



CAROLINE CHARÃO SARTOR

ESTRUTURA POPULACIONAL DE *LEOPARDUS COLOCOLO*  
(CARNIVORA, FELIDAE): DEFININDO UNIDADES DEMOGRÁFICAS PARA A  
CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE NO BRASIL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biologia Animal, Instituto de Biociências da Universidade  
Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial à  
obtenção do título de Mestre em Biologia Animal.

Área de Concentração: Biologia Comparada

Orientador: Prof. Dr. Thales Renato Ochotorena de Freitas

Co-orientadora: Dra. Tatiane Campos Trigo

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

PORTO ALEGRE

2016

ESTRUTURA POPULACIONAL DE *LEOPARDUS COLOCOLO* (CARNIVORA,  
FELIDAE): DEFININDO UNIDADES DEMOGRÁFICAS PARA A  
CONSERVAÇÃO DA ESPÉCIE NO BRASIL

CAROLINE CHARÃO SARTOR

Dissertação aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Banca examinadora:

---

Dra. Maria João Ramos Pereira (UFRGS)

---

Dra. Gislene Lopes Gonçalves (UFRGS)

---

Dr. Daniel Galiano (Unochapecó)

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer às pessoas que tornaram possível o desenvolvimento deste trabalho e me auxiliaram de alguma maneira na realização deste.

Ao meu orientador, Thales R. O. de Freitas, pela confiança, amizade, e por todo o apoio e ensinamentos passados ao longo destes dois anos. Ainda, queria agradecer por ter aceitado realizar este trabalho.

À minha co-orientadora, Tatiane Campos Trigo, pela paciência, confiança, amizade, por sempre estar disposta a me auxiliar, por ter aceitado me co-orientar e principalmente, por todos os ensinamentos que me passou.

Aos professores, colegas e funcionários dos Departamentos de Zoologia e Genética da UFRGS, que enriqueceram muito o meu conhecimento.

Aos colegas de laboratório: Bruna, Bruno, Carol Espinosa, Dani, Diego, Gislene, Jorge, Leandro Borges, Leonardo, Patrícia, Renan e Willian, pelas discussões sobre pesquisa, pelo companheirismo e momentos de distração na hora do café. Meu agradecimento especial à Gisele, Mayara e Sandra, pelos ensinamentos e disposição em me ajudar e, principalmente, por me receberem tão bem no laboratório e pela amizade!

Ao Luciano, nosso querido técnico do laboratório, que não só é indispensável para a realização dos nossos trabalhos, mas torna os nossos dias mais agradáveis e engraçados.

Ao Museu Nacional de História Natural do Uruguai, pelas amostras cedidas e, em especial, ao Enrique González, curador da coleção de mamíferos do museu, que sempre se mostrou disposto a ajudar e me enviou as amostras. Ao Dr. Diego Queirolo que fez o favor de trazer as amostras do Uruguai para mim.

Não poderia deixar de agradecer aos meus pais e minha irmã, que sempre me incentivaram e estiverem do meu lado. Obrigada pelo apoio, amor e dedicação!

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	6
1.1. Genética da Conservação.....	6
1.2. Marcadores Moleculares.....	8
1.3. A Família Felidae.....	9
1.4. <i>Leopardus colocolo</i> .....	10
2. OBJETIVOS.....	14
2.1. Objetivo geral.....	14
2.2. Objetivos específicos.....	15
3. CAPITULO I – Diversidade genética e estruturação populacional do gato palheiro ( <i>Leopardus colocolo</i> ) no Brasil: diretrizes para a conservação.....	16
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	43
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45
6. ANEXOS.....	51

## RESUMO

O gato palheiro, *Leopardus colocolo*, é um felídeo neotropical de pequeno porte. A espécie possui uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo desde os Andes do Peru e da Bolívia, até o extremo sul da América do Sul. No Brasil, a distribuição da espécie ainda é incerta, porém sabe-se que ela ocorre na região centro-oeste e no estado do Rio Grande do Sul. Embora a taxonomia de *L. colocolo* gere controvérsias, sabe-se que algumas populações estão geneticamente estruturadas, provavelmente como resultado de longos períodos de isolamento. Em um estudo filogeográfico baseado em genes de DNA mitocondrial, a diferenciação genética entre os indivíduos do centro-oeste e do sul do Brasil foi evidenciada. Segundo este, estas populações apresentam-se fortemente estruturadas, com um baixo nível de fluxo gênico. No entanto, a análise exclusiva de marcadores de herança unicamente maternal utilizada neste estudo impossibilita a avaliação da real extensão da divergência evolutiva entre estas populações. Em razão disso, o presente estudo procurou avaliar, através do uso de marcadores moleculares de microsatélite, a variabilidade genética das populações de *L. colocolo* na região central e sul do Brasil e verificar a distribuição geográfica desta variabilidade, analisando processos de fluxo gênico, isolamento genético e estrutura populacional, a fim de auxiliar no desenvolvimento de planos de manejo e conservação para a espécie. A investigação genética deste estudo revelou uma alta variabilidade gênica nas populações, comparáveis a condições encontradas em populações de gatos-palheiros do oeste da América do Sul. Os níveis de divergência gênica entre as populações foram significativos. Na análise de agrupamento Bayesiano as populações brasileiras formaram clusters distintos. De modo geral, o estudo evidenciou a divergência genética entre as populações de gato-palheiro da região centro-oeste e sul do Brasil. Acredita-se que a expansão da Floresta Atlântica no final do Pleistoceno, início do Holoceno, separou as populações de *L. colocolo* do centro-oeste e do sul do Brasil, funcionando como uma barreira para o fluxo gênico dessa espécie entre as regiões, deixando a população do sul isolada. Com base nos resultados obtidos, sugerimos que as populações brasileiras sejam consideradas Unidades de Manejo independentes para a conservação efetiva da diversidade genética. Ainda, recomendamos que seja dada uma atenção especial à população do Rio Grande do Sul e Uruguai, pois populações isoladas estão mais propícias ao endocruzamento e perda da diversidade genética, o que diminui a viabilidade da população a longo prazo.

# **1. INTRODUÇÃO**

## **1.1. Genética da conservação**

O aumento do desmatamento e risco de extinção de espécies da fauna e flora global levaram ao surgimento da Biologia da Conservação, uma iniciativa multidisciplinar que tem por objetivos conservar a biodiversidade, minimizando os impactos das ações antrópicas e reduzindo as taxas atuais de extinção (Frankham et al. 2002). A Genética da Conservação é uma área da Biologia da Conservação que, através de dados moleculares, estuda os processos evolutivos atuantes sobre as populações naturais, sua variabilidade genética, estrutura de populações e fluxo gênico, história demográfica e tamanho efetivo das populações (Avice 1994; Paetkau et al. 1998; Palomares et al. 2002; Uphyrkina et al. 2002), com o objetivo de preservar as espécies como entidades dinâmicas capazes de lidar com as mudanças ambientais (Frankham et al. 2002).

A diversidade genética é de extrema importância para a evolução e viabilidade das populações a longo prazo. A variabilidade genética alta é importante para a permanência de uma população, pois ela fornece à seleção natural um maior número de possibilidades sobre as quais ela poderá agir, gerando assim um maior número de adaptações que tendem a aumentar a probabilidade de sobrevivência desta população ao longo do tempo (Avice, 1994).

A variabilidade genética está diretamente relacionada com o tamanho efetivo de uma população. Populações pequenas são mais susceptíveis às pressões do ambiente, tornando-se mais vulneráveis a doenças e catástrofes ambientais, aumentando o risco de extinção (Frankham et al. 2002). São nessas populações que a genética da conservação possui grande interesse, pois elas estão vulneráveis à deriva genética e ao endocruzamento, que podem provocar a perda da variabilidade genética principalmente em populações isoladas e de tamanho reduzido (Frankham et al., 2002; Spielman et al. 2004).

Assim, estudar a distribuição geográfica da variabilidade genética dentro de cada espécie e o nível de fluxo gênico entre as populações possui grande importância em programas de manejo e conservação. Na natureza, as populações geralmente apresentam um certo grau de estruturação genética, com áreas com menor ou maior fluxo gênico entre elas. Áreas com fluxo gênico mais restrito podem representar linhagens evolutivas

independentes, que possuem adaptações ecológicas para o local que habitam (Avice 1994; Moritz e Faith 1998; Taylor e Dizon 1999).

Para fins de manejo, é possível identificar dentro de cada espécie dois tipos de linhagens evolutivas: as Unidades Evolutivamente Significativas (UES) e as Unidades de Manejo (UM). As UES são populações reciprocamente monofiléticas para alelos de DNAm<sub>t</sub> e que demonstram divergência significativa para frequências de alelos em locos nucleares (Moritz 1994; Crandall et al. 2000). Ou seja, uma UES é uma população, ou um grupo de populações, que se encontram diferenciados de populações próximas em termos genéticos, morfológicos ou ecológicos, refletindo uma história de isolamento geográfico em níveis variados. Portanto, ao possuírem características próprias, essas populações devem ser consideradas como unidades independentes para fins de conservação (Eizirik 1996). O conceito de UES foi desenvolvido com o objetivo de providenciar bases racionais para a priorização de táxons para a conservação, tendo em vista que a taxonomia existente pode não refletir a diversidade genética de forma adequada (Moritz 1994).

As UM, por outro lado, são populações com uma diferença na frequência alélica dos locos nucleares ou mitocondriais significante, independente da distinção filogenética dos alelos. Populações que diferem na frequência alélica são significantes para a conservação, pois elas representam populações conectadas por um nível de fluxo gênico tão pequeno, que elas são funcionalmente independentes. Enquanto a UES requer informações na distribuição e filogenia dos alelos para sua determinação, a UM só requer informações da frequência dos alelos (Moritz 1994).

O reconhecimento destas linhagens evolutivas é de vital importância para a realização de programas de conservação de espécies, pois permite preservar padrões históricos de diferenciação das populações que podem representar padrões de adaptações ecológicas locais (Dimmick et al. 2001).

Os felídeos neotropicais enfrentam, atualmente, graves problemas como redução, alteração e fragmentação de habitats, além da caça e outras ameaças antrópicas. Em razão disso, a demarcação de áreas de proteção adequada é de extrema importância para a preservação destas espécies (Eizirik 1996). No entanto, esforços de conservação atuais e passados têm sido prejudicados pela incerteza do grau e significância da subdivisão dentro de cada espécie, e tem refletido em vários esquemas de classificação. Portanto, reconhecer grupos filogenéticos, tanto a nível de espécie,

quanto de subespécie é um dos primeiros passos para designar unidades de conservação (Nowell e Jackson 1996; Johnson et al. 1999).

## 1.2. Marcadores Moleculares

Estudos em Genética da Conservação geralmente utilizam-se dos chamados marcadores moleculares, que permitem o estudo do genoma dos organismos com a finalidade de se obter informações a cerca da variabilidade genética existente nas espécies e nas populações (Allendorf e Luikart 2007). Atualmente, os marcadores moleculares mais utilizados em estudos genéticos de relações evolutivas e populacionais incluem sequências de DNA mitocondrial (DNAmt) e locos nucleares altamente polimórficos, como os de microssatélite.

Os microssatélites estão incluídos dentro das sequências de DNA nuclear denominadas de SSRs *Simple Sequence Repeats* (Kashi et al. 1997) ou VNTRs *Variable Number of Tandem Repeats* (Murray 1996). Estas sequências altamente repetitivas estão dispersas pelo genoma de eucariotos, formadas por repetições em tandem de 1 a 6 pares de bases, e formam conjuntos de cinco até centenas de repetições por loco, podendo variar em tamanho e possuindo um caráter altamente polimórfico (Tautz 1993). Além disso, os microssatélites são codominantes, o que permite identificar se os indivíduos são homozigotos ou heterozigotos para cada loco e seletivamente neutros, possibilitando a manutenção de sua alta variabilidade (Murray 1996). Por apresentarem alelos menores do que 1Kb, para trabalhar com estes marcadores é possível utilizar DNA altamente fragmentado ou em pequenas quantidades, inclusive obtido a partir de amostras antigas (Bruford e Wayne 1993).

A utilização destes marcadores em estudos de Genética da Conservação é cada vez maior, podendo ser utilizados para a identificação de indivíduos ou espécies (Ernest et al. 2000), a comparação da variabilidade genética entre espécies e populações (Johnson et al. 1999; Moreno et al. 2006; Grisolia et al. 2007), determinação de parentesco e estrutura social (Morin et al. 1994; Nesje et al. 2000), determinação do grau de estrutura das populações e migração (Waits et al. 2000; Dalén et al. 2006; Haag et al. 2010; Valdez et al. 2015) e o tamanho efetivo das populações (Kohn et al. 1998). Além disso, podem ser utilizados em estudos de filogeografia (Eizirik et al. 2001;

Tchaicka et al. 2007) e genética da paisagem (Mcrae e Beier 2007; Gabrielsen et al. 2013; Vernesi et al. 2015).

### **1.3. A Família Felidae**

Os felídeos são ilustres predadores, possuindo inúmeras adaptações para o seu hábito estritamente carnívoro (Kitchener 1991; Macdonald e Loveridge 2010). Eles possuem mandíbulas especializadas para subjugar e matar suas presas, com caninos longos, e carniceros bem desenvolvidos, que refletem sua dieta constituída quase que exclusivamente de carne (Eisenberg e Redford 1999; Macdonald e Loveridge 2010). Com exceção do guepardo, *Acinonyx jubatus*, as garras dos felídeos são fortes, altamente curvadas e retráteis, ficando protegidas do desgaste (Kitchener 1991; Nowak 1999).

Os membros da família Felidae são ágeis escaladores e bons nadadores (Nowak 2005). São animais principalmente solitários, e a grande maioria é noturna, embora algumas espécies sejam ativas principalmente durante o dia (Nowak 1999, 2005).

Entre os carnívoros, a família Felidae (Mammalia, Carnivora) representa uma radiação evolutiva única, com um grande número de espécies exibindo traços ecológicos, morfológicos e comportamentais variados (Masuda et al. 1996), sendo considerada uma das famílias de carnívoros mais bem sucedidas do mundo (Nowell e Jackson 1996; Nowak 1999). Atualmente o grupo compreende 36 espécies, pertencentes a 18 gêneros (Macdonald e Loveridge 2010), sendo distribuídas por todo globo, com exceção de Madagascar, Austrália, Nova Zelândia e dos pólos (Nowak 1999).

A reconstrução filogenética molecular dessa família representa um desafio, pois sua história evolutiva é marcada por rápidos eventos de especiação, alta taxa de extinção e de evolução convergente e paralela (Martin 1989). Além disso, as espécies viventes de felinos parecem ter evoluído de um ancestral comum relativamente recente (10-15 milhões de anos atrás) (Johnson e O'Brien 1997).

Atualmente, a família Felidae é subdividida em oito linhagens monofiléticas distintas, entre elas, a Linhagem da Jaguatirica (Johnson e O'Brien 1997; Mattern e McLennan 2000; Johnson et al. 2006). Esta linhagem é endêmica da América do Sul e Central e, com base em dados moleculares, acredita-se que começou a se diferenciar do seu ancestral comum durante e após a formação do istmo do Panamá (2.8 milhões de

anos atrás) (Johnson et al. 1999, 2006). A linhagem da Jaguatirica compreende oito espécies de felídeos de pequeno porte: a jaguatirica (*Leopardus pardalis*), o gato maracajá (*L. wiedii*), o gato-andino (*L. jacobita*), o gato-palheiro (*L. colocolo*), o gato-do-mato-grande (*L. geoffroyi*), o huiña (*L. guigna*), o gato-do-mato-pequeno (*L. tigrinus*) (Johnson et al. 1996, 2006) e o *Leopardus guttulus*, que foi recente reconhecido como uma espécie distinta de *Leopardus tigrinus* por Trigo et al. (2013). Nesta linhagem, Johnson et al. (2006) identificaram dois clados monofiléticos principais: um mais externo, formado por *L. pardalis* e *L. wiedii*, e outro mais interno, formado pelas demais espécies, no qual *L. colocolo* é posicionado como espécie irmã de *L. jacobita*.

#### **1.4. *Leopardus colocolo***

O gato palheiro, *Leopardus colocolo*, é um felino de pequeno porte, com aparência bastante semelhante a um gato doméstico, com comprimento total variando entre 65,5 cm a 102,2 cm e peso variando entre 3 a 4 kg (García-Perea 1994; Nowell e Jackson 1996; Nowak 2005). O pelo é mais longo e áspero, a cauda mais curta e as orelhas mais pontiagudas que as demais espécies de felinos neotropicais. Apresenta seis padrões diferentes de coloração da pelagem que variam do cinza-amarelado ao cinza escuro ou marrom-avermelhado, podendo ou não ter manchas. A principal característica da espécie, porém, são listras escuras e largas nas patas (duas ou três nas anteriores e três a cinco nas posteriores) (Oliveira e Cassaro 1999) (Figura 1a). A ocorrência de indivíduos melânicos é confirmada a partir de registros em campo (Silveira et al. 2005).

O gato dos pampas, como também é conhecido, é uma espécie solitária, que se alimenta principalmente de pequenos roedores e aves terrestres (Nowell e Jackson 1996; Eisenberg e Redford 1999; Oliveira e Cassaro 1999; Napolitano et al. 2008; Barstow e Leslie 2012). É considerado um felino de hábito noturno (Sunquist e Sunquist 2002; Oliveira e Cassaro 1999), porém um estudo feito por Silveira et al. (2005) no Cerrado brasileiro verificou que nesta região a espécie possui maior atividade durante o dia e no crepúsculo. Quanto à área de vida, *L. colocolo* ocupa uma área média de 3,07-36,98 km<sup>2</sup> (Barstow e Leslie 2012).

Este felino foi muito caçado por sua pele no passado, porém hoje a principal ameaça à espécie é a perda de habitat (Sunquist e Sunquist 2002). Atropelamentos são

também uma ameaça importante para *L. colocolo*, além da caça por esporte ou por retaliação pela predação de animais domésticos (Sunquist e Sunquist 2002; Cossíos et al. 2007; Barstow e Leslie 2012). No Brasil, a perda de habitat é provocada principalmente pela expansão agrícola (tanto no Cerrado como no Pampa) e pela silvicultura (basicamente no Pampa), além de práticas históricas de queima de vegetação campestre, principalmente no Pampa, como método de manejo para a exploração pecuária. No bioma Pampa, a predação por cães domésticos é comum, realizada como caça retaliatória ou preventiva (Queirolo et al. 2013). *L. colocolo* é listado como Quase Ameaçado (NT) pela IUCN (Lucherini et al. 2015) e encontra-se como Vulnerável (VU) nacionalmente (Machado et al. 2008).

A espécie ocorre em uma grande variedade de habitats, desde campos abertos a florestas úmidas e regiões montanhosas, sendo encontrado em áreas com mais de 5.000 metros de altitude (Nowak 2005; MacDonald e Loveridge 2010). Distribui-se por uma área bastante extensa, ocorrendo desde os Andes do Equador e da Bolívia, até o sul do Chile e da Argentina, e também no Paraguai, Brasil e Uruguai (Nowell e Jackson 1996; Eisenberg e Redford 1999; Sunquist e Sunquist 2002) (Figura 1b).

No Brasil, a distribuição da espécie ainda é incerta (Oliveira e Cassaro 1999; Queirolo et al. 2013), embora saiba-se que está distribuída em duas regiões distintas. Uma delas abrange o Cerrado, nas regiões central, sudeste e nordeste do país, além das planícies inundáveis do Pantanal. A outra área se limita à metade sul do estado do Rio Grande do Sul (RS), no qual sua distribuição é pouco conhecida devido à escassez de registros (Oliveira e Cassaro 1999; Silveira et al. 2005; Sánchez-Soto 2007; Queirolo et al. 2013). Ainda, acredita-se que as populações do Rio Grande do Sul estão em conexão com populações do Uruguai (Barstow e Leslie 2012).



Figura 1: A) *Leopardus colocolo* (fonte: Queirolo et al. 2013); B) Distribuição geográfica de *Leopardus colocolo*. (fonte: modificado da IUCN - IUCN 2014. IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.1. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>).

Estudos genéticos feitos por Johnson et al. (1999) e Trigo et al. (2008) identificaram híbridos entre *L. colocolo* e *L. tigrinus* numa área de simpatria, na região central e nordeste do Brasil. Trigo et al. (2013) verificaram que este processo parece ter sido antigo e unidirecional, levando à introgressão do DNAm<sub>t</sub> de *L. colocolo* na população de *L. tigrinus*. Santos (2012) sugere ainda que as populações de *L. colocolo* oriundas do Rio Grande do Sul e do Uruguai são mais próximas a haplótipos de *L. tigrinus* híbridos das regiões centro-oeste e nordeste, do que de linhagens atuais de *L. colocolo* do centro-oeste e nordeste brasileiro. Assim, acredita-se que houve uma colonização oeste-leste das linhagens de *L. colocolo*, pois na estrutura filogenética desta espécie os haplótipos brasileiros e uruguaios formam um grupo mais recente, enquanto

que as amostras chilenas, bolivianas e argentinas ficaram posicionadas como mais basais (Figura 2).

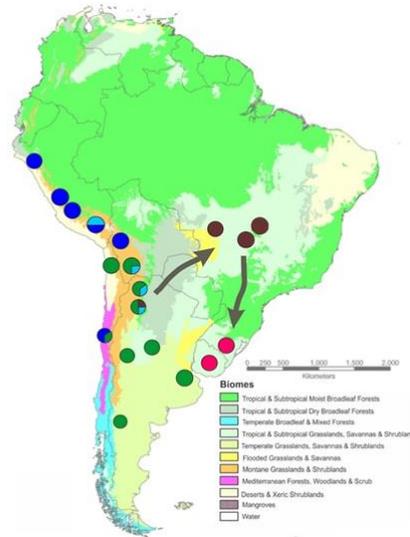


Figura 2. Mapa gerado por Santos (2012) mostrando os grupos genéticos identificados ao longo da distribuição de *Leopardus colocolo*. Os círculos representam grupos amostrais, e a cor indica a presença de haplótipos associados com cada um dos grupos genéticos identificados. As setas indicam o provável caminho de diversificação e colonização das populações atuais de *L. colocolo* no Brasil e Uruguai a partir do oeste da América do Sul.

Apesar de possuir uma ampla área de distribuição, *L. colocolo* é um dos felídeos menos conhecidos da América do Sul (Silveira 1995). Além disso, a taxonomia da espécie tem gerado bastante controvérsia ao longo do tempo. Embora muitos estudos já tenham sido desenvolvidos, a evolução da espécie, bem como sua divisão em subespécies ainda não está clara. Utilizando análises de morfologia craniana e padrões de coloração de pelagem, juntamente com a distribuição da espécie, García-Perea (1994) dividiu os gatos-palheiros em três espécies distintas: *L. colocolo* (com ocorrência restrita ao centro e noroeste do Chile), *L. pajeros* (do Equador até a Patagônia Chilena, ocorrendo ao longo dos Andes) e *L. braccatus* (Paraguai, Uruguai, região sul e central do Brasil). Ainda segundo esta classificação, *L. braccatus* é dividido em duas subespécies, sendo estas: *L. b. braccatus*, ocorrendo no Paraguai e na região centro-oeste do Brasil (Cerrado) e *L. b. munoai*, ocorrendo no Uruguai e sul do Brasil (Pampa) (García-Perea 1994; Barstow e Leslie 2012).

Embora o estudo baseado em caracteres morfológicos tenha indicado a divisão de *L. colocolo* em três espécies distintas (García-Perea 1994), estudos moleculares sugerem uma filogenia baseada em uma única espécie e várias subespécies (Johnson et

al. 1999; Cossíos et al. 2009). Apesar disso, Johnson et al. (1999), Napolitano et al. (2008) e Cossíos et al. (2009) reconheceram, em seus trabalhos, que algumas populações do oeste da América do Sul estão geneticamente estruturadas e que elas provavelmente passaram por significantes e longos períodos de isolamento e redução do fluxo gênico. Johnson et al. (1999) indicam que as populações existentes divergiram de um ancestral comum cerca de 1.7 milhões de anos atrás e que desde então os numerosos períodos glaciais e interglaciais teriam alterado a distribuição dos habitats utilizados por *L. colocolo*, podendo ter levado a mudanças nos tamanhos das populações e suas distribuições. Além disso, as áreas de campo geralmente são separadas por desertos áridos, montanhas altas e florestas úmidas, o que aumentaria a probabilidade de diminuição do fluxo gênico e dos tamanhos efetivos das populações. Essas condições podem levar a populações isoladas, sujeitas à deriva, seleção natural localizada e ao estabelecimento de diferenças geográficas intraespecíficas fixas.

Em um estudo filogeográfico baseado em genes de DNA mitocondrial de *L. colocolo* amostrados no Brasil, Santos (2012) evidenciou a diferenciação genética entre os indivíduos do centro-oeste e do sul do Brasil, apresentando baixo fluxo gênico entre as regiões. Do mesmo modo, com base na morfologia craniana e nos padrões de coloração destas duas subespécies, Nascimento (2010) demonstrou a existência de diferenciação morfológica entre estas populações, sugerindo a elevação das subespécies brasileiras para o nível de espécie, sendo *L. munoai* para o Uruguai e Rio Grande do Sul e *L. braccatus* para o Paraguai e Brasil central. No entanto, Santos (2012) indicam cautela no reconhecimento de espécies distintas para o gato-palheiro no Brasil, indicando a ausência de fortes evidências que comprovem esta distinção. Estes trabalhos evidenciam a falta de informação sobre as populações de gato-palheiro que ocorrem no Brasil, demonstrando a necessidade de pesquisas mais aprofundadas, visando esclarecer a evolução desta espécie no território brasileiro e assim implementar medidas adequadas para a preservação da espécie no país.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Investigar a história evolutiva de *L. colocolo* e gerar novas informações sobre as relações genéticas da espécie no Brasil.

## **2.2. Objetivos Específicos**

1) Analisar a variabilidade genética das populações de *L. colocolo* na região central e sul do Brasil através da análise de marcadores moleculares do tipo microssatélites.

2) Utilizar as informações obtidas para analisar a distribuição geográfica da variabilidade genética no Brasil, analisando processos de fluxo gênico, isolamento genético e estrutura populacional.

3) Contribuir para a elaboração de programas de manejo e conservação para a espécie no Brasil.

### 3. CAPÍTULO I

#### **Diversidade genética e estruturação populacional do gato palheiro (*Leopardus colocolo*) no Brasil: diretrizes para a conservação.**

Caroline Charão Sartor\*, Tatiane Campos Trigo, Eduardo Eizirik, Thales R. O. de Freitas

Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil (CCS, TROF)

Setor de Mastozoologia, Museu de Ciências Naturais, Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 90690-000, Porto Alegre, RS, Brasil (TCT)

Faculdade de Biociências, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 6681, prédio 12, sala 172. Porto Alegre, RS 90619-900, Brasil (EE)

Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Caixa Postal 15007, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brasil (TROF).

\* Autor correspondente: [caroline.c.sartor@gmail.com](mailto:caroline.c.sartor@gmail.com)

Artigo em preparação a ser submetido na Journal of Mammalogy.

## **Resumo**

Alterações naturais ou de origem antropogênica nos habitats das espécies podem provocar modificações em seus padrões de distribuição geográfica. Essas modificações podem apresentar consequências genéticas, como diminuição do fluxo gênico, divergência genética e até mesmo especiação. Estudar as consequências das modificações históricas e atuais na distribuição das espécies silvestres vem ganhando importância em estudos de conservação. Reconhecer linhagens com histórias evolutivas independentes e adaptações ecológicas locais permite o desenvolvimento de medidas efetivas de conservação. Neste trabalho nós analisamos 13 locos de microssatélites para caracterizar a divergência genética de dois grupos populacionais geograficamente disjuntos de *Leopardus colocolo* no Brasil. Nossos resultados demonstram que ambos os grupos estão geneticamente estruturados e possuem um baixo fluxo gênico entre eles. Esses resultados corroboram os dados de estudos anteriores feitos com base em genes de DNA mitocondrial. Nós recomendamos que estes grupos populacionais sejam considerados Unidades de Manejo independentes para que seja possível desenvolver medidas apropriadas para a conservação da espécie no Brasil.

Palavras-chave: América do Sul, divergência gênica, Felidae, microssatélites, unidades de manejo.

## **Introdução**

Programas efetivos para a conservação de espécies ameaçadas requerem a análise da variabilidade genética e da divergência gênica entre as populações de uma espécie (Jones et al. 2004). A variabilidade genética é um componente importante para a manutenção da integridade e viabilidade de uma população em longo prazo (England et al. 2003) e está diretamente relacionada com seu tamanho efetivo (Lande 1988; Frankham et al. 2002). Populações pequenas estão sujeitas à deriva genética e ao endocruzamento, que podem diminuir sua diversidade genética. A perda da variabilidade genética reduz o *fitness* dos indivíduos, afetando sua capacidade de resistir a doenças e de se adaptar a mudanças ambientais (Lande 1988; Altizer et al. 2003).

As populações naturais geralmente apresentam algum nível de estruturação genética, com áreas com menor ou maior fluxo gênico entre elas. O fluxo gênico

aumenta a variabilidade genética das populações e reduz os efeitos do endocruzamento e da deriva gênica (Frankham et al. 2002). Porém, a existência de barreiras ou grandes distâncias geográficas entre duas populações limitam o deslocamento de indivíduos entre estas. Assim, o grau de estruturação genética de uma população é resultado de restrito fluxo gênico desta com as demais (Jones et al. 2004; Tammeleht et al. 2010). Populações geneticamente diferenciadas podem representar linhagens evolutivas independentes, que possuem adaptações ecológicas locais (Moritz e Faith 1998; Taylor e Dizon 1999). Em razão disso, estudar e compreender a estruturação espacial das populações possui grande importância para o estabelecimento de unidades adequadas para medidas de conservação (Moritz 1999).

O gato palheiro, *Leopardus colocolo*, é um felino de pequeno porte que apresenta uma ampla distribuição geográfica, podendo ser encontrado desde os Andes do Equador e da Bolívia, até o sul do Chile e da Argentina, além do Paraguai, Brasil e Uruguai, estando associado a ambientes abertos (Nowell e Jackson 1996; Eisenberg e Redford 1999; Sunquist e Sunquist 2002). Embora possua uma ampla área de distribuição, é um dos felinos menos conhecidos da América do Sul (Silveira 1995). No Brasil sua distribuição é incerta (Oliveira & Cassaro, 1999; Queirolo et al. 2013), embora saiba-se que ocorre nos biomas Cerrado e Pantanal, na região Centro-Oeste do país, e no bioma Pampa, no sul do estado do Rio Grande do Sul (Oliveira e Cassaro 1999; Silveira et al. 2005; Sánchez-Soto 2007; Queirolo et al. 2013), cuja população parece estar em contato com a população do Uruguai (Barstow e Leslie 2012; Santos 2012).

A taxonomia de *L. colocolo* tem representado um desafio. Baseado em características da morfologia craniana, padrões de coloração da pelagem e distribuição da espécie, os gatos-palheiros foram divididos em três espécies distintas e 11 subespécies, sendo que no Brasil duas subespécies foram reconhecidas: *L. braccatus braccatus*, ocorrendo na região centro-oeste do Brasil (Cerrado e Pantanal) e *L. b. munoai*, ocorrendo no sul do Brasil (Pampa) e Uruguai (García-Perea 1994). Contudo, estudos moleculares sugerem uma filogenia baseada em uma única espécie e várias subespécies, embora seja reconhecido que algumas populações estejam geneticamente estruturadas (Johnson et al. 1999; Cossíos et al. 2009; Santos 2012). Johnson et al. (1999) sugerem que as populações existentes divergiram de um ancestral comum cerca de 1.7 milhões de anos atrás e que desde então os períodos glaciais e interglaciais teriam

alterado a distribuição dos habitats utilizados por *L. colocolo*, levando a mudanças nas distribuições das populações, no tamanho efetivo e fluxo gênico entre elas. Ainda, algumas populações podem ter ficado isoladas, sujeitas à deriva e seleção natural localizada, o que levou ao estabelecimento de diferenças geográficas intraespecíficas fixas.

Em um estudo filogeográfico com base no DNA mitocondrial, evidenciou-se a diferenciação genética entre as populações brasileiras de *L. colocolo* do sul e centro-oeste do país, apresentando uma alta estruturação e um baixo fluxo gênico entre as regiões (Santos 2012). Esta diferenciação já havia sido demonstrada em um estudo morfológico, no qual o autor sugeriu a elevação das subespécies brasileiras para o nível de espécie (Nascimento 2010). Entretanto, a análise de marcadores de herança unicamente maternal impossibilita a avaliação da real extensão da divergência evolutiva entre estas populações.

Tendo em vista a falta de informação sobre as populações brasileiras de *L. colocolo* e que a taxonomia existente pode não refletir a diversidade genética da espécie de forma adequada, o presente estudo tem por objetivo analisar a variabilidade genética das populações brasileiras, a fim de avaliar o nível de estruturação genética existente entre as populações do centro e sul do Brasil por meio da investigação de marcadores moleculares de microssatélites. A definição desta estruturação, assim como a caracterização genética de cada população é fundamental para o estabelecimento de estratégias adequadas de manejo e conservação da espécie no país.

## **Materiais e Métodos**

### Coleta de amostras e procedimentos laboratoriais

As amostras biológicas foram obtidas de animais de cativeiro com origem conhecida, indivíduos atropelados, indivíduos capturados em estudos de ecologia e exemplares de museus taxidermizados. No total, foram obtidas amostras de 45 exemplares de *Leopardus colocolo* provenientes dos dois grandes grupos populacionais brasileiros: 23 indivíduos do Centro-Oeste do Brasil (CO), abrangendo os estados de Mato Grosso do Sul, Maranhão, Tocantins e Goiás, e 22 indivíduos do estado do Rio Grande do Sul e Uruguai (RS-U) (Figura 1). Amostras do Uruguai foram incluídas neste estudo considerando-se os resultados obtidos por Santos (2012) que indicam a

existência de uma população única entre este país e o estado do Rio Grande do Sul, com base na análise de genes mitocondriais.

Ainda, com o intuito de verificar a divergência gênica entre as populações brasileiras e uruguaias e as demais populações da América do Sul, foram incluídas oito amostras de exemplares provenientes do Chile, Argentina e Bolívia. Para a realização das análises, essas oito amostras foram tratadas como um único grande grupo populacional, aqui denominadas como grupo Oeste da América do Sul (OAS).

As extrações de DNA genômico das amostras de sangue e tecido foram realizadas utilizando o protocolo padrão de fenol/clorofórmio (Sambrook et al. 1989; Palumbi et al. 1991) e CTAB (Doyle e Doyle 1987), respectivamente. Para a extração das amostras de pele, foi utilizado o kit comercial QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN), com protocolo adaptado para amostras de pele.

Treze locos de microssatélite [10 locos com repetição tetranucleotídica (FCA391, FCA424, FCA441, FCA453, F42, F124, FCA723, FCA730, FCA559 e FCA734), 2 com trinucleotídica (F98 e F146) e 1 com dinucleotídica (FCA77)], desenvolvidos originalmente para o gato doméstico (Menotti-Raymond et al. 1999, 2005), foram amplificados separadamente por reação de cadeia de polimerase (PCR). As reações de PCR foram realizadas em um volume de 15  $\mu$ L contendo 1,5–3,0 mM  $MgCl_2$ , 0,2 mM dNTPs, 0,5U de Taq DNApolimerase, e 0,1 $\mu$ M de primers *forward* e *reverse*. As condições de amplificação foram definidas como: 94°C por 3 minutos, 10 ciclos de 94°C por 45 segundos, *touchdown* de 60-51°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto e 30 ciclos de 94°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos, 72°C por 1 minuto, seguido de 10 minutos de extensão final a 72°C.

Os produtos de PCR foram combinados por diferenças no tamanho dos fragmentos gerados, e uso de diferentes fluorescências. A genotipagem foi realizada em sequenciador ABI 3100 (Applied Biosystems) na empresa Macrogen. Os resultados das genotipagens foram analisados no software PEAK SCANNER v1.0 (Applied Biosystems). A fim de confirmar os genótipos e evitar erros, os resultados da genotipagem foram analisados por duas pessoas separadamente e 20% das genotipagens foram repetidas.

### Análise dos dados

Todos os locos foram avaliados para detecção de possíveis erros de genotipagem devido a presença de *stutters*, *allele drop-out* e alelos nulos através do programa MICRO-CHECKER (Van Oosterhout et al. 2004). A diversidade genética foi calculada para cada grupo populacional separadamente, considerando o número de alelos por loco (A), o número de alelos privados (E), a riqueza alélica (AR), a heterozigotidade observada (Ho) e esperada (He). Estes índices foram determinados pelos programas FSTAT 2.9.3.2 (Goudet 2002) e ARLEQUIN 3.5.1.2 (Excoffier e Lischer 2010). Diferenças significativas entre os valores de Ho e AR obtidos para cada uma das populações alvo, CO e RS-U, foram testadas no programa FSTAT através da análise de comparação de grupos de amostras, usando um total de 10.000 permutações.

Desvios do equilíbrio de Hardy-Wenberg (HWE) e desequilíbrio de ligação (LD) foram avaliados para a amostra como um todo e para cada uma das populações (OAS, CO e RS-U), nos programas ARLEQUIN e GENEPOP 4.1 (Raymond e Rousset 1995; Rousset 2008), respectivamente. Níveis significantes de LD e desvios do HWE foram ajustados com o método sequencial de Bonferroni, considerando múltiplas comparações simultâneas (Rice 1989).

A existência de estruturação populacional e a designação de indivíduos a sua população fonte foi determinada através da análise de *clustering* Bayesiano no programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard et al. 2000). Foram conduzidas 10 corridas independentes para cada valor de K, variando de um a seis grupos, com 1.000.000 interações de MCMC (Markov Chain Monte Carlo) e um período de *burn-in* de 500.000 interações, sem utilizar informações prévias da origem geográfica das amostras. O programa foi rodado primeiramente com modelo de frequências alélicas independentes e depois com frequências correlacionadas, seguindo sugestão dos autores do programa. Os resultados destas análises foram analisados utilizando o software online STRUCTURE HARVESTER (Earl e vonHoldt 2012), incluindo uma avaliação do número de *clusters* geneticamente diferenciados através do método proposto por Evanno et al. (2005).

Após determinado o valor de K, um segundo passo foi realizado (considerando K=3 e modelo de frequências alélicas independentes; ver resultados abaixo) para identificar possíveis migrantes e indivíduos com ancestralidade compartilhada em mais de um *cluster* genético. Para esta análise, foi adicionada a informação *a priori* de

origem dos indivíduos, considerando os três grupos como populações distintas. Os mesmos valores de interações e *burn-in* da análise anterior, realizada sem a informação de população, foram utilizados neste segundo momento. Os indivíduos foram classificados como residentes quando apresentaram valores de  $q > 0,8$  para a área onde foram amostrados, e migrantes com  $q > 0,8$  para uma localidade distinta de sua área de coleta. Indivíduos com valores de  $q < 0,80$  em qualquer um dos grupos populacionais analisados foram considerados apenas como miscigenados, conforme utilizado por Haag et al. (2010). Para todas as corridas foi assumido o modelo de mistura.

A atribuição/exclusão de indivíduos através de populações previamente definidas foi realizada pelo programa GENECLASS 2 (Piry et al. 2004). O mesmo programa foi utilizado também para detectar migrantes de primeira geração, empregando o critério Bayesiano (Rannala e Mountain 1997), com 100 simulações individuais para o método de reamostragem de Monte Carlo e um alfa de 0,01 (Paetkau et al. 2004). Foi calculado um teste razão de verossimilhança comparando a população onde o indivíduo foi amostrado sobre o maior valor de verossimilhança entre todas as populações ( $L = L_{\text{home}}/L_{\text{max}}$ ).

Para avaliar o grau de diferenciação genética entre os grupos populacionais definidos pelas análises no programa STRUCTURE, foram calculados os índices  $F_{ST}$  (Weir e Cockerham 1984) e  $R_{ST}$  (Slatkin 1995) par a par no programa ARLEQUIN. Cada teste foi realizado com 10.000 permutações para avaliar o grau de significância do valor calculado.

O tamanho efetivo das populações do CO e RS-U foi determinado pelo programa LDNe (Waples e Do 2008), que se baseia no método do equilíbrio de ligação e implementa a correção de Waples (2006). Para este procedimento foi utilizado o método de Jackknife sob o modelo de cruzamento randômico e valores críticos ( $P_{\text{crit}}$ ) de 0,05, 0,02 e 0,01. Devido ao pequeno número de amostras provenientes do grupo OAS, e como este grupo populacional não é o enfoque do trabalho, esta população não foi incluída nesta análise. Recentes reduções no tamanho efetivo destas duas populações foram também testadas com o programa BOTTLENECK 1.2.02 (Cornuet e Luikart 1996), assumindo os modelos *Stepwise mutation* (SMM) (Kimura e Ohta 1978) e *Two-phase mutation* (TPM) (Di Rienzo et al. 1994) com 1.000 de interações. O teste de Wilcoxon foi utilizado para verificar o nível de significância de excesso ou deficiência de heterozigoto em cada população. Estimativas de endocruzamento em cada uma das

populações foram obtidas através do cálculo do *F<sub>is</sub>* no programa FSTAT, com teste de significância com base em 26.000 randomizações.

## **Resultados**

### Diversidade genética

Todos os locos mostraram-se polimórficos. A heterozigidade observada (*H<sub>o</sub>*) variou entre 0,650 a 0,673 e a riqueza alélica entre 4,438 e 4,528 entre os três grupos populacionais (Tabela 1). Não houve diferença significativa entre os valores obtidos para as populações do CO e RS-U.

O nível de diversidade encontrado nas populações do CO e RS-U foi bastante similar, tanto para a heterozigidade observada quando para o número médio de alelos. No entanto, as duas populações apresentaram um alto número de alelos exclusivos, sendo 14 identificados em CO e 13 no RS-U.

Uma avaliação dos dados de microssatélite como um todo (considerando-se apenas uma população) indicou a presença de alelos nulos em 11 dos 13 locos analisados. No entanto, quando analisados os três grupos populacionais separadamente, evidencia-se uma grande redução destes, sendo a presença de alelos nulos identificada em apenas um loco para o grupo OAS (FCA723) e para o grupo CO (F124), e em quatro locos para o grupo RS-U (FCA391, F124, FCA77 e FCA730).

Desvios significativos no HWE foram observados em 4 locos (F42, F124, FCA77 e FCA734) quando todas as amostras foram tratadas como uma única população. Para este mesmo conjunto de dados, desvios do equilíbrio de ligação foram identificados em 5 pares de locos (F98xFCA453, F98xF124, FCA441xFCA723, FCA391xFCA730 e F124xFCA559), após a correção de Bonferroni. No entanto, quando analisados os três grupos separadamente, OAS e CO apresentaram apenas um loco com desvio no HWE (FCA723 e F124, respectivamente) e nenhum desequilíbrio de ligação, enquanto RS-U apresentou apenas dois locos com desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (F42 e FCA77) e quatro pares de locos em desequilíbrio de ligação (FCA453xFCA723, F98xFCA723, FCA424xFCA559, FCA124xFCA559), após a correção de Bonferroni. A redução do número de locos com alelos nulos e locos com desvios no HWE e desequilíbrio de ligação quando analisados os dados gerais e depois

divididos em grupos populacionais sugerem que estes estão relacionados a existência de estruturação genética na espécie.

### Estruturação populacional

Na análise Bayesiana de *clusters* realizada com o programa STRUCTURE para identificar o número de populações geneticamente diferenciadas em nossa amostra, o melhor K (número de populações) encontrado para o modelo de frequências alélicas independentes foi  $K = 3$ , tanto para o valor médio de  $\text{LnP}(D)$  ( $\text{LnP}(D) = -2249,76$ ), como para valor de delta K (Figura S1 material suplementar). Para a análise feita com frequências alélicas correlacionadas foram encontrados dois valores possíveis para K através do valor médio de  $\text{LnP}(D)$ , um com  $K = 3$  ( $\text{LnP}(D) = -2268,39$ ), e um com  $K = 4$  ( $\text{LnP}(D) = -2259,91$ ) (Figura S2.a e S2.b na Informação Suporte). Porém, quando analisado pelo método de Evanno, evidenciou-se um grande suporte para  $K = 3$ . Devido a diferenciação genética encontrada entre os grupos populacionais estudados (ver resultados abaixo), principalmente entre o grupo OAS e os demais, foi considerado apenas o resultado do modelo de frequências independentes, visto que o modelo de frequências correlacionadas é mais indicado para populações estreitamente relacionadas. Considerando a frequência alélica independente, os indivíduos foram separados em três *clusters* que correspondem basicamente aos grupos geográficos pré-definidos, embora eles aparentem ter alguns migrantes e outros indivíduos com genótipos misturados (Figura 2a).

Considerando-se os três principais grupos genéticos identificados pelo programa STRUCTURE, foram realizadas estimativas de extensão da diferenciação genética com base nos índices  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$ . Os resultados para a análise de  $F_{ST}$  par a par encontrados apresentaram-se altamente significativos entre as três populações consideradas, podendo ser considerados valores moderados de diferenciação genética. Para o índice  $F_{ST}$ , os valores foram bastante similares entre os grupos, apesar da diferenciação identificada entre os grupos CO e RS-U ter sido mais baixa (Tabela 2). Os resultados obtidos para a análise de  $R_{ST}$  par a par também foram significativos, com exceção da comparação entre os grupos CO x RS-U. As comparações incluindo o grupo OAS apresentaram os valores mais altos tanto de  $F_{ST}$  como de  $R_{ST}$ , sendo a maior diferenciação genética detectada entre este grupo e a população RS-U para ambos os marcadores, mas com maior intensidade pelo índice  $R_{ST}$ .

Na análise de atribuição/exclusão de indivíduos feita pelo GENECLASS, 46 dos 53 (86,8%) indivíduos de gato-palheiro amostrados foram atribuídos com altas probabilidades ao local onde foram amostrados. O programa GENECLASS ainda identificou três possíveis migrantes: bLco31, Lco13 e bLco26 ( $p < 0,01$ ) (Tabela 3). Destes, apenas um (bLco26) foi identificado como migrante pelo programa STRUCTURE (Figura 2b; Tabela S1 na Informação Suporte) na análise que informou previamente a população de origem dos indivíduos, apresentando um valor de  $q > 0,8$  para a localidade do CO, tendo sido amostrado na região do grupo populacional RS-U. O programa STRUCTURE também identificou o indivíduo bLco14 como possível migrante do centro-oeste brasileiro (CO) para a região do OAS. Outros cinco indivíduos (bLco04, bLco05, bLco31, Lco13 e bLco21) apresentaram valores intermediários entre os grupos populacionais (inferiores a 0,80 em todos os *clusters*), sendo então classificados como indivíduos com ancestralidade compartilhada em mais de um *cluster* genético.

Com relação ao tamanho efetivo, os resultados obtidos variaram para a população do CO de acordo com o critério de exclusão de alelos raros, enquanto que para o grupo RS-U, os valores se mantiveram relativamente constantes entre os diferentes métodos (Tabela 4). Para a população do CO, a estimativa realizada após a exclusão de todos os alelos com frequência menor que 0,05 gerou valores bastante semelhante aos valores obtidos para a população do RS-U. Por outro lado, a redução do critério de eliminação dos alelos ( $P_{crit} = 0,02$  e  $0,01$ ) gerou estimativas de tamanho efetivo bem mais elevadas, com a inclusão de “infinito” no intervalo, o que segundo manual do programa, indica não haver evidência de nenhum desequilíbrio de ligação causado pela deriva genética associada a um número finito de indivíduos reprodutivos. Para a população do RS-U, no entanto, os valores semelhantes obtidos para todos os critérios utilizados indicam um tamanho efetivo reduzido, em torno de 50 indivíduos, e intervalos de confiança com valores máximos obtidos abaixo de 150 indivíduos.

Nas análises intrapopulacionais, o valor de  $F_{is}$  obtido como estimativa de endocruzamento foi menor para a população do CO ( $F_{is} = 0,074$ ) do que para a população do RS-U ( $F_{is} = 0,132$ ), sendo que apenas o valor obtido para esta última apresentou-se estatisticamente significativo ( $P = 0,0070$  para o CO, e  $P = 0,0001$  para RS-U, considerando valor de  $p = 0,00192$ , ajustado para múltiplas comparações). Quando testados para a ocorrência de *bottlenecks* recentes, nenhum dos grupos populacionais

demonstrou sinais de excesso de heterozigotos. No entanto, o excesso de homozigotos existente no grupo RS-U sugere que este sofreu um processo mais antigo de redução do seu tamanho efetivo, levando ao cruzamento de indivíduos aparentados.

## **Discussão**

### Diversidade Genética

Os resultados encontrados neste estudo demonstram que a diversidade genética dos grupos populacionais brasileiros de *L. colocolo* podem ser consideradas razoavelmente altas e semelhante a níveis encontrados para populações de onças (*Panthera onca*) da Floresta Atlântica e Pantanal (Haag et al. 2010; Valdez et al. 2015). Ainda, quando comparados com os valores de diversidade encontrados para *Leopardus jacobita* (Cossíos et al. 2012) e *Puma yaguarundi* (Holbrook et al. 2013), a variabilidade genética das populações brasileiras de *L. colocolo* mostra-se evidentemente mais alta.

Os níveis de variabilidade encontrados neste estudo foram mais elevados que os valores encontrados por Cossíos et al. (2009) para populações de gato-palheiro do oeste da América do Sul. No entanto, este tipo de comparação deve ser evitado, pois os locos de microssatélites utilizados nos estudos foram diferentes. Um estudo feito por Trigo et al. (2008), utilizando nove, dos 13 microssatélites aqui utilizados, encontrou uma heterozigotidade esperada mais elevada ( $He = 0,85$ ) para *L. colocolo*, porém esta pode ser devido ao fato de que os seis indivíduos utilizados no estudo eram de diferentes regiões geográficas (Argentina, Bolívia, Chile e Brasil).

### Estruturação populacional

As análises realizadas indicam que os grupos populacionais brasileiros possuem estruturação genética e correspondem a dois *clusters* genéticos distintos, corroborando os dados de Santos (2012). Em concordância com a análise de agrupamento Bayesiano, a estimativa de diferenciação das populações brasileiras baseada no  $F_{ST}$  foi significativa e pode ser considerada como moderada. O valor de  $R_{ST}$  entre os grupos populacionais brasileiros não foi significativo, o que sugere que a diferenciação genética entre estas

populações seja devido à deriva genética e não a mutações (Haag et al. 2010), sendo considerada como uma diferenciação relativamente recente das populações.

A maior divergência genética, porém, está entre o grupo OAS e os grupos brasileiros. De acordo com Santos (2012), as linhagens de *L. colocolo* se expandiram do Oeste para a região Central do Brasil e dali para a região Sul. Isto é corroborado pela diferenciação genética encontrada entre a população do Rio Grande do Sul e Uruguai e as populações do oeste da América do Sul, tanto para o DNAm (Santos 2012), como para os microssatélites. Com base nos nossos dados, ao considerar os indivíduos potencialmente migrantes ou miscigenados indicados pelas análises no GENECLASS e STRUCTURE, nenhum deles apresentou uma herança compartilhada evidente entre estas populações. Apesar da proximidade geográfica das populações argentinas com a população do Rio Grande do Sul e Uruguai, nossos resultados demonstram que não há aparente fluxo gênico entre estas, dando suporte à hipótese de Johnson (1999), de que as bacias dos rios Paraguai, Uruguai e Paraná formam uma barreira significativa para o fluxo gênico da espécie.

Ainda, os valores de divergência gênica encontrados entre os grupos populacionais estão de acordo com os resultados encontrados por Johnson et al. (1999) para a distribuição geral do gato-palheiro. Segundo os autores deste estudo, a baixa variação intraespecífica sugere que as populações geograficamente distintas divergiram recentemente e permaneceram relativamente pequenas. Acredita-se que a retração das florestas e a expansão de pastagens e savanas devido ao clima mais frio e seco das eras do gelo (Hewitt 1996; Hewitt 2000), permitiu que as populações de *L. colocolo* expandissem suas distribuições, inclusive do centro-oeste para o sul do Brasil. Porém, o aumento da temperatura e humidade no final do Pleistoceno, início do Holoceno, permitiram a expansão das florestas tropicais (De Vivo e Carmignotto 2004), o que provavelmente levou ao declínio demográfico e isolamento de algumas populações de *L. colocolo*, como a população do Rio Grande do Sul e Uruguai.

Quanto a designação de indivíduos às suas populações de origem, as análises indicaram que a maior parte dos gatos-palheiros se originaram nos grupos populacionais onde foram amostrados. Considerando as duas análises realizadas, puderam-se identificar apenas quatro indivíduos claramente como migrantes e mais três com evidências de miscigenação. Isto demonstra que o fluxo gênico entre as populações das duas regiões brasileiras e destas com as populações do oeste da América do Sul é baixo

e parece não ser suficiente para impedir a diferenciação genética entre estas. Além disto, as análises de identificação de migrantes demonstram um fluxo prioritário do centro-oeste brasileiro em direção ao oeste da América do Sul e Rio Grande do Sul-Uruguai, corroborando os dados de Santos (2012), e indicando a baixa taxa de migração da região sul Brasileira e Uruguai em direção aos outros grupos populacionais.

Embora o grupo RS-U esteja parcialmente isolado, sua diversidade genética não parece estar reduzida. Na verdade, sua variabilidade gênica mostrou ser tão elevada quanto a do grupo CO, apesar de terem sido encontrados indícios de ocorrência de endocruzamento. Ainda que não foram detectados eventos de *bottlenecks* recentes, a expansão da Floresta Atlântica provavelmente causou uma redução no tamanho efetivo deste grupo, levando ao cruzamento de indivíduos aparentados. Esse declínio populacional, porém, deve ter sido gradual, tendo em vista que a diversidade genética desta população não parece ter sofrido grandes impactos (Frankham et al. 2002).

No entanto, o grupo RS-U requer atenção especial, pois além de nossos dados indicarem a ocorrência de endocruzamento nesta população, seu tamanho populacional efetivo estimado é de cerca de 30 – 120 indivíduos para todos os critérios de exclusão de alelos raros calculados. Apesar de não ser conhecido o quão grandes as populações naturais devem ser para evitar o endocruzamento e a perda de diversidade genética a longo prazo, sabe-se que este valor é maior que 100 exemplares (Frankham et al. 2002). Segundo Frankham et al. (2002), o tamanho efetivo de uma população corresponde em média a 10% do tamanho de censo, e, neste caso, teríamos uma população de *L. colocolo* restrita ao sul do estado do Rio Grande do Sul e Uruguai de cerca de 300 a 1200 indivíduos, sendo suficiente para considerá-la como uma população ameaçada segundo critérios da IUCN (IUCN 2010).

Os resultados encontrados neste estudo confirmam a diferenciação genética dos grupos populacionais brasileiros de *L. colocolo* encontrada por Santos (2012) com base no DNA mitocondrial. Embora os valores de divergência gênica entre os grupos não sejam muito altos, o fluxo gênico entre eles parece ser muito pequeno, dando suporte à teoria de Johnson et al. (1999) de que algumas populações de *L. colocolo* estariam isoladas. A expansão da Floresta Atlântica durante o início do Holoceno provavelmente separou os dois grupos populacionais e funciona como uma barreira para esta espécie de habitats abertos. Assim, as populações do Rio Grande do Sul e Uruguai parecem estar isoladas ao norte pela Floresta Atlântica e ao oeste pelos rios Paraná, Uruguai e

Paraguai. Provavelmente a espécie mantém-se naturalmente com baixas densidades nesta região desde o processo evolutivo de isolamento. No entanto, algumas características populacionais decorrentes deste evento como baixo tamanho efetivo e sinais de endogamia, quando associadas a pressões crescentes de redução de habitat pela conversão dos campos nativos em agropastoris e crescimento das populações humanas, podem tornar-se extremamente perigosas para a conservação da espécie nesta região em longo prazo.

#### Implicações para a conservação

O conceito de unidades evolutivamente significativas (UESs) e unidades de manejo (UMs) foi criado com o objetivo de determinar unidades prioritárias para a conservação abaixo do nível de espécie e assim preservar linhagens evolutivas independentes e adaptações ecológicas a níveis populacionais (Moritz 1994). Para isto, é essencial ter o conhecimento da história evolutiva da espécie e do grau de diferenciação genética entre as populações. Os resultados encontrados neste estudo evidenciam a diferenciação genética entre os dois grupos populacionais do centro-oeste e sul do Brasil de gato-palheiro. Em razão disso, recomendamos que estas populações sejam tratadas como UMs independentes e que sejam desenvolvidos planos de manejo e conservação diferentes para cada população, para que assim seja possível aplicar metodologias de manejo adequadas para cada uma. Além disso, recomendamos que os níveis de diversidade genética da população do Rio Grande do Sul e Uruguai sejam monitorados, pois populações isoladas, com pequeno tamanho efetivo e evidências de endocruzamento tendem a sofrer diminuição da variabilidade genética, o que diminui a viabilidade da população a longo prazo e assim, esta população pode vir a necessitar de medidas de manejo mais intensas.

#### **Agradecimentos**

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por financiar este protejo. Agradecemos ainda a todos os pesquisadores que cederam amostras para este estudo, em especial ao Museu Nacional de História Natural do Uruguai que nos cedeu amostras de *L. colocolo* e ao curador da

divisão de mamíferos do museu, Enrique Gonzalez, que sempre se mostrou disposto em ajudar e nos encaminhou as amostras do Uruguai utilizadas no estudo.

## Literatura Citada

- Altizer, S., D. Harvell, and E. Friedle. 2003. Rapid evolutionary dynamics and disease threats to biodiversity. *Trends in Ecology and Evolution* 18:589–596.
- Barstow, A., and D. M. Leslie Jr. 2012. *Leopardus braccatus* (Carnivora: Felidae). *Mammalian Species* 44:16-25.
- Cornuet, J. M., and G. Luikart. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics* 144:2001-2014.
- Cossíos, D., A. Madrid, J. L. Condori, and U. Fajardo. 2007. Update on the distribution of the Andean cat *Oreailurus jacobita* and the pampas cat *Lynchailurus colocolo* in Peru. *Endangered Species Research* 3:313–320.
- Cossíos, D., M. Lucherini, M. Ruiz-García, and B. Angers. 2009. Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). *BMC Evolutionary Biology* 9:68.
- Cossíos, E., R. Walker, M. Lucherini, M. Ruiz-García, and B. Angers. 2012. Population structure and conservation of a high-altitude specialist, the Andean cat *Leopardus jacobita*. *Endangered Species Research* 16:283-294.
- De Vivo, M., and A. P. Carmignotto. 2004. Holocene vegetation change and the mammal faunas of South America and Africa. *Journal of Biogeography* 31:943-957.
- Di Rienzo, A., A. C. Peterson, J. C. Garza, A. M. Valdes, M. Slatkin, and N. B. Freimer. 1994. Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91:3166-3170.
- Doyle, J. J., and J. L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin* 19:11-15.
- Earl, D. A., and B. M. vonHoldt. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources* 4:359–361.
- Eisenberg, J. F., and K. H. Redford. 1999. *Mammals of the Neotropics – The Central Neotropics*. University of Chicago Press. Chicago, USA.

- England, P. R., G. H. R. Osler, L. M. Woodworth, M. E. Montgomery, D. A. Briscoe, and R. Frankham. 2003. Effects of intense versus diffuse population bottlenecks on microsatellite genetic diversity and evolutionary potential. *Conservation Genetics* 4:595-604.
- Evanno, G., S. Regnaut, and J. Goudet. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology* 14:2611–2620.
- Excoffier, L., G. Laval, and S. Schneider. 2005. Arlequin (version 3.0): an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online* 1:47.
- Frankham, R., J. D. Balloux, and D. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. 617 pp.
- García-Perea, R. 1994. The Pampas Cat Group (Genus *Lynchailurus* Severtzov, 1858) (Carnivora: Felidae), a systematic and biogeographic review. *American Museum novitates* 3096:1-36.
- Goudet, J. 2002. FSTAT: A program to estimate and test gene diversities and fixation indices. Lausanne: Institute of Ecology, Switzerland.
- Haag, T., et al. 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* 19:4906-4921.
- Hewitt, G. 2000. The genetic legacy of the Quaternary ice ages. *Nature* 405:907-913.
- Hewitt, G. M. 1996. Some genetic consequences of ice ages, and their role in divergence and speciation. *Biological Journal of the Linnean Society* 58:247-276.
- Holbrook, J. D., A. Caso, R. W. Deyoung, and M. E. Tewes. 2013. Population genetics of jaguarundis in Mexico: implications for future research and conservation. *Wildlife Society Bulletin* 37:336-341.
- Johnson, W. E., et al. 1999. Disparate phylogeographic patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology* 8:S79-S94.

- Jones, M. E., D. Paetkau, E. L. I. Geffen, and C. Moritz. 2004. Genetic diversity and population structure of Tasmanian devils, the largest marsupial carnivore. *Molecular Ecology* 13:2197-2209.
- Kimura, M., and T. Ohta. 1978. Stepwise mutation model and distribution of allelic frequencies in a finite population. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 75:2868-2872.
- Lande, R. 1988. Genetics and demography in biological conservation. *Science* 241:1455-1460.
- Menotti-Raymond, M., V. A. David, L. A. Lyons, A. A. Schaffer, J. F. Tomlin, M. K. Hutton, and S. J. O'Brien. 1999. A genetic linkage map of microsatellites in the domestic cat (*Felis catus*). *Genomics* 57:9–23.
- Menotti-Raymond, M., V. A. David, L. L. Wachter, J. M. Butler, and S. J. O'Brien. 2005. An STR forensic typing system for genetic individualization of domestic cat (*Felis catus*) samples. *Journal of Forensic Sciences* 50:1061-1070.
- Moritz, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution* 9:373- 375.
- Moritz, C. 1999. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. *Hereditas* 130:217–228.
- Moritz, C., and D. P. Faith. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology* 7:419-429.
- Nascimento, F. O. 2010. Revisão Taxonômica do gênero *Leopardus* Gray, 1842 (Carnivora, Felidae). Ph.D. dissertation, Universidade de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brasil.
- Nowell, K., and P. Jackson. 1996. Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan. IUCN, Gland, Switzerland.
- Oliveira, T. G, and K. Cassaro. 1999. Guia de Identificação dos Felinos Brasileiros. 2nd ed. Editora Sociedade de Zoológicos do Brasil, São Paulo, Brasil.
- Paetkau, D., R. Slade, M. Burden, and A. Estoup. 2004 Genetic assignment methods for the direct, real-time estimation of migration rate: a simulation-based exploration of accuracy and power. *Molecular Ecology* 13:55–65.

- Palumbi, S., A. Martin, S. Romano, W. O. Mcmillan, L. Stice, and Grabowski, G., 1991. The simple fool's guide to PCR, version 2.0. Department of Zoology and Kewalo Marine Laboratory, University of Hawaii, Honolulu, Hawaii.
- Piry, S., A. Alapetite, J. M. Cornuet, D. Paektau, L. Baudouin, and A Estoup. 2004. GeneClass2: a software for genetics assignment and first generation migrants detection. *Journal of Heredity* 95:536–539.
- Pritchard, J. K., M. Stephens, and P. Donnelly. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945–959.
- Queirolo, D., L. B. Almeida, B. M. Beisiegel, and T. G. Oliveira. 2013. Avaliação do risco de extinção do Gato-palheiro *Leopardus colocolo* (Molina, 1782) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira* 3:91-98.
- Rannala, B., and J. L. Mountain. 1997. Detecting immigration by using multilocus genotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:9197–9221.
- Raymond, M., and F. Rousset. 1995. Genepop. Ver. 1.2. Population genetics software for exact test and ecumenicism. *Journal of Heredity* 86:248–249.
- Rice, W. R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution* 223-225.
- Rousset, F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources* 8:103-106.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sánchez-Soto, S. 2007. Nuevo registro de *Oncifelis colocolo* (Felidae) para el Pantanal de Brasil. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 78:211- 212.
- Santos, A.S., 2012. História evolutiva de *Leopardus colocolo* (Mammalia, Felidae): análise de padrões filogeográficos e sua influência no processo de hibridação com *Leopardus tigrinus*. Ph.D. dissertation, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.
- Silveira, L. 1995. Notes on the distribution and natural history of the pampas cat, *Felis colocolo*, in Brazil. *Mammalia* 59:284-288.

- Silveira, L., A. T. A. Jácomo, and M. M. Furtado. 2005. Pampas cat ecology and conservation in the Brazilian grasslands. Cat Project of the Month - September 2005. In: IUCN/SSC Cat Specialist Group. <http://www.catsg.org>. Accessed 10 de Abril de 2014.
- Slatkin, M. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellites frequencies. *Genetics* 139:457-462.
- Sunquist, M., and F. Sunquist. 2002. Wild cats of the world. University of Chicago Press, Chicago, Illinois, USA.
- Tammeleht, E., J. Remm, M. Korsten, J. Davison, I. Tumanov, A. Saveljev, P. Mannil, I. Kojola, and U. Saarma. 2010. Genetic structure in large, continuous mammal populations: the example of brown bears in northwestern Eurasia. *Molecular Ecology* 19: 5359-5370.
- Taylor, B. L., and A. E. Dizon. 1999. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology* 8:S11-S16.
- Trigo, T. C., et al. 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.
- Valdez, F. P., T. Haag, F. C. Azevedo, L. Silveira, S. M. Cavalcanti, F. M. Salzano and E. Eizirik. 2015. Population Genetics of Jaguars (*Panthera onca*) in the Brazilian Pantanal: Molecular Evidence for Demographic Connectivity on a Regional Scale. *Journal of Heredity* 106:503-511.
- Van Oosterhout C., W. F. Hutchinson, D. P. M. Wills, P. Shipley. 2004. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes* 4:535–538.
- Waples, R. S. 2006. A bias correction for estimates of effective population size based on linkage disequilibrium at unlinked gene loci. *Conservation Genetics* 7:167–184.
- Waples, R. S., and C. Do. 2008. LDNE: a program for estimating effective population size from data on 60 linkage disequilibrium. *Molecular Ecology Resources* 8:753–756.
- Weir, B., and C. Cockerham. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution* 38:1358-1370.

## Anexos

### Tabelas

Tabela 1. Medidas de diversidade genética para os 13 locos de microssatélite nos três grupos populacionais de gato-palheiro (*Leopardus colocolo*) analisados neste estudo.

Locus	OAS (n = 8)					CO (n = 23)					RS-U (n = 22)				
	A	E	AR	Ho	He	A	E	AR	Ho	He	A	E	AR	Ho	He
FCA391	5	1	4,117	0,625	0,708	6	0	4,707	0,696	0,804	7	1	4,719	0,591	0,788
FCA424	5	0	4,589	0,625	0,775	9	3	5,239	0,870	0,827	7	1	4,817	0,682	0,778
FCA441	4	0	3,867	0,571	0,747	6	1	4,730	0,810	0,818	5	0	3,983	0,818	0,736
FCA453	4	0	3,464	0,625	0,592	6	1	3,349	0,522	0,546	8	4	4,609	0,773	0,771
F42	7	1	5,339	0,625	0,792	6	1	4,204	0,773	0,772	7	0	4,198	0,636	0,744
F98	5	0	4,518	0,750	0,800	5	1	3,496	0,522	0,611	6	1	3,973	0,556	0,744
F124	4	0	3,615	0,625	0,742	8	2	4,962	0,273	0,818	9	2	5,150	0,550	0,792
F146	4	0	3,831	0,750	0,742	5	1	3,547	0,591	0,655	5	0	4,065	0,667	0,763
B04	4	1	3,742	0,250	0,700	7	1	5,117	0,810	0,827	8	2	5,644	0,818	0,862
FCA77	7	1	6,167	0,667	0,864	10	1	5,300	0,909	0,832	7	0	5,080	0,550	0,823
FCA730	5	1	4,667	0,667	0,818	5	0	4,531	0,913	0,810	5	0	4,130	0,591	0,766
FCA559	5	0	5,000	1,000	0,822	8	1	4,755	0,739	0,761	8	2	4,794	0,762	0,787
FCA734	5	3	4,788	0,667	0,803	6	1	3,845	0,609	0,657	5	0	3,702	0,762	0,698
<b>Média</b>	4,923	0,615	4,438	0,650	0,762	6,692	1,077	4,444	0,695	0,749	6,692	1	4,528	0,673	0,773

Número de alelos (A), número de alelos exclusivos (E), riqueza alélica (AR), heteroziguidade observada (Ho) e esperada (He).

Tabela 2.  $F_{ST}$  (abaixo da diagonal) e  $R_{ST}$  (acima da diagonal) par a par entre os grupos populacionais. Valores significativos estão em negrito ( $p < 0,01$ ).

$F_{ST}$ \ $R_{ST}$	OAS	CO	RS-U
OAS	-	<b>0,191</b>	<b>0,245</b>
CO	<b>0,055</b>	-	0,023
RS-U	<b>0,057</b>	<b>0,047</b>	-

Tabela 3. Resultados da detecção de migrantes com o programa GENECLASS e STRUCTURE. Para ambos os programas a ordem dos grupos populacionais é: OAS/CO/RS-U.

Amostra (número nas figuras)	Localidade de coleta	STRUCTURE (valores de q)	GENECLASS migrantes F0 [-log(L_home/L_max)]	GENECLASS (valor de p)	GENECLASS [-log(L)]
bLco04(4)	OAS	0.087/ <b>0.677</b> /0.003	2.643	0.027	17.562/ <b>14.919</b> /16.966
bLco14(7) <sup>+</sup>	OAS	0.020/ <b>0.828</b> /0.126	4.913	0.011	22.243/ <b>17.330</b> /17.411
bLco05(8)	OAS	<b>0.643</b> /0.002/0.001	1.073	0.056	24.710/ <b>23.636</b> /25.071
bLco31(10)**	CO	0.002/ <b>0.651</b> /0.253	2.319	0.009	13.901/10.764/ <b>8.445</b>
Lco13(31)**	CO	0.001/0.042/ <b>0.457</b>	4.016	0.000	23.719/21.240/ <b>17.224</b>
bLco21(39)	RS-U	0.002/0.020/ <b>0.751</b>	0.314	0.047	21.326/ <b>18.257</b> /18.571
bLco26(40)** <sup>+</sup>	RS-U	0.070/ <b>0.878</b> /0.013	4.775	0.000	18.592/ <b>17.590</b> /22.365

Indivíduos marcados com \*\* foram identificados como migrantes pelo programa GENECLASS, enquanto indivíduos marcados com <sup>+</sup> foram identificados como migrantes pelo programa STRUCTURE segundo critério usado neste trabalho. A provável população fonte está marcada em negrito.

Valores significativos de  $p < 0,01$ .

Tabela 4. Tamanho efetivo das populações estimado pelo programa LDNe e seus respectivos intervalos de confiança para cada população, baseado nos diferentes critérios de exclusão de alelos raros. IC = Intervalo de confiança.

	Pcrit=0,05		Pcrit=0,02		Pcrit=0,01	
	Ne	IC(95%)	Ne	IC (95%)	Ne	IC (95%)
<b>CO</b>	40,4	24,6-249,3	108,6	49,5-∞	108,6	49,5-∞
<b>RS-U</b>	43,4	25,7-106,8	49,9	29,9-120,9	49,9	29,9-120,9

## Figuras

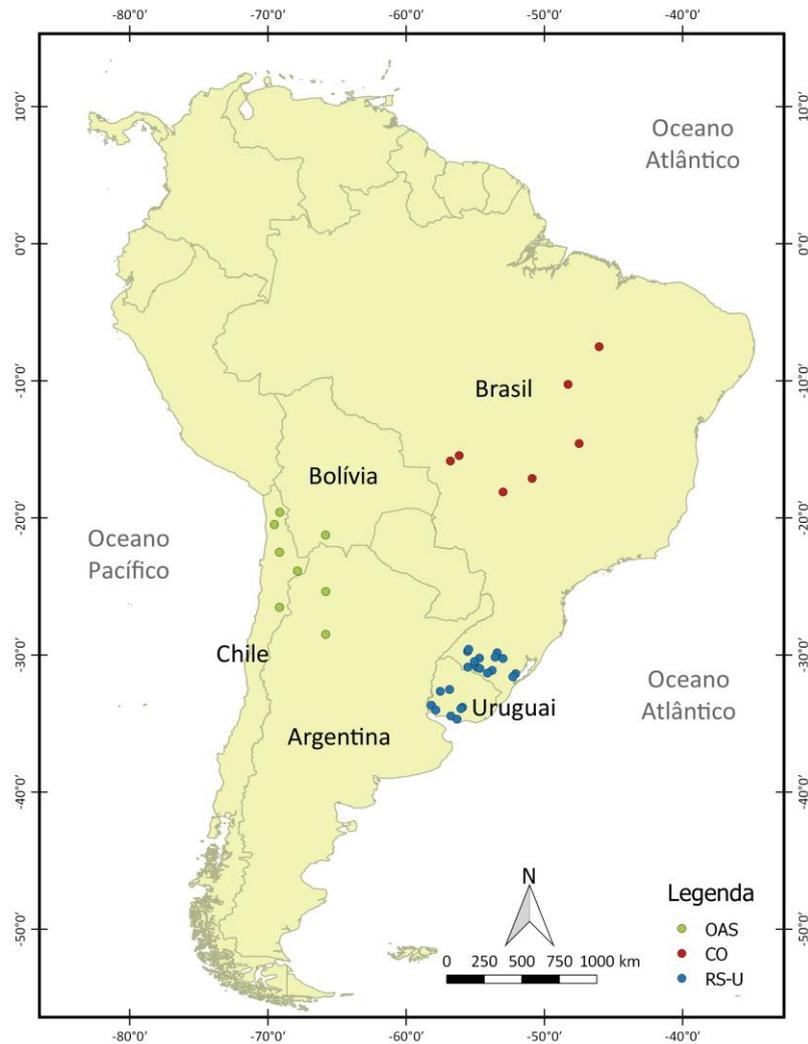


Figura 1. Mapa detalhado representando as populações estudadas. Cada ponto representa a origem geográfica de um ou mais indivíduos amostrados. Os grupos populacionais estão identificados por cores.



Figura 2. Resultados obtidos nas análises com o programa STRUCTURE. A) Estruturação populacional ao longo da distribuição amostrada para um  $K=3$ , sem a utilização de informações prévias das populações e com frequências alélicas independentes. (B) Associação proporcional ( $q$ ) de cada indivíduo inferida pelo STRUCTURE com  $K=3$ , utilizando informação *a priori* das populações. Cada cor representa um cluster geneticamente definido. Cada indivíduo é representado por uma barra vertical, com o comprimento de cada cor por barra indicando a probabilidade de filiação em cada grupo genético [OAS (verde), CO (vermelho e roxo) e RS-U (azul)].

## Informação Suporte

Tabela S1. Designação populacional e ancestralidade inferida dos indivíduos de *L. colocolo* utilizando o programa STRUCTURE com informação geográfica (Pop1 = grupo populacional do oeste da América do Sul; Pop2 = grupo populacional Centro-Oeste do Brasil; Pop3=grupo populacional Rio Grande do Sul e Uruguai. A proporção com que cada indivíduo pertence a cada população é expresso como  $q$ . Indivíduos considerados migrantes estão em negrito e os indivíduos com ancestralidade compartilhada com mais de um cluster genético estão sombreados.

Indivíduo	População geográfica assumida	Probabilidade de pertencer a população assumida	Probabilidade de pertencer a outra população							
			Pop 2	0,000	0,000	0,004	Pop 3	0,000	0,000	0,003
Lco10	Pop 1	0,994	Pop 2	0,000	0,000	0,004	Pop 3	0,000	0,000	0,003
Lco11	Pop 1	0,991	Pop 2	0,000	0,000	0,006	Pop 3	0,000	0,000	0,003
Lco26	Pop 1	0,974	Pop 2	0,001	0,004	0,015	Pop 3	0,000	0,000	0,006
<b>bLco04</b>	Pop 1	<b>0,087</b>	Pop 2	<b>0,677</b>	<b>0,169</b>	<b>0,045</b>	Pop 3	<b>0,003</b>	<b>0,009</b>	<b>0,011</b>
Lco12	Pop 1	0,994	Pop 2	0,000	0,000	0,001	Pop 3	0,000	0,000	0,005
Lco23	Pop 1	0,968	Pop 2	0,001	0,006	0,017	Pop 3	0,000	0,001	0,007
<b>bLco14</b>	<b>Pop 1</b>	<b>0,020</b>	<b>Pop 2</b>	<b>0,828</b>	<b>0,010</b>	<b>0,007</b>	<b>Pop 3</b>	<b>0,126</b>	<b>0,003</b>	<b>0,006</b>
bLco05	Pop 1	0,643	Pop 2	0,002	0,129	0,174	Pop 3	0,001	0,012	0,039
Clco03	Pop 2	0,970	Pop 1	0,000	0,001	0,014	Pop 3	0,000	0,002	0,014
bLco31	Pop 2	0,651	Pop 1	0,000	0,000	0,002	Pop 3	0,253	0,050	0,045
bLco24	Pop 2	0,971	Pop 1	0,000	0,000	0,005	Pop 3	0,000	0,003	0,020
Clco01	Pop 2	0,974	Pop 1	0,000	0,001	0,011	Pop 3	0,000	0,002	0,012
Clco02	Pop 2	0,962	Pop 1	0,000	0,000	0,010	Pop 3	0,000	0,005	0,022
bLco30	Pop 2	0,988	Pop 1	0,000	0,000	0,004	Pop 3	0,000	0,001	0,007
bLco302	Pop 2	0,994	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 3	0,000	0,000	0,005
bLco303	Pop 2	0,984	Pop 1	0,000	0,000	0,005	Pop 3	0,000	0,001	0,010
bLco304	Pop 2	0,997	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 3	0,000	0,000	0,002
bLco305	Pop 2	0,996	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 3	0,000	0,000	0,003
bLco306	Pop 2	0,989	Pop 1	0,000	0,000	0,005	Pop 3	0,000	0,000	0,005
bLco307	Pop 2	0,993	Pop 1	0,000	0,000	0,004	Pop 3	0,000	0,000	0,002
bLco308	Pop 2	0,953	Pop 1	0,000	0,002	0,020	Pop 3	0,000	0,006	0,019
bLco310	Pop 2	0,975	Pop 1	0,000	0,001	0,010	Pop 3	0,000	0,001	0,013
bLco312	Pop 2	0,978	Pop 1	0,000	0,000	0,016	Pop 3	0,000	0,000	0,006
bLco313	Pop 2	0,994	Pop 1	0,000	0,000	0,004	Pop 3	0,000	0,000	0,002
bLco314	Pop 2	0,988	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 3	0,000	0,001	0,010
bLco315	Pop 2	0,962	Pop 1	0,000	0,000	0,005	Pop 3	0,000	0,008	0,024
bLco316	Pop 2	0,986	Pop 1	0,000	0,000	0,002	Pop 3	0,000	0,002	0,010
bLco317	Pop 2	0,984	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 3	0,000	0,003	0,012
bLco318	Pop 2	0,982	Pop 1	0,000	0,001	0,007	Pop 3	0,000	0,001	0,009
bLco320	Pop 2	0,993	Pop 1	0,000	0,000	0,003	Pop 3	0,000	0,000	0,004

Lco13	Pop 2	0,042	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 3	0,457	0,363	0,138
bLco29	Pop 3	0,965	Pop 1	0,000	0,002	0,011	Pop 2	0,000	0,004	0,018
Clco10	Pop 3	0,885	Pop 1	0,000	0,000	0,006	Pop 2	0,000	0,043	0,066
Clco09	Pop 3	0,959	Pop 1	0,000	0,000	0,007	Pop 2	0,000	0,009	0,025
bLco11	Pop 3	0,994	Pop 1	0,000	0,000	0,003	Pop 2	0,000	0,000	0,003
bLco20	Pop 3	0,933	Pop 1	0,000	0,001	0,008	Pop 2	0,003	0,019	0,037
Clco11	Pop 3	0,951	Pop 1	0,000	0,000	0,011	Pop 2	0,000	0,005	0,031
Clco05	Pop 3	0,958	Pop 1	0,000	0,001	0,008	Pop 2	0,000	0,011	0,022
bLco21	Pop 3	0,751	Pop 1	0,002	0,025	0,054	Pop 2	0,020	0,056	0,091
<b>bLco26</b>	<b>Pop 3</b>	<b>0,013</b>	<b>Pop 1</b>	<b>0,070</b>	<b>0,008</b>	<b>0,004</b>	<b>Pop 2</b>	<b>0,878</b>	<b>0,022</b>	<b>0,006</b>
bLco38	Pop 3	0,995	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 2	0,000	0,000	0,004
Clco07	Pop 3	0,996	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 2	0,000	0,000	0,003
bLco28	Pop 3	0,987	Pop 1	0,000	0,000	0,004	Pop 2	0,000	0,001	0,008
bLco16	Pop 3	0,992	Pop 1	0,000	0,000	0,003	Pop 2	0,000	0,000	0,005
Clco04	Pop 3	0,980	Pop 1	0,000	0,000	0,001	Pop 2	0,000	0,001	0,018
Clco22	Pop 3	0,978	Pop 1	0,000	0,000	0,008	Pop 2	0,000	0,002	0,010
Clco14	Pop 3	0,989	Pop 1	0,000	0,000	0,005	Pop 2	0,000	0,000	0,006
Lco09	Pop 3	0,991	Pop 1	0,000	0,000	0,002	Pop 2	0,000	0,001	0,006
Clco13	Pop 3	0,989	Pop 1	0,000	0,000	0,003	Pop 2	0,000	0,000	0,008
Clco25	Pop 3	0,992	Pop 1	0,000	0,000	0,002	Pop 2	0,000	0,000	0,006
bLco32	Pop 3	0,992	Pop 1	0,000	0,000	0,002	Pop 2	0,000	0,000	0,005
Clco15	Pop 3	0,954	Pop 1	0,003	0,001	0,017	Pop 2	0,002	0,005	0,018
Clco21	Pop 3	0,967	Pop 1	0,000	0,002	0,016	Pop 2	0,000	0,002	0,014

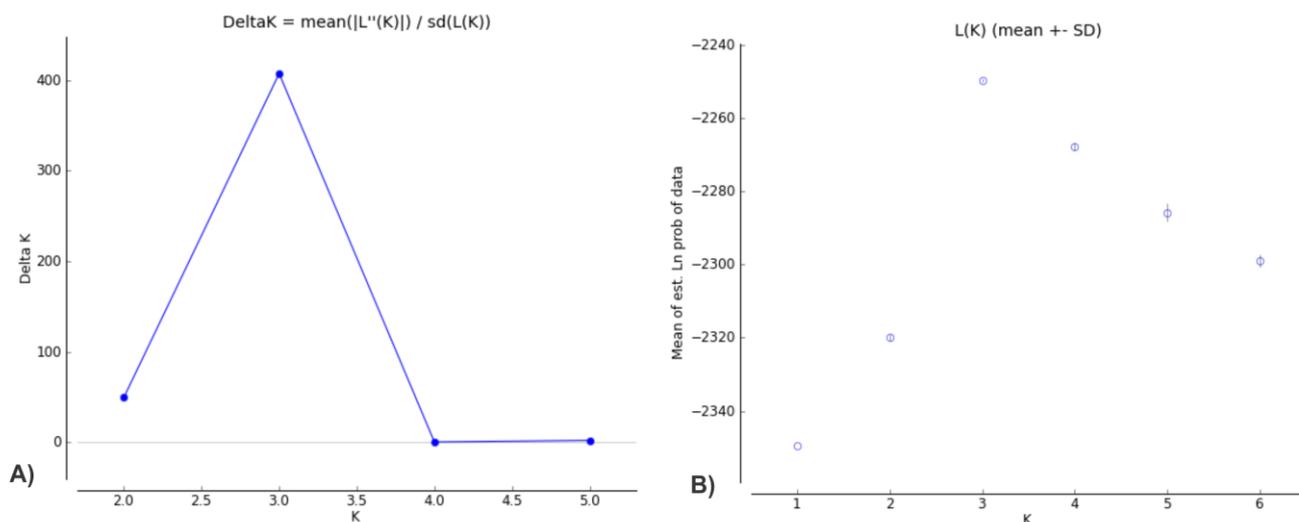


Figura S1. O melhor valor de K inferido pelo maior valor médio de probabilidade (A) e pelo método de Delta K (Evanno et al. 2005) (B), para frequências alélicas independentes.

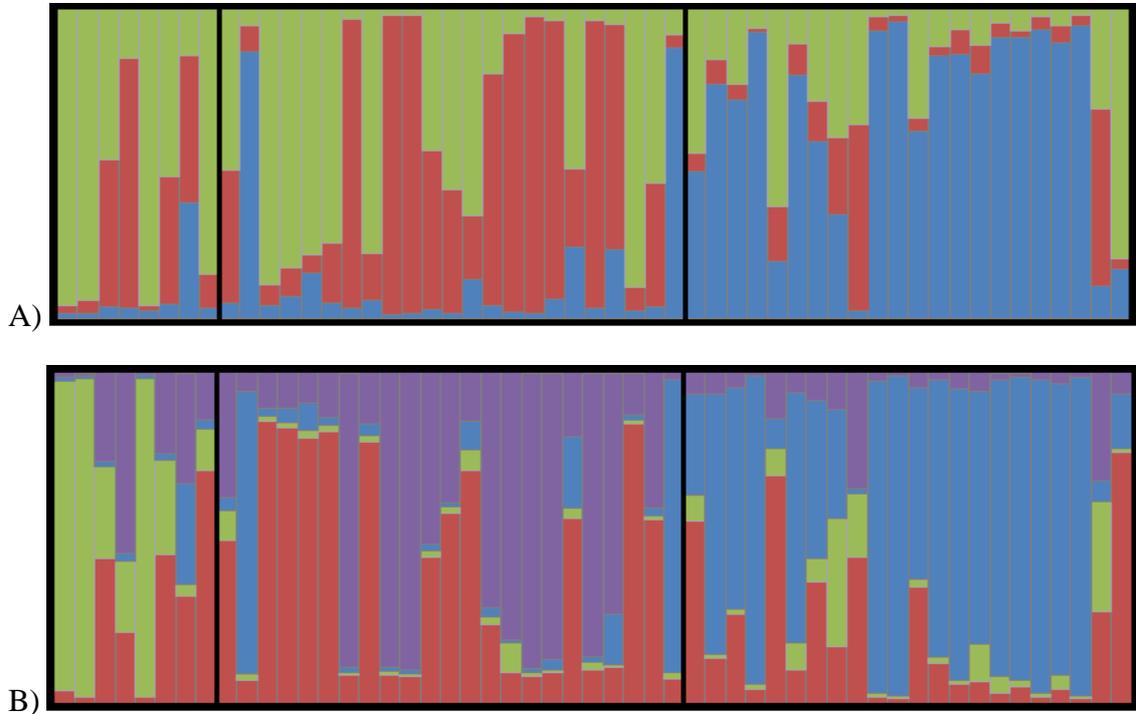


Figura S2. Resultados das análises populacionais no programa STRUCTURE. Estruturação populacional ao longo da distribuição amostrada, para um  $K=3$  (A) e  $K=4$  (B), sem a utilização de informações prévias das populações e com modelo de frequências alélicas correlacionadas.

#### 4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Planos de conservação e manejo devem ser baseados em conhecimento robusto sobre a biologia, distribuição, comportamento, dinâmica e estruturação genética populacional de uma espécie (Mattucci et al. 2016). Embora os felinos representem uma das linhagens mais bem sucedidas entre os carnívoros (Nowak 1999), ainda há uma grande falta de conhecimento sobre estas espécies (Nowell e Jackson 1996). Entre os felinos neotropicais, o gato-palheiro é um dos menos conhecidos (Silveira 1995). Em razão disso, compreender sua variabilidade e estrutura genética na natureza é fundamental para auxiliar na definição de áreas prioritárias e estratégias adequadas para sua conservação.

Estudos moleculares evidenciaram a existência de alta diversidade genética entre as populações de *L. colocolo* (Cossíos et al. 2009; Johnson et al. 1999; Santos et al. 2012) e estudos morfológicos agruparam as populações em diferentes espécies e subespécies (García-Perea 1994; Nascimento 2010). Embora estes estudos demonstrem a grande diversidade morfológica e genética desta espécie em escala global, apenas o estudo de Santos (2012) demonstrou que existia um certo grau de estruturação genética entre as populações brasileiras de gato-palheiro. Porém, por se tratar de um estudo baseado unicamente em genes de DNA mitocondrial (herança unicamente maternal), não foi possível analisar a real extensão da divergência evolutiva entre estas populações.

No presente estudo, as análises genéticas de marcadores moleculares de microssatélite geraram informações importantes sobre o grau de diversidade genética entre as populações do centro-oeste e sul do Brasil. Os níveis de variabilidade genética encontrada nos grupos populacionais estudados foram relativamente altos, sendo mais elevados que os encontrados em populações de *Leopardus jacobita* (Cossíos et al. 2012) e *Puma yaguarundi* (Holbrook et al. 2013), e mais baixos que os encontrados em populações europeias de gato selvagem (*Felis silvestres*) (Mattucci et al. 2015). Ainda, os índices de diversidade dos grupos brasileiros mostraram-se semelhantes aos encontrados para populações de onças (*Panthera onca*) da Floresta Atlântica e Pantanal (Haag et al. 2010; Valdez et al. 2015).

Os grupos populacionais estudados também apresentaram níveis significantes de divergência entre si, embora os valores de  $F_{ST}$  e  $R_{ST}$  par a par não tenham sido muito altos. A maior divergência gênica se encontra entre as populações brasileiras e as amostras do oeste da América do Sul, principalmente entre o grupo OAS e o grupo RS-

U. Os clusters gerados pelo programa Structure corroboram os dados de Santos (2012) para as populações brasileiras. Assim como para as populações do oeste da América do Sul verificadas por Cossíos et al. (2009), a estruturação genética entre os grupos populacionais brasileiros coincidem com a separação taxonômica determinada por García-Perea (1994), que separou estas populações em dois táxons distintos: *Leopardus braccatus braccatus* na região central do Brasil e *L. b. munoai* no sul do Rio Grande do Sul e Uruguai. No entanto, a divergência genética encontrada aqui não sustenta a divisão do gato-palheiro em duas espécies distintas no Brasil, como sugerido por Nascimento (2010).

O fluxo gênico estimado entre os grupos populacionais foi baixo, tendo sido identificado poucos migrantes e indivíduos de ancestralidade compartilhada entre diferentes *clusters* genéticos. Acredita-se que a Floresta Atlântica seja uma barreira para o fluxo gênico entre as duas regiões brasileiras, deixando o grupo populacional RS-U isolado das demais populações. Apesar disso, a variabilidade genética do grupo RS-U é relativamente alta e semelhante a encontrada no grupo CO. Porém, devido ao tamanho populacional efetivo estimado para a população do Rio Grande do Sul e Uruguai ( $N_e < 50$ ) e evidências da ocorrência de endocruzamentos, esta necessita de uma atenção especial, pois pode encontrar-se mais sujeita aos efeitos da depressão endogâmica e consequente perda da variabilidade genética. Por fim, com base nos resultados obtidos neste estudo, juntamente com os resultados gerados por Santos (2012), recomendamos que os grupos populacionais brasileiros de gato-palheiro sejam tratados como Unidades de Manejo (UM) independentes, visando o desenvolvimento de medidas efetivas adequadas para a sobrevivência da espécie em cada localidade.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALLENDORF, F. W. & LUIKART, G. 2007. *Conservation and the genetics of populations*. Blackwell, London.

AVISE, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history and evolution*. New York.

BARSTOW, A. & LESLIE, D. M. JR. 2012. *Leopardus braccatus* (Carnivora: Felidae). *Mammalian Species*, 44, 16-25.

BRUFORD, M. W. & WAYNE, R. K. 1993. Microsatellites and their application to population genetic studies. *Current Opinion Genetics and Development*, 3, 939-943.

COSSÍOS, D., LUCHERINI, M., RUIZ-GARCÍA, M. & ANGERS, B. 2009. Influence of ancient glacial periods on the Andean fauna: the case of the pampas cat (*Leopardus colocolo*). *BMC Evolutionary Biology*, 9, 68.

COSSÍOS, D., MADRID, A., CONDORI, J. L. & FAJARDO, U. 2007. Update on the distribution of the Andean cat *Oreailurus jacobita* and the pampas cat *Lynchailurus colocolo* in Peru. *Endangered Species Research*, 3, 313–320.

COSSÍOS, E., WALKER, R., LUCHERINI, M., RUIZ-GARCÍA, M. & ANGERS, B. 2012. Population structure and conservation of a high-altitude specialist, the Andean cat *Leopardus jacobita*. *Endangered Species Research*, 16,283-294.

CRANDALL, K. A., BININDA-EMONDS, O. R. P, MACE, G. M & WAYNE, R. K. 2000. Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends in Ecology and Evolution*, 15, 290-295.

DALÉN, L., KVALØY, K., LINNELL, J. D. C., ELMHAGEN, B., STRAND, O., TANNERFELDT, M., HENTTONEN, H., FUGLEI, E., LANDA, A. & ANGERBJÖRN, A. 2006. Population structure in a critically endangered arctic fox population: does genetics matter?. *Molecular Ecology*,15(10), 2809-2819.

DIMMICK, W. W., GHEDOTTI, M. J., GROSE, M. J., MAGLIA, A. M., MEINHARDT, D. J. & PENNOCK, D. S. 2001. The evolutionary significant unit and adaptive criteria: a response to Young. *Conservation Biology*, 15 (3): 788-790.

EISENBERG, J. F. & REDFORD, K. H. 1999. *Mammals of the Neotropics – The Central Neotropics*. University Chicago Press, London. 609p.

EIZIRIK, E. 1996. Ecologia molecular, genética da conservação, e o conceito de Unidades Evolutivamente Significativas. *Brasilian Journal of Genetics*, 19, 23-29.

EIZIRIK, E., KIM, J. H., MENOTTI-RAYMOND, M., CRAWSHAW, J. R., PETER, 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.

ERNEST, H. B., PENEDO, M. C. T., MAY, B. P., SYVANEN, M. & BOYCE, W. M. 2000. Molecular tracking of mountain lions in the Yosemite Valley region in California: Genetic analysis using microsatellites and faecal DNA. *Molecular Ecology*, 9, 433–441.

FRANKHAM, R., BALLOUX, J. D. & BRISCOE, D. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. Cambridge University Press, Cambridge. 617 pp.

GABRIELSEN, C. G., KOVACH, A. I., BABBITT, K. J. & MCDOWELL, W. H. 2013. Limited effects of suburbanization on the genetic structure of an abundant vernal pool-breeding amphibian. *Conservation Genetics*, 14(5), 1083-1097.

GARCÍA-PEREA, R. 1994. The Pampas Cat Group (Genus *Lynchailurus* Severtzov, 1858) (Carnivora: Felidae), a systematic and biogeographic review. *American Museum Novitates*, 3096, 1-36.

GRISOLIA, A. B., MORENO, V. R., CAMPAGNARI, F., MILAZZOTTO, M. P., GARCÍA, J. F., ADANIA, C. H. & SOUZA, E. B. 2007. Genetic diversity of microsatellite loci in *Leopardus pardalis*, *Leopardus wiedii* and *Leopardus tigrinus*. *Genetics and Molecular Research*, 6, 382-389.

HAAG, T., SANTOS, A. S., SANA, D. A., MORATO, R. G., CULLEN JR, L., CRAWSHAW JR, 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.

HOLBROOK, J. D., CASO, A., DEYOUNG, R. W. & TEWES, M. E. 2013. Population genetics of jaguarundis in Mexico: implications for future research and conservation. *Wildlife Society Bulletin*, 37, 336-341.

JOHNSON, W. E. & O'BRIEN, S. J. 1997. Phylogenetic reconstruction of the Felidae using 16S rRNA and NADH-5 mitochondrial genes. *Journal of Molecular and Evolution*, 44, S98-S116.

JOHNSON, W. E., DRATCH, P. A., MARTENSON, J. S. & O'BRIEN, S. J. 1996. Resolution of recent radiations within three evolutionary lineages of Felidae using mitochondrial restriction fragment length polymorphism variation. *Journal of Mammalian Evolution*, 3, 97-120.

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.

JOHNSON, W. E., PECON-SLATTERY, J., EIZIRIK, E., KIM, J. H., MENOTTI-RAYMOND, M., BONACIC, C., CAMBRE, R., CRAWSHAW, P., NUNES, A., SEUÁNEZ, H. N., MOREIRA, M. A. M., SEYMOUR, K. L., SIMON, F., SWANSON, W. & O'BRIEN, S. J. 1999. Disparate phylogeography patterns of molecular genetic variation in four closely related South American small cat species. *Molecular Ecology*, 8, S79-S92.

KASHI, Y., KING, D. & SOLLER, M. 1997. Simple sequence repeats as a source of quantitative genetic variation. *Trend in Genetics*, 13, 74-77.

KITCHENER, A. 1991. *The Natural History of the Wild Cats*. Cornell University Press. Ithaca, New York. 280p.

KOHN, M. H., YORK, E. C., KAMRADT, D. A., HAUGHT, G., SAUVAJOT, R. M., & WAYNE, R. K. 1999. Estimating population size by genotyping faeces. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences*, 266(1420), 657-663.

LUCHERINI, M., EIZIRIK, E., OLIVEIRA, T., PEREIRA, J. & WALLACE, R. 2015. *Leopardus colocolo*. In: IUCN 2015. The IUCN Red List of Threatened Species. Ver 2015.4. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Accessed 15 January 2016.

MACDONALD, D. W. & LOVERIDGE, A. J. 2010. *Biology and Conservation of Wild Felids*. Oxford University Press Inc. New York.

MACHADO, A. B. M., DRUMMOND, G. M. & PAGLIA, A. P. 2008. *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção*. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas.

MARTIN, L. D. 1989. Fossil history of the terrestrial carnivora. In: Gittleman, J. L. (ed) *Carnivore Behavior, Ecology and Evolution*. Cornell University Press. Ithaca, New York, 536-568 pp.

MASUDA, R., LOPEZ, J. V., SLATERRY, J. P., YUHKI, N. & O'BRIEN, S. J. 1996. Molecular phylogeny of mitochondrial cytochrome b and 12S rRNA sequences in the Felidae: ocelot and domestic cat lineages. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 6 (3), 351-365.

MATTERN, M. Y & MCLENNAN, D. A. 2000. Phylogeny and speciation of felids. *Cladistics*, 16, 232-253.

MATTUCCI, F., OLIVEIRA, R., LYONS, L. A., ALVES, P. C. & RANDI, E. 2016. European wildcat populations are subdivided into five main biogeographic groups: consequences of Pleistocene climate changes or recent anthropogenic fragmentation?. *Ecology and Evolution*, 6, 3-22.

MCRAE, B. H., & BEIER, P. 2007. Circuit theory predicts gene flow in plant and animal populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(50), 19885-19890.

MORENO, V. R., GRISOLIA, A. B., CAMPAGNARI, F., MILAZZOTTO, M., ADANIA, C. H., GARCÍA, J. F. & SOUZA, E. B. 2006. Genetic variability of *Herpailurus yagouaroundi*, *Puma concolor* and *Panthera onca* (Mammalia, Felidae) studied using *Felis catus* microsatellites. *Genetics and Molecular Biology*, 29, 290-293.

MORIN, P. A., MOORE, J. J., CHAKRABORTY, R., JIN, L., GOODALL, J. & WOODRUFF, D. S. 1994. Kin selection, social structure, gene flow and the evolution of chimpanzees. *Science*, 265, 1193-1201.

MORITZ, C. & FAITH, D. P. 1998. Comparative phylogeography and the identification of genetically divergent areas for conservation. *Molecular Ecology*, 7, 419-429.

MORITZ, C. 1994. Defining “Evolutionary Significant Units” for conservation. *Trends in Ecology and Evolution*, 9, 373- 375.

MURRAY, B. W. 1996. The estimation of genetic distance and population substructure from microsatellite allele frequency data. Disponível em: <<http://helix.biology.mcmaster.ca/~brent>>. Acesso em: 02 de Abril de 2014.

NAPOLITANO, C., BENNETT, M., JOHNSON, W. E., O'BRIEN, S. J., MARQUET, P. A., BARRÍA, I., POULIN, E. & IRIARTE, A. 2008. Ecological and biogeographical inferences on two sympatric and enigmatic Andean cat species using genetic identification of faecal samples. *Molecular Ecology*, 17, 678-690.

NASCIMENTO, F. O. *Revisão Taxonômica do gênero Leopardus Gray, 1842 (Carnivora, Felidae)*. 2010. 357f. Tese (Doutorado em Zoologia) –Instituto de Biociências, Universidade de Universidade de São Paulo, São Paulo.

NESJE, M., ROED, K. H., LIFJELD, J. T., LINDBERG, P. & STEENS, O. F. 2000. Genetic relationships in the falcon (*Falco peregrinus*) analysed by microsatellite DNA markers. *Molecular Ecology*, 9, 53-60.

NOWAK, R. M. 1999. *Walker's Mammals of the world*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London. 6ª edição.

NOWAK, R. M. 2005. *Walker's Carnivores of the World*. The Johns Hopkins University Press. Baltimore and London.

NOWELL, K. & JACKSON, P. 1996. *Wild cats: Status Survey and Conservation Action Plan*. IUCN, Gland, Switzerland.

OLIVEIRA, T. G & CASSARO, K. 1999. *Guia de Identificação dos Felinos Brasileiros*. Editora Sociedade de Zoológicos do Brasil. São Paulo, Brasil. 2ª edição.

PAETKAU, D., WAITS, L. P., CLARKSON, P. L., CRAIGHEAD, L., VYSE, E., WARD, R. & STROBECK, C. 1998. Variation in genetic diversity across the range of North American brown bears. *Conservation Biology*, 12, 418-429.

PALOMARES, F., GODOY, J. A., PIRIZ, A. & O' BRIEN, S. J. 2002. Faecal genetic analysis to determine the presence and distribution of elusive carnivores: design and feasibility for the Iberian lynx. *Molecular Ecology*, 11, 2171-2182.

QUEIROLO, D., ALMEIDA, L. B., BEISIEGEL, B. M. & OLIVEIRA, T. G. 2013. Avaliação do risco de extinção do Gato-palheiro *Leopardus colocolo* (Molina, 1782) no Brasil. *Biodiversidade Brasileira*, 3(1), 91-98.

SÁNCHEZ-SOTO, S. 2007. Nuevo registro de *Oncifelis colocolo* (Felidae) para el Pantanal de Brasil. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 78, 211- 212.

SANTOS, A. S. *História evolutiva de Leopardus colocolo (Mammalia, Felidae): análise de padrões filogeográficos e sua influência no processo de hibridação com Leopardus tigrinus*. 2012. 80 f. Tese (Doutorado em Zoologia) - Programa de Pós-Graduação em Zoologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

SILVEIRA, L. 1995. Notes on the distribution and natural history of the pampas cat, *Felis colocolo*, in Brazil. *Mammalia*, 59, 284-288.

SILVEIRA, L., JÁCOMO, A. T. A. & FURTADO, M. M. 2005. Pampas cat ecology and conservation in the Brazilian grasslands. *Cat Project of the Month* - September 2005. IUCN/SSC Cat Specialist Group. Disponível em: <<http://www.catsg.org>>. Acessado em: 10 de Abril de 2014.

SPIELMAN, D., BROOK, D. W. & FRANKHAM, R. 2004. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 15261-15264.

SUNQUIST, M. & SUNQUIST, F. 2002. *Wild cats of the world*. University of Chicago Press. Chicago, Illinois.

TAUTZ, D. 1993. *Notes on the definition and nomenclature of tandemly repetitive DNA sequences*. Pp. 21-28. Em: PENA, S. D. J., CHAKRABORTY, R., EPPLEN, J. T. & JEFREYS, A. J. DNA fingerprinting: state of the science. Birkhauser Verlag, Berlin.

TAYLOR, B. L. & DIZON, A. E. 1999. First policy then science: why a management unit based solely on genetic criteria cannot work. *Molecular Ecology*, 8, S11-S16.

TCHAICKA, L., EIZIRIK, E., OLIVEIRA, T. G., CÂNDIDO, J. F. & FREITAS, T. R. O. 2007. Phylogeography and population history of the crab-eating fox (*Cerdocyon thous*). *Molecular Ecology*, 16, 819-838.

TRIGO, T. C., FREITAS, T. R. O., KUNZLER, G., CARDOSO, L., SILVA, J. C. R., JOHNSON, W. E., O'BRIEN, S. J., BONATTO, S. L. & EIZIRIK, E. 2008. Inter-species hybridization among Neotropical cats of the genus *Leopardus*, and evidence for an introgressive hybrid zone between *L. geoffroyi* and *L. tigrinus* in southern Brazil. *Molecular Ecology*, 17, 4317-4333.

TRIGO, T. C., TIRELLI, F. P., MACHADO, L. F., PETERS, F. B., INDRUSIAK, C. B., MAZIM, F. D., SANA, D., EIZIRIK, E. & DE FREITAS, T. R. O. 2013. Geographic distribution and food habits of *Leopardus tigrinus* and *L. geoffroyi* (Carnivora, Felidae) at their geographic contact zone in southern Brazil. *Studies on Neotropical Fauna and Environment*, 48, 56-57.

UPHYRKINA, O., MIQUELLE, D., QUIGLEY, H., DRISCOLL, C. & O'BRIEN, S. J. 2002. Conservation Genetics of the Far Eastern Leopard (*Panthera pardus orientalis*). *Journal of Heredity*, 93 (5), 303-311.

VALDEZ, F. P., HAAG, T., AZEVEDO, F. C., SILVEIRA, L., CAVALCANTI, S. M., SALZANO, F. M. & EIZIRIK, E. 2015. Population Genetics of Jaguars (*Panthera onca*) in the Brazilian Pantanal: Molecular Evidence for Demographic Connectivity on a Regional Scale. *Journal of Heredity*, 106, 503-511.

VERNESI, C., HOBAN, S. M., PECCHIOLI, E., CRESTANELLO, B., BERTORELLE, G., ROSÀ, R. & HAUFFE, H. C. 2015. Ecology, environment and evolutionary history influence genetic structure in five mammal species from the Italian Alps. *Biological Journal of the Linnean Society*.

WAITS, L., TABERLET, P., SWENSON, J. E., SANDEGREN, F. & FRANZEN, R. 2000. Nuclear DNA microsatellite analysis of genetic diversity and gene flow in the Scandinavian brown bear (*Ursus arctus*). *Molecular Ecology*, 9, 421-431.

## 6. ANEXOS

### INSTRUCTIONS TO AUTHORS

The *Journal of Mammalogy* is an international, peer-reviewed publication of the American Society of Mammalogists (ASM). We publish manuscripts presenting original research and scholarship on mammals, including topics in mammalian evolution, ecology, behavior, systematics, management, and conservation. Articles should be of interest to a broad scientific readership and may include theoretical or empirical studies that advance our understanding of any aspect of mammalian biology. Book reviews generally may be solicited or readers may request to review a book of general interest to mammalogy (contact the Editor for Reviews).

All submissions are subject to review. Initial review is done by our Journal Editor and by one of the Associate Editors, who evaluate whether the manuscript is of sufficient quality and general interest for outside review. Manuscripts that pass this initial evaluation will be sent to one or more outside reviewers. The assigned Associate Editor then evaluates the reviews and the manuscript and makes a recommendation to the Editor, who makes the final decision regarding suitability for publication

Submitted manuscripts should be free of jargon. The editors reserve the right to edit all manuscripts for style and clarity. Contributions are accepted for review and publication on the condition that they are submitted solely to *Journal of Mammalogy* and will not be reprinted or translated without the publisher's permission, although authors retain copyrights. ASM recommends that original data reported be deposited in a suitable public database. Send inquiries to the [editorial office](#).

#### **Immutable Advance Access**

*Journal of Mammalogy* publishes articles online ahead of inclusion in an issue via OUP's Advance Access.

In order to comply with the requirements of the International Commission on Zoological Nomenclature (ICZN) with regard to nomenclatural works, ALL articles, regardless of whether they include nomenclatural information, that are published in *Journal of Mammalogy* will be immutable from October 1, 2015; this means that no changes will be allowed to any article without the publication of an erratum clearly stating the changes that have been made. Therefore, it is the responsibility of the authors

to carefully check their proofs for accuracy, and to notify the publisher of any changes that are necessary prior to Advance Access publication.

### **Nomenclatural Works**

You will be asked during the submission process whether your article contains a nomenclatural act. If it does, in order to comply with ICZN regulations, the Editorial Office will register your article in ZooBank on your behalf and will insert a nomenclatural statement, which includes a Life Science Identifier (LSID), into the article. Your article will also include the online publication date, and the statement “Version of Record, first published online [online publication date], with fixed content and layout in compliance with Art. 8.1.3.2 ICZN.” Following publication, the Editorial Office will update your ZooBank entry with the DOI, Volume, and Issue information.

## MANUSCRIPT PREPARATION

### **Submission**

Submit all manuscripts through ScholarOne. Once you have prepared your manuscript according to the instructions below, please visit the [online submission web site](#). All articles must include a statement in the Materials and Methods section confirming that the study conforms to published ASM guidelines (see below) as well as to any relevant institutional requirements (e.g., in the United States, IACUC approval must be confirmed). Submissions from authors whose research involved the use of “human subjects” (as defined in federal law) must include evidence of approval from an institutional review board.

### **Document Format**

Use double-spacing and 12-point Times New Roman font throughout all text, tables, references, and figure captions. Number all pages. Avoid the use of appendixes and footnotes in the text. Put tables and figure captions at the end of the document. The title page should contain authors’ names, titles, affiliations, and postal and e-mail addresses.

**Style.** Follow *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers*, 8th edition, for conventions in biology. For general style and spelling, consult the *Chicago Manual of Style*, 16th edition, and a dictionary such as *Merriam-*

*Webster's Collegiate Dictionary*. The *Journal of Mammalogy* uses American English. Mammal Species of the World, 3rd ed., or Handbook of the mammals of the world (4 of 8 volumes published as of August 2014) are our baselines for mammal taxonomy. Newer names accepted; older names need justification. Serial commas should be employed ("a, b, and c" rather than "a, b and c"). Avoid sequential parentheses.

**Symbols, Acronyms, and Units of Measure.** Define all nonstandard symbols, and spell out all acronyms. Use the metric system, SI units (Système international d'unités), to express weights and measures. For details on technical style follow the CSE Manual, 8<sup>th</sup> edition. "Holocene" not "Recent"; use BP for years before present, Ma to indicate 10<sup>6</sup> years, and My to indicate million years ago (equivalent to Ma BP for million years before present); e.g., "The Cretaceous Periods lasted 80 My, from 144 Ma to 65 Ma" (from CSE 8th edition).

All details of statistical outcomes reported should be provided, and degrees of freedom should be reported as subscripts of test statistics (e.g.,  $t_2 = 3.76$ ,  $P < 0.04$ ;  $F_{6,198} = 0.253$ ,  $P = 0.618$ ).

Other statistical standards:

*SD, SE, d.f.*

All tests in italics: *F, G, H, P, R, r, R2, t, U, V, W, z*, etc.

Spell out mean in text, but use  $\bar{X}$  with values; e.g., mean  $\pm SD$ , but  $\bar{X} = 4.8$ .

Spell out chi-square test but use  $X^2$  with values; e.g., we used a chi-square test, but  $X^2 = 234.55$ .

Define analysis of variance and other statistical acronyms (e.g., coefficient of variation, confidence interval, etc.) at first use; thereafter use ANOVA, CV, CI, etc.

Always a space on either side of =, <, >,  $\leq$ ,  $\geq$ .

**General.** Your manuscript should include: title page, text of manuscript, Acknowledgments, Supporting Information (if needed), Literature Cited, Figure Legends, Appendix(es) as needed, Tables, Figures.

1. Title page should include:

- a. Contact information for corresponding author, including email address (single spaced).
- b. Running Heading (a short identification, not a title, ≤ 40 characters including spaces; normal font).
- c. Title (**Bold**, left-justified text; capitalize only the first word and proper nouns; ≤ 15 words).
- d. Names of authors (Normal font (NOT ALL CAPS or Small Caps), left-justified text, with asterisk to identify corresponding author).
- e. Affiliations of authors (Normal font in *italics*, left-justified, with author initials in parentheses following the appropriate address).
- f. Abstract. Summarizes key findings. NO heading. ≤ 5% of the length of the text (Introduction through Discussion).
- g. Foreign-language abstract, if desired (usually a translation of the Abstract, Latin alphabet only; title should be Résumé, Zusammenfassung, Resumen, Resumo, as appropriate; see below).
- h. Key words, ≤10 words, alphabetized and separated by commas.
- i. “\*Correspondent:” followed by email address of corresponding author.

2. Text of manuscript.

- a. The *Journal of Mammalogy* employs up to 4 levels of headings, although most articles skip #2 headings. These are as follows:

**Cap and Small Cap Bold Centered**

*Cap and Lowercase Italic, Centered*

*Italic, paragraph indent, initial cap only: lowercase after colon.—Text follows em dash.*

Roman, Paragraph Indent, Cap and Lowercase Followed by Period. Text follow em space (not dash).

- b. Additionally, taxonomic synonymic headings are as follows:

Family Molossidae

(genus and species indeterminate)

*Noctilio lacrimaelunaris*, new species

*Crocidura fuliginosa* (Blyth 1856)

*Crocidura horsfieldii* Tomes 1856

*Crocidura rapax* G. Allen 1923

3. Introduction. No title for this section.
4. Materials and Methods. Must include a statement indicating that research on live animals followed ASM guidelines (Sikes et al. 2011. *Journal of Mammalogy* 92:235–253, available at <http://asmjournals.org/doi/pdf/10.1644/10-MAMM-F-355.1>) and, if appropriate, was approved by an institutional animal care and use committee (IACUC). All DNA sequences must be submitted to GenBank, and accession numbers provided in the manuscript before publication. Museum catalog numbers for all voucher specimens (including associated tissue) examined must be included in the manuscript (in an Appendix if numerous). Consult recent issues of the *Journal of Mammalogy* for examples.
5. Results. Succinct and supported by data and analyses. Methods and interpretation belong elsewhere.
6. Discussion. No “Summary” or “Conclusion”.
7. Acknowledgments (note spelling).
8. Supporting Information, if included (see below).
9. Literature Cited (see below; not “References”).
10. Tables and Figures (see below).

**Supporting Information.** Supporting information that adds depth to a manuscript but is not essential to a reader’s understanding of the research (e.g., spreadsheets, databases, equations, video or audio files, tables and/or figures) may be hosted online. They can be supplied as text, audio, or video files and uploaded as supplementary materials during

the submission process. Supporting information files will not be edited and should conform to *Journal of Mammalogy* style; editors and reviewers will view the file during peer review, but we will not copyedit, typeset, or format supporting information. The material must be ready for e-posting when the manuscript is submitted for review. Supporting files should be referenced in your manuscript, e.g., “see Supporting Information S1”. All supporting information, be they tables, figures, text, videos, etc., should be labeled as “Supporting Information S1, S2, S3...,” consecutively through the manuscript. A short legend for each supporting file should be included in a section titled, “Supporting Information,” and appearing before the Literature Cited section.

Because e-only supporting files are published separately from the manuscript, they need to stand alone. If references are cited in the supporting information but not in the regular article, the references should appear at the end of the supporting file. References that appear only in the supporting information should not be listed in the Literature Cited section of the manuscript.

Supporting Information can be hosted online in document files (Word, Excel, PDF, etc.). Audio and video files should be no more than 10 minutes in length. Video files may be supplied by authors in .avi, .mov, .mp4, .mpg, .flv, .swf format, MPEG-2, or MPEG-4 preferred. If an author submits a video file, the author is encouraged to submit a still shot from the video (JPG, TIF, or EPS) to use for a thumbnail that can be placed in the article. Audio files should be mp3. 3-dimensional objects and geographic information system data should be KML files.

**Literature Cited.** List all works cited in the text in the Literature Cited; works not cited should not be listed. Submitted manuscripts must be in press or removed before manuscript acceptance. Unpublished data and reports cannot be cited in the manuscript or listed in the Literature Cited, please use pers. comm. or pers. obs. instead. The number of references cited should suffice to lead readers to key literature; use the lowest number of references necessary; rarely are more than 3 citations needed for a given point.

Personal communications should be cited parenthetically in the text; the citation should include the source’s name and affiliation and the date of the communication: (Henry J. Smith, [university or other affiliation, city, state], personal communication, [month and year of communication]). Submit letters from authors of personal communications

giving permission to use the material. Manuscripts submitted for publication but not yet accepted may not be cited.

Cite literature in text using the “Name-Year” format as presented in the CSE guidelines. Multiple in-text citations are ordered chronologically (Author 1998; Author 1999, 2000). Use the first author’s last name and “et al.” for in-text citation of works with more than two authors or editors, and cite in chronological order by lead author (e.g., if Jones, Smith, and Andrews 2000 and Jones, Andrews, and Smith 2001 were cited simultaneously, this should be cited as Jones et al. 2000, 2001). For multiple works by an author in the same year, cite as “a”, “b”, etc. (e.g., Author 2010a, 2010b) with the first article cited in text denoted as “a” (note that Jones, Smith, and Andrews 2001 and Jones, Andrews, and Smith 2001 would be cited as Jones et al. 2001a, 2001b, with the letters allocated in the order mentioned in text).

In the Literature Cited, list the name of every author or editor, unless there are more than 7, in which case use “Author et al. date.” References are presented in alphabetical order by all authors (unless “et al.” is used), and chronologically for references with identical author lines. Capitalize only the first word and proper nouns of a reference and use italics only for scientific names. Provide the full names of all journals.

The following examples are typical of references in *Journal of Mammalogy*; refer to recent issues for additional formatting guidance.

*Journal Articles:*

Dumbacher, J. P., G. B. Rathbun, T. O. Osborne, M. Griffin, and S. J. Eiseb. 2014. A new species of round-eared sengi (genus *Macroscelides*) from Namibia. *Journal of Mammalogy* 95:443–454.

Stapp, P., and G. A. Polis. 2003. Influence of pulsed resources and marine subsidies on insular rodent populations. *Oikos* 102:111–123.

Vieira, M. V. 2003. Seasonal niche dynamics in coexisting rodents of the Brazilian cerrado. *Studies on Neotropical Fauna and Environment* 38:7–15.

White, G. C., and K. P. Burnham. 1999. Program MARK: survival estimation from populations of marked animals. *Bird Studies* 46 (Supplement):120-139.

Sikes, R. S., W. L. Gannon, and the Animal Care and Use Committee of the American Society of Mammalogists. 2011. Guidelines of the American Society of Mammalogists for the use of wild mammals in research. *Journal of Mammalogy* 92:235–253.

#### *Books*

Gardner, A. L. (ed.). 2008 [2007]. *Mammals of South America*, vol. 1, marsupials, xenarthrans, shrews, and bats. Chicago: University of Chicago Press. [Date of issue: March 31, 2008.]

Groves, C., and P. Grubb. 2011. *Ungulate taxonomy*. Johns Hopkins University Press. Baltimore, Maryland.

Hall, E. R. 1981. *The mammals of North America*. 2nd ed. John Wiley & Sons, Inc., New York 1:1–600 + 90. [OR . . . 2:601–1181 + 90.]

Neal, E. G., and D. C. Cheeseman. 1996. *Badgers*. Poyser Natural History, London, United Kingdom.

Peterson, A. T., et al. 2011. *Ecological niches and geographic distributions*. Princeton University Press. Princeton, New Jersey. [note that this reference has 7 authors]

#### *Chapter in Edited Books*

Fahr, J. 2013. *Rhinolophus ziama*. Ziama horseshoe bat. Pp. 355-356 in *Mammals of Africa*. 4. Hedgehogs, shrews, and bats (M. Happold and D. C. D. Happold, eds.). Bloomsbury Publishing, London, United Kingdom.

Goin, F. J., J. N. Gelfo, L. Chornogubsky, M. O. Woodburne, and T. Martin. 2012. Origins, radiations, and distribution of South American mammals: from greenhouse to icehouse worlds. Pp. 20-50 in *Bones, clones, and biomes: the history and geography of Recent Neotropical mammals* (B. D. Patterson and L. P. Costa, eds.). University of Chicago Press, Chicago, Illinois.

Kley, N. J., and M. Kearney. 2007. Adaptations for digging and burrowing. Pp. 284–309 in *Fins into limbs* (B. Hall, ed.). University of Chicago Press. Chicago, Illinois.

#### *Technical Reports*

Carey, A. B., B. L. Biswell, and J. W. Witt. 1991. Methods for measuring populations of arboreal rodents. U.S. Forest Service, General Technical Report PNW-GTR-273:1–24.

Griggs, F. T., and River Partners. 2009. California riparian habitat restoration handbook. 2nd. ed. July 2009. California Riparian Habitat Joint Venture. Sacramento, California.

Zielinski, W. J. 1995. Track plates. Pp. 67–89 in American marten, fisher, lynx, and wolverine: survey methods for their detection (W. J. Zielinski and T. E. Kucera, eds.). U.S. Forest Service, General Technical Report PSW-GTR-157:1–163.

#### *Proceedings*

Armitage, K. B., and D. T. Blumstein. 2002. Body-mass diversity in marmots. Pp 22–40 in Holarctic marmots as a factor of biodiversity. In Proceedings of the 3rd International Conference on Marmots, Cheboksary, Russia, 25–30 August 1997 (K. B. Armitage and V. Y. Rumiantsev, eds.). ABF Publishing House, Moscow, Russia.

#### *Theses or Dissertations*

Quaife, L. R. 1978. The form and function of the North American badger (*Taxidea taxus*) and its fossorial way of life. M.S. thesis, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada.

Steward, P. D. 1997. The social behaviour of the European badger, *Meles meles*. Ph.D. dissertation, University of Oxford, Oxford, United Kingdom.

*Web sites* (Do not include web addresses in manuscript text, cite them as “(Author Year)” and include web address in Literature Cited).

CDFW [California Department of Fish and Wildlife]. 2008. State & federally listed endangered & threatened animals of California. January 2013. [www.dfg.ca.gov/biogeodata/cnddb/pdfs/TEAnimals.pdf](http://www.dfg.ca.gov/biogeodata/cnddb/pdfs/TEAnimals.pdf). Accessed 15 July 2013.

IUCN. 2015. The IUCN Red List of threatened species. Ver. 2015.3. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Accessed 6 November 2015.

To cite the IUCN assessment of a give species, use the following template:

Author(s). Year. *Species name*. In: IUCN 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2015.3. [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). Accessed 6 November 2015.

*Software* (Cite software as “(Author Year)” in text and include citation in literature cited.)

ESRI. 2002. ArcView GIS. Ver. 3.3. Environmental System Research Institute, Inc. Redlands, California.

IBM Corp. 2012. IBM SPSS statistics for Windows. Ver. 21.0. IBM Corp., Armonk, New York.

Jenness Enterprises. 2002. Kit fox telemetry. A custom-written extension for ArcView 3.3. Jenness Enterprises, Flagstaff, Arizona.

Kenward, R. E., A. B. South, and S. S. Walls. Ranges 6. Ver. 1.2. Anatrack Ltd., Wareham, United Kingdom.

R Development Core Team. 2012. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. [www.R-project.org/](http://www.R-project.org/).

Rodgers, A. R., and A. P. Carr. 1998. HRE: the Home Range Extension for ArcView. Centre for Northern Forest Ecosystem Research, Ontario Ministry of Natural Resources. Thunder Bay, Ontario, Canada.

SAS Institute Inc. 2008. SAS/STAT user’s guide. Release 9.2. SAS Institute, Inc. Cary, North Carolina.

Statsoft Inc. 2002. Statistica. Release 6. Statsoft Inc. Tulsa, Oklahoma.

Swofford, D. L. 1999. PAUP\*: phylogenetic analysis using parsimony (\*and other methods). Ver. 4. Sinauer Associates, Inc., Publishers. Sunderland, Massachusetts.

**Tables and Figures.** All Tables and Figures should be interpretable without reference to the manuscript; that is, they should “stand alone.” Tables must be provided as text (not images). Capitalize only the first word in figure and table titles (and subheads), except for proper nouns. Use lowercase letters to indicate footnotes in tables and panels in figures. Put panel labels (a, b, etc.) in the upper left corner of figures, if needed.

Construct tables without vertical rules. For more general guidelines on the construction of tables, see the *CSE Manual* and the *Chicago Manual of Style*.

Artwork should suit the manner in which it will be published and should be readable in black and white, even if it will appear in color. Artwork submitted for publication should be of the highest quality, in vector-graphic format if possible, or with a minimum resolution of 600 dpi for line art and 400 dpi for photographs at 4 x 6 inches for figures intended to run within the article, and the same resolution at 8 x 11 inches for figures intended for the cover. Images for the cover of *Journal of Mammalogy* should have a vertical (portrait) orientation. Photographs (without text) should be submitted in .tif format. All other art should be submitted in .eps format. Maps must include latitude and longitude ticks and, if appropriate, a compass rose and scale, and should be understandable on their own. All figures should be square or rectangular in outline to avoid wasting space; do not submit maps with “locator maps” placed above or to the side of the main map if this leaves empty space adjacent to the primary map.

**Third-Party Content in Open Access Papers.** If you will be publishing your paper under an Open Access licence but it contains material for which you **do not** have Open Access re-use permissions, please state this clearly by supplying the following credit line alongside the material:

*Title of content*

*Author, original publication, year of original publication, by permission of [rights holder]*

*This image/content is not covered by the terms of the Creative Commons licence of this publication. For permission to reuse, please contact the rights holder.*

## PUBLICATION FEES

### **Color Charges**

Authors who want their artwork to print in color will be charged a fee of US\$1,000 for each image. There is no fee for color if an image is used on the cover of *Journal of Mammalogy*.

### **Page Charges**

Articles in *Journal of Mammalogy* are subject to a charge of US\$80.00 per printed page. As a benefit of membership, authors who are members of ASM *at the time of submission* are eligible for a reduction or waiver of page charges (at least one author must be a member). If resources are available, members are strongly encouraged to pay full or partial page charges.

### **Open Access**

*Journal of Mammalogy* authors have the option to publish their paper under the [Oxford Open initiative](#); whereby, for a charge, their paper will be made freely available online immediately upon publication. After your manuscript is accepted, the corresponding author will be required to accept a mandatory license to publish agreement. As part of the licensing process, you will be asked to indicate whether or not you wish to pay for open access. If you do not select the open access option, your paper will be published with standard subscription-based access and you will not be charged. Members of the ASM are eligible to receive a discount on the Open Access fee. To obtain this discount, when requested on the Author Services site to "Please enter American Society of Mammalogists membership number," ASM members should instead enter their ASM-registered email address.

Oxford Open articles are published under Creative Commons licenses.

RCUK/Wellcome Trust funded authors publishing in *Journal of Mammalogy* can use the Creative Commons Attribution license (CC-BY) for their articles. All other authors must use the Creative Commons Attribution Non-Commercial license (CC-BY-NC).

Please click [here](#) for more information about the Creative Commons licenses.

You can pay Open Access charges using our Author Services site. This will enable you to pay online with a credit/debit card, or request an invoice by email or post. The applicable open access charges vary according to which Creative Commons license you select. The open access charges are as follows.

Non-member charges for CC-BY and CC-BY-NC

- Regular charge: £984 / \$1575 / €1279
- List B Developing country charge\*: £493 / \$788 / €640

- List A Developing country charge\*: £0 / \$0 / €0

\*Visit our [developing countries](#) page (click [here](#) for a list of qualifying countries).

Member charges for CC-BY and CC-BY-NC

- Regular charge: £788 / \$1260 / €1024

Orders from the UK will be subject to the current UK VAT charge. For orders from the rest of the European Union, OUP will assume that the service is provided for business purposes. Please provide a VAT number for yourself or your institution and ensure you account for your own local VAT correctly.

### **Offprints**

Authors will receive electronic access to their paper free of charge. Printed offprints may be purchased in multiples of 50. Rates are indicated on the order form which must be returned with the proofs. You can download an Offprint Form [here](#).

### **Self-Archiving**

For more information, please click [here](#). In case of any additional queries, please contact [Journals Permissions](#).

### **AUTHORSHIP**

Everyone listed as an author of an article must have made a substantial contribution to the manuscript. In the case of multiple-author contributions, please include a brief statement detailing the contribution of each author.

1) Authorship should be restricted to those individuals who have met each of three criteria: (a) made a significant contribution to the conception and design or the analysis and interpretation of data or other scholarly effort, (b) participated in drafting the article or reviewing and/or revising it for content, and (c) approved the final version of the manuscript.

2) In the case of papers with multiple authors, the senior author (generally the first or last author) has the responsibility for: (a) including as coauthors all those who meet the three criteria defined in part 1 of this policy and excluding those who do not; and (b) obtaining from all coauthors their agreement to be designated as such, as well as their

approval of the final version of the manuscript. Of course, any person can refuse to be a coauthor if he or she elects to do so.

3) Coauthors assume full responsibility for all work submitted under their names and, as a coauthor, acknowledge that they meet each of the three criteria for authorship as defined in part 1 of this policy.

4) Honorary or courtesy authorships are inconsistent with the principles of this policy and, as such, are unacceptable.

#### CONFLICT OF INTEREST STATEMENT

The pages of *Journal of Mammalogy* are open to all members of the scientific community, whether they work independently or for academic, government, industry, or other organizations. To enable our editors, peer reviewers, and readers to assess authors' professional credentials, as well as any potential biases, we ask that authors disclose all information about their employment affiliations and any financial interests relevant to the work that the author has submitted for publication in *Journal of Mammalogy*. Reviewers should also disclose similar information relevant to the works they are asked to evaluate.

#### LICENSE TO PUBLISH

Please note that by submitting an article for publication you confirm that you are the corresponding/ submitting author and that Oxford University Press ("OUP") may retain your email address for the purpose of communicating with you about the article. You agree to notify OUP immediately if your details change.

Upon receipt of accepted manuscripts at Oxford, authors will be invited to complete an online license to publish form. Once invited, the license form should be signed within 24 hours. If we have not received confirmation of signature by the time the manuscript arrives, your manuscript may be delayed.

It is a condition of publication for all Oxford Journals that authors grant an exclusive license to Oxford University Press or the sponsoring Society. This ensures that all necessary rights needed for publication are in place, including provision for any requests from third parties, to reproduce content from the journals efficiently and

consistently by OUP, and enabling the content to be as widely disseminated as possible. No article will be published unless the signed license has been received at Oxford Journals.

As part of the terms of the license agreement, Authors may use their own material in other publications written or edited by themselves provided that the Journal is acknowledged as the original place of publication, as well as Oxford University Press. As the Author(s), copyright of the Article remains yours (or your employer's if your employer claims copyright in your work). See [here](#) for full details of Oxford Journals' copyright policy and the rights retained by you/your institution under the terms of the license.

Work submitted for publication must be original, previously unpublished, and not under consideration for publication elsewhere. If previously published figures, tables, or parts of text are to be included, the copyright-holder's permission must have been obtained prior to submission. For more information on how to obtain permissions, please consult [Rights and Permissions](#).

#### LANGUAGE EDITING PRE-SUBMISSION

ASM has a “Buddy System” which includes colleagues who have expressed willingness to assist authors with the presentation of their research. If English is not your primary language, you may request a “buddy” who will volunteer his/her time to assist you. [Read more about the ASM "Buddy System" here](#). To be put in contact with a “buddy” please contact the Journal Editor.

Online ISSN 1545–1542 - Print ISSN 0022–2372