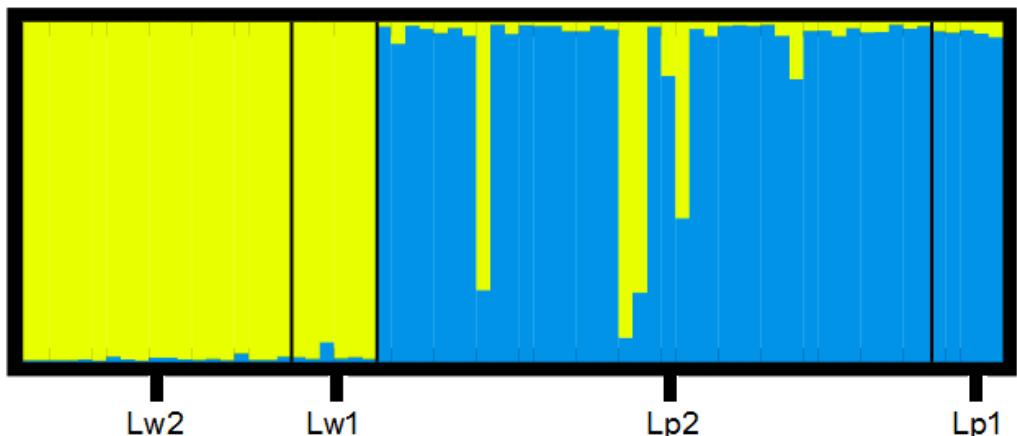


Figura 10. Gráfico de barras gerado pelo programa STRUCTURE. Cada coluna (linha vertical) representa um indivíduo. Cada cor representa grupos ou espécies diferentes (*clusters*) e a proporção das cores em cada coluna representa a probabilidade que cada indivíduo tem de pertencer a uma das espécies.

Tabela 6. Proporção de associação dos haplótipos e/ou genótipos de cada indivíduo aos *clusters* inferidos pela análise Bayesiana do programa STRUCTURE. Cada coluna contém o valor de “q” para cada indivíduo em cada *cluster* populacional. O asterisco (*) indica os indivíduos híbridos identificados no presente estudo

ID.	Cluster 1	Cluster 2	ID.	Cluster 1	Cluster 2
Lwi003	0.9940	0.0060	Lpa038	0.0092	0.9909
Lwi008	0.9948	0.0053	Lpa049	0.0117	0.9883
Lwi013	0.9948	0.0052	Lpa055	0.0117	0.9883
Lwi029	0.9941	0.0059	Lpa073	0.0273	0.9727
Lwi030	0.9917	0.0083	Lpa074	0.0273	0.9727
Lwi082	0.9954	0.0046	Lpa083	0.0108	0.9892
Lwi087	0.9837	0.0163	Lpa084	0.0218	0.9782
Lwi091	0.9909	0.0092	Lpa086*	0.9281	0.0718
Lwi095	0.9952	0.0048	Lpa088*	0.7957	0.2043
Lwi096	0.9869	0.0131	Lpa089	0.0136	0.9864
Lwi097	0.9867	0.0134	Lpa090*	0.1580	0.8421
Lwi101	0.9908	0.0092	Lpa092*	0.5767	0.4233
Lwi103	0.9938	0.0062	Lpa093	0.0206	0.9794
Lwi110	0.9904	0.0096	Lpa098	0.0412	0.9588
Lwi111	0.9946	0.0054	Lpa099	0.0115	0.9885
Lwi116	0.9748	0.0252	Lpa100	0.0092	0.9908
Lwi131	0.9931	0.0069	Lpa105	0.0111	0.9889
Lwi144	0.9939	0.0061	Lpa106	0.0079	0.9921
Lwi156	0.9829	0.0171	Lpa112	0.0400	0.9601
Lwi169	0.9853	0.0147	Lpa113*	0.1676	0.8323
Lwi014	0.9905	0.0095	Lpa117	0.0261	0.9739
Lwi015	0.9416	0.0583	Lpa139	0.0245	0.9755
Lwi037	0.9886	0.0114	Lpa140	0.0416	0.9585

Lwi051	0.9855	0.0145	Lpa141	0.0182	0.9819
Lwi129	0.9900	0.0100	Lpa146	0.0304	0.9697
Lpa005	0.0131	0.9869	Lpa147	0.0290	0.9710
Lpa006	0.0630	0.9370	Lpa154	0.0075	0.9925
Lpa011	0.0098	0.9902	Lpa157	0.0186	0.9814
Lpa016	0.0201	0.9799	Lpa162	0.0123	0.9877
Lpa018	0.0319	0.9681	Lpa165	0.0270	0.9731
Lpa024	0.0836	0.9164	Lpa004	0.0313	0.9687
Lpa027	0.0398	0.9602	Lpa020	0.0236	0.9765
Lpa028*	0.7876	0.2125	Lpa133	0.0335	0.9666
Lpa035	0.0082	0.9919	Lpa155	0.0443	0.9557
Lpa036	0.0348	0.9652			

7. Discussão

7.1. Rios como barreira

Os espécimes de *L. pardalis* foram agrupados em dois clados Lpa1 (norte do Rio Amazonas) e Lpa2 (sul do Rio Amazonas), os padrões filogeográficos observados nestas linhagens apontam para um importante episódio geográfico que dividiu a população por um período significativo de tempo. A provável causa para essa subdivisão parece ser uma barreira histórica imposta pelos rios Negro-Amazonas, uma vez que, cada grupo filogenético ocorre em apenas uma das margens do rio. Já os espécimes de *L. wiedii* foram agrupados em outros dois clados: Lwi1 (norte do Rio Amazonas) e Lwi2 (sul do Rio Amazonas), e os padrões filogeográficos observados parecem ser concordantes, em vários aspectos, aos de jaguatirica, uma vez que existe uma clara subdivisão entre linhagens de margens opostas do Rio Amazonas, o que possivelmente tenha sido causado pelo mesmo evento histórico que dividiu as populações de jaguatirica.

Pelo exposto, nossos resultados claramente suportam a hipótese de rios como barreiras. A hipótese de diversificação, dos rios como barreira histórica, foi proposta primariamente por Wallace (1852), que através de observações de espécies de primatas, separadas pelos grandes rios amazônicos, dividiu a bacia em quatro domínios biogeográficos principais, delimitados pelos rios Amazonas – Solimões, Negro e Madeira. Essa hipótese propõe que grandes populações ancestrais foram fragmentadas em subpopulações durante o estabelecimento dos grandes rios numa região antes de floresta contínua (Sick, 1967). Os rios agem então como uma barreira ao fluxo gênico, favorecendo assim a diversificação entre as populações isoladas por estes (Gascon *et al.*, 1998).

Quatro suposições derivadas da hipótese de rios como barreiras podem ser testadas usando-se o enfoque filogeográfico: (i) populações reciprocamente monofiléticas para os haplótipos do DNA mitocondrial ocorrerão em margens opostas dos grandes rios após ter decorrido tempo suficiente para a separação das linhagens; (ii) a divergência genética entre populações será positivamente correlacionada com a presença de rios separando-as mesmo depois de removidos

os efeitos da distância geográfica; (iii) a divergência genética entre populações separadas por um rio será maior na região de desembocadura do que na cabeceira; e (iv) os rios atuarão como áreas de diferenciação primária em vez de contato secundário das linhagens (Funk *et al.*, 2007).

Evidências para suportar a hipótese de rios como barreira são variáveis. Estudos filogeográficos envolvendo felídeos sul-americanos, em particular, tem evidenciado o efeito dos rios como barreira para o deslocamento das espécies, como observado em jaguatirica (*L. pardalis*) e gato-maracajá (*L. wiedii*) ao longo dos rios Negro e Amazonas em trabalho desenvolvido por Eizirik *et al.* (1998). Johnson *et al.* (1999) ressaltam a influência da Bacia do Rio Amazonas no isolamento das linhagens de *L. trigrinus* das Américas Central e do Sul. Já estudos realizados com onça-pintada (*Panthera onca*) revelaram pouca estrutura filogeográfica, no entanto, grandes barreiras geográficas como o Rio Amazonas e o estreito de *Darien*, entre o norte da América do Sul e América Central parecem ter restringido o fluxo genético nesta espécie, produzindo uma mensurável diferenciação genética (Eizirik *et al.*, 2001).

No entanto, esta divergência genética ao longo das margens, entre as populações irmãs, tende a ser reduzida à medida que se aproxima das cabeceiras dos rios, pois há um aumento na taxa de fluxo gênico à medida que há uma diminuição na largura do rio, podendo resultar na formação de zonas de contato (Haffer, 1997; Lougheed *et al.*, 1999; Patton *et al.*, 1994).

Neste sentido, a hipótese de rios como barreira não é um modelo estritamente alopátrico, devido às taxas de migração entre margens opostas serem diferente de zero, especialmente nas cabeceiras. Fato este que pode ser a provável explicação para a ocorrência de sete indivíduos de jaguatirica (Lpa11, Lpa16, Lpa17, Lpa18, Lpa49, Lpa55 e Lpa139) da linhagem Lp2 e um de gato-maracajá (Lwi13) da Linhagem Lw2 ao norte do Rio Amazonas, sendo a maioria destes pertencentes a localidade de São Gabriel da Cachoeira (Amazonas, Brasil).

A análise das sequências de DNA mitocondrial do banco de dados obtido revelaram que as espécies envolvidas no presente estudo são reciprocamente monofiléticas, não havendo introgressão do genoma mitocondrial de uma espécie

em outra. Estes resultados diferem do que foi observado por Johnson *et al.* (1999), onde foram registrados 9 indivíduos identificados morfologicamente como *L. tigrinus* agrupados no clado de *L. colocolo*. Mais recentemente em trabalho desenvolvido por Trigo *et al.* (2008), utilizando DNA mitocondrial e marcadores microssatélites, registrou-se 8 indivíduos de *L. geoffroyi* e 1 de *L. colocolo* agrupados no clado de *L. tigrinus*, 6 *L. tigrinus* no clado de *L. geoffroyi* e 5 *L. tigrinus* incluídos no clado de *L. colocolo*, em uma estreita zona de contacto que inclui o sul do Brasil. Estes resultados observados por estes autores forneceram indícios da existência de eventos de hibridação envolvendo as espécies do gênero *Leopardus*, o que foi confirmado principalmente através da análise dos marcadores nucleares.

7.2. Hibridação entre *L. pardalis* e *L. wiedii*

Ao contrário do observado com os dados de DNA mitocondrial, as análises com marcadores microssatélites forneceram evidências da ocorrência de hibridação entre *L. pardalis* e *L. wiedii*, os resultados obtidos pelo programa STRUCTURE claramente mostram a introgressão gênica de indivíduos de *L. wiedii* da linhagem Lwi2 em indivíduos de *L. pardalis* da linhagem Lpa2. Um fato que pode explicar este padrão é a notável diferença de tamanho entre jaguatirica e gato-maracajá. Entretanto, fêmeas subadultas de *L. pardalis* podem assemelhar-se a exemplares machos de *L. wiedii*, apresentando proporções corporais semelhantes (Oliveira & Cassaro, 2005). Este pode ser um fator determinante para a ocorrência de hibridação entre estas espécies, além disso, a herança uniparental do genoma mitocondrial (origem materna) impossibilita a introgressão do genoma mitocondrial de *L. wiedii* em *L. pardalis*.

A visão tradicional de que a hibridação é um fenômeno raro em animais, e com pouca influência na especiação e evolução, vem sendo cada vez mais desafiada, uma vez que tem se tornado evidente que um grande número de espécies geneticamente distintas se cruzam regularmente, mesmo que apenas uma pequena fração da população possa estar envolvida (Dowling & Secor, 1997; Barton, 2001; Mallet, 2005). A hibridação tem provado ter, através da introgressão, uma

importante influência em vários fenômenos evolutivos, como a origem de caracteres evolutivos, irradiação adaptativa e especiação (Dowling & Secor, 1997; Seehausen, 2004).

Todos os indivíduos híbridos ($n=6$) identificados no presente estudo são, geograficamente, pertencentes à região do Cerrado Beniano (Nordeste da Bolívia), nas proximidades dos municípios de Guajará – Mirim (Rondônia, Brasil) e Riberalta (Beni, Bolívia), sendo esta, considerada no presente trabalho como a zona híbrida para *L. pardalis* e *L. wiedii* (Figura 11.).

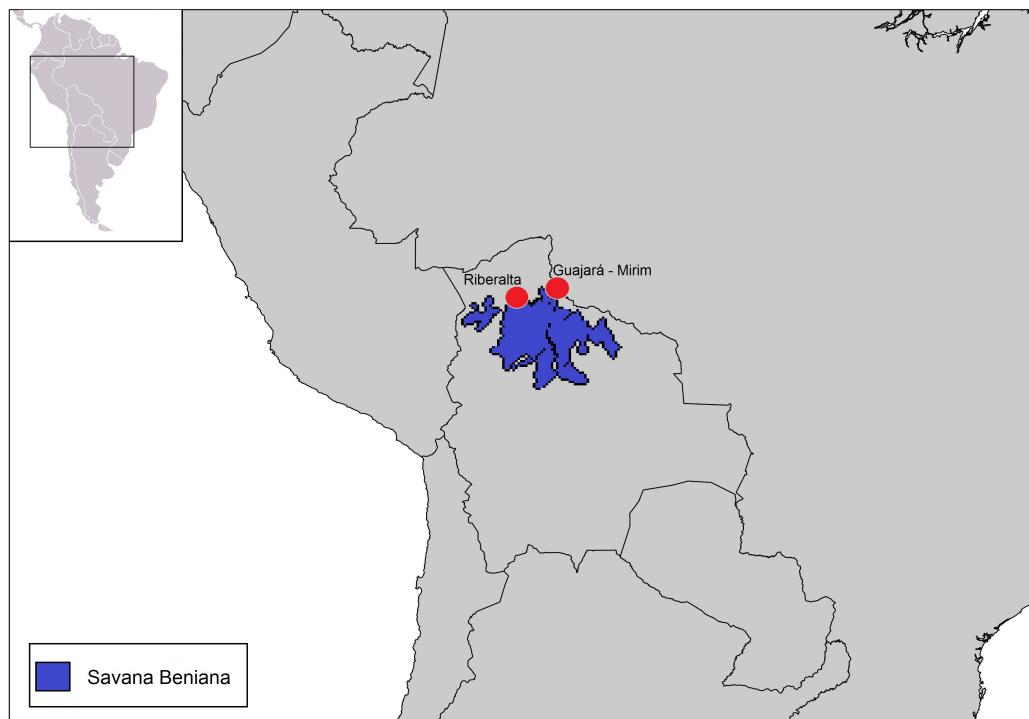


Figura 11. Mapa evidenciando a região das savanas de Beni, nas proximidades do municípios de Riberalta e Guajará-mirim.

O Cerrado Beniano é uma região de savanas arborizadas, que são sazonalmente inundadas (Hanagarth & Beck 1996). Esta apresenta três características próprias e bem conhecidas. Em primeiro lugar, essa área permite a convergência de espécies pertencentes a três diferentes áreas biogeográficas, Amazônia, Cerrado e Gran Chaco, (Moraes & Beck, 1992; Hanagarth & Beck, 1996). Isto permite o surgimento de populações compostas por espécies com diferentes

afinidades biogeográficas. Por outro lado, a composição vegetal e sua distribuição espacial estão intimamente relacionadas ao relevo. De um modo geral, quatro tipos de ambientes estão presentes nesta região: florestas inundadas, florestas secas, savanas secas, e savanas úmidas (Walker, 2008). Em terceiro lugar, a dinâmica de inundação durante a estação chuvosa provavelmente cria ciclos de contração e expansão das áreas, resultando em fragmentações temporais e isolamento das populações. Como resultado destes processos, não só a diversidade regional é relativamente alta (Beck & Moraes, 1997; Beck & Moraes, 2004), mas os níveis de adaptação a enchentes são notáveis (Lüttge, 1997).

Apesar de *L. pardalis* e *L. wiedii* serem espécies simpátricas, elas possuem nichos ecológicos diferentes, o que gera uma importante barreira ecológica entre estas espécies. No entanto, este cenário de inundação causando fragmentação natural de habitat da região do Cerrado Beniano proporcionaria um contato mais próximo entre estas espécies, em áreas isoladas pela cheia. Tal cenário somado a uma divergência evolutiva recente, e a uma barreira pré-zigótica provavelmente ainda incipiente, poderia favorecer para a ocorrência de hibridação entre as mesmas.

Investigações futuras abordando diferentes aspectos ecológicos, tais como, eventos geológicos, sazonalidade, seleção ambiental, bem como processos históricos de expansões populacionais e dispersão, além da antropização do ambiente serão importantes para a compreensão do surgimento e manutenção de zonas híbridas (Harrison, 1993; Hewitt, 2001), e no caso específico entre *L. pardalis* e *L. wiedii*, uma vez que o surgimento da mesma se dá em resposta direta a estas diferentes pressões exercidas no ambiente.

8. Conclusão

Os resultados obtidos no presente estudo permitem concluir que:

- O Rio Amazonas é uma barreira ao fluxo gênico tanto em *L. pardalis* quanto em *L. wiedii*.
- Existem duas linhagens principais tanto para *L. pardalis*, quanto para *L. wiedii*, estando estas separadas pelo rio Amazonas.
- As linhagens de *L. pardalis* e *L. wiedii* não estão distribuídas aleatoriamente na Amazônia.
- A hibridização é assimétrica e a introgressão ocorre de forma unidirecional, de *L. wiedii* para *L. pardalis*.
- Uma zona de hibridação foi identificada nesse estudo, a região das savanas de Beni, na Bolívia.
- A hibridação entre *L. pardalis* e *L. wiedii* não ocorre de maneira aleatória na região amazônica, estando restrita as savanas de Beni.

9. Referências bibliográficas

- Abbott, R.; Albach, D.; Ansell, S.; Arntzen, J.W.; Baird, S.J.E.; Bierne, N. 2013. Hybridization and speciation. *J. Evol. Biol.* 26: 229–246.
- Anderson, E. 1949. Introgressive Hybridization. John Wiley & Sons, New York.
- Ávila-Pires, T. C. S.; Hoogmoed, M. S.; VITT, L. J. 2007. Herpetofauna da Amazônia. In *Herpetologia no Brasil II* (L.B. Nascimento & M.E. Oliveira, eds.). Sociedade Brasileira de Herpetologia, Belo Horizonte, p. 13-43.
- Avise, J.C. 1986. Mitochondrial DNA and evolutionary genetics of higher animals. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*. 312: 325-342.
- Ayres, J. M.; Clutton-Brock, E. T. H. 1992. River Boundaries and Species Range Size in Amazonian Primates. *American Naturalist* 140: 531-537.
- Barton, N. H.; Hewitt, G. M. 1985. Analysis of hybrid zones. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* 16: 113–14.
- Barton, N. H. 2001. The role of hybridization in evolution. *Molecular Ecology*, 10, 551–568.
- Beck S. G.; Moraes, M. 1997. Llanos de Mojos region. In: Davis, S. D.; Heywood, V. H.; Herrera-MacBry, O.; Villa-Lobos ,J.; Hamilton, A. C. (eds) Centers of plant diversity: The Americas, vol 3. WWF, IUCN, Oxford, pp 421–425.
- Beck, S. G.; Moraes, M. 2004. Características biológicas generales de la llanura del Beni. In: Pouilly, M.; Beck, S. G.; Moraes, M.; Ibañez, C. (eds) Diversidad biológica en la llanura de inundación del río Mamoré. Importancia ecológica de la dinámica fluvial. Fundación Simón I. Patiño, Santa Cruz, pp 27–75.
- Bianchi, R.C.; Mendes, S.L. 2007. Ocelot (*Leopardus pardalis*) predation on primates in Caratinga Biological station, Southeast Brazil. *Am. J. Primatol.* 69, 1173–1178.
- Bisbal, F. J. 1986. Food Habitats of some Neotropical Carnivores in Venezuela (Mammalia, Carnivora). *Mammalia* 50 (3): 329-339.
- Boore, J. L. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res.* 27:1767–1780.
- Brasil. 2008. Presidência da República. Plano Amazônia Sustentável: diretrizes para

- o desenvolvimento sustentável da Amazônia Brasileira. Brasília, MMA.112p.
- Burland, T. M.; Bishop, J. M.; O’Ryan, C.; Faulkes, C. G. 2001. Microsatellite primers for the African mole-rat genus *Cryptomys* and cross-species amplification within the family Bathyergidae. *Mol. Ecol. Notes* 1, 311–314.
- Cabanne, G. S.; Santos, F.; Miyaki, C. Y. 2007. Phylogeography and demographic history of *Xiphorhynchus fuscus* (Passeriformes: Dendrocolaptidae) in the Southern Atlantic forest of Brazil and Argentina. *Biological Journal of the Linnean Society* 91: 73-84.
- Caixeta, E. T.; Oliveira, A. C. B.; Brito, G. G.; SAkiyama, N. S. Tipos de marcadores moleculares. In: BORÉM, A.; CAIXETA, E. T. (Eds.). Marcadores moleculares. Viçosa: UFV, 2006. p. 9-78.
- Chinchilla, F. A. 1997. La dieta del jaguar (*Panthera onca*), el puma (*Felis concolor*) y el manigordo (*Felis pardalis*) (Carnívora: Felidae) en el Parque Nacional Corcovado, Costa Rica. *Revista Biológica Tropical* 45: 1223-1229.
- Chinnery, P. F.; Thorburn, D. R.; Samuels, D. C.; White, S. L.; Dahl, H. M.; Turnbull, D. M.; Lightowers, R. N.; Howell, N. 2000. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet.* 16, 500-505.
- Darwin, C. R. (Ed.) 1862. Notes on the Causes of Cross and Hybrid Sterility. Cambridge University Press, Cambridge.
- Da Silva, J. M. C.; Rylands, A.; Fonseca, G. A. B. 2005. The fate of the Amazonian areas of endemism. *Conservation Biology*, v. 19, n. 3, June p. 689-694.
- Di Bitetti, M. S.; Paviolo, A.; De Angelo, C. 2006. Density, habitat use and activity patterns of ocelots (*Leopardus pardalis*) in the Atlantic Forest of Misiones, Argentina. *Journal of Zoology*, 270, 153-163.
- Dobzhansky, T. 1937. Genetics and the Origin of Species. Columbia University Press, New York.
- Dobzhansky, T. 1940. Speciation as a stage in evolutionary divergence. *Am. Nat.* 74:312–321.
- Dotta, G.; Queirolo, D.; Senra, A. 2007. Distribution and conservation status of small

felids on the Uruguayan savanna ecoregion, southern Brazil and Uruguay. In: Hughes, J.; Mercer, R. (eds), Felid Biology and Conservation Conference 17-19 September: Abstracts, pp. 105. WildCRU, Oxford, UK.

Dowling, T. E.; Secor, C. L. 1997. The role of hybridization and introgression in the diversification of animals. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 28, 593–619. (doi:10.1146/annurev.ecolsys.28.1.593).

Eizirik, E.; Bonatto, S. L.; Johnson, W. E.; Crawshaw, P. G.; Vie, J. C.; Brousset, D. M.; O'Brien, S. J.; Salzano, F. M. 1998. Phylogeographic patterns and evolution of the mitochondrial DNA control region in two Neotropical cats (Mammalia, Felidae). *Journal of Molecular Evolution* 47: 613-624.

Eizirik, E.; Kim, J.; Raymond, M. M.; Crawshaw, P. G.; O'Brien, S. J.; Johnson, W. E. 2001. Phylogeography, population history and conservation genetics of jaguars (*Panthera onca*, Mammalia, Felidae). *Molecular Ecology*, 10: 65-79.

Emmons, L. H. 1987. Comparative feeding ecology of felids in a Neotropical Rainforest. *Behavior Ecology and Sociobiology* 20: 271-283.

Emmons, L. H. 1997. Neotropical Rainforest Mammals: a field guide. The University of Chicago Press, Chicago.

Emmons, L. H.; Feer, F. 1998. Neotropical Rainforest Mammals: A Field Guide. Second Edition. Chicago: University of Chicago Press.

Excoffier, L. G. L.; Schneider, S. 2005. Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary bioinformatics online*, v.1, p. 47-50.

Faber, J. E.; Stepien, C. A. 1997. The utility of mitochondrial DNA control region sequences for analyzing phylogenetic relationships among populations, species, and genera of the Percidae. In: *Molecular Systematics of Fishes* (eds Kocher, T. D.; Stepien, C. A. pp. 129-144. Academic Press, San Diego, CA.

Farrell, L. E.; Romant, J.; Sunquist, M. E. 2000. Dietary separation of sympatric carnivores identified by molecular analysis of scats. *Molecular Ecology* 9: 1583-1590.

Ferreira, M.; Grattapaglia, D. 1995. Introdução ao uso de marcadores RAPD e RFLP

em análise genética. Brasília: EMBRAPA-CENARGEN.

Fonseca, G. A. B.; Herrmann, G.; Leite, Y. L. R.; Mittermeier, R. A.; Rylands, A. B.; Patton, J. L. 1996. Lista Anotada dos Mamíferos do Brasil. Occasional Papers in Conservation Biology 4: 1-38.

Garesse, R.; Carrodeguas, J. A.; Santiago, J.; Perez, M. L.; Marco, R.; Vallejo, C. G. 1997. Artemia mitochondrial genome: molecular biology and evolutive considerations. Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol. 117:357–366.

Garner, T. W. J.; Pearman, P. B.; Angelone, S. 2004. Genetic diversity across a vertebrate species range: a test of the central-peripheral hypothesis. Mol. Ecol., 13, 1047–1053.

Gascon, C.; Lougheed, S. C.; Bogart, J. P. 1998. Patterns of genetic population differentiation in four species of Amazonian frogs: a test of the riverine barrier hypothesis. Biotropica, 30, 104–119.

Goldstein, D. B.; Schlötterer C. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. Oxford University Press, New York, 368p.

Großning, J.; Hochkirch, A. 2008. Reproductive interference between animal species. Q. Rev. Biol. 83: 257–282.

Haffer, J. 1997. Alternative models of vertebrate speciation in Amazonia: an overview. Biodiversity and Conservation, 6, 451–476.

Haldane, J. B. S. 1922. Sex ratio and unisexual sterility in hybrid animals. J. Genet. 12: 101–109.

Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41:95-98.

Hamada, H.; Petrino, M. G.; Kakunaga, T. 1982. A novel repeated element with ZDNA forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. Proceedings of National Academy of Sciences of United States of America, v.79, p. 6465-6469.

Hanagarth, W.; Beck, S. G. 1996. Biogeographie der Beni-Savannen (Bolivien). Geogr Rundsch 48:662–668.

- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biol. J. Linn. Soc.* 58: 247–276.
- Hewitt, G.M. 2001. Speciation, hybrid zones and phylogeography – or seeing genes in space and time. *Molecular Ecology*, 10, 537-549.
- Hoorn, C.; Wesselingh, F. P.; Steege, H.; Bermudez, M. A.; Mora, A.; Sevink, J. 2010. Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330, 927–931.
- IUCN. 2008. IUCN Red List of Threatened Species. <www.iucnredlist.org>.
- Johnson, W. E.; Pecon-Slattery, J.; Eizirik, E. 1999. Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology*, 8(Suppl.), S79-S92.
- Johnson, W. E.; Eizirik, E.; Pecon-Slattery, J.; Murphy, W. J.; Antunes, A.; Teeling, E.; O'Brien, S. J. 2006. The late Miocene radiation of modern Felidae: A genetic assessment. *Science* 311, 73-77.
- Konecny, M. J. 1989. Movement pattern and food habits of four sympatric carnivore species in Belize, Central America, p. 243-264. In: Redford, K. H.; Eisenberg, J. F. (Eds). *Advances in Neotropical Mammalogy*. Gainesville, The Sandhill Crane Press, 614p.
- Kumar S, Tamura K & Nei M (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5:150-163.
- Louheed, S. C.; Gascon, C.; Jones, D. A.; Bogart, J. P.; Boag, P. T. 1999. Ridges and rivers: a test of competing hypotheses of Amazonian diversification using a dart-poison frog (*Epipedobates femoralis*). *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 266, 1829–1835.
- Luettge, U. 1997. *Physiological ecology of tropical plants*. Springer-Verlag, Berlim.
- Macdonald, D. W.; Loveridge, A. J. editors. 2010. *Biology and conservation of wild felids*. Oxford University Press, New York. xix + 762 p.
- Mallet, J. 2005. Hybridization as an invasion of the genome. *Trends Ecol. Evol.* 20:

229–237.

Martins, F.M.; Ditchfield, A.D.; Meyer, D.; Morgante, J.S. 2007. Mitochondrial DNA phylogeography reveals marked population structure in the common vampire bat, *Desmodus rotundus* (Phyllostomidae). Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research, 45, 372-378.

Martins, R.; Quadros, J.; Mazzolli, M. Hábito alimentar e interferência antrópica na atividade de marcação territorial do *Puma concolor* e *Leopardus pardalis* (Carnivora: Felidae) e outros carnívoros na Estação Ecológica de Juréia-Itatins, São Paulo, Brasil. Revista Brasileira de Zoologia. v. 25, n. 3 p. 427-435, 2008.

Matioli, S. R.; Passos-Bueno, M. R. S. 2001. Métodos baseados em PCR para análise de polimorfismos de ácidos nucléicos. In: Matioli, S. R. (ed). Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos, p. 153-161.

McBride, R. T.; Giordano, A. J. 2010. First record of a white ocelot (*Leopardus pardalis*). The Southwestern Naturalist, 55(4):567-568.

Menotti-Raymond, M.; David, V. A.; Lyons, L. A.; Schaffer, A. A.; Tomlin, J. F.; Hutton, M. K.; O'Brien, S. J. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). Genomics 57:9–23.

Meyer, H.; Martin P.; Hanns-Joachim, R. 1994. Sequence alterations within and downstream of the A-type inclusion protein gene allow differentiation of *Orthopoxvirus* species by polymerase chain reaction. J. Virol., 75: 1975-1981.

Meza, A. D.; Meyer, E. M.; González, C. A. 2002. Ocelot (*Leopardus pardalis*) food habits in a Tropical Deciduous Forest of Jalisco, México. American Midland Naturalist. Notre Dame: v. 148, n. 1, p. 146-154.

Miotto, R. A.; Rodrigues, F. P.; Ciochetti, G.; Galetti Jr, P. M.. Determination of the minimum population size of pumas (*Puma concolor*) through fecal DNA analysis in two protected Cerrado areas in the Brazilian Southeast. Biotropica (Lawrence, KS), v. 39, p. 647-654, 2007.

Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Brooks, T. M.; Pilgrim, J. D.; Konstant, W. R.; Fonseca G. A. B.; Kormos, C. 2003. Wilderness and biodiversity conservation. Proceedings of the National Academy of Science 100: 10309-10313.

- Moraes, M.; Beck, S. 1992. Diversidad florística de Bolivia. In: Marconi M (ed) Conservación de la diversidad biológica en Bolivia. CDC, USAID, Cochabamba, pp 73–111.
- Mullis, K.; Faloona, F. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. V.55, p.335-350.
- Murray, J. L.; Gardner, G. L. 1997. *Leopardus pardalis*. Mammalian Species 548, p.1-10.
- Nowell, K.; Jackson, P. 1996. Wild Cats. Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, 382 pp.
- Oliveira, T.G.; Cassaro, K. 1999. Guia de identificação dos felinos brasileiros. São Paulo: Sociedade dos Zoológicos do Brasil, 60p.
- Oliveira, T. G.; Cassaro, K. 2005. Guia de campo dos felinos do Brasil. Instituto Pró - Carnívoros; Fundação Parque Zoológico de São Paulo; Sociedade de Zoológicos do Brasil; Pró - Vida Brasil: São Paulo, 80 p.
- Oliveira, T. G. 2008. *Leopardus wiedii* - Mamíferos. P. 789-790. In: Machado, A. B. M.; Drummond, G. M.; Paglia, A. P. (Eds.). Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção. 1a ed. V. 2. Brasília, DF: Ministério do Meio Ambiente (MMA); Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas. 1420 p.
- Parker, P. G.; Snowm, A. A.; Schugg, D.; Booton, C.; Fuerst, P. A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. Ecology 79:361- 382.
- Patton, J. L.; Da Silva, M. N. F.; Malcolm, J. R. 1994. Gene genealogy and differentiation among arboreal spiny rats (*Rodentia, Echimyidae*) of the Amazon Basin: a test of the riverine barrier hypothesis. Evolution, 48, 1314–1323.
- Pellegrino, K. C. M.; Rodrigues, M. T.; Waite, A. N.; Morando, M.; Yassuda, Y. Y.; Sites J. W. 2005. Phylogeography and species limits in the *Gymnodactylus darwinii* complex (Gekkonidae, Squamata): genetic structure coincides with river system in the Brazilian Atlantic Forest. Biological Journal of the Linnean Society 85: 13–26.
- Prioli, S.; Prioli, A. J.; Júlio Jr., HF.; Pavanelli, C. S.; Oliveira, A. V.; Carrer, H.;

- Carraro, D. M; Prioli, L. M. 2002. Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, vol. 25, no. 4, p. 421-430.
- Pritchard J. K; Stephens M.; Donnelly P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, v.155, p.945-959.
- Quijada-Mascareñas, J. A.; Ferguson, J. E.; Pook, C. E.; Salomão, M. G.; Thorpe, R. S.; Wüster, W. 2007. Phylogeographic patterns of trans-Amazonian vicariants and Amazonian biogeography: the Neotropical rattlesnake (*Crotalus durissus complex*) as an example. *Journal of Biogeography*, 34, 1296–1312.
- Rhymer, J. M.; Simberloff, D. S. 1996. Genetic extinction through hybridization and introgression. *Annual Review of Ecology and Systematics*, v.27, p.83-109.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, v.43, p.223-225.
- Rocha, V. J.; Filipaki, S. A.; Fier, I. S. N.; Oliveira, S. V.; Pucci, J. A. L. 2004. Peso corpóreo de mamíferos silvestres da região de Telêmaco Borba, Paraná. In: III Encontro sobre animais selvagens. Anais... Poços de Caldas.
- Rocha, V. J.; Motta, M. C.; Cheida, C. C.; Perachi, A. L. 2005. Ordem Carnívora. In: Reis, N. R.; Peracchi, A. L.; Marino, J. H. F.; Rocha, V. J. (Org.). Mamíferos da Fazenda Monte Alegre, Centro Leste do Paraná Brasil. 1 ed. Londrina, v. , p. 91-125.
- Rognon, X.; Guyomard, R. 2003. Large extent of mitochondrial DNA transfer from *Oreochromis aureus* to *O. niloticus* in West Africa. *Molecular Ecology* 12: 435-445.
- Rokas, A.; Ladoukakis, E.; Zouros, E. 2003. Animal mitochondrial DNA recombination revisited. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 18, n. 8.
- Rylands, A. B. 2002. Amazonia. In: Mittermeier, R. A.; Mittermeier, C. G.; Robles P.; Pilgrim, J.; da Fonseca, G. A. B.; Brooks T.; Konstant, W. R. (eds.). *Wilderness: earth's last wild places*. pp. 56-107. CEMEX, Agrupación Serra Madre, S.C., Mexico.
- Saiki, R. K.; Gelfand, D. H.; Stoffel, S.; Scharf, S. J.; Higuchi, R.; Horn, G. T.; Mullis, K. B.; Erlich, H. A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, v. 239, p. 487-491.
- Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maniatis, T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*.

- 2nd ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labelling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Seehausen, O. 2004. Hybridization and adaptive radiation. *Trends Ecol. Evol.* 19: 198–207.
- Sick, H. 1967. Rios e enchentes como obstáculo para a avifauna. In H. Lent (Ed.), *Atas do simpósio sobre a biota amazônica* (Vol. 5, pp. 495–520). Rio de Janeiro: Conselho de Pesquisas.
- Sivasundar, A.; Bermigham, E.; Orti, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (Prochilodus: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* 10 (2): 407-417.
- Sunnucks P. 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology and Evolution* 15:199-203.
- Sunquist, M. E.; Sunquist, F. C. 2002. *Wild Cats of the World*. Chicago: Univ. Chicago Press. 452 pp.
- Tamura, K.; Peterson, D.; Peterson, N.; Stecher, G.; Nei M.; Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.*, 28: 2731-2739.
- Tautz, D.; Renz, M. 1984. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research*, v.12, n.10, p. 4127-4138.
- Thompson, J.; Higgins, D; Gibson, T. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4690.
- Torres, R. A.; Ribeiro, J. 2009. The remarkable species complex *Mimagoniates microlepis* (Characiformes: Glandulocaudinae) from the Southern Atlantic Rain forest (Brazil) as revealed by molecular systematic and population genetic analyses. *Hydrobiologia*, 617, 157-170.
- Trigo, T.C.; Freitas, T. R. O.; Kunzler, G.; Cardoso, L.; Silva, J. C. R.; Johnson, W. E.; O'Brien, S. J.; Bonatto, S. L.; 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. *Molecular Ecology*, vol.17. 4317-4333.

Walker, J. H. 2008. The Llanos de Mojos. In: Silverman H, Isbell WH (eds) *Handbook of South American archeology*. Springer, New York, pp 927–939.

Wallace, A. R. 1852. On the monkeys of the Amazon. *Proceedings of the Zoological Society of London*, 20, 107–110.

Wang, E. 2002. Diet of Ocelots (*Leopardus pardalis*), Margays (*L. wiedii*) and Oncillas (*L. tigrinus*) in the Atlantic Rainforest Southeast Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 37 (3): 207-212.

Williamson, K. S.; Cordes, J. F.; May, B. 2002. Characterization of microsatellite loci in *Chinook salmon Oncorhynchus tshawytscha* and cross-species amplification in other salmonids. *Molecular Ecology Notes* 2(1): 17-19.

Wozencraft, W.C. 2005. Order Carnivora. In Wilson D. E.; Reeder, D. M. (eds) *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic Reference*. 3rd ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore: 532-628.

Zarza, E.; Reynoso, V. H.; Emerson, B.C. 2008. Diversification in the northern neotropics: mitochondrial and nuclear DNA phylogeography of the iguana *Ctenosaura pectinata* and related species. *Molecular Ecology*, 17, 3259-3275.

Anexo I

Sequências parciais da Região Controle do DNA mitocondrial obtidas para *L. pardalis* e *L. wiedii*. Os números acima correspondem as posições dos sítios sequenciados.

```
[      111111111222222223333333444444445555555566666666777777777  
[      12345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012345678]  
Lwi003 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi013 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi029 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi095 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi097 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi101 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi107 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi030 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi082 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi096 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi103 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi111 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi008 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi091 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi116 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi110 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi131 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi144 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi087 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi156 AAAAAACTAACCCATAACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi129 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATACACCCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi037 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi051 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lwi014 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATACACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa004 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTCATTTA  
Lpa020 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTCATTTA  
Lpa133 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTCATTTA  
Lpa155 AAAAACCAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATACTCATACTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTCATTTA  
Lpa006 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa011 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa024 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa028 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa033 ??????????????????CCCATATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa035 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa036 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa073 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa074 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa083 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa084 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa089 AAAAAACTAACCCATACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa092 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa106 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa113 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa139 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa141 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa055 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa038 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa005 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa090 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa093 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa130 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa146 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa147 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa154 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa157 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa162 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA  
Lpa098 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCCCAGTATGTCTTTATTTA
```

Lpa099 AAAAAACTAACCCATGACTCCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa100 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa105 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa117 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa104 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATCTA
Lpa112 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATCTA
Lpa140 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCACATACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa149 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa016 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa018 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa027 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa086 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa088 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa115 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa128 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA
Lpa017 AAAAAACTAACCCATGACTTCCATAATTCATATAATTGCATATAACCCATGCTGTGCTTGCAGTAGTCCTTATTTA

Lpa093 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACACTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa130 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa146 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa147 CCATAAAAACAAGCAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa154 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa157 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa162 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa098 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACACTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa099 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACACTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa100 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACACTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa105 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACACTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa117 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACACTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa104 CCATAAATACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACATTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa112 CCATAAATACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACATTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa140 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa149 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAGCGCAAAAAATTAACTTATCAACCACCAAC
Lpa016 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAAATTAACTTATCGGACCACCAAC
Lpa018 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAAATTAACTTATCGGACCACCAAC
Lpa027 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa086 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa088 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa115 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa128 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAACTCATCAACCACCAAC
Lpa017 CCATAAAAACAAGTAA-AA--CCCTATTACCACGCCTACAAACGCATAACGCAAAAA-TTAATCATCAACCACCAAC

Lpa106 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTACATTAACGTGCTAATTCCCAGGAATAT
 Lpa113 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTACATTAACGTGCTAATTCCCAGGAATAT
 Lpa139 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa141 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa055 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATGCA-AACACACTATGTATGTCGACATTAACGTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa038 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-A-TATACTATGTATATCGTCGATTGCTAGCCCCCATGAATAT
 Lpa005 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTATATCGTCGATTATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa090 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTATATCGTACATTGATTGCTAGCCCCCATGAATAT
 Lpa093 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTATACCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa130 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTCATTAACGTGCTAATTCCCAT?????
 Lpa146 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTACATTAACGTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa147 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTCATTAACGTGCTAGCCCCCATGAATAT
 Lpa154 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa157 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTATATCAACTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa162 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATATCGTACATTAACGTGCTAATTCCCATGAATAT
 Lpa098 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTATATCGTACATTGATTGCTAGCCCCCATGAATAT
 Lpa099 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTATATCGTACATTGATTGCTAGCCCCCATGAATAT
 Lpa100 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-A-TATACTATGTATATCGTCGATTAATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa105 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTATATCGTCGATTAATTGCTAGCCCCCATGAATAT
 Lpa117 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTATATCGTCGATTAATTGCTAGCCCCCATGAATAT
 Lpa104 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCATACA-AAATACTATGTATATCGTCGATTAATTGCTAGTCCCCCTGAATAT
 Lpa112 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCATACA-AAATACTATGTATATCGTCGATTAATTGCTAGTCCCCCTGAATAT
 Lpa140 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATACA-AAATACTATGTACATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCCTGAATAT
 Lpa149 TTACACTCCCCACAACCTCCGCCTATGCA-AACACACTATGTATGTCGATTAACGTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa016 TTACATTCCCCACAACCCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATACCGTACATTGACTGCTGGCCCCATGAATAT
 Lpa018 TTACATTCCCCACAACCCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGTATACCGTACATTGACTGCTGGCCCCATGAATAT
 Lpa027 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACAATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa086 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGAATATCGTACATTAACGTGCTAATTCCCAGGAATAT
 Lpa088 TTACACTCCCCACAATCCTCCGCCTATACA-AACACACTATGAATATCGTCATTAATTGCTAATCCCAGGAATAT
 Lpa115 TTACACTCCCCAAAAATCCTCCGGCTATACA-AACACACTATGAATATCGTCGATTAATTGCTAGTCCCCATGAATAT
 Lpa128 TAAACTCCCCAAAAACCTCCGGCTATA-ATAACAAACTACGAATATTGTAATTGCTAATCCCAGGAATAT
 Lpa017 ??

[22233333333333333]
 [3333344444444445555555566666666666777777788888889999999990000000000111]
 [567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890123456789012]
 Lwi003 TAAGCATGTACGGTAGTTATATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATG???
 Lwi013 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi029 TAAGCATGTACGGTAATCTATATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCA????
 Lwi095 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi097 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAACGTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi101 TAAGCATGTACAGTAATCTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCA????
 Lwi107 TAAGCATGTACAGTAATCTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCA????
 Lwi030 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi082 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi096 TAAGCATGTACAGTACTTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCA????
 Lwi103 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi111 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGGAT
 Lwi008 TAGGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATATTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi091 TAGGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATATTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi116 TAGGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATATTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi110 TAGGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi131 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATATTATGTATATCGTCATTAACGTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi144 TAAGCATGTACAGTAATTATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCGATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi087 TAAGCATGTACAGTAATCTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCA????
 Lwi156 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lwi129 ???
 Lwi037 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATG??
 Lwi051 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATG??
 Lwi014 TAGGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa004 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa020 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAACGTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa133 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa155 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa006 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa011 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCAAGTCCCCATGAAT
 Lpa024 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa028 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCCCATGAAT
 Lpa033 TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTACATTAACGTGCTAGTCCCCATGAAT

Lwi144 GGAAATTAAGCAGGACAGAATTAAATAATTACATAAGGCATACTAGGTATATCGGGCATAAATTGCTAGCCCC
Lwi087 ???
Lwi156 ???
Lwi129 ???
Lwi037 ???
Lwi051 ???
Lwi014 --ATA-TTAGGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa004 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa020 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa133 ???
Lpa155 ???
Lpa006 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa011 ???
Lpa024 ???
Lpa028 ???
Lpa033 ???
Lpa035 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa036 --ATA-TCAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa073 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa074 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa083 ATA-T--TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAA????????????????????????
Lpa084 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa089 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa092 ???
Lpa106 ???
Lpa113 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa139 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa141 ???
Lpa055 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGACATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa038 ATA-T--TAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACAT????????????????????
Lpa005 ???
Lpa090 ATA-T--TAAGCATGTACAGTAGTTA????????????????????????
Lpa093 ???
Lpa130 ???
Lpa146 TGAATATTAAGCATGTAGAGAAGTTATAAATATT-TATAAC????????????????????
Lpa147 ???
Lpa154 ???
Lpa157 ?????????????????????????????????????
Lpa162 ?????????????????????????????????
Lpa098 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa099 ???
Lpa100 ?????????????????????????????????????
Lpa105 ?????????????????????????????????
Lpa117 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa104 ?????????????????????????????????????
Lpa112 ?????????????????????????????????
Lpa140 ?????????????????????????????????
Lpa149 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa016 ?????????????????????????????????
Lpa018 --ATA-TTAAGCATGTACAGTAGTTATATATTACATAAGGCATACTATGTATATCGTCATTAATTGCTAGTCCC
Lpa027 ?????????????????????????????
Lpa086 ?????????????????????????????
Lpa088 ?????????????????????????????
Lpa115 ?????????????????????????????
Lpa128 ?????????????????????????????
Lpa017 ?????????????????????????????????

```

[      4444]
[      6777]
[      9012]
Lwi003 ???
Lwi013 ???
Lwi029 ???
Lwi095 ???
Lwi097 CATG
Lwi101 ???
Lwi107 ???
Lwi030 ???
Lwi082 ???

```

Lwi096 ????
Lwi103 ????
Lwi111 ????
Lwi008 ????
Lwi091 ????
Lwi116 ????
Lwi110 CATG
Lwi131 ????
Lwi144 CA??
Lwi087 ????
Lwi156 ????
Lwi129 ????
Lwi037 ????
Lwi051 ????
Lwi014 CATG
Lpa004 CATG
Lpa020 CATG
Lpa133 ????
Lpa155 ????
Lpa006 CATG
Lpa011 ????
Lpa024 ????
Lpa028 ????
Lpa033 ????
Lpa035 CATG
Lpa036 CATG
Lpa073 CATG
Lpa074 CATG
Lpa083 ????
Lpa084 CATG
Lpa089 CATG
Lpa092 ????
Lpa106 ????
Lpa113 CATG
Lpa139 CATG
Lpa141 ????
Lpa055 CATG
Lpa038 ????
Lpa005 ????
Lpa090 ????
Lpa093 ????
Lpa130 ????
Lpa146 ????
Lpa147 ????
Lpa154 ????
Lpa157 ????
Lpa162 ????
Lpa098 CATG
Lpa099 ????
Lpa100 ????
Lpa105 ????
Lpa117 CATG
Lpa104 ????
Lpa112 ????
Lpa140 ????
Lpa149 CATG
Lpa016 ????
Lpa018 CATG
Lpa027 ????
Lpa086 ????
Lpa088 ????
Lpa115 ????
Lpa128 ????
Lpa017 ????
55

Anexo II

Sequências parciais do gene *citocromo b* obtidas para *L. pardalis* e *L. wiedii*. Os números acima correspondem as posições dos sítios sequenciados.

```
[           11
]
[           11 1111122222 2222333333 3333444444 4455555566 6667777777 7788888888 89999999900
]
[           1234567801 4567901235 6789012345 6789012346 7902356923 4580123456 7901234568 9124567801
]
#Puma yagouaroundi -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa4 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa20 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa70 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa18 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa16 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa24 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa23 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa36 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa11 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa6 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa33 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa35 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa55 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa73 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa74 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lpa38 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi14 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi15 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi13 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi8 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi3 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi29 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi30 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi87 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi103 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi110 TCATTCATGA TACCGCTCCT CCAACATCTC AGCATGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi37 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi69 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
#Lwi51 -----TGATGA ATTGGTCTTA GGTTGCCTAA TCTACAAATC TACGGCCTTT
```

```

[           1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111 1111111111
]           0000011111 1112222222 2233333334 4444444455 5555556666 6666777777 7788888888 8999999999
]
[           3467902345 6890123567 8923467890 2345678912 4567890123 6789023567 8901234578 9012346789
]

#Puma_yagouaroundi CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa4   CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa20  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa70  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa18  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa16  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa24  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa23  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa36  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa11  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa6   CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa33  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa35  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa55  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa73  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa74  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lpa38  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi14  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi15  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi13  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi8   CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi3   CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi29  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi30  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi87  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi103 CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi110 CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi37  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi69  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC
#Lwi51  CTGCATCACT AACATCAACA CAAACGCCCT TCATCAGTAC CACATCTGCC GACGTAATAT GGCTGAATAT CCGATAATAC

```

```

[          2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222 2222222222
]          0000000001 1111111222 2222223333 3333444444 4555555555 6666666677 7777778888 8888889999
]
[          0123567891 2345789013 4567890135 6789123578 9012346789 0235678901 2567890123 4567890235
]
#OutgroupHerpailurus ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa4      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa20     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa70     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa18     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa16      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa24     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa23      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa36     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa11     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa6       ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa33     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa35     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa55     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa73      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa74      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lpa38      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi14      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi15      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi13      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi8       ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi3       ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi29      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi30      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi87      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi103     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi110     ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi37      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi69      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA
#Lwi51      ATGCAACGGG CCTCATATTT TTATCTGCTT ACATCACTGG ACGAGGGATAT ATAGGCTCCT ACCTTCTCAG AAACATGAAA

```

```

[          2223333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 3333333333 444444444444
]
[          9990000000 0111111222 2223333334 4444455555 5566666667 7777788888 8889999999 0000000111
]
[          6890124567 8123479235 6891234570 1467903567 8913456781 3456901236 7892345789 0134579023
]

#Puma yagouaroundi TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa4 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa20 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa70 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa18 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa16 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa24 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa23 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa36 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa11 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa6 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa33 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa35 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa55 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa73 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa74 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lpa38 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi14 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi15 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi13 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi8 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi3 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi29 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi30 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi87 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi103 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi110 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi37 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi69 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC
#Lwi51 TTGAATATACTTATTGATGCAGCCTTAGAGTCCTGA GGCAATATCTTGAGGCAACTAATCCAACTCTTCACATCC

```

```

[          4444444444 4444444444 4444444444 444
[          1112222222 2333333344 444444555 555]
[          5690123457 9135678901 2345679245 678]
#Puma_yagouaroundi TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa4          TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa20         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa70         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa18         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa16         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa24         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa23         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa36         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa11         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa6          TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa33         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa35         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa55         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa73         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa74         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lpa38         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi14         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi15         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi13         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi8          TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi3          TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi29         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi30         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi87         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi103        TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi110        TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi37         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi69         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC
#Lwi51         TATCGGAACA CTGAGAATGA ATCTGAGGTT CTC

```