

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
ESCOLA DE CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE
MESTRADO EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE.

MARCOS VINICIUS LOCATELLI

**PADRÕES DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE ONÇAS-PINTADAS EM BIOMAS
BRASILEIROS INFERIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE GENOMAS COMPLETOS**

Porto Alegre
2024

PÓS-GRADUAÇÃO - *STRICTO SENSU*



Pontifícia Universidade Católica
do Rio Grande do Sul

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL ESCOLA DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE**

**PADRÕES DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE ONÇAS-PINTADAS EM BIOMAS
BRASILEIROS INFERIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE GENOMAS COMPLETOS**

Marcos Vinicius Locatelli

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ipiranga 6681 - Caixa Postal 1429
Fone: (51) 3320-3500
90619-900 Porto Alegre, RS, Brasil
2024**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL ESCOLA DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE E DA VIDA PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE**

**PADRÕES DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE ONÇAS-PINTADAS EM BIOMAS
BRASILEIROS INFERIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE GENOMAS COMPLETOS**

**Nome do aluno(a): Marcos Vinicius Locatelli
Orientador(a): Eduardo Eizirik**

**Dissertação apresentada como requisito para
obtenção do grau de mestre pelo Programa de Pós-
graduação em Ecologia e Evolução da
Biodiversidade da Escola de Ciências da Saúde e da
Vida da Pontifícia Universidade Católica do Rio
Grande do Sul.**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO
PORTO ALEGRE, RS, BRASIL
2024**

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO
GRANDE DO SUL ESCOLA DE CIÊNCIAS DA
SAÚDE E DA VIDA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM ECOLOGIA E EVOLUÇÃO DA BIODIVERSIDADE**

**PADRÕES DE DIVERSIDADE GENÉTICA DE ONÇAS-PINTADAS EM BIOMAS
BRASILEIROS INFERIDOS A PARTIR DA ANÁLISE DE GENOMAS COMPLETOS**

Nome do aluno(a): Marcos Vinicius Locatelli

Orientador(a): Eduardo Eizirik

Aprovada em: de de .

Banca examinadora:

Prof. Dr. Sandro L. Bonatto

Prof. Dr. Maurício R. Bogo

PORTO ALEGRE, RS, Brasil

2024

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador pela paciência, pelo apoio e por todo o conhecimento compartilhado, tanto nas disciplinas quanto na orientação, e nas reuniões de laboratório. Esse trabalho só foi possível por esforço em conjunto. Agradeço pela coragem de aceitar a orientação de alguém que veio do outro lado do país, com a cara e a coragem apenas. Agradeço pelo apoio depois que descobrimos as condições psiquiátricas e de saúde mental.

Agradeço à banca examinadora, pela prontidão, exame e retorno sobre a dissertação. Agradeço pelas críticas, e pelo apoio acadêmico.

Agradeço ao CNPq pelo fomento, já que seria impossível que eu financiasse além das mensalidades, o custo de viver longe de casa.

Agradeço à Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul pelo acolhimento e por toda a estrutura fornecida para que esse trabalho fosse possível, e também pela acomodação concedida após o desenrolar do declínio de minha saúde mental.

Agradeço ao grupo de pesquisa da Pós Graduação Ecologia e Evolução da Biodiversidade, pelo compartilhamento de conhecimento, pela ajuda com referências e técnicas na geração e interpretação dos dados. Também agradeço pela companhia durante os meses da Pandemia da Covid-19, que fez uma grande diferença positiva no estresse causado pela mesma. Agradeço ainda em especial ao Henrique Figueiró e Caroline Charão Sartor, que compartilharam de seu tempo e esforço para que esse trabalho fosse possível.

Agradeço finalmente à minha família, pelo suporte emocional e financeiro, pelo carinho, pela atenção e pela preocupação durante todo o tempo dessa pós-graduação, principalmente no período de declínio de minha saúde mental e subsequente acompanhamento psiquiátrico. Sem eles, eu não teria sido capaz de caminhar até o final.

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS.....	5
RESUMO	7
ABSTRACT	8
RESUMO PARA LEIGOS	9
INTRODUÇÃO.....	10
A onça-pintada em Biomas Brasileiros	13
Cerrado	13
Mata Atlântica	14
Caatinga	15
Variabilidade Genética e Endocruzamento	16
OBJETIVOS	18
Objetivo geral	18
Objetivos Específicos	18
MATERIAL E MÉTODOS.....	19
Geração dos dados genômicos.....	19
Análises dos dados	20
RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
REFERÊNCIAS	29

RESUMO

A onça-pintada (*Panthera onca*) é o maior felídeo das Américas, um predador de topo de cadeia trófica que se encontra ameaçado de extinção devido à perda e fragmentação de seus habitats, conflito com humanos e tráfico de fauna. Um aspecto-chave do delineamento, implementação e monitoramento de programas de conservação desta espécie é a análise de seus padrões de diversidade genômica em ambientes com diferentes níveis de fragmentação. Neste estudo, foram sequenciados 10 genomas completos de onças-pintadas, os quais foram analisados em conjunto com 10 outros genomas sequenciados previamente. Essa amostra de 20 genomas, representando diferentes biomas brasileiros, permitiu a análise de padrões de diversidade, com especial foco na prevalência de blocos homozigotos, em populações remanescentes desta espécie. Observamos altos níveis de homozigose, indicando endocruzamento recente, em indivíduos da Mata Atlântica costeira, alguns indivíduos da Mata Atlântica de Interior, e em um indivíduo amazônico amostrado no 'Arco do Desmatamento'. Os padrões observados permitem concluir que a fragmentação de paisagens, com consequente desconexão das pequenas populações de onças-pintadas remanescentes em algumas regiões, geram efeitos mensuráveis, e em alguns casos severos, nos genomas dos indivíduos amostrados. Estes resultados fornecem informações relevantes para embasar estratégias de conservação e manejo da onça-pintada nos biomas brasileiros em que a espécie ainda persiste.

Palavras-chave:

genômica populacional; genômica da conservação; Felidae

ABSTRACT

The jaguar (*Panthera onca*) is the largest felid in the Americas, a top predator that is threatened due to habitat loss and fragmentation, compounded by conflict with humans and wildlife trafficking. A key aspect of the design, implementation and monitoring of conservation programs for this species is the analysis of its patterns of genomic diversity in habitats with different levels of fragmentation. In this study, 10 whole genomes of free-living jaguars were sequenced, which were analyzed along with 10 other genomes reported previously by our research group. This sample of 20 genomes, representing different Brazilian biomes, allowed the analysis of diversity patterns, particularly focusing on the prevalence of Runs of Homozygosity, in remaining jaguar populations. We observed high levels of homozygosity, indicating recent inbreeding, in individuals sampled in the coastal Atlantic Forest, some individuals from the Inner Atlantic Forest, and one Amazonian individual sampled in the 'Deforestation Arc'. The observed patterns allowed the conclusion that habitat fragmentation, leading to the disconnection among small jaguar populations remaining in some regions, generate measurable, and in some cases severe, effects in the genomes of the sampled individuals. These results provide relevant information to empower conservation and management strategies for jaguars in the Brazilian biomes in which the species still persists.

Keywords:

population genomics; conservation genomics; Felidae

RESUMO PARA LEIGOS

A onça-pintada (*Panthera onca*) é uma espécie bioindicadora, espécie que necessita de um ambiente bem conservado para habitar, que ocorre nas Américas, desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Pela destruição de seu habitat natural, a onça-pintada vem perdendo área de ocupação de forma dramática, o que causa a redução do número de indivíduos existentes, o que por sua vez faz com que onças de parentesco próximo inter-cruzem. Esse fenômeno é chamado de “endocruzamento”, e contribui para a diminuição da variabilidade genética dos indivíduos presentes na população. Características variadas numa espécie animal são, em geral, algo positivo, que permite à espécie sobreviver a mais adversidades como doenças e mudanças no ambiente. Essas características vêm do material genético do animal, mais comumente conhecido por “DNA”. Metade do material genético do animal vem de cada pai, o que confere a ele duas cópias do material genético. Na onça-pintada, esse processo de endocruzamento vem criando o que chamamos de “janelas de homozigossidade”, onde ambas as cópias de material genético do animal são idênticas em um grande pedaço do DNA. Ao ter filhotes, as onças que possuem essas janelas de homozigossidade contribuem com menos variedade de características para os filhotes, e assim, ao longo das gerações, todos os indivíduos acabam igualmente suscetíveis a serem erradicados por doenças ou outras adversidades do ambiente. Neste trabalho, demonstramos como a redução do habitat disponível para a onça-pintada já causa enormes janelas de homozigossidade, especialmente nas fronteiras de desmatamento e áreas degradadas de biomas brasileiros.

INTRODUÇÃO

A onça-pintada (*Panthera onca*) é o maior felino neotropical e o único representante atual no hemisfério ocidental do gênero *Panthera*, o qual também compreende outros quatro grandes felinos vivos (Figueiró et al. 2017). Possui uma pelagem amarelada com rosetas e pintas escuras, musculatura muito desenvolvida, crânio e dentes particularmente robustos, conferindo a ela uma mordida mais poderosa do que a dos outros felinos (Seymour, 1989; Sunquist and Sunquist, 2002). Chega a medir até dois metros de comprimento e pesar mais de cem quilos (Kitchener, 1991). É um animal de enorme importância ecológica, pois ocupa a função de predador de topo nos ecossistemas em que ocorre. Também se deve considerar que a ocorrência da onça-pintada depende de um ecossistema preservado, o que a torna um bioindicador (Thornton et al., 2016).

Sua ocorrência histórica (até cerca de 1900) abrangia desde o sudoeste dos EUA até o centro-sul argentino (Seymour, 1989). No entanto, por destruição antrópica do ambiente natural, sua ocorrência foi limitada a menos da metade da área antes ocupada e, além disso, a distribuição das populações remanescentes se encontra altamente fragmentada (Sanderson et al. 2002). A estrutura genética inferida para a espécie indica que até recentemente houve conectividade ao longo de toda a sua distribuição (Eizirik et al. 2001). Entretanto, esta conectividade hoje se encontra severamente comprometida pelo processo de fragmentação das paisagens naturais, o qual já afetou de forma detectável a diversidade e estruturação genética em nível local (Haag et al. 2010; Srbeek-Araujo et al., 2018).

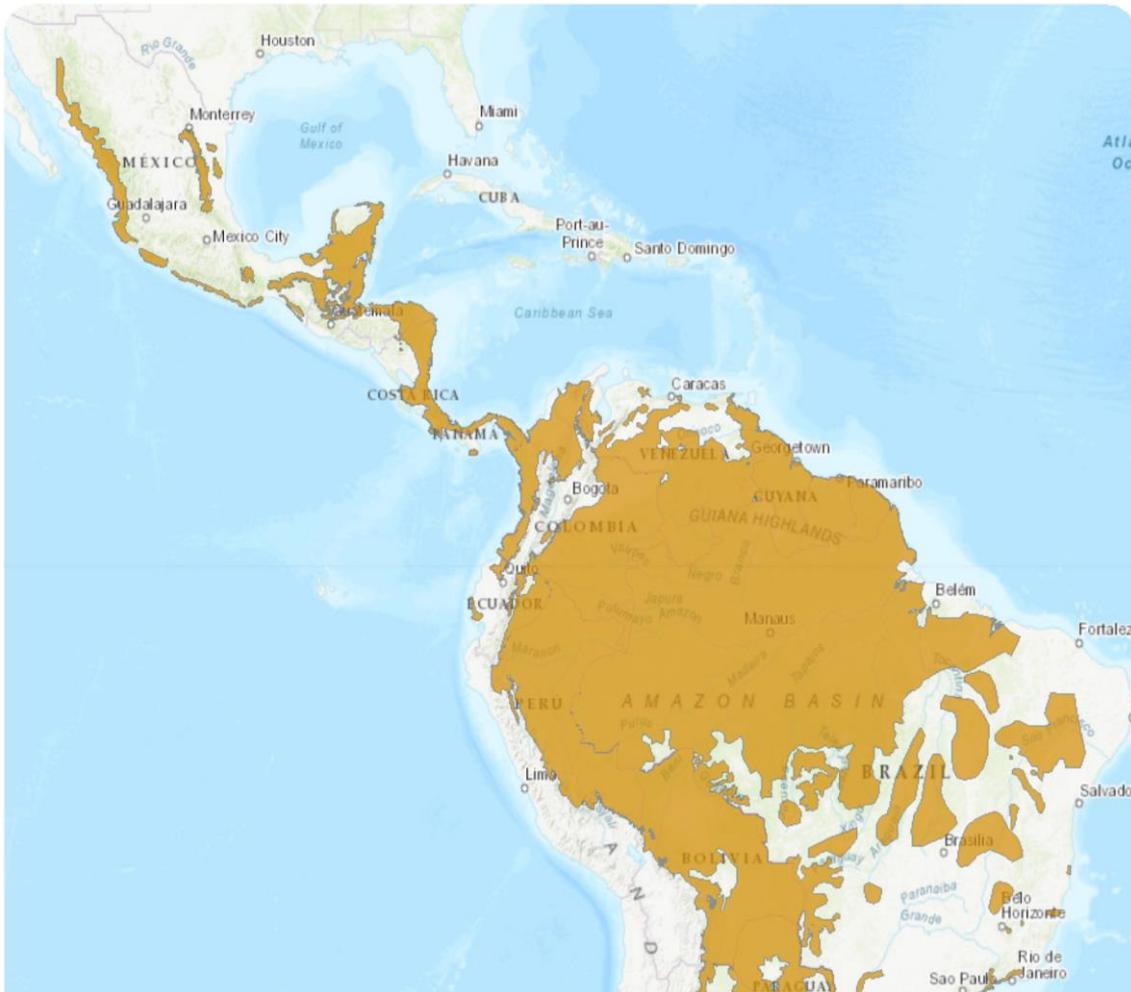


Fig. 1. Distribuição atual da onça-pintada (*Panthera onca*). Fonte: *Panthera onca*. The IUCN Red List of Threatened Species (2018 errata version).

Mesmo tendo perdido cerca de 54% de sua área de distribuição original, a espécie ainda ocorre do sul estadunidense até o norte argentino (Fig. 1). A onça-pintada consegue habitar diferentes biomas brasileiros, com variadas composições de biota, desde os ambientes mais abertos do Cerrado às florestas densas da Mata Atlântica e Amazônia, além do semiárido da Caatinga e dos alagados sazonais do Pantanal. Segundo a IUCN, a espécie se encontra “quase ameaçada” (IUCN, 2016), mas deve-se ter em mente que isso é baseado na espécie como um todo, e está desconsiderando locais onde ela está localmente extinta ou criticamente ameaçada de extinção, como a Mata Atlântica (Sanderson et al. 2002; Paviolo et al., 2011, 2016). Enquanto subpopulações como a amazônica estão ainda em estado de conservação bom ou razoável devido a sua extensa área (Caso et al. 2008), outras estão extremamente fragmentadas, como as subpopulações da Mata Atlântica (Sanderson et al. 2002). Nesse sentido, é importante que os diferentes biomas e suas populações de onça-pintada sejam considerados separadamente em análises de viabilidade e avaliações de estado de conservação.

A maior ameaça à conservação da onça-pintada é a devastação das áreas conservadas remanescentes para implantação de atividades agropecuárias e a retaliação por eventos de predação de gado, além da caça ilegal (Paviolo et al., 2016; Zeilhofer et al., 2014). A perda de áreas viáveis para a ocorrência de uma espécie pode acabar por confinar os indivíduos a fragmentos da área da distribuição original. Isso pode induzir ou intensificar os processos de deriva genética e endocruzamento. A onça pintada, como um grande felino e predador de topo, é um grande sinalizador da perda de habitat e sua destruição, uma vez que, para sua ocorrência ser sustentada, uma grande área preservada é necessária (Haag et al. 2010). Muitas populações tendem a se reduzir em tamanho e ficar cada vez mais isoladas, o que por sua vez as torna suscetíveis a processos estocásticos como a deriva genética, bem como ao endocruzamento, uma vez que eventos de reprodução entre parentes são muito mais comuns em populações pequenas (Eizirik et al. 2008).

Ao longo dos últimos anos, as tecnologias moleculares sofreram dramático melhoramento e barateamento de seus custos, possibilitando uma transição de estudos baseados em marcadores tradicionais (como microssatélites e sequências de DNA mitocondrial [mtDNA]) para aqueles que empregam marcadores em escala genômica, como a genotipagem de polimorfismos de nucleotídeo único (*single nucleotide polymorphisms* [SNPs]), sequenciamento de exomas e por fim sequenciamento de genomas completos (*whole genome sequencing* [WGS]) (Goodwin et al., 2016).

Da mesma forma, nossa compreensão sobre o estado de conservação dos organismos e de como se comportam as populações ao longo do tempo também se ampliou ao longo do processo de produção do conhecimento com base em métodos moleculares. No caso da onça-pintada, observa-se uma expansão do conhecimento genético sobre a espécie, desde o trabalho inicial utilizando mtDNA e microssatélites (Eizirik et al. 2001), seguido por trabalhos empregando microssatélites em escala regional (p.ex. Haag et al. 2010), até um conjunto recente de estudos que analisou dados genômicos (incluindo sequenciamento de exomas e WGS) para abordar sua história evolutiva, diversidade genética e estrutura populacional (Lorenzana et al. 2022, 2024).

A partir do conjunto de dados de WGS analisado por Lorenzana (2019), pode-se expandir a amostragem de genomas para investigar a diversidade genética, história populacional e atual estado da conservação da onça-pintada em biomas brasileiros, ajudando a interpretar seus padrões históricos e atuais de fluxo gênico, incluindo uma avaliação dos impactos recentes do processo de fragmentação dos seus habitats. De forma similar, Saremi et al. (2019) obtiveram importantes *insights* sobre a história recente de populações de puma (*Puma concolor*) intensamente isoladas por ação antrópica, bem como os resultados genômicos da miscigenação de uma dessas populações com pumas de outras áreas. Tais processos se assemelham ao que está ocorrendo com algumas das subpopulações de onças-pintadas, como a da Mata Atlântica brasileira (p.ex. de la Torre et al., 2018; Haag et al., 2010), para as quais intervenções de manejo como translocações e reprodução assistida já estão sendo discutidas (Srbek-Araujo et al., 2018). Neste contexto, é de suma importância conhecer as características genômicas de populações fragmentadas, comparando-as a outras que ainda são maiores e mais contínuas (como as

da Amazônia e do Pantanal), de forma a embasar de forma mais aprofundada ações para sua conservação e manejo.

A onça-pintada em Biomas Brasileiros

Cerrado

O Cerrado brasileiro é um bioma de vasta extensão, cobrindo mais de 2 milhões de km² e possuindo uma grande variedade de ambientes e composições de fauna e flora: savanas, o “cerradão” (que é uma formação florestal), campos abertos, campos rupestres e florestas de galeria (Klein, 2000).

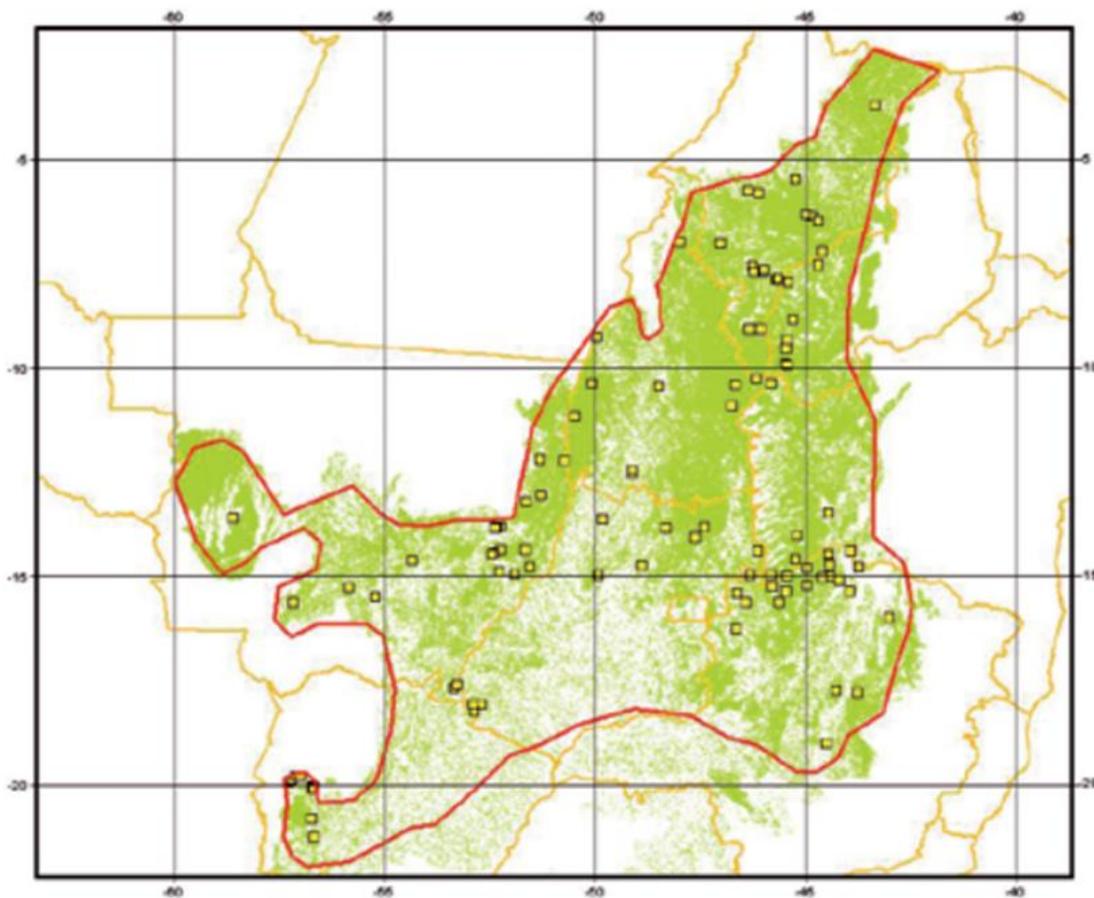


Fig 2. Ocorrência restante de onças pintadas no Cerrado brasileiro (polígono vermelho) com pontos de ocorrência registrados (quadrados amarelos). Fonte: MORAES Jr., 2012.

Segundo Moraes Jr. (2012), a subpopulação do Cerrado (Fig. 2) encontra-se ameaçada devido à perda de mais de 50% de sua área original de ocorrência, majoritariamente convertida em campos para o agronegócio nos últimos 25 anos. Seu levantamento sugere que restem menos de 250 indivíduos adultos (0,67 indivíduos adultos

por 100 km²) nessa subpopulação de onça-pintada. O autor adota uma postura mais conservadora, apontando a possível existência de aproximadamente 323 indivíduos adultos em todo o Cerrado, projetando um declínio ainda maior nos próximos 25 anos. Além disso, essa subpopulação de onças-pintadas sofre os mesmos problemas ambientais anteriormente citados, com o adicional de perda de habitat para implantação de mineração e instalação de usinas hidroelétricas.

Mata Atlântica

Na Mata Atlântica, a onça-pintada se encontra criticamente ameaçada, reduzida a uma pequena parte da população original, com as estimativas mais drásticas indicando entre 87% e 90% de redução do tamanho e área de ocorrência originais (Fig. 3). O bioma em si foi severamente degradado por desflorestamento desde a colonização até as últimas décadas, restando apenas cerca de 12% da cobertura original, severamente fragmentada e ameaçada constantemente pela expansão da urbanização e outras atividades antrópicas (INPE & Fundação SOS Mata Atlântica, 2008; Di Bitetti et al., 2003).

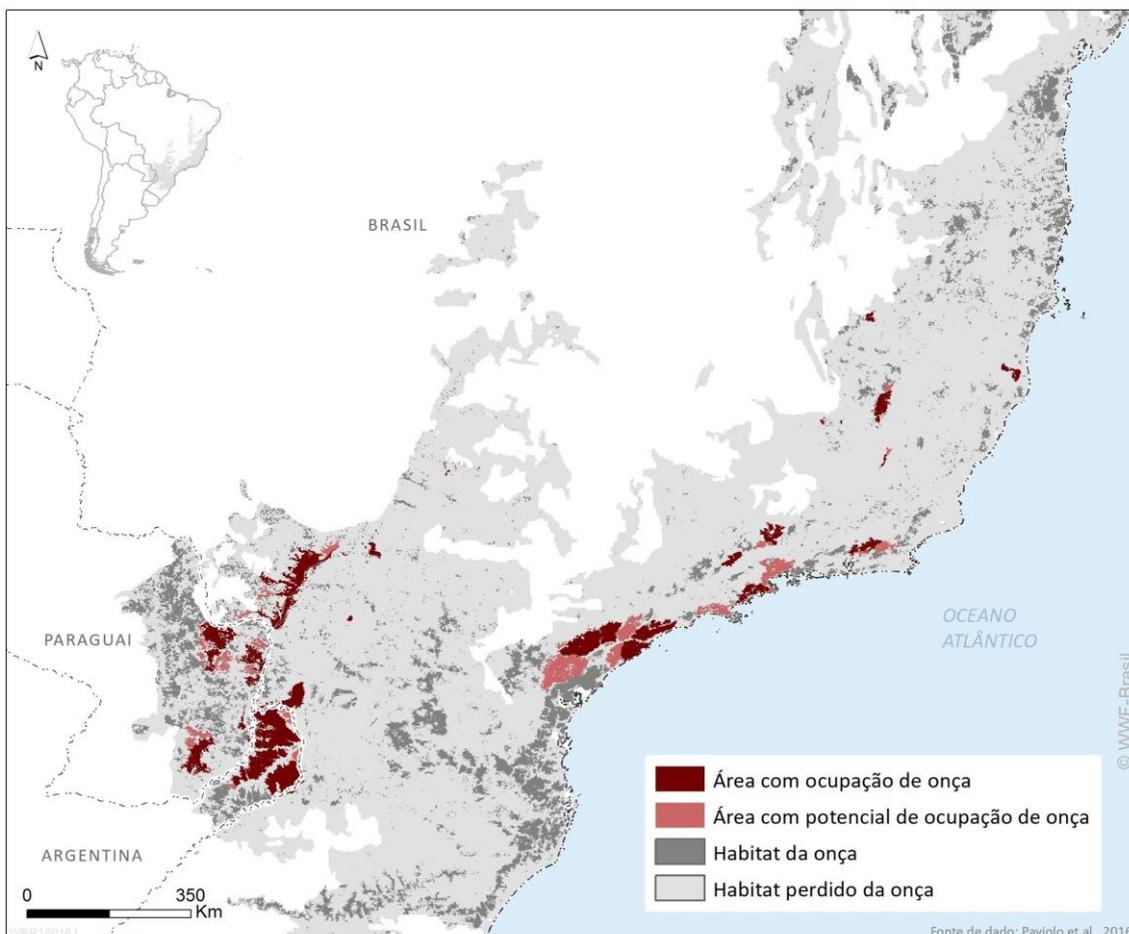


Fig 3. Distribuição histórica, atual, potencial e habitat não ocupado de *P. onca* no bioma Mata Atlântica. Fonte: Paviolo et al. 2016.

O bioma compreende uma enorme variedade de ambientes: floresta ombrófila densa, floresta ombrófila aberta, floresta ombrófila mista, floresta estacional decidual, floresta estacional semidecidual, mangues, restingas e campos de altitude. As ameaças à onça-pintada no bioma são essencialmente as mesmas que nos outros: caça, perda da base alimentar, perda de áreas habitáveis para a agricultura e urbanização, e ainda há o adicional de existir uma fragmentação severa já documentada (de la Torre et al., 2018; Beisiegel et al., 2012), levando à redução da diversidade genética presente nas populações remanescentes (Haag et al., 2010; Srbek-Araujo et al., 2018).

Caatinga

A Caatinga é um bioma de característica semi-árida, exclusivamente brasileiro, composto por vegetação xerófila que se encontra em severo estado de degradação de origem antrópica, com até 70% da sua cobertura original de 844.453 km² tendo sido já alterados por ações humanas. Apenas 7% está protegida por áreas de conservação, sendo que menos de 1% corresponde a áreas de proteção integral (MMA, 2012). Dentro da sua variedade de ambientes, podemos encontrar floresta ombrófila densa, floresta ombrófila aberta, floresta estacional decidual, floresta estacional semidecidual e savana (IBGE, 2012).

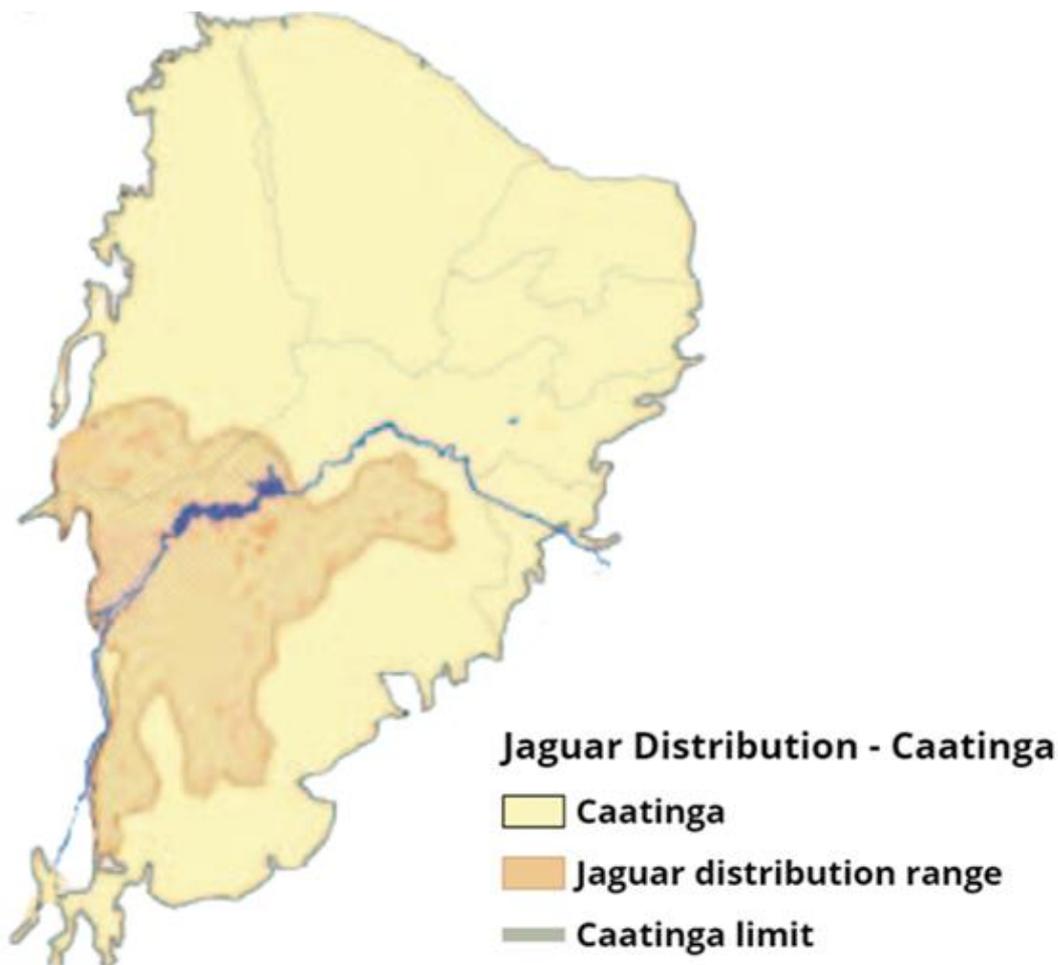


Fig 4. Ocorrência restante de onças pintadas na Caatinga (polígono laranja) com pontos de ocorrência registrados. Fonte: DE PAULA (2012).

A onça-pintada encontra-se criticamente ameaçada nesse bioma, com menos de 250 indivíduos em idade reprodutiva, que se distribuem ao longo de aproximadamente 21% da Caatinga (Fig. 4). A estimativa é uma média de 0,3 ind/100 km², o que é uma densidade populacional baixa. Semelhantemente aos outros biomas, a onça-pintada enfrenta ameaças como caça, perda de habitat por desflorestamento, perda de habitat por modificações antropogênicas no ambiente e perda de sua base alimentar (de Paula et al., 2012).

Variabilidade Genética e Endocruzamento

No contexto da conservação de espécies ameaçadas, é fundamental caracterizar padrões de variabilidade genética das populações remanescentes, incluindo inferências sobre processos históricos e atuais que levem a uma redução da diversidade. Este tipo de investigação, conduzida desde os anos 1980 no âmbito da Genética da Conservação, vem sendo gradualmente realizado em escala genômica, dando origem à área da Genômica da Conservação.

No âmbito da Genômica da Conservação, várias novas questões podem ser abordadas, desde análises refinadas de estruturação populacional e história demográfica, até a identificação de genes envolvidos em processos adaptativos ou predisponentes à depressão por endocruzamento. Apesar do enorme potencial das análises genômicas no contexto da conservação da biodiversidade, a sua incorporação no embasamento da definição de status de ameaça ou no planejamento de estratégias conservacionistas é ainda incipiente (Brüniche-Olsen et al., 2018). Neste sentido, é importante caracterizar aspectos genômicos de populações com diferentes níveis de ameaça, em uma mesma espécie, a fim de iniciar sua incorporação na concepção e desenvolvimento destas iniciativas.

Neste contexto, um aspecto genômico que apresenta um potencial relevante é o estudo de *Runs of Homozygosity* (ROH). Estes são segmentos genômicos ininterruptos de genótipos homocigotos de SNPs, implicando que ali existem haplótipos idênticos herdados de ambos os pais do indivíduo. ROH longas são geralmente herdadas de eventos recentes de endocruzamento, enquanto ROH menores geralmente são herdadas de ancestrais mais distantes. ROH pequenas nem sempre são fruto de autozigose quando sua principal característica é o Desequilíbrio de Ligação (LD). Há casos em que o cruzamento de indivíduos distantemente relacionados pode resultar no surgimento destes blocos (Brüniche-Olsen et al., 2018; Ceballos et al., 2018; Kardos et al., 2017). Desta forma, o tamanho das ROH e sua quantidade é dependente do histórico da população em análise: ROH mais longas surgem em populações com forte endogamia devido ao efeito de “inbreeding loops”, enquanto ROH mais curtas tendem a estar presentes nos genomas de populações que sofreram “efeito de gargalo-de-garrafa” (Ceballos et al., 2018).

Assim sendo, a presença de ROH, especialmente quando longas, é um indicativo de uma provável relação de consanguinidade entre os progenitores do indivíduo em análise. Esse tipo de cruzamento com organismos geneticamente muito parecidos, que compartilham um ancestral comum há poucas gerações, implica que ambos os progenitores contribuirão com um mesmo haplótipo, ou seja, reduzirão a heterozigidade de sua cria e poderão formar ROH. Ao contrário, populações miscigenadas, ou seja, que possuem ancestrais comuns mais distantes ou distintos, apresentam um menor número de ROH (e ROH mais curtas) do que seus progenitores (Ceballos et al., 2018; Kardos et al., 2017).

De forma geral, se prevê que a quantidade e tamanho das ROH em indivíduos amostrados em uma população seja dependente de seu tamanho efetivo, ou seja, quanto menor o tamanho efetivo populacional, maiores e mais numerosas tendem a ser as ROH devido aos eventos de endogamia recentes (Ceballos et al., 2018; Kardos et al., 2017). Além disso, a análise de ROH pode permitir uma inferência mais detalhada de processos demográficos atuais vs. antigos que geram variação em diversidade em uma população, auxiliando na compreensão de sua relevância para a persistência da mesma em longo prazo.

As ROH podem ser classificadas em dois tipos básicos: *identical-by-descent* (IBD) e *identical-by-state* (IBS). Todas as ROH que são IBD são também necessariamente IBS, mas o contrário não é necessariamente aplicável. ROH que são IBD geralmente surgem em função, de forma geral, de um processo de endocruzamento, enquanto as ROH IBS podem surgir por processos variados de dinâmica populacional mais antiga, como descrito acima (Brüniche-Olsen et al., 2018). Um outro ponto interessante é que, quando diferentes indivíduos de uma mesma população (ou populações de uma mesma espécie) são comparados, pode-se avaliar se eles possuem as mesmas ROH, que seriam então IBS ou mesmo IBD entre indivíduos. Isso é um aspecto bastante relevante no contexto de incorporação deste tipo de informação em estratégias de conservação, pois indica o quanto indivíduos diferentes apresentam homozigose nos mesmos segmentos genômicos, e de que forma a reprodução entre os mesmos poderia atenuar processos de endocruzamento antropogênicos.

Desta forma, se ressalta a necessidade de caracterizar a magnitude e distribuição de ROH em populações de espécies ameaçadas que apresentem diferentes histórias demográficas e graus de isolamento antrópico. Tendo em vista a literatura recente, se prevê que este tipo de abordagem apresente grande potencial para contribuir de forma relevante para o delineamento de estratégias mais realistas de conservação para estes táxons.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Investigar os níveis de diversidade genômica de populações brasileiras de onça-pintada (*Panthera onca*), com foco principal na caracterização da distribuição de *Runs of Homozygosity* (ROH) ao longo do genoma. Com base nesses dados e sua relação com informações ecológicas sobre as mesmas populações, contribuir para o aprimoramento de estratégias para a conservação dessa espécie.

Objetivos Específicos

- Gerar sequências de genomas completos de múltiplos indivíduos de onça-pintada, amostrados em biomas brasileiros, com prioridade para Cerrado, Caatinga e Mata Atlântica;
- Caracterizar a prevalência e padrão de comprimento de blocos homocigotos (*Runs of Homozygosity*, ROH) presentes nos genomas analisados;
- Caracterizar os níveis de diferenciação genômica entre as populações de onça-pintada presentes nestes biomas, e o impacto da presença de alta homocigosidade nestes padrões de diferenciação espacial;
- Utilizar os padrões de ROH observados para inferir a história demográfica das populações investigadas, incluindo a detecção de assinaturas de declínio populacional recente e de endocruzamento.

MATERIAL E MÉTODOS

Geração dos dados genômicos

A partir de amostras de DNA genômico disponíveis no Laboratório de Biologia Genômica e Molecular da PUCRS, genomas completos de dez indivíduos foram sequenciados utilizando a plataforma Illumina HiSeqX, com cobertura mínima de 10x pós-mapeamento (ver abaixo), utilizando serviço de empresa terceirizada. Os indivíduos amostrados são provenientes da Amazônia (n=4), Pantanal (n=2), Cerrado (n=3), Caatinga (n=3) e Mata Atlântica (n=8) (Figura 5). Optamos por avaliar a Mata Atlântica de forma sub-categorizada, dividindo-a em Mata Atlântica de Interior (n=5) e Mata Atlântica Costeira (n=3) devido ao alto grau de fragmentação em que o bioma se encontra. Os dez genomas completos sequenciados neste estudo foram analisados em conjunto com dez genomas de onça-pintada reportados previamente por nosso grupo de pesquisa (Lorenzana et al. 2022), gerando um conjunto de dados abrangente com relação às populações de onça-pintada remanescentes em biomas brasileiros (Figura 5).

Todos os 20 genomas analisados neste estudo foram mapeados contra a referência disponível no repositório público DNAZoo (DNA <https://www.dnazoo.org/>), a qual foi gerada utilizando os métodos descritos por Clavijo et al. (2017) e Dudchenko et al., (2018). A montagem genômica do DNAZoo foi escolhida por sua contiguidade. Devido ao fato dos *scaffolds* serem em nível cromossômico, acreditamos que ela seja a melhor escolha para a montagem dos novos genomas. Foram selecionados os dezoito primeiros *scaffolds*, que corresponderiam a basicamente todo o genoma, tendo em vista que a espécie possui 18 cromossomos (os demais correspondem a fragmentos não incorporados aos *scaffolds* principais).

O mapeamento das *reads* genômicas contra essa referência foi realizado utilizando o *pipeline* “Paleomix”, descrito por Schubert et al. (2014). Regiões de baixa qualidade foram removidas, assim como os adaptadores. O pacote *BWA mem* foi empregado para o mapeamento, cuja qualidade foi avaliada através do software *MultiQC* (Ewels et al. 2016).

Para avaliar a congruência entre os resultados obtidos por Lorenzana et al. (2022), que utilizaram o genoma de referência gerado por Figueiró et al. (2017), e os dados deste estudo, realizamos análises comparativas de diversidade dos dez genomas reportados naquele artigo com base nas duas referências. Especificamente, estimamos a heterozigosidade média ao longo do genoma, em fragmentos não-sobrepostos de 200kb, utilizando o script reportado por Ramirez et al. (2022). Com isso, almejamos avaliar se o uso de referências genômicas distintas afeta os padrões de diversidade observados.

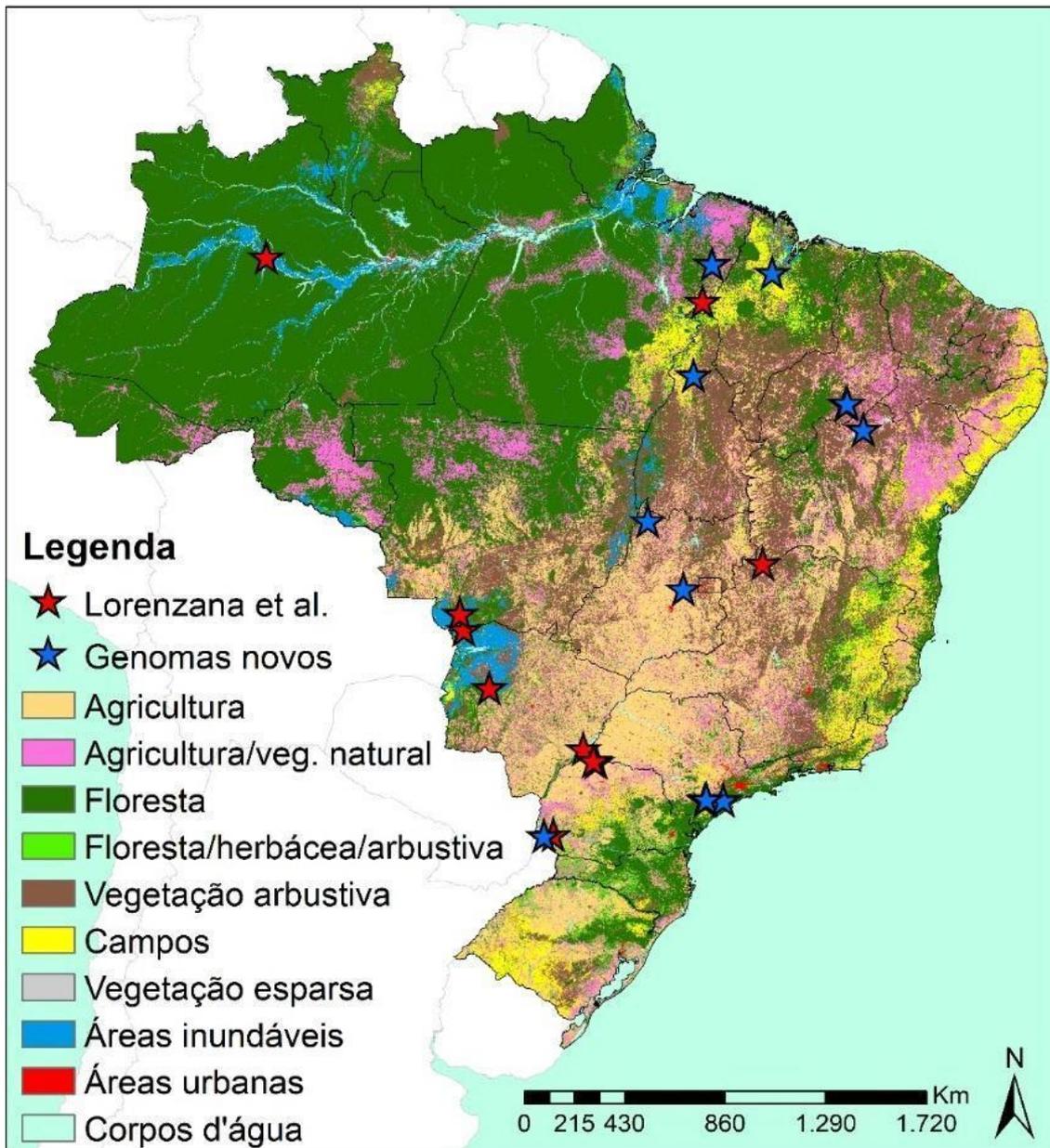


Fig. 5. Localização geográfica das amostras analisadas neste estudo. As estrelas vermelhas indicam genomas reportados no estudo de Lorenzana et al. (2022). As estrelas azuis indicam genomas sequenciados neste estudo.

Análises dos dados

O processo de identificação de SNPs (*SNP calling*) foi realizado com o pacote ANGSD (Korneliussen et al. 2014), utilizando *genotype likelihoods*. Outras análises dos dados foram também realizadas com o mesmo pacote, incluindo uma Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis, PCA*), a qual empregou especificamente o programa PCA-ANGSD, sendo seus resultados posteriormente plotados com o *software* R Studio (R Core Team, 2021). Esta análise teve como objetivo específico avaliar a estruturação genética geral das amostras analisadas, e particularmente a diferenciação de indivíduos que apresentassem altos níveis de homozigose em seus genomas (ver abaixo).

O foco principal deste estudo foi a caracterização de blocos homocigotos (*Runs of Homozygosity, ROH*) presentes nos genomas analisados. Isso foi realizado com o *software* ROHan (Renaud et al. 2019). ROHan não requer a utilização de arquivos *.vcf*, sendo executado diretamente a partir dos arquivos *.bam*, gerados no mapeamento genômico descrito acima. Após rodadas preliminares para a testagem dos parâmetros do ROHan, optamos pela utilização do parâmetro $rohmu = 1^{-04}$, que modela os padrões de variação na heterocigosidade local ao longo do genoma. As análises destes blocos tiveram como objetivo estimar sua prevalência ao longo do genoma de cada indivíduo, bem como estimar o tamanho dos blocos em cada genoma, o que fornece informações sobre a história de endocruzamento em cada amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os dez novos genomas sequenciados no âmbito deste projeto apresentaram boa qualidade e métricas de mapeamento do mesmo nível dos genomas previamente reportados por Lorenzana et al. (2022). A fim de avaliar o efeito do genoma-referência em análises de diversidade e endocruzamento em onças-pintadas, comparamos métricas de heterozigosidade obtidas por Lorenzana et al. (2022), com base na referência reportada por Figueiró et al. (2017), com aquelas obtidas neste estudo empregando a referência do DNAZoo. Os resultados foram muito semelhantes, como ilustra a análise de heterozigosidade média ao longo do genoma (Fig. 6).

Ao comparar a heterozigosidade estimada com base nas duas referências, para os 10 indivíduos analisados por Lorenzana et al. (2022), observamos um leve incremento em heterozigosidade quando a referência do DNAZoo foi utilizada, o que pode se dever à maior contiguidade desta montagem, viabilizando maior eficiência de mapeamento e maior recuperação de regiões variáveis do genoma.

Ao mesmo tempo, esta suave diferença não foi significativa (vide sobreposição de estimativas na Fig. 6), indicando baixo impacto da montagem de referência sobre esta métrica de diversidade. Assim, pode-se constatar que os padrões de variação de diversidade observados entre os indivíduos analisados por Lorenzana et al. (2022) foram os mesmos reportados naquele estudo, com heterozigosidade mais baixa nas amostras bPon052 e bPon395, ambos da Mata Atlântica de Interior.

Um ponto relevante é que o estudo de Lorenzana et al. (2022) não incluiu amostras da Mata Atlântica costeira, inviabilizando comparações de diversidade que incluíssem esta região altamente fragmentada. Neste estudo, sequenciamos três genomas desta área (Tabela 1, Fig. 5), o que permite uma comparação de seus níveis de diversidade com aqueles observados em outras regiões. A comparação inicial dos níveis de heterozigosidade, incluindo dois desses indivíduos (bPon444 e LegadoSP), já forneceu indicações de que a diversidade genética nesta área poderia ser ainda menor do que o registrado previamente para amostras da Mata Atlântica de Interior (ver Fig. 6). Este resultado salientou a necessidade de análises mais aprofundadas, focadas nos padrões de homozigose genômica, comparando os indivíduos amostrados nessa região com aqueles de outros biomas brasileiros.

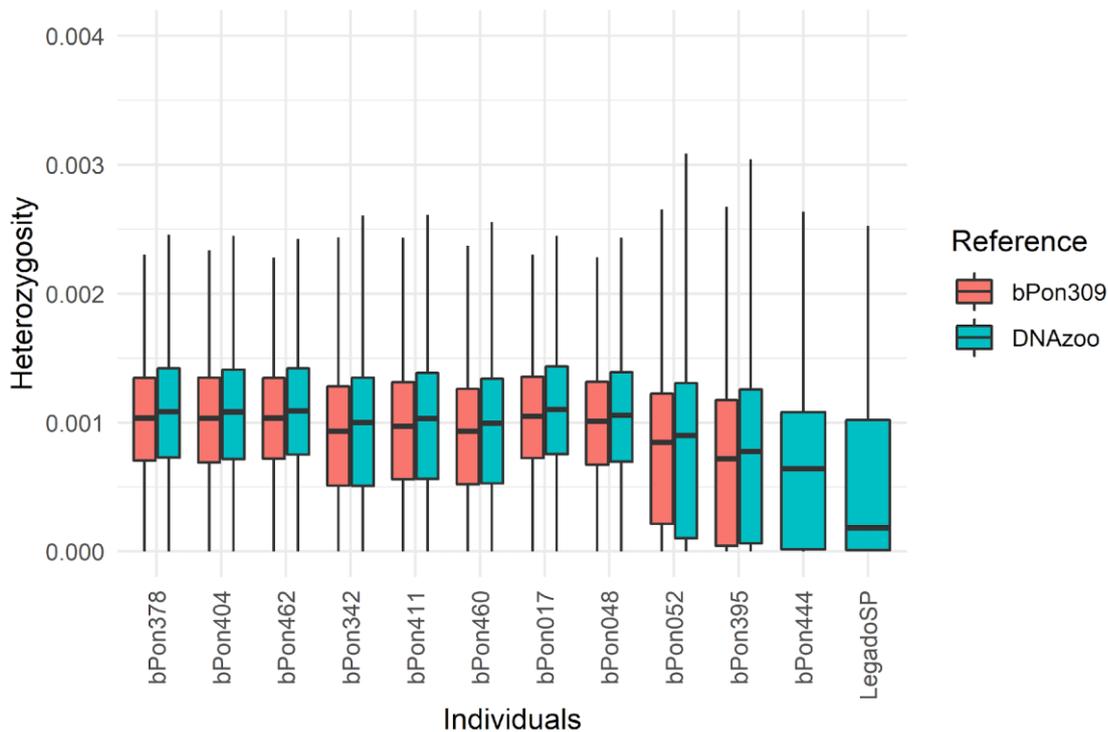


Fig. 6. Heterozigosidade média, estimada ao longo do genoma (a partir de fragmentos não sobrepostos de 200kb), dos 10 indivíduos reportados por Lorenzana et al. (2022), quando mapeados contra o genoma-referência do indivíduo bPon309, reportado por Figueiró et al. (2017), e contra o genoma-referência disponibilizado pela iniciativa DNAZoo (Clavijo et al. 2017). A barra central indica a mediana, o boxplot indica um quartil em cada direção, e a linha vertical indica a variância de cada estimativa. Para fins de comparação, no lado direito encontram-se as mesmas estimativas para dois dos indivíduos sequenciados no presente estudo (bPon444 e ‘LegadoSP’), ambos da Mata Atlântica costeira, e montados contra a referência do DNAZoo.

A seguir, realizamos análises detalhadas dos blocos homocigotos (*Runs of Homozygosity, ROHs*) presentes nos 20 genomas analisados. De fato, observamos que os maiores níveis regionais de homocigosidade foram detectados na Mata Atlântica, especialmente em sua região costeira (Tabela 1, Fig. 7). Em particular, o indivíduo denominado ‘*LegadoSP*’, proveniente dessa área, apresentou a maior extensão cumulativa do genoma (44,8%) localizada em ROHs. A região de Mata Atlântica de Interior também apresentou considerável prevalência de segmentos genômicos homocigotos, ainda que de forma mais variável entre seus indivíduos amostrados (ver abaixo).

Tabela 1. Caracterização da presença e distribuição por tamanho de blocos homozigotos (*Runs of Homozygosity, ROH*), bem como porcentagem geral do genoma ocupada por estes blocos, em indivíduos de onça-pintada amostrados em diferentes biomas brasileiros.

Bioma	Indivíduo	Tamanho do ROH				% do Genoma em ROH
		1-5 Mb	6-10 Mb	> 10 Mb	Total	
Amazônia						
	bPon404	1.80E+07	7.00E+06	1.43E+08	1.68E+08	8.25
	bPon378	1.20E+07	6.00E+06	9.50E+07	1.13E+08	5.56
	bPon515*	4.50E+07	2.30E+07	6.90E+08	7.58E+08	37.56
	bPon213*	2.20E+07	0.00E+00	3.50E+07	5.70E+07	2.80
Pantanal						
	bPon462	2.00E+07	0.00E+00	3.50E+07	5.50E+07	2.71
	bPon342	3.20E+07	2.70E+07	2.25E+08	2.84E+08	13.96
Cerrado						
	bPon411	4.00E+07	4.50E+07	1.35E+08	2.20E+08	10.88
	bPon425*	3.70E+07	4.60E+07	1.38E+08	2.21E+08	10.89
	bPon442*	5.00E+07	4.80E+07	2.05E+08	3.03E+08	14.98
Caatinga						
	bPon460	5.00E+07	4.90E+07	1.33E+08	2.32E+08	11.47
	bPon482*	4.10E+07	3.40E+07	1.26E+08	2.01E+08	9.26
	bPon497*	8.80E+07	2.80E+07	1.93E+08	3.09E+08	15.33
Mata Atlântica						
Interior	bPon017	1.70E+07	6.00E+06	7.40E+07	9.70E+07	4.77
	bPon048	1.30E+07	2.60E+07	7.90E+07	1.18E+08	5.82
	bPon052	6.00E+07	3.90E+07	3.89E+08	4.88E+08	24.15
	bPon395	2.50E+07	8.70E+07	4.28E+08	5.40E+08	27.00
	bPon514*	7.00E+07	4.70E+07	1.78E+08	2.95E+08	14.60
Costeira	bPon444*	6.20E+07	1.02E+08	4.92E+08	6.56E+08	32.92
	LegadoSP*	8.20E+07	9.10E+07	7.13E+08	8.86E+08	44.84
	bPon392*	5.30E+07	8.00E+07	5.28E+08	6.61E+08	33.08

* Genomas sequenciados neste estudo.

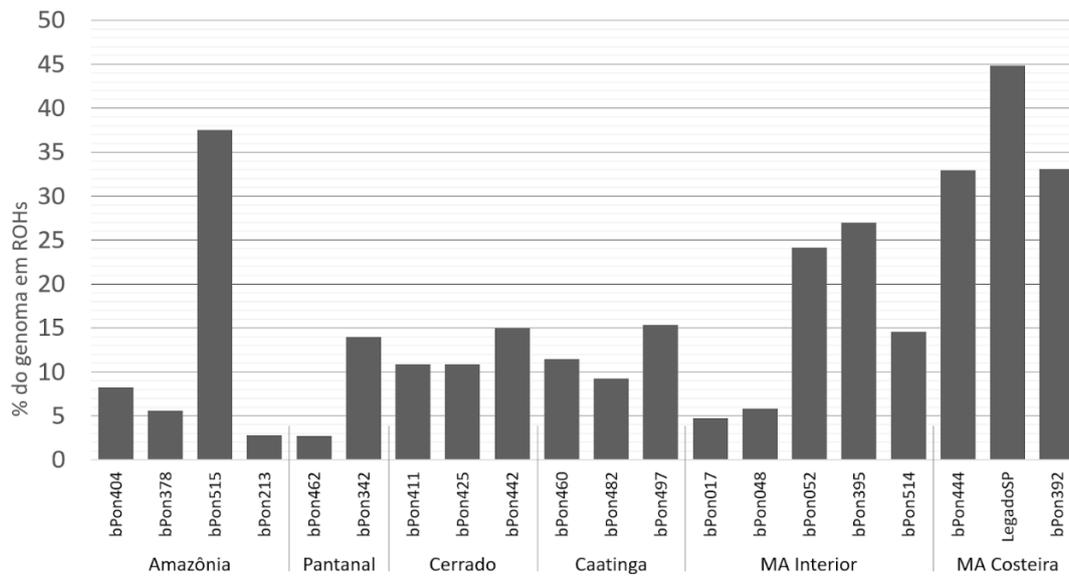


Fig. 7. Porcentagem de cada genoma encontrada em blocos homocigotos (ROHs). Os indivíduos analisados estão apresentados de acordo com os respectivos biomas.

Indivíduos do Cerrado e da Caatinga apresentam porcentagens moderadas de seus genomas em blocos homocigotos, chegando ao máximo de 15,3% do genoma da amostra bPon497 (Caatinga). Com exceção do indivíduo bPon515, a Amazônia demonstrou as menores prevalências de blocos homocigotos. O indivíduo bPon515 apresentou um padrão muito atípico, com uma proporção muito alta (37,56%) de seu genoma em homocigose. Isto indica uma história genealógica desse indivíduo contendo extenso endocruzamento, o que contrasta com o observado nos demais animais amostrados na Amazônia. Uma hipótese que pode explicar este resultado é que o intenso desmatamento sofrido pela região em que esse indivíduo foi amostrado (leste do Pará, no 'Arco do Desmatamento' - ver Fig. 5) tenha gerado uma população local já isolada geneticamente, o que induziu a ocorrência de endocruzamento entre os animais remanescentes.

A fim de explorar de forma mais aprofundada esta hipótese, bem como analisar os padrões de homocigosidade nas demais amostras, é relevante investigar a prevalência de ROHs de diferentes comprimentos, que refletem diferenças na história de endocruzamento de cada indivíduo. ROHs mais curtas indicam episódios mais antigos de endocruzamento, usualmente atribuídos a uma história de pequeno tamanho populacional e/ou episódios sucessivos de 'efeitos gargalo-de-garrafa', enquanto ROH muito longas indicam episódios recentes de endocruzamento (Ceballos et al., 2018). Os resultados desta análise (Fig. 8) indicaram padrões muito interessantes, que serão detalhados a seguir.

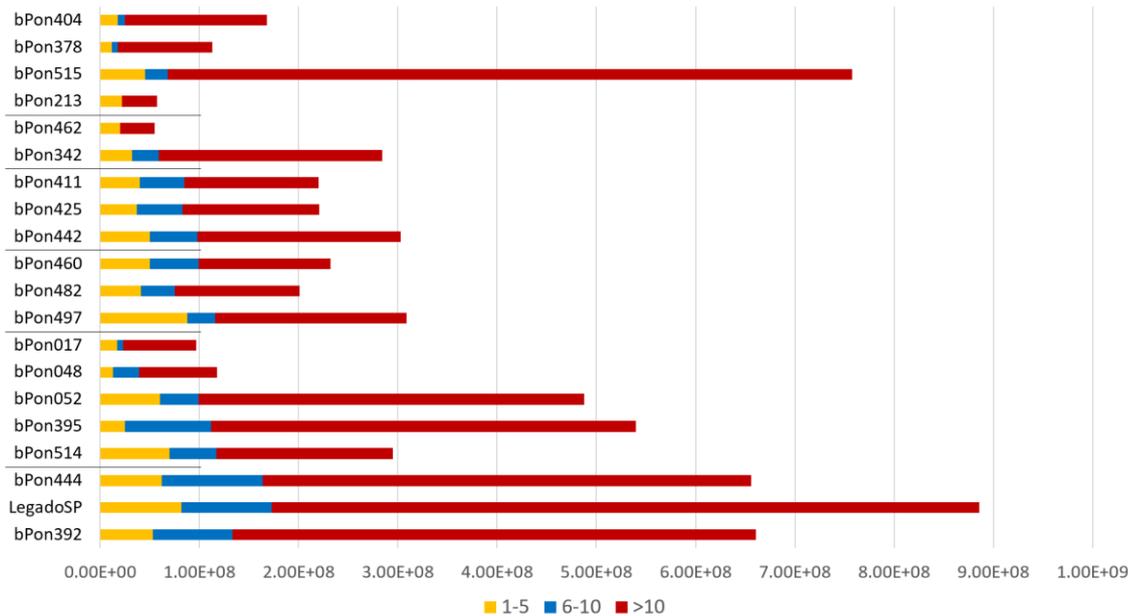


Fig. 8. Distribuição do somatório das janelas de homozigose de diferentes tamanhos em cada amostra analisada. Em amarelo está destacado o somatório do genoma em ROH de 1 a 5 Mb, azul, de 6 a 10 Mb e em vermelho, acima de 10 Mb.

Em primeiro lugar, pode-se destacar o indivíduo amazônico bPon515, cuja altíssima prevalência de ROHs muito longas (acima de 10 Mb) indica forte endocruzamento recente, corroborando a hipótese proposta acima de que isto pode se dever ao isolamento de uma população local no contexto do 'Arco do Desmatamento'. Além disso, observa-se consistente prevalência de ROHs muito longas nos três indivíduos da Mata Atlântica costeira (bPon392, bPon444 e 'LegadoSP'), corroborando a hipótese de que esta população de onças-pintadas está sofrendo um processo intenso de endocruzamento devido ao seu tamanho reduzido e ao completo isolamento desta região em relação a outras áreas remanescentes da distribuição da espécie.

No caso da Mata Atlântica de Interior, observa-se variabilidade no perfil de ROHs entre os indivíduos, mesmo no caso de amostras provenientes da mesma área. Por exemplo, os indivíduos bPon048 e bPon052 provêm do Parque Estadual Morro do Diabo, SP, uma área isolada e já demonstradamente afetada por perda de diversidade por deriva genética e ocorrência de endocruzamento (Haag et al., 2010; Lorenzana et al., 2022). Como previamente reportado por Lorenzana et al. (2022) o indivíduo bPon052 apresenta forte evidência de endocruzamento recente. Em contraste, o indivíduo bPon048, amostrado na mesma época (fim dos anos 1990 e início dos anos 2000), não apresenta este padrão. Isto indica que, naquele momento, aquela área se encontrava no início de seu processo de intensificação do endocruzamento devido ao isolamento genético da área (o que corrobora as inferências de Haag et al. 2010), de forma que os padrões individuais ainda eram bastante distintos. O mesmo pode ser observado na população do Parque Nacional do Iguaçu, também nesta região da Mata Atlântica de Interior. O indivíduo bPon395, já reportado por Lorenzana et al. (2022), apresenta alta prevalência de ROHs longas, enquanto o indivíduo bPon514, sequenciado neste estudo e amostrado na mesma época (anos 2010), apresenta prevalência moderada destes blocos homozigotos, em níveis semelhantes ao observado em amostras da Caatinga, Cerrado e Pantanal. Isto indica que

será necessária uma amostragem mais extensa de indivíduos destas áreas para compreender seus padrões de homozigidade genômica. Já o indivíduo bPon017 provém de uma população ('Porto Primavera') já extinta, cuja análise genética indicou provável miscigenação histórica com o Pantanal e Cerrado (Haag et al., 2010; Lorenzana et al., 2022). Isto provavelmente contribui para a baixa prevalência de ROHs em seu genoma.

A fim de investigar a estruturação genética das amostras analisadas, bem como possíveis efeitos da fragmentação antropogênica neste padrão (devido aos efeitos da deriva genética e endocruzamento em pequenas populações fragmentadas), realizamos uma Análise de Componentes Principais (PCA). Observamos que todos os indivíduos de onça-pintada provenientes de áreas com baixos níveis de fragmentação (e com menor porcentagem do genoma em ROHs) se agruparam de forma coesa, com baixa diferenciação regional (Fig. 9). Por outro lado, os indivíduos de populações isoladas, com alta prevalência de ROHs, apresentaram um padrão completamente distinto. Os indivíduos bPon392, bPon444 e 'LegadoSP', da Mata Atlântica costeira, formam um *cluster* muito distante no PC1, indicando forte diferenciação genética desta população. Da mesma forma, os indivíduos bPon052 e bPon048, do Parque Estadual Morro do Diabo, SP, aparecem distantes dos demais no PC2, sendo seguidos pelos indivíduos bPon395 e bPon514 (do Parque Nacional do Iguaçu), posicionados proximamente entre si, em um *cluster* próprio. O indivíduo bPon515, da Amazônia, mais uma vez se destaca dos demais, ficando posicionado no extremo oposto do PC2 (Fig. 9). Estes resultados indicam fortemente que a fragmentação antropogênica de paisagens já gerou efeitos marcantes na estruturação genética da onça-pintada, induzindo a formação de clusters distintos com indivíduos pertencentes a populações pequenas e isoladas.

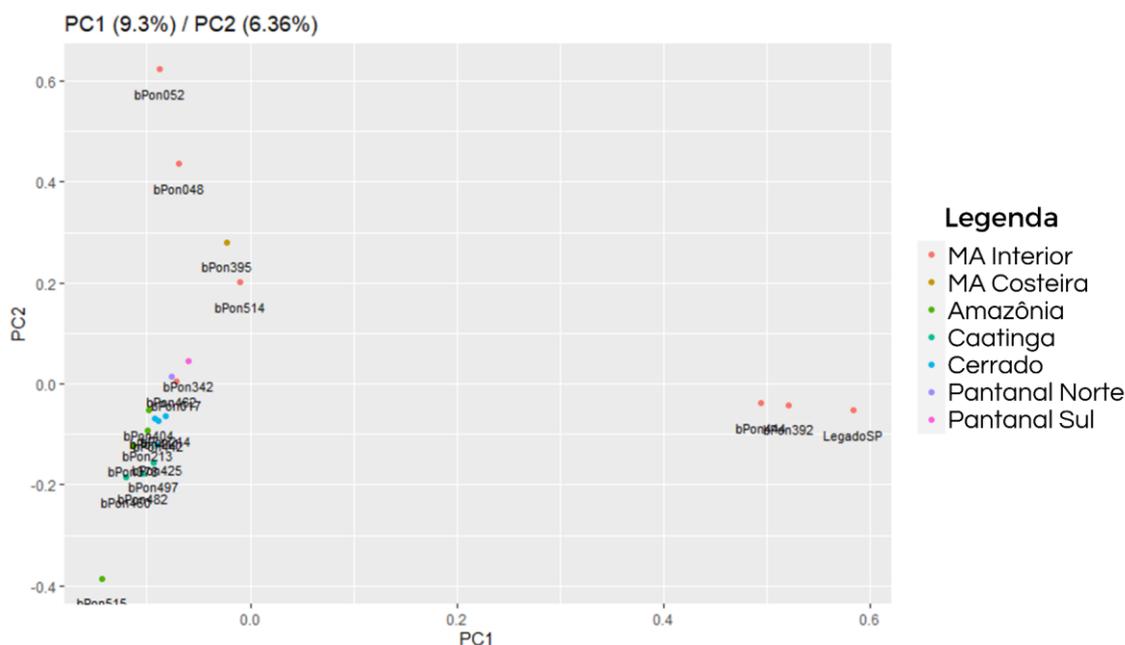


Fig. 9. Análise de Componentes Principais (*Principal Component Analysis*, PCA) gerada a partir de dados de genomas completos de 20 indivíduos de onça-pintada amostrados em biomas brasileiros. Os pontos estão coloridos de acordo com o bioma de origem, conforme legenda interna.

De forma geral, os resultados deste estudo contribuem para uma melhor compreensão da diversidade genômica da onça-pintada, ao analisar genomas completos em número duas vezes maior do que o reportado em nosso estudo anterior (Lorenzana et al., 2022). Além do número maior, neste estudo incluímos pela primeira vez amostras da Mata Atlântica costeira, o que permitiu revelar os altos níveis de endocruzamento ocorrentes nesta população, e salientando a necessidade de ações de manejo genético com foco nesta área. Por fim, o resultado obtido com o indivíduo bPon515, proveniente do 'Arco do Desmatamento' na Amazônia, foi bastante surpreendente, indicando que altos níveis de endocruzamento já estão sendo detectados nesta região, o que provavelmente se deve ao isolamento de pequenas populações remanescentes de onça-pintada em fragmentos isolados de floresta. Amostras adicionais de indivíduos desta área serão importantes para investigar de forma mais aprofundada esta hipótese. Espera-se que, no futuro, análises deste tipo possam ser realizadas com um grande número de indivíduos amostrados em todas as populações remanescentes de onça-pintada, permitindo uma compreensão mais completa do panorama de variabilidade genômica nesta espécie. A incorporação destas informações permitirá o aprimoramento das estratégias de conservação e manejo com foco neste predador ameaçado, visando à manutenção de sua viabilidade genética na natureza em longo prazo.

REFERÊNCIAS

- Beisiegel, B., Sana, D., & Moraes, E. (2012). The jaguar in the Atlantic Forest. *CAT News*, 7, 14–18. <https://docs.google.com/file/d/0Bzj9kwN98RshWTRuaUk5TnNOaDA/edit>
- Brüniche-Olsen, A., Kellner, K. F., Anderson, C. J., & DeWoody, J. A. (2018). Runs of homozygosity have utility in mammalian conservation and evolutionary studies. *Conservation Genetics*, 19(6), 1295–1307. <https://doi.org/10.1007/s10592-018-1099-y>
- Caso, A., Lopez-Gonzalez, C., Payan, E., Eizirik, E., de Oliveira, T., Leite-Pitman, R., Kelly, M. & Valderrama, C. 2008. *Panthera onca*. The IUCN Red List of Threatened Species 2008: e.T15953A5327466. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2008.RLTS.T15953A5327466.en>
- Cavalcanti, S. M. C., de Azevedo, F. C. C., Tomas, W. M., Boulhosa, R. L. P., & Crawshaw Junior, P. G. (2012). The status of the jaguar in the Cerrado. *CAT News*, 7, 29–34. <https://docs.google.com/file/d/0Bzj9kwN98RshQW9BbIBVY0dIQ1E/edit>
- Ceballos, F. C., Joshi, P. K., Clark, D. W., Ramsay, M., & Wilson, J. F. (2018). Runs of homozygosity: Windows into population history and trait architecture. *Nature Reviews Genetics*, 19(4), 220–234. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.109>
- De Angelo, C., Paviolo, A., & Di Bitetti, M. (2011). Differential impact of landscape transformation on pumas (*Puma concolor*) and jaguars (*Panthera onca*) in the Upper Paraná Atlantic Forest. *Diversity and Distributions*, 17(3), 422–436. <https://doi.org/10.1111/j.1472-4642.2011.00746.x>
- De La Torre, A. J., González-Maya, J. F., Zarza, H., Ceballos, G., & Medellín, R. A. (2018). The jaguar's spots are darker than they appear: Assessing the global conservation status of the jaguar *Panthera onca*. *Oryx*, 52(2), 300–315. <https://doi.org/10.1017/S0030605316001046>
- De Paula, R. C., De Campos, C. B., & De Oliveira, T. G. (2012). Red List assessment for the jaguar in the Caatinga Biome. *CAT News*, Special Is(Spring 2012), 19–24.
- Di Bitetti, M.S; Placci, G.; e Dietz, L.A. (2003) Uma visão de Biodiversidade para a Ecorregião Florestas do Alto Paraná – Bioma Mata Atlântica: Atlântica: planejando a paisagem de conservação da biodiversidade e estabelecendo prioridades para ações de conservação. Washington, D.C.: World Wildlife Fund, 2003.
- Eizirik, E., Haag, T., Santos, A. S., Salzano, F. M., Silveira, L., Azevedo, F. C. C., & Furtado, M. M. (2008). Jaguar conservation genetics. *Cat News Special Issue: The Jaguar in Brazil*, 4(4), 31–34. http://www.jaguar.org.br/pdf/Publicacoes_9_Eizirik_et_al_2008_Jaguar_conservation_genetics_in_Brazil.pdf
- Eizirik, E., Kim, J. H., Menotti-Raymond, 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(1), 65–79. <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2001.01144.x>

- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Källér, M. MultiQC: Summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics* (2016) doi: 10.1093/bioinformatics/btw354
- Figueiró, H. V., Li, G., Trindade, F. J., Assis, J., Pais, F., Fernandes, G., Santos, S. H. D., Hughes, G. M., Komissarov, A., Antunes, A., Trinca, C. S., Rodrigues, M. R., Linderoth, T., Bi, K., Silveira, L., Azevedo, F. C. C., Kantek, D., Ramalho, E., Brassaloti, R. A., ... Eizirik, E. (2017). Genome-wide signatures of complex introgression and adaptive evolution in the big cats. *Science Advances*, 3(7), 1–14. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1700299>
- Goodwin, S., McPherson, J. D., & McCombie, W. R. (2016). Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, 17(6), 333–351. <https://doi.org/10.1038/nrg.2016.49>
- Haag, T., Santos, A. S., Sana, D. A., Morato, R. G., Cullen, L., Crawshaw, P. G., De Angelo, C., Di Bitetti, M. S., Salzano, F. M., & Eizirik, E. (2010). The effect of habitat fragmentation on the genetic structure of a top predator: Loss of diversity and high differentiation among remnant populations of Atlantic Forest jaguars (*Panthera onca*). *Molecular Ecology*, 19(22), 4906–4921. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2010.04856.x>
- Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE. (2012). Manual Técnico da Vegetação Brasileira. IBGE. <https://doi.org/ISSN 0101-4234>
- IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species. (2016) Available at <https://www.iucnredlist.org/> (acessado pela última vez em 26/05/2020)
- Kardos, M., Åkesson, M., Fountain, T., Flagstad, Ø., Liberg, O., Olason, P., Sand, H., Wabakken, P., Wikenros, C., & Ellegren, H. (2018). Genomic consequences of intensive inbreeding in an isolated Wolf population /631/208/730 /631/181/457/649 article. *Nature Ecology and Evolution*, 2(1), 124–131. <https://doi.org/10.1038/s41559-017-0375-4>
- Kitchener, A. (1991). *The Natural History of the Wild Cats*. A and C Black, London.
- Klein, A. L. (2000) *Eugen Warming e o cerrado brasileiro: um século depois*. São Paulo: Editora UNESP; Imprensa Oficial do Estado; Fapesp.
- Korneliussen TS, Albrechtsen A, Nielsen R (2014) ANGSD: Analysis of Next Generation Sequencing Data. *BMC bioinformatics*, 15, 356
- Lorenzana, G. P., Figueiró, H. V., Kaelin, C. B., Barsh, G.S., Johnson J., Karlsson, E., Morato, R. G., G., Sana, D.A. Cullen, L., May, J. A., Moraes, E. A., Kantek, D. L. Z., Silveira, L., Murphy, W. J., Ryder, O. A., Eizirik, E. (2022). Whole-genome sequences shed light on the demographic history and contemporary genetic erosion of free-ranging jaguar (*Panthera onca*) populations. *Journal of Genetics and Genomics*. 49(1), 77-78. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2021.10.006>
- Lorenzana, P. M., Figueiró, H. V., Coutinho, L. L., Villela, P. M. S. (2024). Comparative assessment of genotyping-by-sequencing and whole-exome sequencing for estimating genetic diversity and geographic structure in small sample sizes: insights from wild jaguar populations. *Genetica*. <https://doi.org/10.1007/s10709-024-00212-5>
- Paviolo, A., De Angelo, C., Ferraz, K. M. P. M. B., Morato, R. G., Martinez Pardo, J., Srbeek-Araujo, A. C., Beisiegel, B. D. M., Lima, F., Sana, D., Xavier Da Silva, M.,

- Velázquez, M. C., Cullen, L., Crawshaw, P., Jorge, M. L. S. P., Galetti, P. M., Di Bitetti, M. S., De Paula, R. C., Eizirik, E., Aide, T. M., ... Azevedo, F. (2016). A biodiversity hotspot losing its top predator: The challenge of jaguar conservation in the Atlantic Forest of South America. *Scientific Reports*, 6(November). <https://doi.org/10.1038/srep37147>
- Purcell S, Neale B, Todd-Brown K et al. (2007) PLINK: A Tool Set for Whole-Genome Association and Population-Based Linkage Analyses. *The American Journal of Human Genetics*, 81, 559–575.
- Ramirez, L., Lescroart, J., Figueiró, H. V., Torres-Florez, J. P., Villela, P. M. S., Coutinho, L. L., Freitas, P. D., Johnson, W. E., Antunes, A., Galetti, P. M. Jr., Eizirik, E. (2022). Genomic Signatures of Divergent Ecological Strategies in a Recent Radiation of Neotropical Wild Cats. *Molecular Biology and Evolution*, 39(6):msac117. <https://doi.org/10.1093/molbev/msac117>
- Sanderson, E. W., Redford, K. H., Chetkiewicz, C. L. B., Medellin, R. A., Rabinowitz, A. R., Robinson, J. G., & Taber, A. B. (2002). Planning to save a species: The jaguar as a model. *Conservation Biology*, 16(1), 58–72. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1739.2002.00352.x>
- Schubert, M. (2016). PALEOMIX Documentation.
- Srbek-Araujo, A. C., Haag, T., Chiarello, A. G., Salzano, F. M., & Eizirik, E. (2018). Worrysome isolation: Noninvasive genetic analyses shed light on the critical status of a remnant jaguar population. *Journal of Mammalogy*, 99(2), 397–407. <https://doi.org/10.1093/jmammal/gyy007>
- Sunquist M, Sunquist F (2002) *Wild cats of the world* (CAW Guggisberg, Ed.). University of Chicago Press.
- Thornton, D., Zeller, K., Rondinini, C., Boitani, L., Crooks, K., Burdett, C., Rabinowitz, A., & Quigley, H. (2016). Assessing the umbrella value of a range-wide conservation network for jaguars (*Panthera onca*) . *Ecological Applications*, 26(4), 1112–1124. <https://doi.org/10.1890/15-0602>
- Zeilhofer, P., Cezar, A., Tôrres, N. M., de Almeida Jácomo, A. T., & Silveira, L. (2014). Jaguar *Panthera onca* Habitat Modeling in Landscapes Facing High Land-use Transformation Pressure-Findings from Mato Grosso, Brazil. *Biotropica*, 46(1), 98–105. <https://doi.org/10.1111/btp.12074>



Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Av. Ipiranga, 6681 – Prédio 1 – Térreo
Porto Alegre – RS – Brasil
Fone: (51) 3320-3513
E-mail: propesq@pucrs.br
Site: www.pucrs.br