

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL

FACULDADE DE BIOCÊNCIAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA

**CARACTERIZAÇÃO EVOLUTIVA DE UMA ZONA HÍBRIDA ENTRE DUAS ESPÉCIES DE FELÍDEOS
NEOTROPICAIS (*Leopardus tigrinus* E *L. geoffroyi*) ATRAVÉS DA ANÁLISE DE MARCADORES
NUCLEARES**

Livia Menger Lehueur

Orientador: Dr. Eduardo Eizirik

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

PORTO ALEGRE – RS – BRASIL

2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente a todas as pessoas que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

Primeiramente aos meus pais Celso Antonio e Terezinha, por todo o amor, dedicação e por sempre fazerem o possível pra me conduzir pelo que julgam ser o melhor caminho pra mim. Obrigada pela referência de caráter e de ser humano que desejo ser, por sempre apoiarem minhas escolhas, e por me darem meios de chegar onde estou.

Ao meu orientador, Dr. Eduardo Eizirik, pela oportunidade de aprendizado e crescimento profissional e pessoal, e por compartilhar comigo e demais alunos suas ideias, conhecimentos e experiências.

À Tatiane C. Trigo pelo apoio, discussões e acompanhamento durante grande parte deste trabalho, e por ter me apresentado o tema da hibridação que me encantou desde o primeiro momento.

Ao Manoel L. F. Rodrigues, por me ensinar todas as regras de funcionamento do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, e pelo apoio e paciência sempre quando o procuro. E, assim como a Tati, por serem pessoas tão especiais que sempre me motivaram e incentivaram a prosseguir neste caminho.

A todos os meus colegas e amigos do Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, em especial Henrique, Tiago, Alexsandra, Taiz, Laurinha, Fernanda, Talita, Fe, Ana Lucia, Giovanna e Taiana por tornarem o “Genoma” um lugar mais agradável de se conviver, e pela ajuda sempre que necessário.

Por fim, nada seria possível sem a fé, carinho, amizade e confiança de todos os meus familiares e os amigos que a vida me deu.

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil.

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	4
APRESENTAÇÃO	5
ARTIGO	8
<i>RESUMO</i>	9
<i>INTRODUÇÃO</i>	10
<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	12
<i>RESULTADOS</i>	16
<i>CONCLUSÕES</i>	24
<i>LEGENDAS DAS FIGURAS</i>	27
<i>FIGURAS</i>	28
<i>TABELAS</i>	39
REFERÊNCIAS	44

RESUMO

A hibridação entre espécies animais vem sendo observada cada vez mais frequentemente na natureza, devido provavelmente ao avanço das técnicas moleculares, que têm nos permitido acessar inúmeras informações previamente desconhecidas com relação à biologia dos seres vivos. Os felídeos Neotropicais *Leopardus geoffroyi* e *L. tigrinus* possuem sua distribuição essencialmente alopátrica, com uma estreita zona de contato que inclui o Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Após suspeita levantada em estudos de campo, a hibridação entre estas espécies foi confirmada com análises do DNA mitocondrial e microssatélites nucleares (Trigo 2008). O principal objetivo do presente trabalho é aprofundar a investigação dos processos de hibridação e introgressão entre estas duas espécies, incluindo aspectos como sua simetria e direcionalidade, bem como testar a viabilidade de utilização de múltiplos locos localizados no cromossomo X para diferenciar o compartilhamento de haplótipos por ancestralidade daquele resultante do processo de hibridação. Foram selecionados 43 indivíduos da espécie *L. geoffroyi* e 38 da espécie *L. tigrinus*, de regiões próximas (incluindo prováveis puros e híbridos) e também de regiões afastadas da zona de contato, além de seis *L. colocolo* utilizados como grupo externo para fins de comparação. Através da construção e análise de redes de haplótipos, foi possível identificar 38 híbridos, enquanto através da avaliação de blocos haplotípicos compartilhados, inferiu-se que este número pode chegar a mais de 53 indivíduos. Foi observada introgressão bidirecional e bastante assimétrica entre as espécies, corroborando a hipótese de que se trata de um processo atual e complexo em sua dinâmica. Além disso, um resultado importante deste estudo foi a demonstração de que o segmento analisado do cromossomo X apresenta poder informativo suficiente para identificar blocos haplotípicos ancestrais de cada uma das espécies envolvidas, o que abre caminho para análises genômicas mais aprofundadas deste processo de hibridação.

ABSTRACT

Hybridization in animal species has been observed with increasing frequency in nature, probably due to advances in molecular techniques, which have allowed accessing a wealth of information on the biology of living beings. The Neotropical felids *Leopardus geoffroyi* e *L. tigrinus* have essentially allopatric distributions, with a narrow contact zone that includes Rio Grande do Sul state, Brazil. Following initial suspicions raised by field studies, hybridization between these species was confirmed by the analysis of mitochondrial DNA and nuclear microsatellites (Trigo 2008). The main objective of this study was to clarify aspects related to hybridization and introgression between these species, including its symmetry and directionality, and also to test the application of multiple loci linked to the X chromosome to differentiate ancestral haplotype sharing from that resulting from the hybridization process. We selected 43 *L. geoffroyi* individuals and 38 *L. tigrinus* from regions that are near as well as outside the contact zone, in addition to six *L. colocolo* used as outgroups for comparison. Through the use of haplotype networks, it was possible to identify 38 hybrids, and based on shared haplotype blocks, we inferred that this number could reach more than 53 individuals. We observed bidirectional and quite asymmetric introgression between these species, corroborating the hypothesis that this is a current and complex hybridization process. In addition, an important result was the demonstration that the X chromosome segment analyzed here harbors sufficient information content to identify ancestral haplotypic blocks from each of the implicated species, opening up new avenues for in-depth genomic analyses targeting this hybridization process.

APRESENTAÇÃO

A hibridação pode ser definida como o cruzamento entre indivíduos pertencentes a espécies ou populações que sejam distinguíveis entre si por pelo menos um caráter hereditário. A hibridação pode levar à extinção de uma ou ambas as espécies parentais, e é possível que este problema esteja sendo subestimado (Rhymer & Simberloff 1996), e venha ocorrendo de forma crescente. Por outro lado, faz parte do processo evolutivo natural das espécies, podendo ocorrer devido ao isolamento reprodutivo incompleto, ou pelo contato secundário entre populações ou espécies que tenham divergido em alopatria (Allendorf & Luikart 2007).

Sendo assim, pode ser definida como intra- ou interespecífica. A hibridação intraespecífica tem um papel fundamental no processo evolutivo das espécies, sendo responsável por mantê-las unidas como unidades evolutivas (Mayr 1963). Com apenas um indivíduo migrante de um grupo para outro a cada geração, todos os alelos passam a ser encontrados em ambos, gerando diversidade genética e mantendo ao menos estável o tamanho efetivo de cada população (Allendorf & Luikart 2007). Já a hibridação e introgressão interespecíficas podem ser mais comuns do que se imagina. Muitas linhagens independentes são capazes de hibridizar por longos períodos de tempo sem comprometer sua individualidade fenotípica (Allendorf & Luikart 2007). Isto torna mais difícil sua detecção na natureza, e esta pode ser a causa da baixa prevalência percebida historicamente em animais.

Historicamente, acreditava-se que a taxa de hibridação em espécies animais era relativamente baixa quando comparada a espécies vegetais. Em plantas, é mais comum que a hibridação gere novas espécies por isolamento reprodutivo (Mayr 1942, Dobzhansky 1951). Já em animais é comum que a prole tenha menor valor adaptativo em relação às espécies parentais, o que atuaria como uma restrição seletiva intensa contra sua manutenção. Nas últimas décadas, com o avanço de técnicas moleculares, tem sido possível a verificação de uma maior ocorrência destes eventos em animais, que também podem gerar híbridos férteis capazes de cruzar entre si ou com uma ou ambas as espécies parentais.

Neste contexto, podemos citar alguns casos de hibridação entre espécies animais. Lecis *et al.* (2006) utilizaram locos de microssatélites ligados entre si para descrever a hibridação entre gatos selvagens europeus (*Felis silvestris silvestris*) e gatos domésticos (*Felis silvestris catus*) na Itália e Hungria, onde, respectivamente, 8% e 25-31% dos indivíduos analisados apresentaram

evidência de hibridação. Neaves *et al.* (2010) descreveram a hibridação e introgressão entre duas espécies de cangurus do leste (*Macropus giganteus*) e oeste (*Macropus fuliginosus*) da Austrália, através de marcadores de microssatélite e do DNA mitocondrial. Naquele estudo, 7,6% dos animais examinados apresentaram evidência de hibridação bidirecional, e foi constatada a ocorrência de híbridos férteis. VonHoldt *et al.* (2011) utilizaram dados genômicos para descrever a hibridação entre diversas espécies de canídeos parentes do lobo-cinza (*Canis lupus*) em todo o mundo. Foram descritos diferentes níveis de hibridação interespecíficos entre lobos-cinza, lobos-vermelhos, coiotes e lobos dos Grandes Lagos, o que dificulta decisões acerca de sua taxonomia, bem como a restauração e proteção de algumas espécies e populações ameaçadas contidas neste grupo. Trigo (2008) e Trigo *et al.* (em prep.) descreveram a hibridação entre diferentes espécies de felídeos neotropicais, especificamente *Leopardus tigrinus* e *L. colocolo* no centro-oeste do Brasil, e entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* no estado do Rio Grande do Sul. Este segundo caso representa um dos mais altos níveis de hibridação relatados até o momento para carnívoros (cerca de 34% dos indivíduos amostrados), evidenciando um alto nível de introgressão bidirecional entre as espécies.

Os felídeos *Leopardus tigrinus* e *L. geoffroyi* pertencem ao gênero *Leopardus* (Johnson *et al.* 2006), contido na família Felidae e na ordem Carnivora. O primeiro deles, conhecido como gato-do-mato pequeno, é menor (comprimento total entre 60 e 92 cm; peso entre 1,75 e 3,5 kg), tendo porte semelhante ao do gato doméstico, possui pelagem de fundo amarelado com manchas escuras e rosetas abertas, e tem sua distribuição geográfica desde o sul da América Central (Costa Rica) até o norte da Argentina e em grande parte do Brasil, até o centro do Estado do Rio Grande do Sul, onde ocorre em simpatria com a outra espécie da mesma linhagem, *Leopardus geoffroyi*, conhecido como gato-do-mato-grande. Esta, por sua vez, estende-se da Bolívia, Paraguai e norte da Argentina até o extremo sul do continente Americano, ocorrendo no Brasil somente na metade sul do Rio Grande do Sul. Maior e mais robusta do que *L. tigrinus* (comprimento total entre 70 e 110 cm; peso entre 2 e 6 kg), possui pelagem de tom acinzentado com manchas pretas sólidas (Oliveira & Cassaro 2005).

Segundo Trigo (2008), a hibridação entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* pode ter se originado de causas naturais, pela ocorrência de contato geográfico e ausência de isolamento reprodutivo total entre as espécies. Porém, o Estado do Rio Grande do Sul apresenta sua paisagem florística extremamente fragmentada e modificada por atividades humanas, como a agricultura e a pecuária (IBGE 1986, Rambo 1994), o que pode ter propiciado maior contato recente entre estas

espécies. Trigo (2008), Schneider (2009) e Trigo *et al.* (em prep.) investigaram este tema empregando marcadores de microssatélites nucleares, DNA mitocondrial, segmentos dos cromossomos X e Y, além de segmentos autossômicos, através dos quais foi possível detectar diversas combinações genéticas em diferentes marcadores, sugerindo um processo de hibridação recente, ou mais provavelmente atual. Contudo, um obstáculo que não pôde ser superado nestes estudos anteriores foi diferenciar o compartilhamento ancestral de haplótipos daquele resultante do processo de hibridação. Este problema dificulta a quantificação dos processos de hibridação e introgressão com base em sequências nucleares, bem como a estimativa da idade deste fenômeno. O presente trabalho visa a tentar resolver esta questão através de uma amostragem mais extensa e regular do cromossomo X, buscando avaliar se esta abordagem permite identificar blocos haplotípicos ancestrais de cada espécie, de forma a viabilizar uma inferência mais conclusiva dos compartilhamentos induzidos por hibridação e introgressão.

A dissertação será apresentada na forma de um artigo científico, o qual, após revisão e tradução para o inglês, será submetido ao periódico *Heredity*.

Estudo da hibridação entre dois felídeos do gênero *Leopardus* com base em múltiplos marcadores ligados ao cromossomo X

Livia M. Lehugeur, Alexandra Schneider, Tatiane C. Trigo e Eduardo Eizirik

Estudo da hibridação entre dois felídeos do gênero *Leopardus* com base em múltiplos marcadores ligados ao cromossomo X

Livia M. Lehueur¹, Alexandra Schneider¹, Tatiane C. Trigo² e Eduardo Eizirik^{1,3}

¹ Laboratório de Biologia Genômica e Molecular, Faculdade de Biociências, PUCRS. Av. Ipiranga 6681, prédio 12. Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil.

² Departamento de Genética, Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale – Bloco III, Av. Bento Gonçalves 9500 Porto Alegre, RS 91501970. Brasil.

³ Instituto Pró-Carnívoros, Atibaia, SP, Brasil.

RESUMO

A hibridação pode ser considerada um processo evolutivo capaz de levar à extinção uma ou ambas as espécies parentais envolvidas (Rhymer & Simberloff 1996), mas também pode ter um importante papel na geração de diversidade genética. Diferentes espécies ou populações são capazes de hibridizar por longos períodos de tempo sem perder suas características fenotípicas (Allendorf & Luikart 2007), o que torna difícil a detecção deste processo na natureza exclusivamente com base em caracteres morfológicos. Por isso, a utilização de marcadores moleculares tem sido uma importante ferramenta no estudo de tal fenômeno. Porém, quando o mesmo envolve espécies muito proximamente relacionadas, torna-se mais complexo desenvolvimento de marcadores moleculares diagnósticos, que possam viabilizar a identificação de caracteres ancestrais de cada táxon original. Aqui utilizamos diversos marcadores nucleares ligados ao cromossomo X, contidos em uma região de baixa recombinação, para investigar questões referentes à hibridação e introgressão gênica entre as espécies de felídeos Neotropicais *Leopardus geoffroyi* e *L. tigrinus*, com foco no Estado do Rio Grande do Sul. Sequências de DNA representando oito segmentos foram investigadas nestas espécies a fim de quantificar a hibridação, determinar sua simetria e avaliar a viabilidade de inferir-se a presença de blocos haplotípicos ancestrais de cada espécie, em uma escala de vários megabases. Foram

identificados ao menos 38 indivíduos de diferentes categorias híbridas, com evidências claras de introgressão gênica bidirecional, mas bastante assimétrica (mais introgressão evidente de *L. tigrinus* para *L. geoffroyi*). A inferência de tamanho dos blocos haplotípicos ancestrais remanescentes nos indivíduos híbridos sugere que se trata de um processo recente, e provavelmente atual, de miscigenação inter-específica. Além disso, tal análise demonstrou a viabilidade de se utilizar este segmento genômico para análises de ancestralidade neste sistema biológico, a fim de dissecar de forma mais aprofundada o processo de hibridação.

INTRODUÇÃO

Durante estudos de campo realizados no Estado do Rio Grande do Sul, entre 1993 e 2004 (Eizirik *et al.* 2006) constatou-se a ocorrência de indivíduos portadores de fenótipos intermediários entre as espécies *Leopardus tigrinus* e *Leopardus geoffroyi*, tanto em relação ao porte corporal como aos padrões de pelagem. Nesta ocasião, levantou-se a hipótese de ocorrência de hibridação entre elas, que mais tarde foi confirmada através da análise de marcadores de microssatélites, DNA mitocondrial, segmentos autossômicos e marcadores dos cromossomos X e Y (Trigo *et al.* 2008; Trigo *et al.* em prep.; Schneider 2009).

A vantagem da utilização de locos de microssatélite neste tipo de estudo consiste no fato de serem de herança biparental, altamente polimórficos, sendo suficientemente variáveis para permitir a identificação precisa de todos os indivíduos amostrados. Além disso, torna-se possível a realização de diversas análises estatísticas capazes de definir os indivíduos como pertencentes a uma ou mais populações de origem, no caso de serem híbridos (Hansen *et al.* 2000). Por sua vez, marcadores de sequência nucleares apresentam taxa de substituição relativamente mais lenta quando comparados aos microssatélites. Isto permite uma melhor identificação de possível monofilia das espécies, além de alelos diagnósticos de cada uma delas (Hare 2001).

Uma limitação compartilhada tanto por variantes de sequência nuclear quanto por microssatélites é a dificuldade de distinguir entre alelos compartilhados por introgressão e aqueles decorrentes de polimorfismo ancestral, que precede o evento de especiação entre os táxons envolvidos no processo de hibridação. Esta questão é fundamental para que se possa avaliar de forma detalhada os eventos subjacentes à hibridação, incluindo uma avaliação da magnitude e antiguidade do processo. Se por um lado locos de sequência nucleares reduzem o problema da homoplasia como uma fonte de ambiguidade, eles podem estar ainda mais propensos do que os

microssatélites a sofrerem com o problema da persistência de polimorfismos ancestrais, devido justamente às suas taxas mais lentas de substituição. Uma forma de potencialmente resolver este problema é a utilização de múltiplos segmentos nucleares ligados, incorporando vários sítios polimórficos em haplótipos integrados, que podem conter uma quantidade e qualidade de informação suficientes para distinguir compartilhamentos ancestrais de outros que sejam secundários. Estudos recentes sugerem que marcadores ligados entre si, em conjunto com análises estatísticas sofisticadas que modelam a dinâmica genômica da miscigenação, podem significativamente aumentar a detecção de indivíduos híbridos, quantificar o processo de hibridação, e caracterizar sua simetria e direcionalidade (Lecis *et al.* 2006; Verardi *et al.* 2006; Brown *et al.* 2010).

A identificação de híbridos pode ser dificultada quando as espécies parentais apresentam uma relação evolutiva próxima e não possuem marcadores genéticos claramente diagnósticos. Porém, a combinação de diferentes marcadores moleculares (ligados e não ligados) com diferentes propriedades mutacionais e demográficas (p.ex. microssatélites, sequências de autossomos e de cromossomos sexuais) possibilita dissecar as diferentes variáveis que afetam os padrões genéticos resultantes deste fenômeno. Neste sentido, a análise combinada de marcadores moleculares com diferentes formas de herança é importante para que se possa realizar análises de processos complexos atuantes sobre o genoma, como os decorrentes dos eventos de hibridação e introgressão (Eizirik *et al.* 2006).

Trigo *et al.* (2008) utilizaram segmentos do DNA mitocondrial (*mtDNA*) e nove microssatélites nucleares para demonstrar as primeiras evidências moleculares de hibridação entre as espécies *Leopardus tigrinus* e *L. geoffroyi*, na região central do Rio Grande do Sul. Naquele estudo foram identificados indivíduos com evidência de eventos recentes de hibridação, sendo possível a confirmação de alguns casos de introgressão genômica. Trigo *et al.* (2008) sugerem que, apesar das observações a partir dos dados dos microssatélites e *mtDNA* não mostrarem isto diretamente, é possível que a introgressão entre as espécies seja simétrica e bidirecional, e evidenciam a necessidade de se saber tratar-se de uma hibridação recente, que poderia ser consequência de ações humanas, ou uma hibridação bastante antiga, ocasionada por um contato secundário e facilitada pela ausência de isolamento reprodutivo entre as espécies.

Schneider (2009) caracterizou cinco locos localizados no cromossomo X, dois autossômicos e onze locos de microssatélites, a fim de quantificar o processo de hibridação e sua direcionalidade. Dos 68 indivíduos analisados, 48 foram identificados como híbridos. Inferiu-se

naquele estudo que o processo de hibridação é atual, com fluxo gênico assimétrico e bidirecional, com taxas de introgressão maiores de *L. tigrinus* para *L. geoffroyi*. A maior limitação encontrada por Schneider (2009) foi diferenciar o compartilhamento de haplótipos por ancestralidade e por hibridação.

Trigo *et al.* (em prep.) utilizaram segmentos dos cromossomos X e Y, *mtDNA* e dez locos de microssatélites para investigar este tema, sendo possível observar um alto índice de miscigenação entre as espécies *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* no Rio Grande do Sul. Foi possível verificar a ocorrência de diversas combinações genéticas nos diferentes marcadores moleculares, o que sugere a existência de um processo de miscigenação atual ou recente, com intensa introgressão bidirecional, sugerindo também a produção de uma prole viável e no mínimo parcialmente fértil, capaz de cruzar entre si e/ou com uma ou ambas as espécies parentais.

O presente estudo visa a aprimorar o conhecimento referente aos eventos de hibridação e introgressão entre *L. tigrinus* e *L. geoffroyi* no Rio Grande do Sul, e para isso foi realizada uma seleção criteriosa de indivíduos puros e híbridos a partir dos resultados dos estudos anteriores (considerando *mtDNA*, microssatélites e segmentos do cromossomo Y). Esta seleção teve por objetivo a melhor amostragem possível de todas as categorias híbridas existentes, a fim de se traçar um gradiente de miscigenação, com foco no cromossomo X. Além dos cinco segmentos localizados no braço longo do cromossomo X previamente analisados por Schneider (2009) e Trigo *et al.* (em prep.), expandimos a amostragem neste cromossomo, buscando identificar segmentos variáveis a cada 5 Mb, em regiões intercaladas com os marcadores previamente utilizados. A escolha desta região do cromossomo X, especificamente, foi devida às baixas taxas de recombinação observadas no gato doméstico (Schmidt-Küntzel *et al.* 2009), e da provável ligação entre os segmentos, que também foi testada neste estudo. Usualmente, segmentos nucleares curtos apresentam poucos sítios variáveis, sendo estes sob a forma de SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), e baixas taxas de substituição, dificultando assim a distinção entre casos de alelos compartilhados por introgressão daqueles decorrentes de polimorfismo ancestral. Por este motivo, buscamos a utilização de diversos segmentos nucleares ligados, incorporando vários SNPs em um mesmo haplótipo, para que uma maior quantidade e qualidade de informação sejam suficientes para distinguir entre introgressão e compartilhamentos que antecedem a especiação dos táxons envolvidos no processo de hibridação.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostragem

As amostras de *Leopardus tigrinus* e *L. geoffroyi* utilizadas neste estudo foram primeiramente analisadas por Trigo (2008), Schneider (2009) e/ou Trigo *et al.* (em preparação). Estes estudos identificaram os indivíduos como sendo de origem pura ou híbrida através da avaliação de diversos marcadores moleculares (microssatélites, mtDNA e segmentos dos cromossomos X e Y) conjuntamente com características morfológicas. No presente estudo, utilizamos os resultados obtidos por Trigo *et al.* (em preparação) para selecionar indivíduos que abrangessem da melhor forma possível um gradiente de miscigenação, desde aqueles com maior ancestralidade proveniente de *L. tigrinus* até outros com maior prevalência de segmentos genômicos oriundos de *L. geoffroyi*. Tal seleção teve como base os dados de microssatélites autossômicos (valores de 'q' obtidos na análise Bayesiana conduzida no programa Structure), bem como presença de haplótipos do cromossomo Y e DNA mitocondrial preliminarmente inferidos como sendo diagnósticos de cada espécie.

A partir destes resultados, foram selecionados 38 indivíduos morfológicamente identificados como *L. tigrinus*, sendo 28 considerados como provavelmente puros (ou seja, sem evidência molecular prévia de miscigenação), e 10 com evidências de uma origem híbrida. Para a população morfológicamente identificada como *L. geoffroyi*, foram selecionados 43 indivíduos, sendo 24 de origem provavelmente pura e 19 de provável origem híbrida. Todos os indivíduos híbridos selecionados são originários da zona de contato geográfico entre as espécies, localizada no Estado do Rio Grande do Sul (RS), enquanto que os indivíduos puros são provenientes de regiões próximas da zona de contato (ou seja, dentro do RS), ou de regiões mais distantes (fora do RS) (Fig. 1). Além das amostras de *L. geoffroyi* e *L. tigrinus* (Tabela 1, A e B, respectivamente), também foram selecionados seis indivíduos da espécie *L. colocolo* como grupo externo para fins de comparação. As amostras utilizadas foram obtidas de animais mantidos em cativeiro com origem geográfica conhecida, animais atropelados encontrados mortos em estradas e animais capturados em campo por diversos colaboradores. As amostras são provenientes de tecido sanguíneo (mantido em uma solução saturada de sal [Tris 100mM, EDTA 100mM, SDS 2%]) ou muscular (preservado em etanol 95%). A extração de DNA total das amostras foi realizada seguindo o protocolo padrão de fenol/clorofórmio de Sambrook *et al.* (1989), ou empregando o kit QIAmp DNeasy Blood/Tissue (Qiagen).

Marcadores Moleculares

Os marcadores utilizados neste estudo foram inicialmente selecionados com base nos resultados obtidos em estudos anteriores, especialmente Trigo *et al.* (em prep.) e Schneider (2009). No estudo de Schneider (2009) foram selecionados marcadores fisicamente próximos entre si, contidos em uma região do cromossomo X que apresenta baixas taxas de recombinação no gato doméstico (Schmidt-Küntzel *et al.* 2009). Cinco segmentos presumivelmente ligados entre si e previamente analisados Schneider (2009) e Trigo *et al.* (em prep.) foram incluídos neste estudo, sendo eles: exon 3 do gene *ATPase, Cu⁺⁺ transporting alpha polypeptide (ATP7A)*, intron 16 do gene *Bruton agammaglobulinemia tyrosine kinase (BTK)*, introns 2 e 5 do gene *Proteolipid Protein 1 (PLP1)* e intron 3 do gene *Biglycan (BGN)*, localizado em uma região mais distante do cromossomo X. Cabe mencionar que o estudo de Trigo *et al.* (em prep.) analisou apenas os segmentos *PLP1* (intron 2) e *BTK*, enquanto que o de Schneider (2009) incluiu os cinco marcadores, porém em um número menor de indivíduos (sem aplicar um critério tão detalhado de seleção quanto o do presente estudo, no sentido de cobrir de forma mais completa o gradiente de hibridação).

Além dos marcadores previamente utilizados, focamos nossos esforços em realizar uma melhor amostragem da mesma região do cromossomo X, buscando identificar segmentos potencialmente informativos, distando 5 Mb entre si, com base na anotações do genoma do gato doméstico disponíveis na plataforma *Felis catus Genome Annotation Resource Field v12.2: GARField* (Pontius & O'Brien 2007, <http://lgd.abcc.ncifcrf.gov/cgi-bin/gbrowse/cat/>). Foram selecionados 15 segmentos (Tabela 2), e para cada um deles foi desenhado um par de *primers* (*forward* e *reverse*), com auxílio do programa *Primer3* (Rosen *et al.* 2000; <http://frodo.wi.mit.edu/>), anelando preferencialmente em regiões de blocos de sequência conservados (de acordo com GARField). A amplificação destes segmentos foi testada em 2 a 4 indivíduos representantes de cada uma das espécies, *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, e posteriormente sequenciados para verificação da existência de *SNPs* (Tabela 3). Visto que as duas espécies têm uma relação evolutiva próxima, era esperado encontrar pouca ou nenhuma variação. Assim, focamos nosso estudo naqueles segmentos claramente variáveis nesta amostragem inicial, dando ainda prioridade àqueles apresentando sítios provavelmente diagnósticos das duas espécies. Através desse processo foram selecionados três novos segmentos (*LOC728849*, *CYLC1* e *FAM70A*) que, somados aos marcadores utilizados em estudos anteriores (Schneider 2009 e Trigo *et al.* em prep.), forneceram os 8 segmentos – localizados em uma região de aproximadamente 70Mb no cromossomo X – analisados no presente estudo. Além dos marcadores de sequência, informações provenientes do DNA mitocondrial, segmentos do cromossomo Y e 11 locos de microssatélites

caracterizados previamente por nosso grupo de pesquisa (Trigo et al. 2008, Trigo et al. em preparação) foram incluídos de forma comparativa neste estudo para permitir uma inferência mais completa sobre os eventos de hibridação.

Todos os segmentos nucleares foram amplificados por PCR (*Polymerase Chain Reaction*, Palumbi 1996) utilizando *primers* já descritos ou desenhados ao longo deste estudo. As reações de PCR foram realizadas em um volume final de 20µL, contendo tampão de PCR 1X, 2.0 – 2.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 0.2 – 0.3U de Taq Platinum (Invitrogen), 0.2 µM de cada *primer* e 10 – 50 ng de DNA. As condições para amplificação dos segmentos *ATP7A*, *BTK*, *PLP1-I2*, *LOC728849*, *CYLC1* e *FAM70A* foram as mesmas, e as dos segmentos *PLP1-I5* e *BGN* diferiram daquelas pelas temperaturas de anelamento e pelo número de ciclos de *touchdown* (Tabela 4). A adição de Betaína (1M) foi utilizada para eliminar bandas espúrias, otimizando eficiência e especificidade nos segmentos *ATP7A*, *PLP1-I5*, *BGN*, *LOC728849*, *CYLC1* e *FAM70A*.

Os produtos de PCR obtidos foram verificados através de eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed 10.000X e BFB, e quantificados de acordo com o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder* (Invitrogen), sendo visualizados em transiluminador de luz ultravioleta. Os produtos foram então purificados utilizando-se as enzimas *exonuclease I* (EXO I) e *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP), e sequenciados com sequenciadores automáticos ABI 3730xl e ABI 3700. As sequências geradas foram visualizadas com os programas Geneious R6 (Biomatters <http://www.geneious.com>) e Mega v5 (Tamura *et al.* 2011), alinhadas com o algoritmo CLUSTALW (Thompson *et al.* 1994) executado no programa Geneious R6, e editadas manualmente quando necessário.

Análise das Sequências de DNA

Os sítios heterozigóticos foram identificados quando dois nucleotídeos estavam presentes na mesma posição do alinhamento em ambas as fitas (*forward* e *reverse*), com o pico mais fraco alcançando no mínimo 50% da altura do pico mais forte. A fase gamética foi determinada para as fêmeas, devido a estado diploide somente nestas, utilizando o algoritmo PHASE implementado no programa DnaSP 5.10 (Librado & Rozas 2009), a partir do modelo de recombinação, para dados bialélicos. A inferência de fase gamética foi realizada para cada um dos oito segmentos individualmente, e para todos os segmentos concatenados.

Os haplótipos de cada segmento foram inferidos com o programa DnaSP 5.10. Utilizando o programa Network 4.611 (<http://www.fluxus-engineering.com/>), foram construídas redes de

haplótipos através do método *median-joining* (Bandelt *et al.* 1999) para cada segmento separadamente, e a seguir para os segmentos concatenados. Uma análise adicional dos segmentos concatenados foi realizada excluindo-se o segmento mais distante BGN (ver Resultados). Os haplótipos foram coloridos de acordo com o fenótipo de cada indivíduo e informações prévias de outros segmentos (microsatélites, mtDNA, cromossomo Y e autossomos) que classificam os indivíduos como sendo puros ou híbridos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Foram amplificados 4860pb de oito segmentos distintos do cromossomo X (Tabela 5). Ao todo, foram identificados 48 sítios variáveis, sendo o segmento *BTK* o menos variável, com apenas 3 SNPs, e *FAM70A* o mais variável, com 18 SNPs. A seguir serão descritos os resultados obtidos para cada um dos segmentos analisados.

LOC728849

Foram sequenciados 683pb do segmento *LOC728849* para 38 indivíduos morfológicamente pertencentes à espécie *L. geoffroyi*, sendo 27 machos (M) e 11 fêmeas (F), 30 indivíduos da espécie *L. tigrinus* (20M e 10F) e quatro *L. colocolo* (3M e 1F). Este segmento apresentou cinco sítios variáveis, sendo um deles uma deleção de 32 nucleotídeos. Para a geração de redes de haplótipos, estes 32 nucleotídeos foram substituídos pelo nucleotídeo “A” quando presentes, e pelo nucleotídeo “C” quando ausentes (tendo em vista que o algoritmo não permite a modelagem de polimorfismos de inserção/deleção). Os sítios variáveis deram origem a cinco haplótipos (Fig. 4A), sendo dois deles exclusivos de *L. colocolo* (H4 e H5). O haplótipo H2 apresentou-se mais frequente em *L. tigrinus* (40 cromossomos), estando presente em 12 *L. geoffroyi*, sendo 10 destes previamente identificados como híbridos através de outros marcadores (microsatélites, mtDNA, cromossomo Y e/ou segmentos autossômicos). O indivíduo de *L. geoffroyi* previamente considerado puro encontrado neste haplótipo foi bLge10. O haplótipo H1 é exclusivo de *L. geoffroyi*, e já o H3 apresentou-se em maior frequência na espécie *L. geoffroyi*, e em apenas um indivíduo da espécie *L. tigrinus* (bLti05, proveniente do RS), sendo que este havia sido previamente identificado como híbrido. Curiosamente, o que separa este indivíduo dos demais da sua espécie, é a deleção dos 32 pares de base. Este pequeno fragmento consiste de uma duplicação de parte do cromossomo com a substituição de uma base (C-A) em uma das cópias, ocorrida anteriormente

à divergência desta linhagem em relação ao gato doméstico. Esta duplicação foi posteriormente perdida na espécie *L. geoffroyi*.

ATP7A

Foram analisados 385pb do terceiro exon do gene *ATP7A* de 41 *L. geoffroyi* (29M e 12F), 36 *L. tigrinus* (24M e 12F) e 6 *L. colocolo* (5M e 1F). Foram identificados quatro sítios polimórficos, que constituíram sete haplótipos. Na construção da rede de haplótipos, alguns deles foram unidos (H1+H5 e H4+H6) por não apresentarem qualquer diferença ao desconsiderarmos os dados faltantes (Ns), resultando em cinco haplótipos distintos (Fig. 4B). Um deles (H7) é exclusivo de um indivíduo da espécie *L. colocolo*. O haplótipo H3 é compartilhado pelas três espécies, sugerindo que este seja o haplótipo ancestral das mesmas, embora bem mais frequente em *L. geoffroyi*. O haplótipo H1, mais frequente em *L. tigrinus*, está presente em 11 indivíduos da espécie *L. geoffroyi*, sendo a maioria deles previamente identificados como híbridos, com exceção de bLge10. Este mesmo indivíduo também apresentou um haplótipo não esperado para o seu grupo fenotípico no segmento acima (*LOC728849*), sugerindo que seja um híbrido não identificado como tal até o momento pelos outros marcadores (microsatélites, mtDNA e cromossomo Y). O haplótipo H4 é compartilhado por três *L. tigrinus* puros e um indivíduo de *L. geoffroyi* (bLge10, evidenciando mais uma vez tratar-se de um indivíduo híbrido). Já o haplótipo H2 é exclusivo de um indivíduo *L. geoffroyi* (bLge08, proveniente do RS), sendo este identificado como híbrido através de outros marcadores moleculares.

CYLC1

O segmento do gene *CYLC1* (*Cylicin-1*) obtido foi de 677 pares de base, a partir de 42 indivíduos da espécie *L. geoffroyi* (31M e 11F), 38 *L. tigrinus* (25M e 13F) e seis *L. colocolo* (5M e 1F). Foram identificados 11 sítios variáveis, sendo um deles uma inserção/deleção de três pares de base. Para a geração de rede de haplótipos, a presença dos três pares de base foi substituída pelo nucleotídeo "C", e a ausência (*gaps*) foi representada por um "A". Primeiramente, o indivíduo bLge41 distou ao menos seis passos mutacionais de outros haplótipos, indicando que possa ter havido alguma contaminação na amostra utilizada. Este foi então excluído desta análise. Assim, foram definidos sete haplótipos, sendo alguns deles unidos (H6+H3) por não apresentarem nenhuma diferença desconsiderando-se dados faltantes (Ns), originando então seis haplótipos distintos (Fig. 4C). Dois destes (H1 e H2) são exclusivos de *L. colocolo*. O haplótipo H4, mais comum em *L. tigrinus*, foi apresentado em 14 *L. geoffroyi*, sendo dois deles considerados puros até o

momento (bLge10 e blge70). Um deles (bLge10) já apresentou indícios de hibridação nos marcadores acima, sendo sugerido mais uma vez pelo segmento *CYLC1* que apresenta partes do seu genoma provenientes de *L. tigrinus*. O haplótipo H7 aparece como uma reticulação entre os haplótipos H3 e H4, sendo representado por apenas um cromossomo de um único indivíduo (bLti143), uma fêmea considerada pura até então, única heterozigota para a inserção/deleção. Esta reticulação sugere um evento de recombinação, pois a fêmea apresenta no mesmo cromossomo um dos alelos deste segmento associado a *L. tigrinus* e outro associado a *L. geoffroyi*. O haplótipo H3 foi representado em maior frequência em *L. geoffroyi*, mas também incluiu sete indivíduos de *L. tigrinus*, sendo bLti68, bLti75 e bLti133 considerados puros até o momento. O haplótipo H5 ocorreu exclusivamente em um indivíduo de *L. geoffroyi* considerado previamente como híbrido (bLge46).

BTK

Os 550 pares de base de 43 indivíduos de *L. geoffroyi*, 38 *L. tigrinus* e 5 *L. colocolo* foram obtidos de um estudo prévio (Trigo *et al.* em prep.), reanalisados aqui em conjunto com os outros segmentos. Para estes indivíduos, foram encontrados três sítios variáveis que deram origem a quatro haplótipos (Fig. 4D). Um deles (H4) é exclusivo da espécie *L. colocolo*. Outro (H3) é exclusivo de dois indivíduos puros da espécie *L. tigrinus* (bLti61 e bLti97), provenientes de São Paulo e Espírito Santo, respectivamente. Os outros dois haplótipos são compartilhados entre as espécies *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*. Pela grande maioria dos indivíduos portando o haplótipo H2, assumimos que este seja o haplótipo original de *L. tigrinus*, sendo amostrado também em 12 *L. geoffroyi*, a maioria destes previamente identificados como híbridos, com exceção de bLge10 que, assim como em todos os marcadores acima, apresenta evidências de hibridação. Quatro *L. tigrinus* apresentaram o haplótipo mais frequente de *L. geoffroyi* (H1), sendo dois deles anteriormente identificados como híbridos, e os outros dois puros (bLti68 e bLti143). O indivíduo bLti68 também apresentou um haplótipo não esperado para o seu grupo fenotípico no segmento *CYLC1*, e neste mesmo segmento o indivíduo bLti143 apresentou um haplótipo recombinante entre outros dois, aumentando assim as evidências de que tratem-se de híbridos não identificados anteriormente com outros marcadores.

PLP1 intron 2

As sequências de 880 pares de base deste segmento, representando 43 indivíduos da espécie *L. geoffroyi* (31M e 12F), 38 *L. tigrinus* (25M e 13F) e 5 *L. colocolo* (4M e 1F) foram oriundas de um estudo prévio (Trigo *et al.* em prep.). Oito sítios polimórficos deram origem a oito haplótipos (Fig. 4E), sendo dois deles (H5 e H6) encontrados apenas em *L. colocolo*. O haplótipo H4 é exclusivo de três indivíduos da espécie *L. geoffroyi* (bLge28, bLge46 e bLge62). Os outros três haplótipos (H1, H2 e H3) são compartilhados entre *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*. Quatro *L. tigrinus* portaram o haplótipo mais frequente de *L. geoffroyi* (H1), sendo bLti68 e bLti143 previamente presumidos como sendo puros. Assim como nos segmentos *CYLC1* e *BTK*, temos aqui mais uma evidência de hibridação destes indivíduos. Três *L. geoffroyi* foram representados em um haplótipo mais frequente em *L. tigrinus* (H3), sendo bLge10 considerado puro previamente. Como vimos nos marcadores descritos acima, este indivíduo consistentemente apresenta um haplótipo inesperado para o seu fenótipo. Dez *L. geoffroyi* (todos híbridos) apresentaram o haplótipo H2, também mais frequente em *L. tigrinus*.

PLP1 intron 5

Quinhentos e noventa (590) pares de base do quinto intron do gene *PLP1* foram sequenciados a partir de 43 *L. geoffroyi* (31M e 12F), 38 *L. tigrinus* (25M e 13F) e 6 *L. colocolo* (5M e 1F). Seis haplótipos foram determinados por sete sítios polimórficos (Fig. 4F), sendo dois deles (H5 e H6) exclusivos de *L. colocolo*. Os haplótipos H1+H3 e H2+H4 foram agrupados ao desconsiderarmos os dados faltantes (Ns). Os dois haplótipos distintos resultantes destes são compartilhados pelas espécies *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*. Treze *L. geoffroyi* apresentaram o haplótipo mais frequente de *L. tigrinus* (H2), sendo a maioria deles previamente identificada como sendo híbridos (todos provenientes do RS) e apenas bLge10 previamente tido como puro. Este mesmo indivíduo também apresenta haplótipos inesperados para o seu fenótipo nos segmentos acima descritos, evidenciando mais uma vez tratar-se de um indivíduo híbrido. O haplótipo mais frequente em *L. geoffroyi* (H1) também foi registrado em três indivíduos da espécie *L. tigrinus* [sendo um considerado anteriormente como sendo híbrido (bLti05) e dois puros (bLti68 e bLti143)]. Estes considerados puros pelos dados de microssatélites, mtDNA e cromossomo Y também foram representados em haplótipos inferidos como tendo origem em *L. geoffroyi* nos segmentos *LOC728849*, *ATP7A*, *CYLC1*, *BTK* e intron 2 do *PLP1*, apresentando portanto forte evidência de hibridação.

FAM70A

Foram sequenciados 569 pares de base do segmento *FAM70A*, a partir de 39 indivíduos pertencentes à espécie *L. geoffroyi* (28M e 11F), 32 *L. tigrinus* (21M e 11F) e cinco *L. colocolo* (4M e 1F). Este segmento mostrou-se altamente variável, sendo identificados 18 sítios polimórficos. Assim como no segmento *CYLC1*, o indivíduo bLge41 mostrou-se distante por pelo menos 8 passos mutacionais de outros haplótipos, sendo assim excluído desta análise (por tratar-se presumivelmente de contaminação com DNA de outra espécie, ou amplificação de um segmento parálogo). Foram identificados doze haplótipos distintos (Fig. 4G), sendo três destes (H10, H11 e H12) exclusivos dos indivíduos da espécie *L. colocolo*. Os haplótipos H3 e H7 são exclusivos dos indivíduos bLge09 e bLge78, respectivamente, provenientes da Argentina e Rio Grande do Sul. O haplótipo H1, mais frequente em *L. geoffroyi*, foi observado em nove *L. tigrinus*, sendo bLti94 e bLti143 previamente puros. O indivíduo bLti143 parece mesmo tratar-se de um híbrido como ilustrado nos segmentos acima; já o indivíduo bLti94 é inconclusivo no momento, considerando apenas um segmento. O haplótipo H2 aparece com maior frequência em *L. tigrinus*, sendo apresentado também por oito *L. geoffroyi*, sendo a maioria destes híbridos, com exceção de bLge10 (que apresenta evidências nos marcadores acima) e bLge47. Os haplótipos H5 (bLge32 e bLge52) e H6 (bLge33) aparecem como reticulações entre os haplótipos H1 e H2, podendo representar eventos de recombinação nestes indivíduos. Os haplótipos H8 e H9 são exclusivos de *L. tigrinus* puros. Já o haplótipo H4 é compartilhado por um *L. geoffroyi* previamente sem indício de hibridação (bLge10, que neste marcador tem seu outro cromossomo associado ao haplótipo de *L. tigrinus*), dois *L. tigrinus* previamente tidos como híbridos (bLti01 e bLti09) e um *L. tigrinus* previamente considerado puro (bLti80).

BGN

Foram sequenciados 595 pares de base do segmento *BGN* a partir de 30 *L. geoffroyi* (23M e 7F), 30 *L. tigrinus* (19M e 11F) e seis *L. colocolo* (5M e 1F), sendo a maioria destas sequências oriundas de um estudo anterior (Schneider 2009), complementadas e reanalisadas aqui. O segmento *BGN* mostrou-se altamente variável, com 12 sítios polimórficos. Porém, diversas sequências apresentaram dados faltantes (Ns), e por este motivo alguns sítios precisaram ser excluídos das análises. Ainda assim, foram determinados oito haplótipos distintos considerando-se os sete sítios polimórficos restantes (Fig. 4H), sendo dois deles (H1 e H2) exclusivos de *L. colocolo*. Os haplótipos H3 e H8 são exclusivos de um *L. geoffroyi* (bLge01, híbrido) e um *L. tigrinus* (bLti97, puro), respectivamente. O haplótipo H5, mais frequente em *L. geoffroyi*, foi também amostrado

em três *L. tigrinus*, sendo um deles (bLti46) previamente considerado puro. O haplótipo H6 aparece como uma reticulação entre H4 e H5, representando dois *L. tigrinus* híbridos (bLti09 e bLti49), dois *L. geoffroyi* puros (bLge33 e bLge71) e um *L. geoffroyi* híbrido (bLge74), aparentando ser um haplótipo recombinante. O haplótipo H7 também apresenta uma reticulação entre H4 e H5, representado apenas por indivíduos considerados híbridos (bLge74, bLti09 e bLti49), o que também sugere recombinação. Já o haplótipo H4 é compartilhado por *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, sendo mais frequente na primeira espécie. Neste estão presentes 22 *L. geoffroyi*, sendo a maioria deles considerados previamente como puros (bLge09, bLge10, bLge20, bLge29, bLge31, bLge36, bLge41, bLge52, bLge62, bLge64 e bLge87).

Alguns indivíduos considerados puros com base nos estudos anteriores foram recorrentemente associados a haplótipos distintos daqueles esperados para o seu grupo fenotípico, estando dentre estes os seguintes indivíduos: bLge10, bLge47, bLti46, bLti68 e bLti143. Outros indivíduos foram associados a um haplótipo distinto do esperado para o seu fenótipo em apenas um segmento: bLge70, bLti 75, bLti94 e bLti133. Estes dados podem sugerir que os marcadores utilizados até o momento não estivessem detectando todos os eventos de hibridação, e não sendo totalmente eficazes em distinguir indivíduos puros de indivíduos híbridos retrocruzados. Para refinar o poder informativo destes segmentos, os mesmo foram concatenados, assumindo-se ligação gênica entre eles. Análises posteriores (ver abaixo; Fig. 5) visaram a testar se trata-se realmente de um único bloco haplotípico ou se o mesmo deve ser subdividido em blocos menores onde não haja evidência de recombinação.

Segmentos Concatenados

Os oito segmentos concatenados resultaram em um alinhamento de 4860 pares de base, composto por 80 cromossomos provenientes de 32 *L. geoffroyi* (23M e 9F), 26 *L. tigrinus* (17M e 9F) e três *L. colocolo* (2M e 1F), onde foram observados 48 sítios variáveis. Excluindo-se dois sítios que continham dados faltantes (Ns), foram determinados 40 haplótipos distintos (Fig. 4I). A partir da rede de haplótipos gerada, pode-se observar *L. colocolo* como o grupo mais divergente, com pelo menos 22 passos mutacionais separando-o das outras espécies, coincidindo com a filogenia atual do grupo (Johnson *et al.* 2006). Não observou-se inicialmente uma separação clara entre os grupos *L. tigrinus* e *L. geoffroyi*, e o ramo de *L. colocolo* não conectou-se ao ponto onde estas duas linhagens se encontram, como seria esperado. Porém, pudemos observar dois agrupamentos distantes um do outro por sete passos mutacionais, estando um cromossomo de um indivíduo *L. tigrinus* presente no meio deste ramo (bLti143). Nenhum indivíduo de *L. tigrinus* foi amostrado no

grupamento de *L. geoffroyi*. Por outro lado, alguns indivíduos de *L. geoffroyi* estão presentes no grupo *L. tigrinus*. São eles (categorização prévia indicada entre parênteses): H10 – bLge12 (híbrido); H2 – bLge02 e bLge13 (híbridos); H7 – bLge10 (puro); H8 – bLge10 (puro); H4 – bLge05 (híbrido); H18 – bLge42 (híbrido); H3 – bLge04 (híbrido) e H14 – bLge32 (híbrido). É importante ressaltar que muitos indivíduos foram retirados desta análise por apresentarem segmentos faltantes (especialmente no segmento *BGN*).

Por este motivo, e pelas evidências das altas taxas de recombinação entre o segmento *BGN* e os demais, foi realizada uma segunda análise baseada em rede de haplótipos excluindo-se o segmento *BGN*. Além de reduzir o impacto dos episódios de recombinação, esta remoção do segmento *BGN* permitiu também a inclusão de um maior número de indivíduos na análise. Neste caso, foi utilizado um alinhamento de 4264 pares de base, para 32 *L. geoffroyi* (23M e 9F), 28 *L. tigrinus* (19M e 9F) e três *L. colocolo* (2M e 1F). Foram determinados 27 haplótipos a partir de 36 sítios polimórficos (Fig. 4J), sendo quatro destes exclusivos de *L. colocolo*, com pelo menos 18 passos mutacionais separando-os dos demais. Neste caso observou-se uma separação muito clara (com cinco passos mutacionais) entre os clados de *L. geoffroyi* e *L. tigrinus*, e o enraizamento destes pela espécie *L. colocolo* ocorreu no ramo central, como esperado. No clado de *L. geoffroyi* foram amostrados dois indivíduos de *L. tigrinus*: bLti05 (previamente híbrido) no haplótipo H9 e bLti143 (previamente puro) no haplótipo H20. Já no clado de *L. tigrinus* foram amostrados diversos *L. geoffroyi*: H8 – bLge12 (híbrido); H2 – bLge02, bLge07, bLge13 e bLge42 (todos considerados previamente híbridos); H11 – bLge32 (híbrido); H17 – bLge79; H3 – bLge04 e bLge05 (ambos híbridos); H5 – bLge10 (puro) e H6 – bLge10 (puro). Todos estes indivíduos que aqui aparecem inseridos no clado inverso ao da sua espécie fenotípica apresentaram evidência de introgressão nos marcadores quando analisados separadamente.

Curiosamente, o fluxo gênico parece ser mais intenso em uma direção, com mais segmentos de *L. tigrinus* introgrididos em *L. geoffroyi* do que vice-versa. Esta observação poderia ser explicada pela maior abundância de uma das espécies na região de contato entre elas, mas observações de campo realizadas até o momento não sugerem tal tipo de desigualdade no local (dados não publicados). Outro fator que poderia gerar fluxo gênico aparentemente desigual seria um viés na categorização fenotípica dos indivíduos híbridos durante sua identificação, caso a maior parte dos híbridos fosse categorizada como *L. geoffroyi*. Uma terceira possível causa para esta observação seria que os indivíduos híbridos realmente se assemelhassem mais à espécie *L. geoffroyi* do que a *L. tigrinus*. Porém, estes desvios também não parecem ser reais, tendo em vista

a análise de diversos caracteres morfológicos e de pelagem realizada por Trigo (2008) de indivíduos puros e híbridos, que demonstra estar usualmente correta a categorização fenotípica dos indivíduos no momento da sua identificação.

Inferência de Blocos Haplotípicos

Indivíduos híbridos apresentam partes do seu genoma oriundas de ambas as espécies parentais, contendo uma mistura de alelos de cada uma delas. Tratando-se do cromossomo X, as fêmeas híbridas de F1 apresentam uma cópia do cromossomo de cada uma das espécies parentais, enquanto que os machos apresentam somente uma cópia íntegra da espécie materna. Na geração F2, ocorrendo um mínimo de um episódio de recombinação, as fêmeas poderão apresentar dois ou mais “blocos” em cada cromossomo X, enquanto que nos machos este padrão também poderá ocorrer na única cópia do cromossomo X que cada um deles possui. A cada nova geração de cruzamentos entre híbridos e/ou retro-cruzamentos, mais episódios de recombinação serão esperados. O que isto significa é que um fluxo gênico recente tende a ocasionar a presença de blocos relativamente maiores, ao passo que quanto mais antigo o processo de hibridação, menores serão estes blocos. Para tentarmos avaliar o tamanho dos blocos haplotípicos presentes nos indivíduos amostrados, foi realizada uma composição visual manualmente, de todos os 44 sítios variáveis presentes em todos os segmentos concatenados utilizados neste estudo. Primeiramente, foram analisados todos os SNPs (Fig. 5A e B), coloridos de acordo com a frequência geral em ambas as espécies (preto para o alelo mais frequente e cinza para o menos frequente). Esta figura, em um primeiro momento, pode não parecer muito elucidativa, pois nela estão representadas as mutações recorrentes, além das mutações fixadas que são capazes de identificar as espécies. A partir daí, pudemos separar os SNPs com alelos considerados fixados em cada uma das espécies, pois são estes os realmente informativos capazes de nos mostrar mais claramente os blocos haplotípicos. Foram então selecionados 16 SNPs, e estes foram coloridos de acordo com o diagnóstico das espécies [vermelho para os alelos considerados “fixados” em *L. tigrinus* e azul para os “fixados” em *L. geoffroyi* (Fig. 5C e D)]. Um destes sítios parece não estar fixado na espécie *L. tigrinus* e por este motivo foi desconsiderado na inferência de origem pura ou híbrida dos indivíduos. A partir desta figura, pudemos finalmente visualizar os blocos haplotípicos remanescentes, resultado de diversos eventos de hibridação e recombinação. Pudemos observar blocos de menos de um Megabase (Mb) até aproximadamente 10 Mb. Também pudemos verificar a existência de pelo menos 16 blocos haplotípicos distintos, número que provavelmente aumentaria se tivéssemos mais segmentos amostrados ao longo do cromossomo. Uma observação

interessante é que, a partir desta análise, conseguimos identificar muito mais indivíduos híbridos do que com as análises computacionais realizadas previamente. Dos 43 *L. geoffroyi*, teríamos apenas 6 puros em nossa amostra (86% seriam híbridos), e dos 38 *L. tigrinus*, 17 puros (55% seriam híbridos). Os indivíduos considerados puros até o momento, que nesta análise aparecem como híbridos são: bLge09, bLge10, bLge20, bLge29, bLge31, bLge33, bLge36, bLge41, bLge47, bLge52, bLge62, bLge64, bLge70, blge71, bLge77, bLge85, bLge87, bLti46, bLti48, bLti56, bLti68, bLti75, bLti94, bLti99, bLti113, bLti117, bLti133 e bLti143. A identificação de um maior número de indivíduos com inferência de hibridação em uma análise manual pode se dever à dificuldade de programas computacionais em diferenciar mutações recorrentes daquelas fixadas nas distintas espécies, o que pode ser realizado pela análise visual da frequência dos alelos, e do conhecimento prévio de indivíduos provavelmente puros ou híbridos.

Pudemos observar também que a região contida entre os segmentos *FAM70A* e *BGN* (de aproximadamente 32Mb) parece ser uma região de alta recombinação, uma vez que grande parte dos indivíduos apresenta uma “quebra” de bloco haplotípico neste ponto. O mesmo acontece dentro do segmento *BGN*, onde também grande parte dos indivíduos parece ter sofrido um ou mais eventos de recombinação. É importante ressaltar que o tamanho dos blocos ancestrais aqui considerados está provavelmente sendo superestimado, pois episódios de recombinação envolvendo segmentos intercalados entre os nossos marcadores não poderiam ser detectados. Assumindo que ocorra ao menos um episódio de recombinação no segmento genômico analisado a cada geração, a detecção de 16 blocos distintos sugere que a hibridação entre as espécies *L. geoffroyi* e *L. tigrinus* no Estado do Rio Grande do Sul venha ocorrendo há cerca de 17 gerações. Este número pode ser muito maior, caso o segmento apresente taxas de recombinação mais baixas do que um evento por geração. Isto é uma hipótese plausível, visto que esta região apresenta baixas taxas de recombinação no gato doméstico (Schmidt-Küntzel *et al.* 2009), o que pode ser ainda exacerbado no contexto da meiose de indivíduos híbridos. Estudos futuros, que incorporem informações sobre a taxa de recombinação deste segmento nas populações envolvidas, poderão estender as inferências aqui apresentadas, estimando de forma mais precisa a idade deste processo de introgressão recíproca.

CONCLUSÕES

A análise de múltiplos locos nucleares vem se mostrando uma importante ferramenta no estudo de relações evolutivas entre espécies. No presente estudo, demonstrou ser uma

abordagem bastante eficiente para investigar informações referentes ao processo de hibridação entre duas espécies de felídeos neotropicais. Com a utilização de diversos segmentos proximamente localizados, foi possível realizar pela primeira vez uma estimativa do número e tamanho dos blocos haplotípicos gerados por este processo em uma região genômica, assim como observar a ocorrência de fluxo gênico (introgressão) bastante assimétrico entre as espécies.

Uma das maiores dificuldades encontradas até agora, de identificar se o compartilhamento de haplótipos é ancestral ou devido ao processo de hibridação, pode ser parcialmente resolvida aqui, devido a um maior número de SNPs analisados em uma mesma região genômica. A presença de compartilhamento essencialmente em indivíduos oriundos de regiões próximas à zona de contato sugere que este seja ocasionado por um contato secundário entre as espécies, enquanto que um compartilhamento ancestral seria esperado em todos os indivíduos, incluindo-se aqueles de regiões mais afastadas da zona de contato. Além disso, a estrutura da rede de haplótipos gerada neste estudo com base nos dados concatenados (Figura 4J) corrobora esta inferência, já que há uma clara formação de clados distintos, cada um deles predominando em uma das espécies, mas incluindo também indivíduos do outro táxon (frequentemente em posições internas, implicando tratar-se de haplótipos recentes, surgidos após a divergência inicial dos clados). Por fim, tal interpretação é também reforçada pela evidência independente de hibridação (com base em segmentos genômicos distintos, como mtDNA, microssatélites e cromossomo Y) envolvendo muitos dos indivíduos aqui observados como contendo blocos haplotípicos com origem na outra espécie envolvida no processo.

Outro ponto relevante foi a constatação de introgressão de segmentos genômicos em ambas as espécies, ou seja, bidirecionalmente, porém com uma grande assimetria, havendo um maior número de indivíduos fenotipicamente associados à espécie *L. geoffroyi* que apresentaram introgressão de segmentos inferidos como provindo de *L. tigrinus*, do que o contrário.

Uma grande dificuldade parcialmente superada no presente estudo foi a inferência do número e tamanho dos blocos haplotípicos ancestrais remanescentes em indivíduos híbridos, e assim, uma estimativa inicial do número de gerações em que vem ocorrendo o processo de hibridação. Os resultados aqui encontrados sugerem uma hibridação relativamente recente e provavelmente atual.

Devido aos resultados promissores, e aos extensos níveis de hibridação e introgressão detectados, vemos a importância da continuidade deste estudo. Para isso, sugere-se a utilização

de um maior número de marcadores moleculares e novas tecnologias de sequenciamento de DNA, além de um maior número de indivíduos amostrados em regiões próximas à zona de hibridação, e também de regiões mais afastadas, a fim de aprimorar a determinação dos haplótipos originais de cada espécie. Também são necessários estudos detalhados da ecologia e comportamento destas espécies para que se possa aprofundar o conhecimento acerca das possíveis causas deste fenômeno, incluindo os processos demográficos históricos e atuais que induzem a assimetria constatada neste estudo.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1 – Mapa da América do Sul e em destaque (quadro laranja) do Estado do Rio Grande do Sul, com pontos de coleta das amostras dos indivíduos *L. geoffroyi* em azul, e *L. tigrinus* em vermelho. Os números correspondem aos indivíduos listados na Tabela 1.

Figura 2 – Fluxograma de trabalho para desenvolvimento de novos marcadores localizados no cromossomo X.

Figura 3 – Representação do cromossomo X, com a localização de cada segmento utilizado neste estudo. Em azul, os segmentos já caracterizados em estudos anteriores, e em vermelho os novos segmentos aqui descritos. Nos parênteses está a posição aproximada (em Mb) de cada marcador, tendo como referência a anotação genômica do gato doméstico.

Figura 4 – Redes de haplótipos dos oito segmentos analisados, bem como dos mesmos concatenados. Os círculos representam cada haplótipo; os números em cada ramo representam a posição do SNP dentro do segmento. As cores representam as espécies e diferentes composições genômicas: *L. colocolo* em verde, *L. geoffroyi* ‘puros’ em azul-claro e híbridos em azul-escuro; e *L. tigrinus* ‘puros’ em vermelho-claro e híbridos em vermelho-escuro. Em todos os casos, a designação de indivíduos ‘puros’ e ‘híbridos’ foi realizada com base em marcadores independentes daqueles analisados neste estudo, ou seja, empregando dados de mtDNA, microssatélites e segmentos do cromossomo Y. Cada painel inclui um conjunto de dados diferente: A) *LOC728849*. B) *ATP7A*. C) *CYLC1*. D) *BTK*. E) *PLP1* intron 2. F) *PLP1* intron 5. G) *FAM70A*. H) *BGN*. I) Oito segmentos concatenados. J) Sete segmentos concatenados (*BGN* excluído).

Figura 5 – Representação esquemática dos alelos de cada SNP. Os números abaixo de cada figura representa a posição do SNP no alinhamento dos oito segmentos. A e B) Todos os SNPs encontrados ao longo dos oito segmentos. O alelo mais comum em ambas as espécies está representado pela cor preta, e o menos comum pela cor cinza. Os espaços em branco representam os dados faltantes. Abaixo da posição de cada SNP está o segmento ao qual ele pertence e a posição aproximada deste segmento em Mb no cromossomo X. C e D) SNPs com alelos inferidos como tendo estado fixados em cada uma das espécies, antes do processo de hibridação ocorrer. Os alelos fixados em *L. geoffroyi* estão representados em azul, e aqueles fixados em *L. tigrinus* em vermelho. Os indivíduos marcados com um asterisco são aqueles considerados previamente como híbridos, de acordo com outros marcadores.

FIGURAS

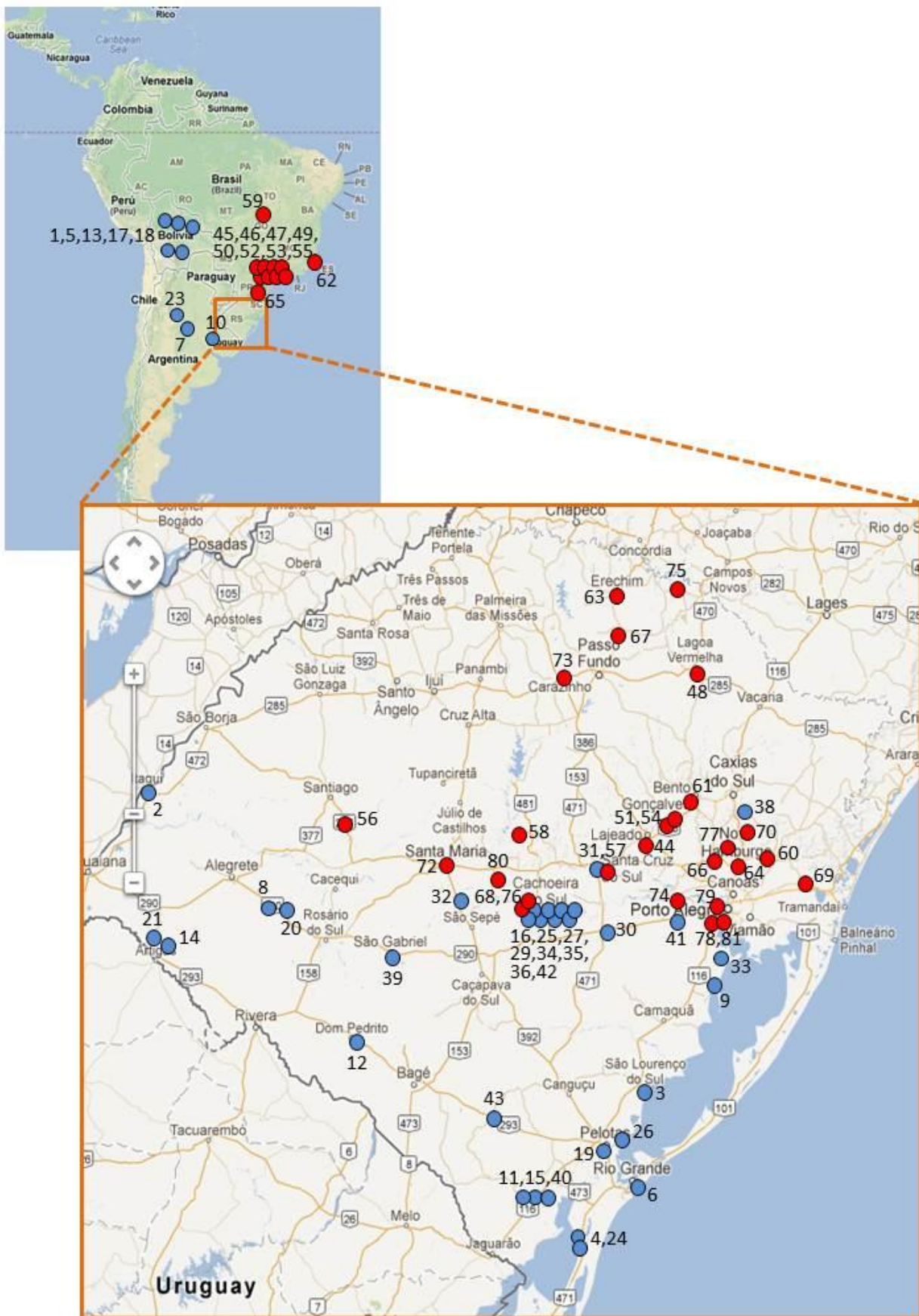


Figura 1

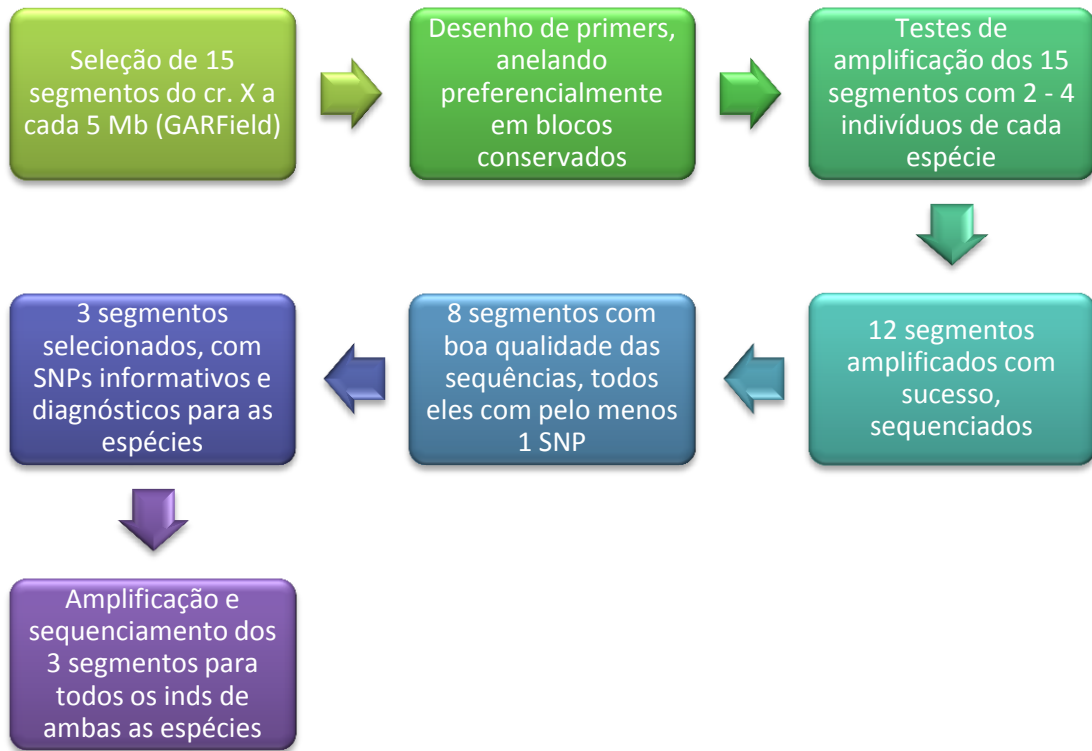


Figura 2

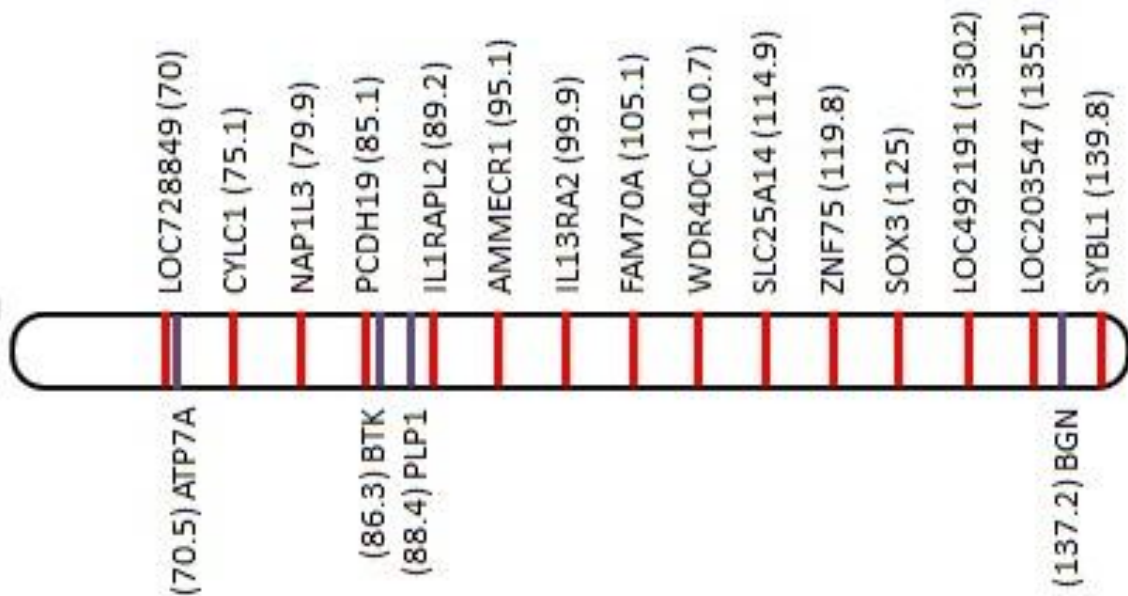
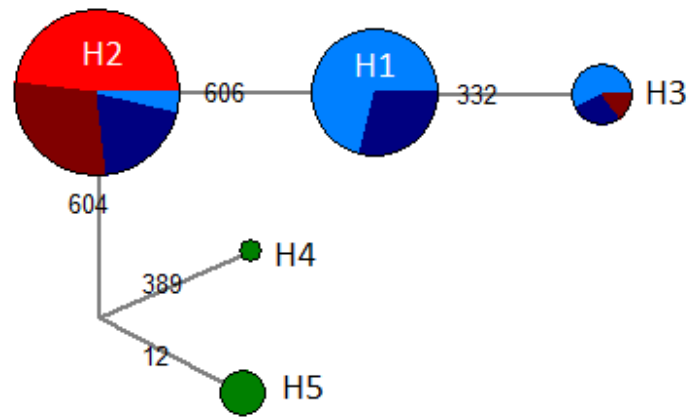
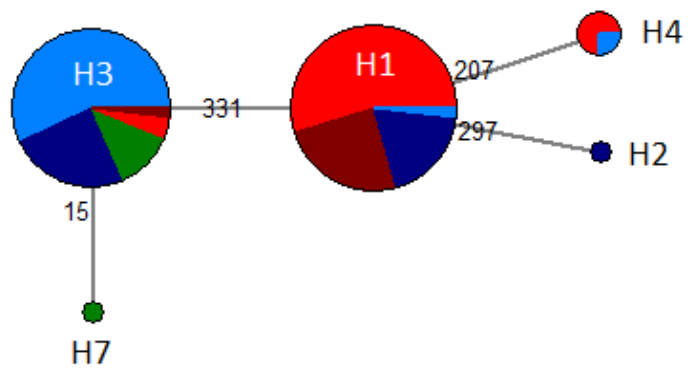


Figura 3

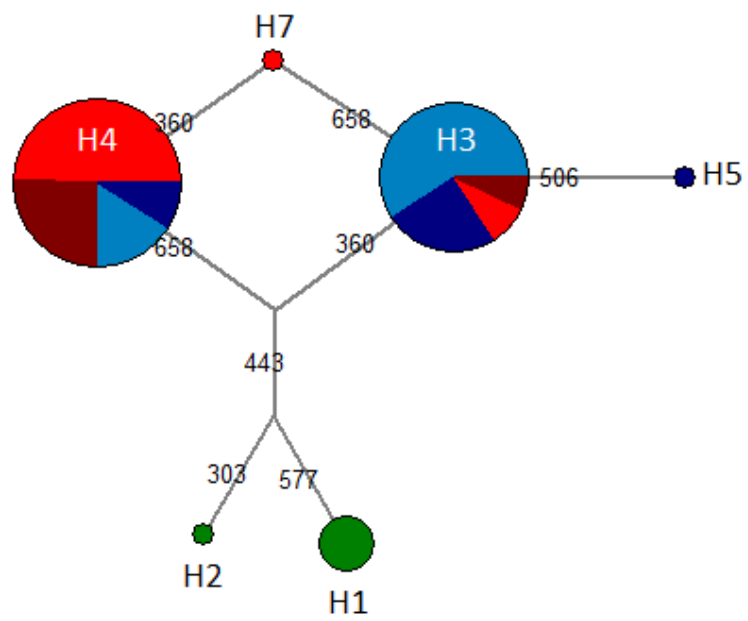
Figura 4:



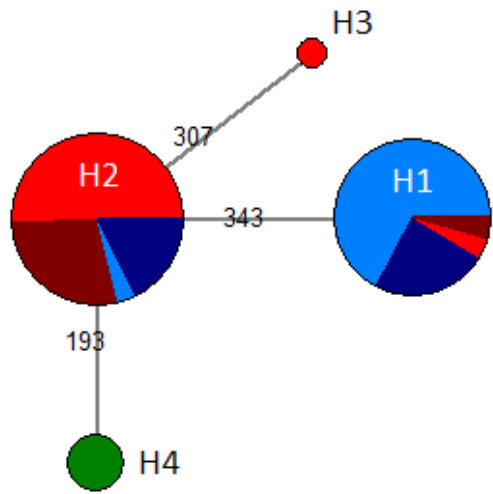
A



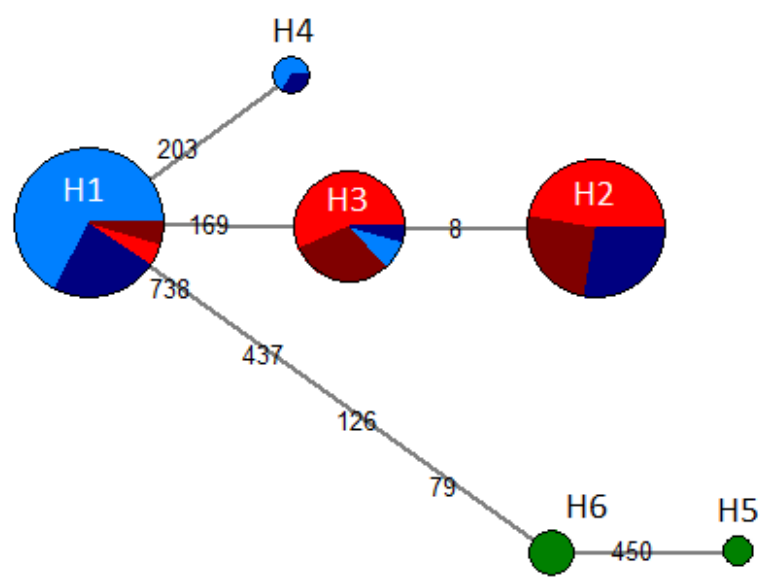
B



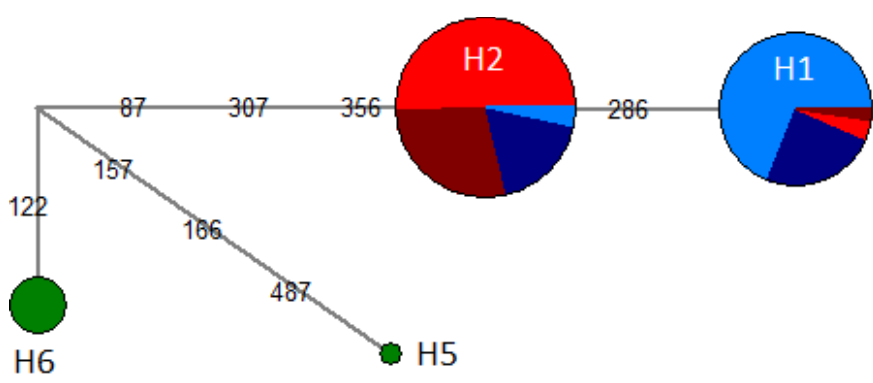
C



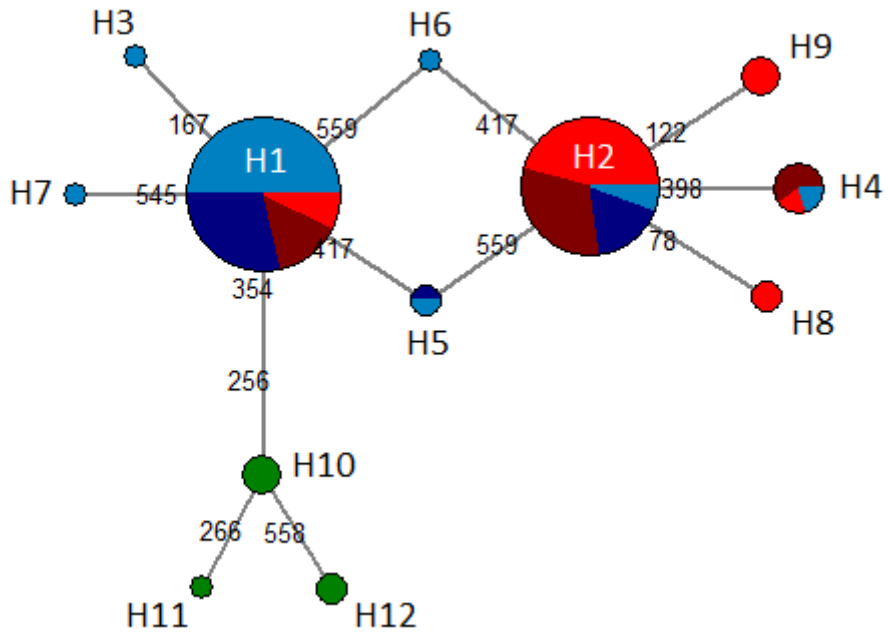
D



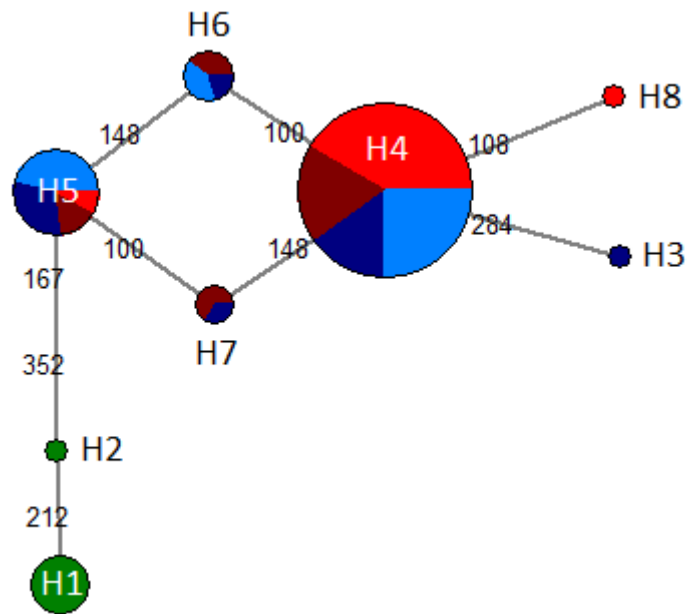
E



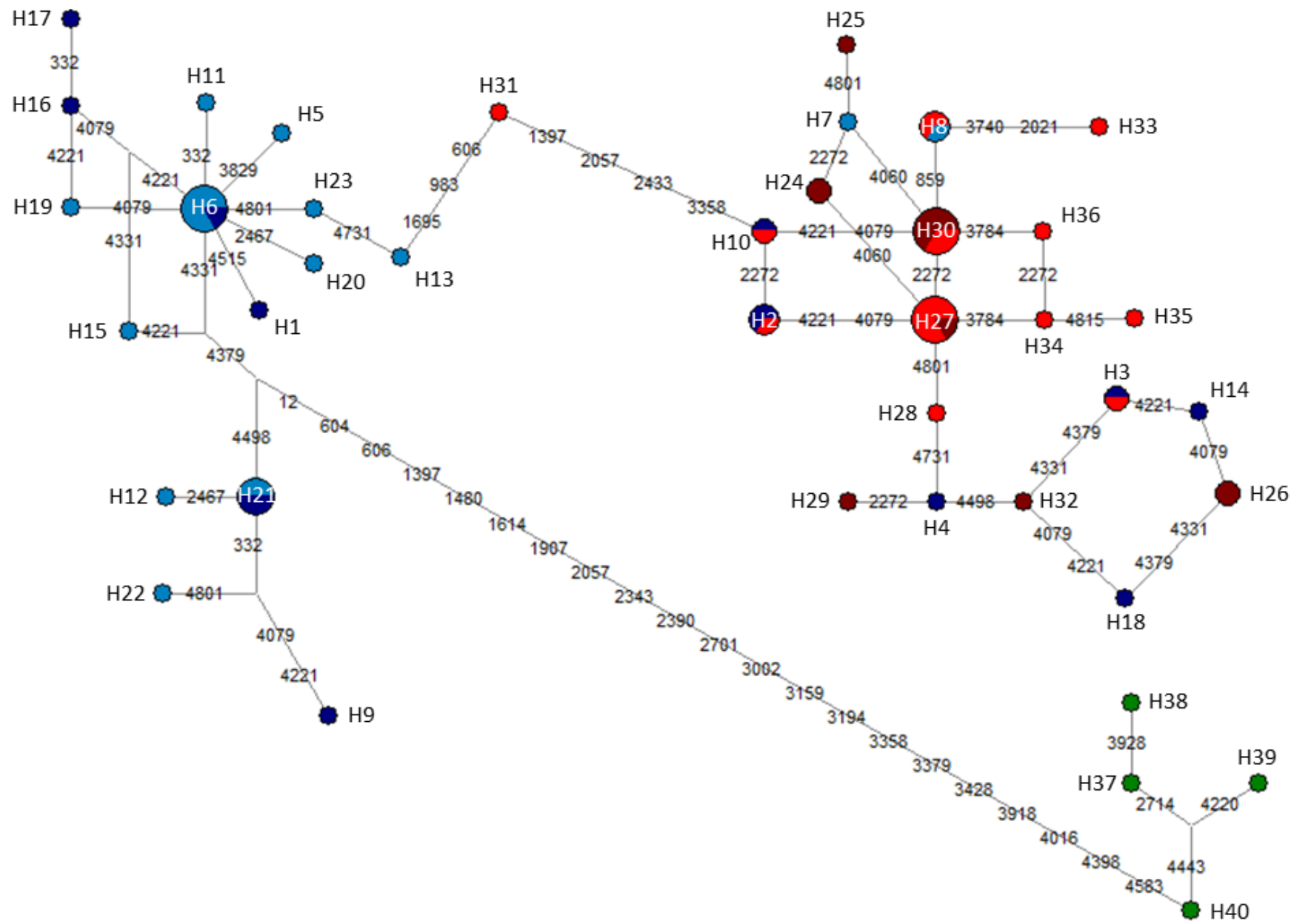
F

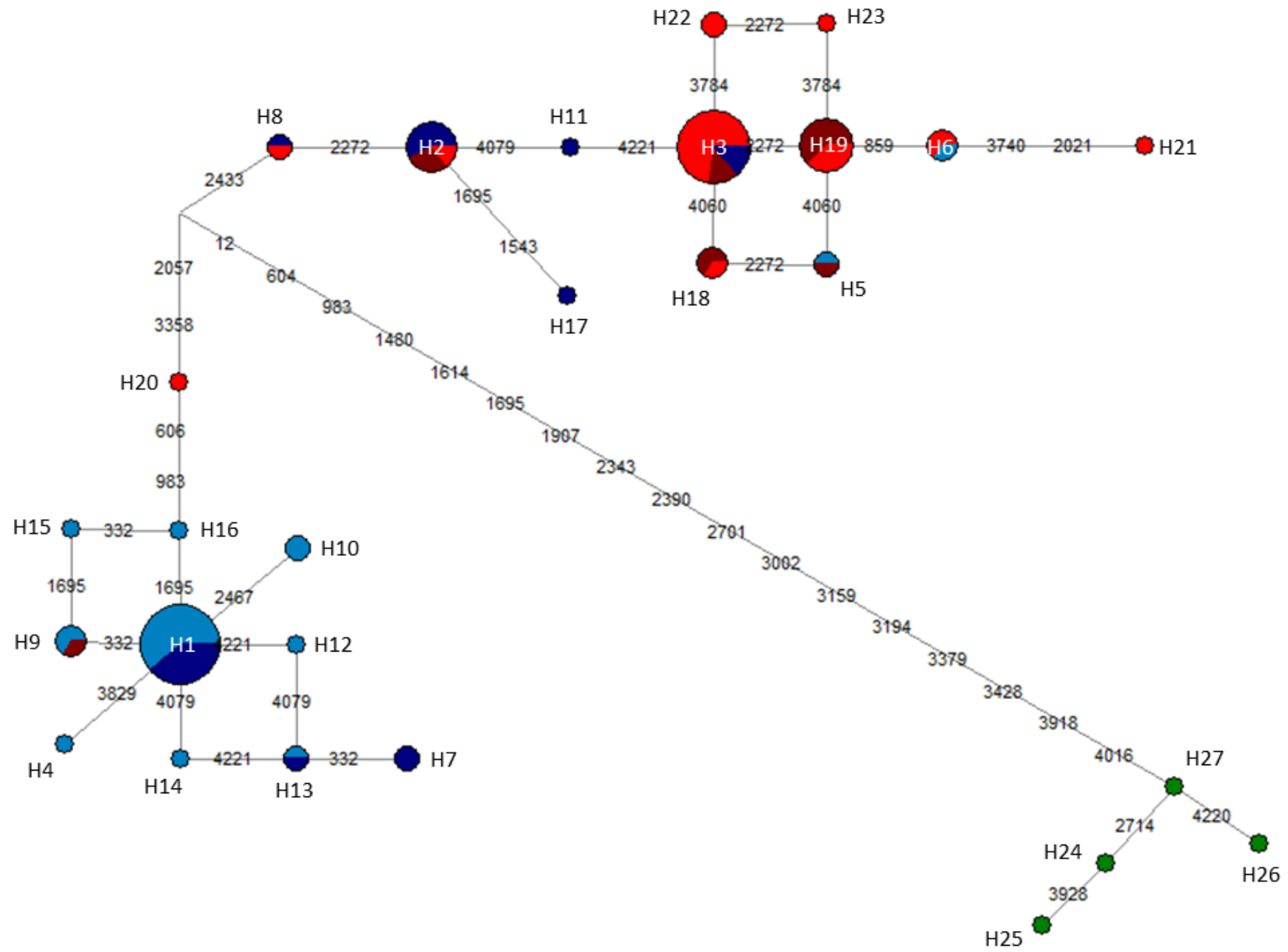


G



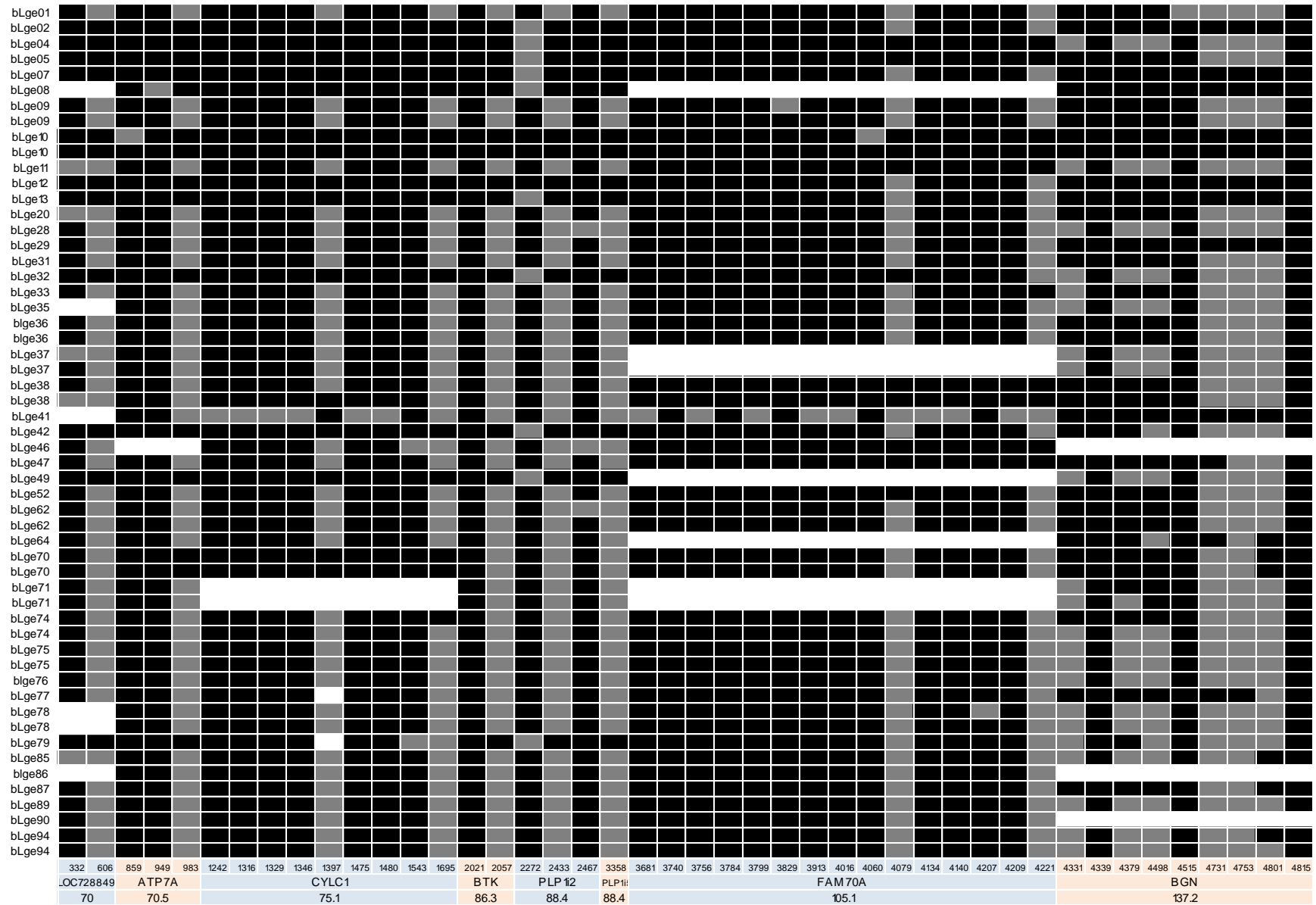
H





J

Figura 5:



A



B



C



D

TABELAS

Tabela 1A: Indivíduos fenotipicamente associados à espécie *L. geoffroyi* utilizados neste estudo. O município, estado e país referem-se ao local de coleta. Identificação de espécie por marcadores do DNA mitocondrial (mtDNA), cromossomo Y e valor de q na associação à espécie fenotípica.

	Indivíduo	Município	Estado	País	Coletor/Instituição	mtDNA	Y	Valor q
1	bLge62			Bolívia	Santa Cruz Zoo	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9861
2	bLge41	Itaqui	RS	Brasil	Everton R. Behr e Luís Olímpio M. Giasson	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9855
3	bLge37	São Lourenço do Sul	RS	Brasil	Zoo Sapucaia do Sul, RS	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9849
4	bLge35	Taim	RS	Brasil	Tati, Cariane, Miguel e Adriano	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9844
5	bLge64		Santa Cruz	Bolívia	Santa Cruz Zoo	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9820
6	bLge78	Rio Grande	RS	Brasil	Fábio Mazim	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9806
7	bLge09		Cordoba	Argentina	Zoo Cordoba	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9799
8	bLge33	Entre Rosário e Alegrete	RS	Brasil	Glauca, Márcio Martins	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9776
9	bLge28	Tapes/Arambaré	RS	Brasil	Lauren Veronese	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9774
10	bLge20			Uruguai	Guillermo D'Elia	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9747
11	bLge75	Arroio Grande	RS	Brasil	Fábio mazim e José Bonifácio G. Soares	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9703
12	bLge77	Dom Pedrito	RS	Brasil	Fábio Mazim	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9684
13	bLge86			Bolívia		<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9670
14	bLge31	Quaraí	RS	Brasil	Dênis, Fernanda, Cibele, Tati	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9650
15	bLge70	Arroio Grande	RS	Brasil	Zoo Sapucaia	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9637
16	bLge10	Cachoeira do Sul	RS	Brasil		<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9558
17	bLge87			Bolívia		<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9486
18	bLge85			Bolívia		<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9347
19	bLge71	Pelotas	RS	Brasil	Thales R. O. de Freitas e José Stoltz	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.9220
20	bLge89	Alegrete - Rosário do Sul	RS	Brasil	Thales Freitas e Jorge Marinho	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9150
21	bLge29	Quaraí	RS	Brasil	Dênis, Fernanda, Cibele, Tati	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9041
22	bLge52		Catamarca	Argentina	Parque Zoológico de Córdoba	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.8523
23	bLge47		RS	Brasil	Zoo Sapucaia do Sul, RS	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.7739
24	bLge36	Taim	RS	Brasil	Tati, Cariane, Miguel e Adriano	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.6367
25	bLge02*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil	Zoo Cachoeira	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9197
26	bLge79*	Balneário dos Prazeres	RS	Brasil	CETAS UFPel	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9012
27	bLge12*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil		<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9878
28	bLge49*		RS	Brasil	Zoo Sapucaia do Sul, RS	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9778
29	bLge04*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil	Zoo Cachoeira	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9286
30	bLge32*	Pantano Grande	RS	Brasil	Tati, André	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9136
31	bLge01*	Santa Cruz do Sul	RS	Brasil	Zoo Sapucaia	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9827
32	bLge38*	Santa Maria - São Sepé	RS	Brasil	Lázaro Cabral	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.8651
33	bLge42*	Barra do Ribeiro	RS	Brasil		<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.8042
34	bLge08*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil	Denis A. Sana	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.8035
35	bLge11*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil		<i>L. tigrinus</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.7724
36	bLge05*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil	Zoo Cachoeira	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.6933
37	bLge94*		RS	Brasil	FZB-RS	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.4893
38	bLge46*	Canela	RS	Brasil	Zoo Sapucaia do Sul	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.4766
39	bLge90*	São Gabriel	RS	Brasil	Projeto Carnívoros do RS	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.4526
40	bLge76*	Arroio Grande	RS	Brasil	Fábio Mazim e José Bonifácio G. Soares	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.3129
41	bLge13*	Eldorado do Sul	RS	Brasil	Paulo Ott	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.0373
42	bLge07*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil	Zoo Cachoeira	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.0329
43	bLge74*	Pinheiro Machado	RS	Brasil	Fábio Mazim	<i>L. tigrinus</i>	F	0.0303

* Indivíduos com evidência prévia de hibridação com *L. tigrinus*.

Tabela 1B : Indivíduos fenotipicamente associados à espécie *L. tigrinus*.

	Indivíduo	Município	Estado	País	Instituição	mtDNA	Y	Valor q
44	bLti48	Estrela	RS	Brasil	Zoo Sapucaia	<i>L. tigrinus</i>	F	0.9930
45	bLti59	Mogi Guaçu	SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Pelinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	F	0.9930
46	bLti56	Piracicaba	SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Pelinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9920
47	bLti75		SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Pelinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	F	0.9910
48	bLti133	Lagoa Vermelha	RS	Brasil	Rodney Schmidt	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9908
49	bLti62	Campinas	SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Pelinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9904
50	bLti87	Mogi Mirim	SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Felinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9900
51	bLti124	Arroio do Meio	RS	Brasil	Ezequiel Pedó	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9893
52	bLti71	Sorocaba	SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Pelinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9891
53	bLti76	Pedreira	SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Pelinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9886
54	bLti117	Arroio do Meio	RS	Brasil	Carlos Benhur Kasper	<i>L. tigrinus</i>	F	0.9885
55	bLti61	São Carlos	SP	Brasil	Plano de Manejo Peq. Pelinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9860
56	bLti99	Nova Esperança do Sul	RS	Brasil	Paulo Roberto Vielmo	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9843
57	bLti106	Santa Cruz	RS	Brasil	Eduardo Eizirik e Cibele Indrusiak	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9829
58	bLti94	Ibarama	RS	Brasil	Sônia Cechin, Kuriakin H. Toscan e Lúcia Olímpio M. Giasson	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9817
59	bLti96	Água Boa	GO	Brasil	Flávio Rodrigues	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9813
60	bLti132	Taquara- Rolante	RS	Brasil	Jorge Marinho	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9807
61	bLti46	Garibaldi	RS	Brasil	ZooParticular MaisonForestier, Seagram	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9804
62	bLti97	D. Martins	ES	Brasil	Dênis Sana	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9758
63	bLti102	Erechim	RS	Brasil	Zoo Sapucaia do Sul, RS	<i>L. tigrinus</i>	F	0.9753
64	bLti143	Novo Hamburgo	RS	Brasil	SMAM Novo Hamburgo	<i>L. tigrinus</i>	F	0.9752
65	bLti89	Pato Branco	PR	Brasil	Plano de Manejo Peq. Felinos Brasileiros	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9743
66	bLti68	Montenegro	RS	Brasil	L.F. Brutto; pele c/ Gerson Buss e Fátima	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9661
67	bLti113	Getúlio Vargas	RS	Brasil	Ibama	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9640
68	bLti120	Cachoeira do Sul	RS	Brasil	Tati, Duda, Manoel, Ronaldo, Raquel, Lisia	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9476
69	bLti80	Santo Antônio da Patrulha	RS	Brasil	Jan e Cibele	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9399
70	bLti137	Dois Irmãos	RS	Brasil	Ivana Rollet (prefeitura de Dois Irmãos)	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.9528
71	bLti136	Carazinho	RS	Brasil	Tati, Igor P. Coelho, Flávia Tirelli, Daniel Green	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.8011
72	bLti05*		RS	Brasil	Zoo Sapucaia	<i>L. tigrinus</i>	<i>L. geoffroyi</i>	0.9720
73	bLti108*	Santa Maria	RS	Brasil	Gleide	<i>L. tigrinus</i>	M/NA	0.8161
74	bLti01*	Triunfo	RS	Brasil		<i>L. geoffroyi</i>	F	0.7378
75	bLti138*	Machadinho	RS	Brasil	Joel Antunes da Rosa	<i>L. tigrinus</i>	F	0.2726
76	bLti09*	Cachoeira do Sul	RS	Brasil	Zoo Cachoeira	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.1460
77	bLti135*	Estância Velha	RS	Brasil	Zoológico de Sapucaia do Sul	<i>L. tigrinus</i>	F	0.0927
78	bLti79*	Guaíba	RS	Brasil	Thales R.O. Freitas, Juliana da Silva, Fernanda Bitencourt	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.0288
79	bLti121*	Ilha do Gamaleão	RS	Brasil	Tati, Thales, Manoel, Ronaldo, Lisia e Raquel	<i>L. geoffroyi</i>	<i>L. tigrinus</i>	0.0247
80	bLti98*	Restinga Seca	RS	Brasil	Jan Mähler Jr.	<i>L. tigrinus</i>	F	0.0165
81	bLti49*	Guariba	RS	Brasil	Paulo Ott	<i>L. geoffroyi</i>	F	0.0130

* Indivíduos com evidência prévia de hibridação com *L. geoffroyi*.

Tabela 2: Lista dos segmentos nucleares caracterizados neste estudo, espaçados a cada 5Mb. A posição destes no cromossomo X é relativa à anotação genômica do gato doméstico. Para cada segmento, tabela apresenta a sequência dos primers *Forward* (F) e *Reverse* (R), o tamanho do produto amplificado em pares de base (pb), também com base no genoma do gato doméstico, e o resultado dos experimentos de amplificação por PCR e sequenciamento.

Nome do loco	Posição no cromossomo X do gato doméstico	Sequência primer F / R (5'-3')	Tamanho do segmento (pb)	Resultado da amplificação	Resultado do sequenciamento
LOC728849	70.005962 – 70.359.959	CAATTATCAAAGAAACATCCCTACAA / CCCAACTATTATGATACTTCATTTTGC	786	OK em ambas as espécies	OK
CYLC1	75.126.658 – 75.287.005	GTCCACCAAGAAGGATGCAG / TCTTATGTGTTAGTCCCTAACTTGCA	762	OK em ambas as espécies	OK
NAP1L3	79.972.126 – 80.006.629	GCCCAGATACCCTCCTCTTT / TACCCAATGATGCCATTTGA	635	OK em ambas as espécies	Sequências de baixa qualidade
PCDH19	85.100.581 – 85.284.891	GCCCCTAACTCTCAGGTCAGT / ACCTTATGACATGTTTATGTTTGC	700	OK em ambas as espécies	Sequências de <i>L. geoffroyi</i> com baixa qualidade
IL1RAPL2	89.273.898 – 90.650.788	TGTGTCTCTTCACAGAACAAA / CAGTTCCTTCACACAATACCTTC	780	OK em ambas as espécies	OK
AMMECR1	95.171.851 – 95.295.045	CATCAAAATTTTGTAGCAACAAAACA / CTAGAAACAGGCAGCCCTGA	672	OK em ambas as espécies	OK
IL13RA2	99.991.601 – 100.047.148	CCTACCTGGCCGATCTGTAA / GATTCGGGGGAGAGAACTTT	662	OK em ambas as espécies	OK
FAM70A	105.116.612 – 105.182.531	GATGGTAGTGGCCAGGAAGA / AGCATAACACCTCCAGGTC	641	OK em ambas as espécies	OK
WDR40C	110.732.851 – 110.734.463	AGAAGCGTCTTGGAGGGATT / GCTAAGGATGGCCAATGTGT	604	Sítio de anelamento inespecífico	-
SLC25A14	114.989.096 – 115.025.713	TCTCCAGAACTTCAAGCCTTC / GGCACTTGCCCTTTCATTAC	682	OK em ambas as espécies	OK
ZNF75	119.873.031 – 119.949.848	ATGGGTATGCTGGGACTGAC / CCACTCCAGGGACTATCCAA	695	Sítio de anelamento inespecífico	-
SOX3	125.089.478 – 125.093.356	AGCGCGACAAAATATTCAC / GGTTTTCTGGTGGGTTCTT	681	Sítio de anelamento inespecífico	-
LOC492191	130.213.381 – 130.366.345	TCCCCTTAGCAGCTTGAGAA / AAATTGGTGCCCGATCTCTT	695	OK em ambas as espécies	OK
LOC203547	135.104.373 – 135.149.477	GCTTTTGAGGATGGCTTTTG / ACACTTGTGGCCAAGTCTGG	682	OK em ambas as espécies	OK
SYBL1	139.881.988 – 139.951.563	GGCAGCTCAACTGCTTTATCTT / CAGGTGTCAGCCTATGTATTAGGA	691	OK em ambas as espécies	OK

Tabela 3: Lista de segmentos amplificados para as espécies *Leopardus geoffroyi* e *L. tigrinus*. A posição dos SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) é referente ao alinhamento das sequências.

Nome do loco	Número de indivíduos testados	Número de sequências obtidas	SNPs identificados
LOC728849*	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	4 (<i>forward</i>)	629: Deleção de 32pb em <i>L. geoffroyi</i> .
CYLC1*	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	4 (<i>forward</i>)	685: <i>L. geoffroyi</i> fixado 'T', <i>L. tigrinus</i> fixado 'G'.
NAP1L3	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	4 (<i>forward</i>)	Sequências de baixa qualidade
PCDH19	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	4 (<i>forward</i>)	Sequências de <i>L. geoffroyi</i> com baixa qualidade
IL1RAPL2	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	4 (<i>forward</i>)	649: <i>L. geoffroyi</i> fixado 'T', <i>L. tigrinus</i> fixado 'C'.
AMMECR1	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	4 (<i>forward</i>)	410: polimorfismo 'C/T' em <i>L. tigrinus</i> . 564: <i>L. geoffroyi</i> fixado 'G', <i>L. tigrinus</i> fixado 'A'.
IL13RA2	4 <i>L. geoffroyi</i> 4 <i>L. tigrinus</i>	8 (<i>forward</i>) 7 (<i>reverse</i>)	289: polimorfismo 'C/T'. 467: polimorfismo 'C/G'.
FAM70A*	4 <i>L. geoffroyi</i> 4 <i>L. tigrinus</i>	6 (<i>forward</i>) 8 (<i>reverse</i>)	117: polimorfismo 'C/T'. 195: polimorfismo 'A/T'. 534: <i>L. geoffroyi</i> fixado 'A', <i>L. tigrinus</i> fixado 'G'.
SLC25A14	4 <i>L. geoffroyi</i> 4 <i>L. tigrinus</i>	8 (<i>forward</i>)	347: polimorfismo 'C/T' em <i>L. tigrinus</i> .
LOC492191	4 <i>L. geoffroyi</i> 4 <i>L. tigrinus</i>	8 (<i>forward</i>) 8 (<i>reverse</i>)	335: polimorfismo 'A/C' em <i>L. geoffroyi</i> 138: <i>L. geoffroyi</i> 'T', <i>L. tigrinus</i> 'C'.
LOC203547	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	3 (<i>forward</i>)	240: microssatélite dinucleotídico (TC)
SYBL1	2 <i>L. geoffroyi</i> 2 <i>L. tigrinus</i>	4 (<i>forward</i>)	Sequências de média qualidade. Sem variação identificada.

*Segmentos selecionados e genotipados para todos os indivíduos incluídos neste estudo.

Tabela 4: Condições de amplificação por PCR de cada um dos segmentos utilizados neste estudo.

Segmento	Desnat. Inicial	Desnat.	Anelamento	Extensão	Nº ciclos	Extensão final
<i>LOC728849, ATP7A, BTK, CYLC1, PLP112, FAM70A</i>	94°C por 3'	94°C por 45''	60-50°C por 45''	72°C por 1'30''	10	
		94°C por 45''	50°C por 45''	72°C por 1'30''	30	72°C por 3'
<i>PLP115</i>	94°C por 3'	94°C por 45''	60-55°C por 45''	72°C por 2'	5	
		94°C por 45''	50°C por 45''	72°C por 2'	35	72°C por 3'
<i>BGN</i>	94°C por 3'	94°C por 45''	60-55°C por 45''	72°C por 1'30''	10	
		94°C por 45''	55°C por 45''	72°C por 1'30''	30	72°C por 3'

Tabela 5: Caracterização dos oito segmentos do cromossomo X incluídos nas análises finais deste estudo, bem como na construção de um conjunto de dados concatenado do cromossomo X.

Segmento	Número de indivíduos de cada fenótipo	Tamanho do segmento (pb)	Número de sítios variáveis (SNPs)	Número de Haplótipos
<i>LOC728849</i>	38 <i>L. geoffroyi</i> 30 <i>L. tigrinus</i>	683	5	5
<i>ATP7A</i>	41 <i>L. geoffroyi</i> 36 <i>L. tigrinus</i>	385	4	7
<i>CYLC1</i>	42 <i>L. geoffroyi</i> 38 <i>L. tigrinus</i>	677	11	9
<i>BTK</i>	43 <i>L. geoffroyi</i> 38 <i>L. tigrinus</i>	550	3	4
<i>PLP1 intron 2</i>	43 <i>L. geoffroyi</i> 38 <i>L. tigrinus</i>	880	8	8
<i>PLP1 intron 5</i>	43 <i>L. geoffroyi</i> 38 <i>L. tigrinus</i>	590	7	6
<i>FAM70A</i>	39 <i>L. geoffroyi</i> 32 <i>L. tigrinus</i>	569	18	13
<i>BGN</i>	30 <i>L. geoffroyi</i> 30 <i>L. tigrinus</i>	595	12	8
Concatenação	32 <i>L. geoffroyi</i> 26 <i>L. tigrinus</i>	4826	48	40

REFERÊNCIAS

- Allendorf, FW. & Luikart, G. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. Blackwell.
- Bandelt, HJ; Foster, P & Rohl, A. 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*. 16: 37-48.
- Brown, RM; Nichols, RA; Faulkes, CG ; Jones, CG; Bugoni, L; Tatayah, V ; Gottelli, D & Jordan, WC. 2010. Range expansion and hybridization in Round Island petrels (*Pterodroma* spp.): evidence from microsatellite genotypes. *Molecular Ecology*. 19: 3157-3170
- Dobzhansky, T. 1951. Genetics and the Origin of Species. New York: Columbia University Press.
- Eizirik, E; Indrusiak, C; Trigo, TC; Sana, D; Mazim, FD & Freitas, TRO. 2006. Refined mapping and characterization of a geographic contact zone between two Neotropical cats, *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi* (Mammalia, Felidae). *Cat News* 45: 8-11.
- Hansen, MM; Ruzzante, DE; Nielsen, EE & Mensberg, KD. 2000. Microsatellite and mitochondrial DNA polymorphism reveals life-history dependent interbreeding between hatchery and wild brown trout (*Salmo trutta* L.). *Molecular Ecology*. 9(5): 383-594.
- Hare, MP. 2001. Prospects for nuclear gene phylogeography. *Trends in Ecology and Evolution*. 16: 700-706.
- IBGE. 1986. Levantamento de recursos naturais. Rio de Janeiro: Fundação Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), Departamento de Recursos Naturais e Estudos Ambientais.
- 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.
- Lecis, R; Pierpaoli, M; Biro, ZS; Szemethy, L; Ragni, B; Vercillo, F & Randi E. 2006. Bayesian analyses of admixture in wild and domestic cats (*Felis silvestris*) using linked microsatellite loci. *Molecular Ecology*. 15: 119-131.
- Librado, P. & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*. 25: 1451-1452.
- Mayr E. 1942. Systematics and the Origin of Species. New York: Columbia University Press.
- Mayr, E. 1963. Animal Species and Evolution. Cambridge: Harvard University Press.
- Neaves, LE; Zenger, KR; Cooper, DW & Eldridge, MDB. 2010. Molecular detection of hybridization between sympatric kangaroo species in south-eastern Australia. *Heredity*. 104: 502-512.
- Oliveira, TG & Cassaro, K. 2005. Guia de Campo dos Felinos do Brasil. 3ª Ed. São Paulo: Instituto Pró-Carnívoros, Fundação Parque Zoológico de São Paulo, Sociedade de Zoológicos do Brasil & Pró-Vida Brasil.

- Palumbi, SR. 1996. Nucleic acids II: The polymerase chain reaction. *Molecular Systematics*. Sunderland, MA: Sinauer Associates. p. 205-247.
- Pontius, JU & O'Brien, SJ. 2007. Genome Annotation Resource Fields—GARFIELD: A Genome Browser for *Felis catus*. *Journal of Heredity*. 98 (5): 386-389.
- Rambo, B. 1994. A Fisionomia do Rio Grande do Sul. 3ª Ed. São Leopoldo: Editora Unisinos.
- Rhymer, JM & Simberloff, D. 1996. Extinction by hybridization and introgression. *Annual review of Ecology and Systematics*. 27: 83-109.
- Sambrook, J; Fritsch, EF; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*, 2nd edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schmidt-Küntzel, A; Nelson, G; David, VA; Schäffer, AA; Eizirik, E; Roelke, ME; Kehler, JS; Hannah, SS; O'Brien, SJ & Menotti-Raymond M. 2009. A domestic cat X chromosome linkage map and the sex-linked orange locus: mapping of orange, multiple origins and epistasis over nonagouti. *Genetics*. 181 (4): 1415-25.
- Schneider, A. 2009. Caracterização de uma zona híbrida entre dois felídeos Neotropicais utilizando múltiplos locos nucleares. Dissertação de Mestrado.
- 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. *Molecular Biology and Evolution*. 28: 2731-2739.
- Thompson, JD; Higgins, DG & Gibson, TJ. 1994. ClustalW: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*. 22: 4673-4680.
- Trigo, TC. 2008. Híbridação e introgressão entre espécies de felídeos neotropicais (Mammalia, Carnívora). Tese de Doutorado.
- Trigo, TC; Freitas, TRO; Kunzler, G; Cardoso, L; Silva, JCR; Johnson, WE; O'Brien, SJ; Bonatto, SL & Eizirik, E. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology* 17: 4317-4333.
- Trigo, TC; Schneider, A; Lehugeur, LM; Oliveira, TG; Silveira, L; Freitas, TRO & Eizirik, E. Em preparação. Complex patterns of hybridization and divergence among Neotropical cats.
- Verardi, A; Lucchini, V & Randi, E. 2006. Detecting introgressive hybridization between free-ranging domestic dogs and wild wolves (*Canis lupus*) by admixture linkage disequilibrium analysis. *Molecular Ecology*. 15: 2845-2855.
- VonHoldt, BM; Pollinger, JP; Earl, DA; Knowles, JC; Boyko, AR; Parker, H; Geffen, E; Pilot, M; Jedrzejewski, W; Jedrzejewska, B; Sidorovich, V; Greco, C; Randi, E; Musiani, M; Kays, R; Bustamante, CD; Ostrander, EA; Novembre, J & Wayne, RK. 2011. A genome-wide perspective on the evolutionary history of enigmatic wolf-like canids. *Genome Research*. 21: 1294-1305.