

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ECOLOGIA E  
RECURSOS NATURAIS (PPGERN)

MARIANA CAMPANHA FÉLIX

DIVERSIDADE GENÉTICA E ESTRUTURAÇÃO POPULACIONAL EM  
CAPIVARAS, *Hydrochoerus hydrochaeris* (LINNAEUS, 1766)

SÃO CARLOS – SP

2022

Mariana Campanha Félix

Diversidade genética e estruturação populacional em capivaras,  
*Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, para obtenção do título de mestre em Ecologia e Recursos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior

São Carlos-SP

2022



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais

---

## Folha de Aprovação

---

Defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Mariana Campanha Felix, realizada em 08/03/2022.

### Comissão Julgadora:

Prof. Dr. Pedro Manoel Galetti Junior (UFSCar)

Profa. Dra. Alexandra Sanches (UFSCar)

Profa. Dra. Adriane Pinto Wasko (UNESP)

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Recursos Naturais.

## **DEDICATÓRIA**

À minha mãe que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos, força e exemplo.

## AGRADECIMENTO

À Deus por me fortalecer nos momentos difíceis. Minha mãe Angela Campanha presença permanente incondicional. À minha prima Ivete Félix e à Marcela Campanha irmã e amiga querida por todos os momentos. À Hebe Horta pela dedicação e bons conselhos. Ao meu cunhado e amigo Thiago sempre presente nos momentos bons e ruins. Ao amigo Cristiano Araújo pelo apoio em todos os momentos. Ao amigo Rodrigo Correia (doidinho) pela amizade e pelo apoio em minha qualificação. Ao amigo Martin Gonzalez, presença nos ótimos momentos em São Carlos.

Dr. Lairton Andrade e Regina Stephan, aos meus professores da Universidade Federal de Viçosa de Minas Gerais, principalmente do Departamento de Biologia Animal e Ecologia por inspirarem as minhas escolhas, em especial: Gisele Lessa e Jorge Dergam pelos momentos de aprendizagem durante o estágio. Também não posso deixar de agradecer às professoras Flávia Maria e Gisele Lessa pelos conselhos ao final da graduação.

Ao CETAS da Universidade Federal de Viçosa por meu primeiro estágio e por momentos maravilhosos de aprendizagem, nos três primeiros períodos da graduação, foram momentos inesquecíveis.

À Universidade Federal de São Carlos, São Paulo, a oportunidade de efetuar a Pós-graduação.

Aos meus colegas de laboratório pela receptividade em especial ao Bruno, Karen, Carla, Carmem e Carol que me acompanharam desde o início do projeto. Ao meu competente orientador Pedro Galetti através do qual todo esse trabalho foi possível. Por fim, agradeço às agências de fomento. Agradeço ao CNPq pelo financiamento da pesquisa através da bolsa de estudos. O presente trabalho foi realizado também com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

“Não nos surpreendemos com a raridade de uma espécie, mas ficamos chocados com o seu desaparecimento; é como admitir que a doença é o prelúdio da morte e não se sentir surpreso diante da doença, mas apenas com a morte da pessoa doente, não atribuindo o falecimento de que ela sofria, mas a algum ato desconhecido de violência.”

Charles Darwin

## RESUMO

A diminuição da conectividade para as espécies e conseqüentemente limitação da dispersão pode estar ligada a vários fatores ambientais como clima, barreiras de dispersão, ou dispersão limitada. No caso de organismos semi-aquáticos, como a capivara, sua dispersão é influenciada pela presença de corpos d'água. Neste trabalho avaliamos a distribuição da diversidade genética de *Hydrochoerus hydrochaeris* em diferentes bacias hidrográficas da América do Sul. Avaliamos, também, a presença de estruturação entre diferentes bacias hidrográficas e entre microbacias hidrográficas das bacias do Paraguai e do Alto Paraná em território brasileiro. Para isso, amplificamos um fragmento da região D-loop do DNA mitocondrial, construímos redes de haplótipos e realizamos análises filogenética e de variância molecular. Também reconstruímos uma história demográfica com a análise *Bayesian Skyline Plot*. Nossos resultados evidenciaram que as populações de *H. hydrochaeris* encontram-se estruturadas entre as bacias do Orinoco, Paraguai e Alto Paraná, mas ainda mantêm polimorfismos ancestrais e possivelmente um fluxo de indivíduos entre as bacias do Paraguai e Alto Paraná. Enquanto a diversidade genética, tanto haplotípica quanto nucleotídica, nas bacias do Paraguai e Alto Paraná é elevada e as populações apresentam um crescimento demográfico relativamente recente, as populações da bacia do Orinoco apresentam baixa diversidade e um declínio populacional. Os padrões de estrutura e diversidade genética provavelmente são resultado da história evolutiva distinta das bacias hidrográficas e recentes oscilações demográficas sofridas pelas populações, respectivamente.

**Palavras-chave:** Rodentia. Fluxo gênico. Barreiras geográficas. Haplótipos D-loop.

## ABSTRACT

Decreased connectivity for species and consequently limited dispersal can be linked to various environmental factors such as climate, dispersal barriers, or limited dispersal. In the case of semi-aquatic organisms such as capybara, their dispersion can be influenced by the presence of water bodies. Our work aims to evaluate the distribution of genetic diversity of *Hydrochoerus hydrochaeris* in river basins of South America. We also evaluated the presence of structuring between different hydrographic basins and between hydrographic microbasins of the Paraguay and Alto Paraná basins in Brazilian territory. For this, we amplified a fragment of the D-loop region of mitochondrial DNA, constructed haplotype networks and performed phylogenetic and molecular analysis of variance. We also reconstructed a demographic history with the Bayesian Skyline Plot analysis. Our results showed that *H. hydrochaeris* populations are structured between the Orinoco, Paraguay and Alto Paraná basins, but still maintain ancestral polymorphisms and possibly a flow of individuals between the Paraguay and Alto Paraná basins. On the other hand, the genetic diversity, both haplotypic and nucleotide, in the Paraguay and Alto Paraná basins is high and the populations show a relatively recent demographic growth, the populations of the Orinoco basin show low diversity and a population decline. The patterns of structure and genetic diversity are probably a result of the distinct evolutionary history of watersheds and recent demographic fluctuations suffered by populations, respectively.

**Keywords:** Rodentia. Gene flow. Geographical barriers. D-loop haplotypes



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	10
1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS CAPIVARAS	10
1.2 A DIVERSIFICAÇÃO DO GRUPO DAS CAPIVARAS	12
1.3 ESTUDOS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES DE CAPIVARAS	13
<b>2 OBJETIVOS</b>	15
2.1 OBJETIVO GERAL	15
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	15
2.3 HIPÓTESE	15
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	16
3.1 AMOSTRAGEM	16
3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DOS MARCADOR MITOCONDRIAL	18
3.3 ANÁLISE DE DADOS	18
3.3.1 <i>Diversidade genética</i>	20
3.3.2 <i>Distribuição dos haplótipos e estruturação</i>	21
3.3.3 <i>Análise filogenética e demografia histórica</i>	21
<b>4 RESULTADOS</b>	23
4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA	23
4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS E ESTRUTURAÇÃO	24
4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA E DEMOGRAFIA HISTÓRICA	28
<b>5 DISCUSSÃO</b>	31
<b>6 CONCLUSÕES</b>	34
<b>7 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	35
<b>8 REFERÊNCIAS</b>	36

## 1 INTRODUÇÃO

### 1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE AS CAPIVARAS

As capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) são mamíferos semiaquáticos, amplamente distribuídos pelo continente sul-americano (HERRERA & MACDONALD, 1989; QUINTANA, 1999). O ambiente aquático é o local onde a espécie encontra suas principais fontes de alimento e também é essencial para a cópula, fuga de predadores, regulação térmica e abrigo (BARRETO & QUINTANA, 2012; HERRERA & MACDONALD, 1989; QUINTANA 1999). Além disso, a água também é usada como meio de dispersão para os indivíduos da espécie (HERRERA & MACDONALD, 1989; QUINTANA, 1999). As capivaras normalmente possuem hábitos crepusculares, descansando no período da manhã e forrageando à tarde até o amanhecer; vivem em grupos sociais poligínicos, geralmente constituído de seis a 12 adultos, conferindo maior proteção contra predadores, onde apenas um macho é dominante e os demais são subordinados (MACDONALD, 1981). O tamanho dos grupos pode variar de acordo com as características do habitat, podendo chegar em torno de 100 indivíduos nas épocas de seca (MACDONALD, 1981; OJASTI, 1973). O tamanho dos grupos também pode aumentar quando em altas densidades populacionais (CONGDON, 2007; HERRERA & MACDONALD, 1987; SALAS, 1999) ou diminuir devido à caça (FESTA-BIANCHET, 2003; FITZGIBBON, 1998; TUYTTENS & MACDONALD, 2000). O macho dominante possui hábitos territorialistas, não permitindo que os machos subordinados se aproximem de seu harém de fêmeas reprodutoras (MACDONALD, 1981). O macho alfa também tem o comportamento infanticida podendo induzir prematuramente as fêmeas a entrarem no estro (SWENSON, 2003). Similarmente aos machos, as fêmeas também são divididas em fêmeas dominantes (reprodutoras) e fêmeas subordinadas. Fêmeas subordinadas são impedidas de copular com o macho dominante tanto por contenção física, quanto por mecanismos hormonais das fêmeas reprodutoras (MALDONADO-CHAPARRO & BLUMSTEIN, 2008). O grupo também é formado por juvenis e filhotes, dependendo da época do ano. Dificilmente podemos distinguir o macho e a fêmea principalmente quando jovens, quando as diferenças morfológicas são imperceptíveis para nós, e os órgãos sexuais ficam no interior da cavidade abdominal (HERRERA, 2012), sendo muitas vezes necessário alguns métodos de sexagem como a contenção e a projeção do órgão sexual (PAULA & WALKER, 2012). Somente o

macho dominante pode ser reconhecido pela presença da glândula nasal mais desenvolvida, usada para demarcação de território, apesar disso, em cativeiro algumas fêmeas dominantes também possuem esta glândula mais desenvolvida (HERRERA, 2012) e as fêmeas são reconhecidas pelo macho dominante através do cheiro das secreções glandulares (CLARK & OLFERT, 1986).

Apesar de ser uma espécie com ampla distribuição geográfica, algumas de suas populações encontram-se reduzidas ou ameaçadas. Isso se deve, principalmente, a fatores como a destruição do seu habitat natural e a caça devido ao interesse na sua carne e couro, ameaçando algumas de suas populações, como já ocorre na região dos chacos argentinos (CORRIALE & HERRERA, 2014). No entanto, situação diferente ocorre em algumas regiões do Brasil, onde suas populações podem crescer de forma descontrolada, principalmente devido à redução ou extinção dos seus predadores naturais nestas áreas (FERRAZ et al., 2007; NOGUEIRA-FILHO & NOGUEIRA 2004). Seus principais predadores terrestres são a onça pintada (*Panthera onca*) e a onça-parda (*Puma concolor*) (FOSTER et al., 2013).

Enquanto ocorre destruição do seu habitat natural por ações antrópicas, a capivara pode ocupar áreas modificadas pelo uso de terra onde é fornecido água e alimentos e ela tem se tornado cada vez mais tolerante à presença humana (ROSENFIEL & PIZZUTO, 2019). Além disso, ela possui um sistema digestivo que lhe permite enfrentar as mudanças ambientais, uma vez que no período de abundância de recursos ela pode optar pela qualidade dos alimentos, enquanto no período de escassez de recursos o ceco do tubo digestório aumenta de tamanho, permitindo a ingestão de maior quantidade de alimentos menos nutritivos (BORGES et al., 1996; OJASTI, 1983). Algumas regiões, como os Lhanos venezuelanos e o Pantanal brasileiro, possuem condições favoráveis para a propagação da espécie; devido aos frequentes ciclos de chuvas extremas e seguidas de um período seco. No final da estação chuvosa o solo se torna mais fértil aumentando a qualidade e a quantidade de recursos disponíveis para os animais, como as capivaras (FERRAZ et al., 2003). O aumento populacional das capivaras pode causar sérios problemas, por exemplo, anomalias em plantas causadas pela herbivoria (RAMOS et al., 2018), danos às áreas de cultivo, transmissão de doenças e, até mesmo, o aumento de acidentes nas rodovias (RINALDI, 2014).

## 1.2 A DIVERSIFICAÇÃO DO GRUPO DAS CAPIVARAS

Os cavimorfos são roedores que surgiram há mais de 30 milhões de anos atrás dando origem a vários outros roedores como pacas (*Cuniculus* spp.), preás (*Cavia* spp.) e capivaras (*Hydrochoerus* spp.). Eles se originaram na África dos ancestrais histicognatos durante o eoceno que migraram para a América do Sul, e se diversificaram durante o Eoceno no Médio Ótimo Climático antes do resfriamento inicial do Oligoceno (ANTOINE et al., 2012; KERBER, 2017). A diversificação dos caviomorfos se iniciou com duas radiações entre o final do Oligoceno e o início do Mioceno, seguida de uma terceira fase que corresponde a radiação dos caviomorfos que ocorreu no Mioceno médio (PÉREZ & POL, 2012). O fóssil mais antigo de capivara surgiu no mioceno tardio, onde era altamente diversificada (MOREIRA et al., 2012). Para testar a hipótese sobre a alta biodiversidade da capivara na bacia amazônica, Ruiz-García et al. (2016) sequenciaram o citocromo b e a região controle do DNA mitocondrial de capivaras na Colômbia, Equador, Brasil e Peru. Os resultados indicaram que a sua diversificação haplotípica ocorreu do final do Mioceno até o Plioceno, além de outros processos de diversificação haplotípica se estendendo até o Pleistoceno e alguns eventos de expansão populacional durante o Pleistoceno (RUIZ-GARCÍA et al., 2016). Byrne et al. (2021) analisaram padrões filogeográficos através das sequências obtidas pela amplificação da região D-loop do DNA mitocondrial, junto com sequências de outros estudos sobre diversidade genética da capivara em diferentes regiões da América do Sul. Os resultados sugeriram que a capivara surgiu na Amazônia ocidental e que os eventos climáticos do Pleistoceno provocaram um declínio populacional seguido por expansões populacionais associadas às condições climáticas do Holoceno.

Atualmente, são reconhecidas duas espécies para o gênero *Hydrochoerus*, sendo *Hydrochoerus isthmius* e *Hydrochoerus hydrochaeris* (GOMES et al., 2019), diferenciadas por características morfológicas (MONES, 1984; MONES & OJASTI, 1986) e genéticas (MOREIRA et al., 2012). *Hydrochoerus isthmius* é menor, mais leve, com tempo de gestação mais curto, enquanto *H. hydrochaeris* apresenta o osso frontal mais grosso e largo (MONES & OJASTI, 1986). Entretanto, esse status taxonômico ainda é considerada controversa e alguns estudos sugerem a existência apenas de subespécies (BYRNE et al., 2021; RUIZ-GARCÍA et al., 2016). A espécie *H. isthmius* está restrita principalmente à região do Panamá, noroeste da Colômbia,

e nordeste da Venezuela. Já *H. hydrochaeris* está distribuída pelo restante da América do Sul com exceção do Chile (REID, 2016). Na Colômbia e na Venezuela ambas as espécies estão presentes, porém separadas pela Cordilheira dos Andes. Na Colômbia, *Hydrochoerus hydrochaeris* apresenta maiores densidades nas savanas dos Llanos Orientales (ALDANA-DOMÍNGUEZ et al., 2002; CARO et al., 2005; RODRÍGUEZ et al., 2003). Na Venezuela, *Hydrochoerus isthmius* é encontrada apenas ao redor do lago de Maracaibo (OJASTI, 1973). No Brasil, *Hydrochoerus hydrochaeris* é encontrada em todos os estados e Distrito Federal apresentando maior densidade populacional em savanas inundadas como o Pantanal Matogrossense (FONSECA et al., 1996; MOREIRA, 2004; OLIVEIRA & Bonvicino, 2006; SCHALLER & CRAWSHAW, 1981), e principalmente nas áreas agrícolas onde prevalecem plantas C4 do estado de São Paulo (FERRAZ et al., 2007). Já no nordeste do Brasil, provavelmente pela pressão da caça e alteração de habitat, a espécie está ameaçada de extinção no bioma caatinga (MOREIRA, 2004).

### 1.3 ESTUDOS GENÉTICOS EM POPULAÇÕES DE CAPIVARAS

Do melhor do nosso conhecimento, há na literatura poucos estudos de genética populacional de capivaras. Em um deles, os autores compararam populações da Venezuela e do Paraguai da espécie *H. hydrochaeris*, usando um fragmento da região controle do DNA mitocondrial para testar a influência da drenagem dos rios na estruturação genética da capivara (BYRNE et al., 2015). Neste estudo, os autores descrevem uma alta diversidade genética e uma estruturação populacional significativa entre as populações da Venezuela, Paraguai e Argentina. Já para as sub-bacias, foi encontrada estruturação apenas dentro do Paraguai, devido à falta de corredores através de rios permanentes. Situação essa diferente a da encontrada para a Argentina, onde a presença de inundações sazonais pode favorecer a movimentação da espécie.

Campos-Krauer e Wisely (2011) analisaram a influência da pecuária no aumento populacional da capivara através da modelagem de nicho e amplificação da região D-loop do DNA mitocondrial. De acordo com os autores, os dados de modelagem de nicho juntamente com os dados genéticos indicam uma grande influência do uso de terra na expansão da capivara para as áreas convertidas em pastagens além de alterar a conectividade entre as populações. Maldonado-Chaparro et al. (2011),

estudando a diversidade genética de capivaras dos Llanos Colombianos, utilizando marcadores microssatélites, encontraram um valor médio-baixo de diversidade genética ( $H_e=0,61$ ), além de um gargalo recente, provavelmente causado pela caça ilegal.

Com a finalidade de avaliar os efeitos genéticos de um programa de conservação da capivara implementado pelo governo da Venezuela em 1968, Borges-Landáez et al. (2012) avaliaram a variabilidade genética através da região HVI da região D-loop do DNA mitocondrial de cinco populações manejadas. De acordo com os autores, os resultados indicam limitações no fluxo gênico entre estas populações estudadas, o que pode causar problemas para a conservação dessas populações manejadas. A diversidade genética e a presença de estruturação na região dos Chacos paraguaios e argentinos foram analisadas por Byrne et al. (2019). Segundo os autores, a presença de um haplogrupo muito frequente nos locais de amostragem, pode indicar a existência de um fluxo gênico histórico nestas regiões.

Em populações brasileiras de *H. hydrochaeris*, não há nenhum estudo empregando análises moleculares para avaliar a presença de grupos genéticos diferenciados ao longo de sua distribuição em nosso território. Entretanto, devido à alta dependência da água da espécie para sua dispersão, bem como devido à história geológica de cada bacia hidrográfica, pode-se esperar que forças evolutivas atuando diferentemente entre as populações ao longo da distribuição da espécie, podem levar a populações geneticamente diferenciadas, com fluxo gênico limitado entre bacias hidrográficas. Alternativamente, o fluxo gênico entre as populações seria suficiente para prevenir a estruturação populacional dentro das microbacias.

Em ambos os casos, fatores ambientais, como mudanças no habitat e a caça podem mudar os padrões de distribuição da diversidade genética e promover ou acentuar a estruturação genética populacional, devido à alteração do fluxo gênico. Quanto maior a estruturação genética entre as populações, maior a potencial vulnerabilidade dessas à extinção local devido a redução do fluxo gênico e diversidade genética (FRANKHAM et al., 2002). Portanto, entender sobre a distribuição e os valores de diversidade genética da espécie é fundamental para entender o seu status populacional e também identificar potenciais unidades evolutivas diferenciadas. Além disso, a precisa informação genética é fundamental para o manejo de qualquer espécie e, considerando a necessidade de controle de

algumas de suas populações, conhecer como está distribuída a diversidade genética da capivara é um elemento crucial. Nesse contexto, o uso de marcadores moleculares mitocondriais pode ser muito útil para entender o padrão de distribuição da diversidade genética e detectar estruturação populacional, principalmente para se detectar potenciais barreiras históricas, como pode ser o caso das bacias hidrográficas.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a distribuição da diversidade genética da espécie *H. hydrochaeris* em diferentes bacias hidrográficas da América do Sul.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Avaliar a ocorrência de estruturação genética populacional em *H. hydrochaeris* em diferentes bacias hidrográficas da América do Sul.

Avaliar a ocorrência de estruturação genética populacional em *H. hydrochaeris* em diferentes microbacias hidrográficas das bacias do Paraguai e do Alto Paraná em território brasileiro.

### **2.3 HIPÓTESE**

Considerando que os rios pertencentes a uma determinada bacia hidrográfica podem atuar como corredores para a dispersão da espécie (BYRNE et al., 2015; 2019), esperamos encontrar ausência de estruturação entre microbacias dentro das bacias hidrográficas e presença de estruturação entre populações de capivaras de diferentes bacias (BYRNE et al., 2015; 2019).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 AMOSTRAGEM

Utilizamos 31 amostras de tecido (sangue e músculo) de *H. hydrochaeris* de vida livre provenientes das bacias do Paraguai (N=13) e do Alto Paraná (N=18) (Tabela 1; Fig. 1). As amostras de músculo (N=30) foram obtidas a partir de material de caça fornecido pela Polícia Militar Ambiental do Estado de São Paulo. Apenas uma amostra de sangue (S9628, Tabela 1) foi provida por colaboradores. O acesso ao patrimônio genético das amostras foi autorizado pelo cadastro A9F8717 no Sistema Nacional de Gestão do patrimônio genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SISGEN). Todas as amostragens e procedimentos foram realizados sob e recomendações legais propostas pelo Conselho Federal de Biólogos, Resolução 301 (8 de dezembro de 2012). Também seguimos as diretrizes do comitê de ética para animais de pesquisa (Comitê de Ética no Uso de Animais, CEUA – UFSCar Portaria 721/04), evitando o uso inapropriado ou abusivo de animais.

Tabela 1 - Informações sobre as amostras de tecido utilizadas neste estudo.

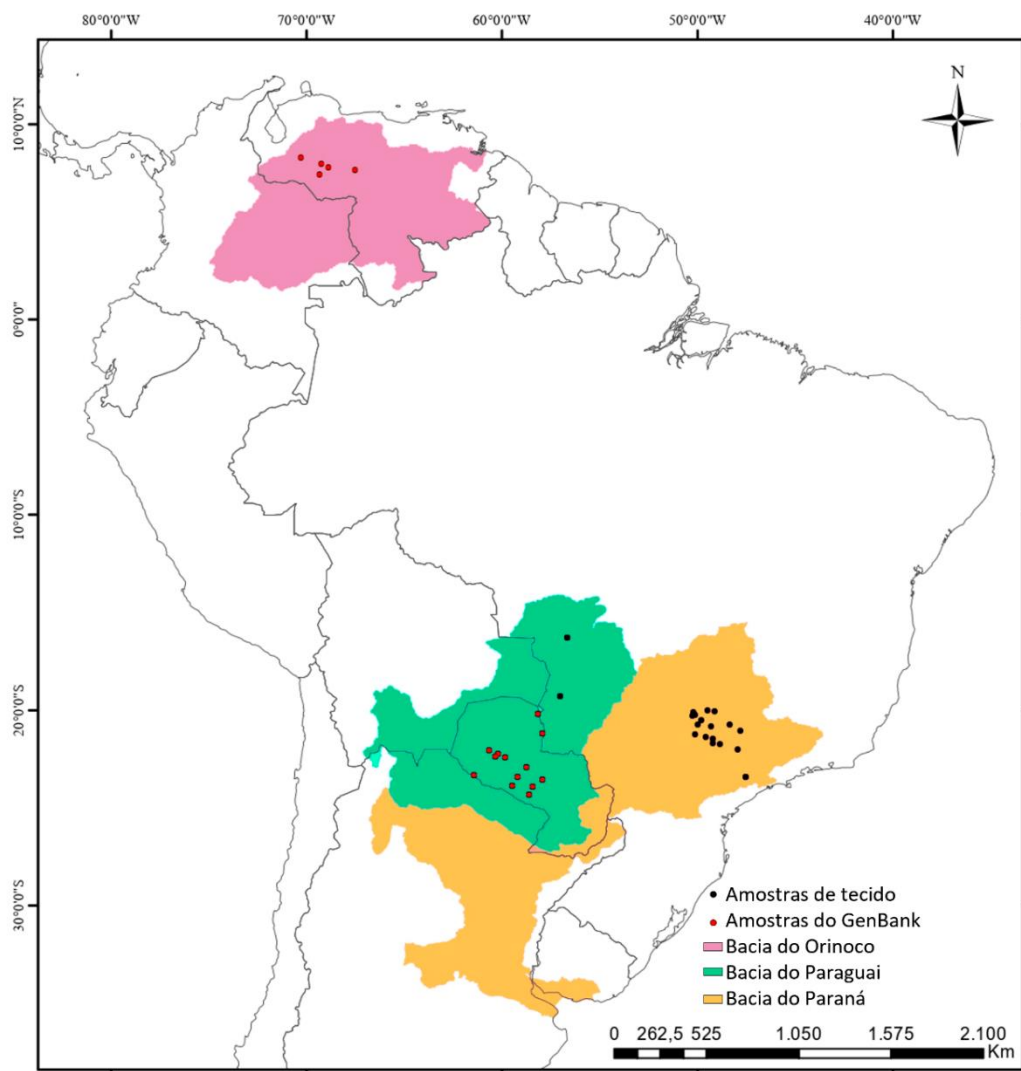
ID	Bacia	Agrupamento geográfico*	Coordenadas	
			Oeste	Sul
3164	Alto Paraná	Acima Tietê	-49.7736	-20.4767
4769i	Alto Paraná	Acima Tietê	-50.1918	-20.0928
5697	Alto Paraná	Acima Tietê	-50.1113	-20.2457
5982	Alto Paraná	Acima Tietê	-50.2486	-20.2750
111337	Alto Paraná	Acima Tietê	-49.2712	-20.8282
130586	Alto Paraná	Acima Tietê	-49.1144	-20.0332
140455	Alto Paraná	Acima Tietê	-48.3411	-20.7324
141787	Alto Paraná	Acima Tietê	-47.7890	-21.0306
161112	Alto Paraná	Acima Tietê	-49.9768	-20.7178
161960	Alto Paraná	Acima Tietê	-49.4829	-19.9952
15042	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-49.5594	-21.3727
131698	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-47.9219	-21.9940
140583	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-48.8146	-21.7455
140590	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-49.2025	-21.4734
140633	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-50.1064	-21.2186
141197	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-49.1729	-21.6583
150136	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-48.8373	-21.6716
S9628	Alto Paraná	Microbacia Tietê	-47.5162	-23.3873
FMPN1	Paraguai	Pantanal Norte	-56.6456	-16.2652
FMPN2	Paraguai	Pantanal Norte	-56.6456	-16.2652
FMPN5	Paraguai	Pantanal Norte	-56.6456	-16.2652
FMPN7	Paraguai	Pantanal Norte	-56.6456	-16.2652



FMPN11	Paraguai	Pantanal Norte	-56.6456	-16.2652
FMPN12	Paraguai	Pantanal Norte	-56.6456	-16.2652
FMPS1	Paraguai	Pantanal Sul	-57.0274	-19.2916
FMPS3	Paraguai	Pantanal Sul	-57.0274	-19.2916
FMPS4	Paraguai	Pantanal Sul	-57.0274	-19.2916
FMPS5	Paraguai	Pantanal Sul	-57.0274	-19.2916
FMPS6	Paraguai	Pantanal Sul	-57.0274	-19.2916
FMPS8	Paraguai	Pantanal Sul	-57.0274	-19.2916
FMPS10	Paraguai	Pantanal Sul	-57.0274	-19.2916

\*Agrupamento criado com base na localidade das amostras para as análises de estruturação populacional dentro das bacias hidrográficas.

Figura 1 - Mapa da localização das amostras analisadas.



Fonte: elaborada pelo autor

### 3.2 EXTRAÇÃO DE DNA E AMPLIFICAÇÃO DO MARCADOR MITOCONDRIAL

Para a amostra de sangue, extraímos o DNA total seguindo o protocolo de fenol-clorofórmio (GREEN & SAMBROOK, 2012), e para as amostras de músculo seguimos o protocolo de extração por precipitação salina (ALJANABI & MARTINEZ, 1997). Após a extração, o DNA foi quantificado em biofotômetro (*BioPhotometer*, Eppendorf®).

Para a análise de diversidade genética e estruturação genética populacional, utilizamos a região D-loop do DNA mitocondrial, a qual apresenta uma região hipervariável. Esta região apresenta maior nível de polimorfismo, sendo, assim, indicada para estudos populacionais (e.g., BORGES-LANDÁEZ et al., 2012; CAMPOS-KRAUER & WISELY, 2011). Utilizamos os primers HV1-F1 (5'-CCCACCATCAGTACCCAAA-3') e HV1-R2 (5'-CGAGATGTCTTATTTAAGGGGAAC-3') descritos por Borges-Landáez et al. (2012). O protocolo de PCR foi configurado para um volume final de 12 µL contendo 50 ng de DNA *template*, 1U de Taq DNA Polimerase Platinum (*Invitrogen*™), 1x Taq Buffer (200 mM Tris HCl (pH 8,4), 500 mM KCl, *Invitrogen*™), 0,62 mM de cada *primer*, 3mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,2 mM de dNTPs (*Invitrogen*™), e água ultrapura. O ciclo de amplificação consistiu em uma etapa de desnaturação inicial a 95°C por 5 min, seguida de 35 ciclos de desnaturação a 95°C por 30 s, anelamento a 56°C por 45s, extensão a 72°C por 45s e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos de PCR foram analisados por eletroforese em gel de agarose 1,5% e visualizadas sob luz UV. Os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol 20% (PEG) (LIS & SCHLEIF, 1975) e sequenciados em sequenciador automático modelo ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, California, EUA). Posteriormente, as sequências serão submetidas ao GenBank.

### 3.3 ANÁLISE DE DADOS

Para avaliar a diversidade genética e estruturação populacional entre as bacias hidrográficas ao longo da distribuição geográfica de *H. hydrochaeris*, além das sequências obtidas nesse estudo para as bacias do Paraguai e Alto Paraná, utilizamos sequências disponíveis no banco de dados do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) para as bacias do Orinoco, na Venezuela (N = 152), e do Paraguai, no Paraguai (N = 110) (Tabela 2). Esse conjunto de dados constituiu o *dataset 1*, cujas sequências apresentavam 386 pb, para correto

alinhamento entre todos os dados disponíveis. Para avaliar as diferenças entre microbacias, utilizamos apenas as sequências obtidas com as amostras de tecido e sangue de dentro do território brasileiro (N = 31; *dataset 2*), com 486 pb. Para a bacia do Paraguai, as sequências foram agrupadas entre Pantanal Norte (N = 6) e Pantanal Sul (N = 7), enquanto para a bacia do Alto Paraná, dentro da microbacia do Tietê (N = 8) e amostras acima da microbacia do Tietê (N = 10) (Tabela 1). As localizações de todas as amostras e sequências analisadas estão na Figura 1.

Tabela 2 - Informações sobre as sequências obtidas no GenBank e utilizadas neste estudo.

Código Acesso GenBank	Localidade	Bacia	Coordenadas		Fonte
			Oeste	Sul	
GU456363.1	Toledo	Paraguai	-60.3313	-22.3544	(1)
GU456363.1	Lapacho	Paraguai	-60.1911	-22.2247	(1)
GU456363.1	Loma Plata	Paraguai	-59.8353	-22.3880	(1)
GU456363.1	Laguna Rey	Paraguai	-58.7117	-22.9019	(1)
GU456363.1	Arizona	Paraguai	-58.4025	-23.8901	(1)
GU456363.1	Loreto	Paraguai	-59.4592	-23.8693	(1)
GU456363.1	Sauces	Paraguai	-61.4252	-23.3005	(1)
GU456363.1	Olimpo	Paraguai	-57.9359	-21.1615	(1)
GU456372.1	Bahia Negra	Paraguai	-58.1368	-20.1655	(1)
GU456373.1	Bahia Negra	Paraguai	-58.1368	-20.1655	(1)
GU456374.1	Bahia Negra	Paraguai	-58.1368	-20.1655	(1)
GU456375.1	Toledo	Paraguai	-60.3313	-22.3544	(1)
GU456375.1	Toledo	Paraguai	-60.3313	-22.3544	(1)
GU456376.1	Laguna Rey	Paraguai	-58.7117	-22.9019	(1)
GU456364.1	Toledo	Paraguai	-60.3313	-22.3544	(1)
GU456364.1	Loma Plata	Paraguai	-59.8353	-22.3880	(1)
GU456364.1	Jerovia	Paraguai	-59.2021	-23.3932	(1)
GU456364.1	Arizona	Paraguai	-58.4025	-23.8901	(1)
GU456364.1	Maroma	Paraguai	-57.9067	-23.5462	(1)
GU456364.1	Eñe	Paraguai	-58.5786	-24.2978	(1)
GU456364.1	Loreto	Paraguai	-59.4592	-23.8693	(1)
GU456364.1	Sauces	Paraguai	-61.4252	-23.3005	(1)
GU456364.1	Olimpo	Paraguai	-57.9359	-21.1615	(1)
GU456364.1	Bahia Negra	Paraguai	-58.1368	-20.1655	(1)
GU456365.1	Toledo	Paraguai	-60.3313	-22.3544	(1)
GU456365.1	Mariscal	Paraguai	-60.6227	-22.0236	(1)
GU456365.1	Loma Plata	Paraguai	-59.8353	-22.3880	(1)
GU456365.1	Jerovia	Paraguai	-59.2021	-23.3932	(1)
GU456365.1	Arizona	Paraguai	-58.4025	-23.8901	(1)
GU456365.1	Eñe	Paraguai	-58.5786	-24.2978	(1)
GU456365.1	Loreto	Paraguai	-59.4592	-23.8693	(1)

GU456366.1	Olimpo	Paraguai	-57.9359	-21.1615	(1)
GU456367.1	Toledo	Paraguai	-60.3313	-22.3544	(1)
GU456368.1	Olimpo	Paraguai	-57.9359	-21.1615	(1)
GU456368.1	Bahia Negra	Paraguai	-58.1368	-20.1655	(1)
GU456369.1	Bahia Negra	Paraguai	-58.1368	-20.1655	(1)
GU456370.1	Toledo	Paraguai	-60.3313	-22.3544	(1)
GU456371.1	Arizona	Paraguai	-58.4025	-23.8901	(1)
EU149768.1	El Cedral	Orinoco	-69.3333	7.416667	(2)
EU149768.1	El Frio	Orinoco	-68.8833	7.783333	(2)
EU149768.1	Santa Luisa	Orinoco	-67.5167	7.683333	(2)
EU149768.1	Santa Maria	Orinoco	-70.2667	8.316667	(2)
EU149769.1	El Cedral	Orinoco	-69.3333	7.416667	(2)
EU149769.1	El Frio	Orinoco	-68.8833	7.783333	(2)
EU149769.1	Mata de Guamo	Orinoco	-69.2167	7.966667	(2)
EU149769.1	Santa Luisa	Orinoco	-67.5167	7.683333	(2)
EU149772.1	El Cedral	Orinoco	-69.3333	7.416667	(2)
EU149772.1	El Frio	Orinoco	-68.8833	7.783333	(2)
EU149772.1	Mata de Guamo	Orinoco	-69.2167	7.966667	(2)
EU149772.1	Santa Maria	Orinoco	-70.2667	8.316667	(2)
EU149774.1	El Cedral	Orinoco	-69.3333	7.416667	(2)
EU149774.1	El Frio	Orinoco	-68.8833	7.783333	(2)
EU149771.1	El Frio	Orinoco	-68.8833	7.783333	(2)
EU149771.1	Mata de Guamo	Orinoco	-69.2167	7.966667	(2)
EU149775.1	El Frio	Orinoco	-68.8833	7.783333	(2)
EU149776.1	El Frio	Orinoco	-68.8833	7.783333	(2)
EU149773.1	Mata de Guamo	Orinoco	-69.2167	7.966667	(2)
EU149767.1	Santa Luisa	Orinoco	-67.5167	7.683333	(2)
EU149770.1	Santa Luisa	Orinoco	-67.5167	7.683333	(2)

(1) CAMPOS-KRAUER & WISELY, 2011; (2) BORGES-LANDÁEZ et al., 2012.

### 3.3.1 Diversidade genética

As sequências do D-loop foram visualizadas e manualmente editadas no *software* Geneious v.7.1.7 (KEARSE et al., 2012). Em seguida, foram alinhadas através do algoritmo de CLUSTAL W (LARKIN et al., 2007) implementado no mesmo *software* (KEARSE et al., 2012). Considerando todos os indivíduos amostrados e as sequências disponíveis no GenBank, calculamos os índices de diversidade entre as bacias e as microbacias hidrográficas analisadas no *software* DNAsp v. 5.1 (LIBRADO & ROZAS et al., 2009). Nós calculamos o número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

### 3.3.2 Distribuição dos haplótipos e estruturação

A partir das sequências obtidas para todos os indivíduos em cada *dataset*, foram construídas redes haplotípicas com o *software* PopART (*Population Analysis with Reticulate Trees*) (LEIGH & BRYANT, 2015), utilizando o algoritmo *Median Joining*. Em seguida, verificamos se os indivíduos nas bacias (*dataset 1*) e microbacias (*dataset 2*) representam populações geneticamente diferenciadas. Para isso, calculamos os valores do índice de fixação ( $\Phi_{ST}$ ) par-a-par entre as bacias estudadas e realizamos a análise de variância molecular (AMOVA), testada através de 10000 permutações. Ambas as análises foram realizadas no programa Arlequin v. 3.5.2.2 (EXCOFFIER & LISCHER, 2010).

Avaliamos a estruturação populacional entre as bacias e microbacias considerando a espacialidade das amostras, buscando por agrupamentos dos haplótipos encontrados nas áreas amostradas utilizando o *software* Geneland (GUILLOT et al., 2005) implementado no R versão 4.0.3 (R CORE TEAM, 2021). Nesse caso, utilizamos apenas cada haplótipo encontrado por localidade amostrada e sua coordenada geográfica. A análise foi feita com o número de populações variando de 1 a 10 (K de 1 a 10) com 10 rodadas independentes, sendo o K selecionado aquele que apresentar o maior valor de probabilidade posterior. Nós usamos os modelos *Uncorrelated* e espacial com 1.000.000 iterações para MCMC e 1.000 *thinning*. Por fim, também avaliamos a correlação entre as distâncias genéticas baseadas em K2P (Kimura 2-Parameters) calculadas no MEGA v.7 (KUMAR et al., 2016) e distâncias geográficas pareadas (calculadas com a função “*dist*” do pacote *vegan* v.2.5-6; OKSANEN et al, 2019) por um teste de Mantel (MANTEL, 1967), usando a função de teste de Mantel do pacote *vegan* (OKANSEN et al., 2019), com significância estatística testada por 10.000 permutações aleatórias, no *software* R versão 4.0.3 (R CORE TEAM, 2021).

### 3.3.3 Análise filogenética e demografia histórica

Para identificar agrupamentos entre os haplótipos detectados tanto para as bacias quanto para as microbacias, realizamos análises filogenéticas utilizando o método de inferência bayesiana. A análise foi realizada no BEAST v.2.2.1 (BOUCKAERT et al., 2014), com modelo de substituição nucleotídica baseado no critério de informação Bayesiano (BIC), determinado pelo programa jModelTest v.

2.1.4 (*datasets 1 e 2: HKY+I*) (POSADA, 2008). Foram empregadas como especificações, o relógio molecular *stricto*, modelo de Yule para o *prior* da árvore, três corridas independentes das cadeias de Markov com 10 milhões de gerações com as árvores e parâmetros salvos a cada 10000 gerações. A combinação dos arquivos foi realizada com o software LogCombiner v.1.8 (DRUMMOND et al., 2012). A convergência das cadeias e os valores de ESS (tamanho de amostragem efetivo) para os parâmetros estimados foram checados no Tracer v1.7 (RAMBAUT et al. 2014), considerando valores maiores que 200 para todos os parâmetros. A árvore foi sumarizada com o programa TreeAnnotator v.1.8 (RAMBAUT & DRUMMOND, 2012) e posteriormente visualizada no software FigTree v.1.4. (<http://tree.bio.ed.ac.uk/>).

Buscando compreender a demografia histórica da espécie dentro de cada bacia hidrográfica (Orinoco, Paraguai e Alto Paraná), a fim de detectar possíveis oscilações populacionais históricas que tenham influenciado os atuais padrões de diversidade genética, nós realizamos a análise de *Bayesian Skyline Plot* (BSP; DRUMMOND et al., 2005) no software BEAST v.2.2.1 (BOUCKAERT et al., 2014). Para a reconstrução da demografia histórica foi estimado o modelo mutacional para o conjunto de dados de cada bacia hidrográfica utilizando o BIC (HKY para Alto Paraná e Orinoco; HKY+I para Paraguai). Para a análise foi utilizada a taxa mutacional estimada do D-loop para *H. hydrochaeris* ( $2,575 \times 10^{-7}$  mutações por sítio por geração; RUIZ-GARCIA et al., 2016), relógio molecular *stricto* e para o modelo da árvore *a priori* foi o *Coalescent Bayesian Skyline*. Três cadeias de Markov foram corridas independentemente com 50 milhões de gerações cada e com amostragens a cada 50 mil gerações. Os arquivos “.log” e “.tre” de cada corrida foram combinados, utilizando o software LogCombiner no BEAST v.2.2.1 e 25% das corridas foram descartadas. Tracer v1.5 (RAMBAUT et al., 2014) foi utilizado para a checagem de convergência das cadeias de Markov de acordo com o tamanho de amostragem efetivo (>200). No mesmo software, a dinâmica populacional histórica foi reconstruída utilizando a opção *Bayesian Skyline reconstruction*.

## 4 RESULTADOS

### 4.1 DIVERSIDADE GENÉTICA

Considerando todas as sequências obtidas para as bacias Orinoco, Paraguai e Alto Paraná (*dataset 1*), encontramos 31 haplótipos, representados por 34 sítios polimórficos, dos quais 32 eram parcimoniosamente informativos. No geral, observamos alta diversidade haplotípica e alta diversidade nucleotídica, exceto para a bacia do Orinoco, onde comparando os valores entre as bacias notamos menor diversidade haplotípica e nucleotídica na bacia do Rio Orinoco em relação às demais (Tabela 3). Na comparação entre microbacias (*dataset 2*), encontramos 16 haplótipos e o mesmo padrão de alta diversidade haplotípica e alta diversidade nucleotídica, tanto para o total das sequências, quanto para cada microbacia (Tabela 3). Nota-se, ainda, um baixo número de sítios parcimoniosamente informativos para as microbacias do Paraguai.

Tabela 3 - Índices de diversidade genética de *Hydrochoerus hydrochaeris* para o marcador mitocondrial D-loop entre diferentes bacias hidrográficas da América do Sul (*dataset 1*) e entre microbacias hidrográficas das bacias do Paraguai e do Alto Paraná em território brasileiro (*dataset 2*).

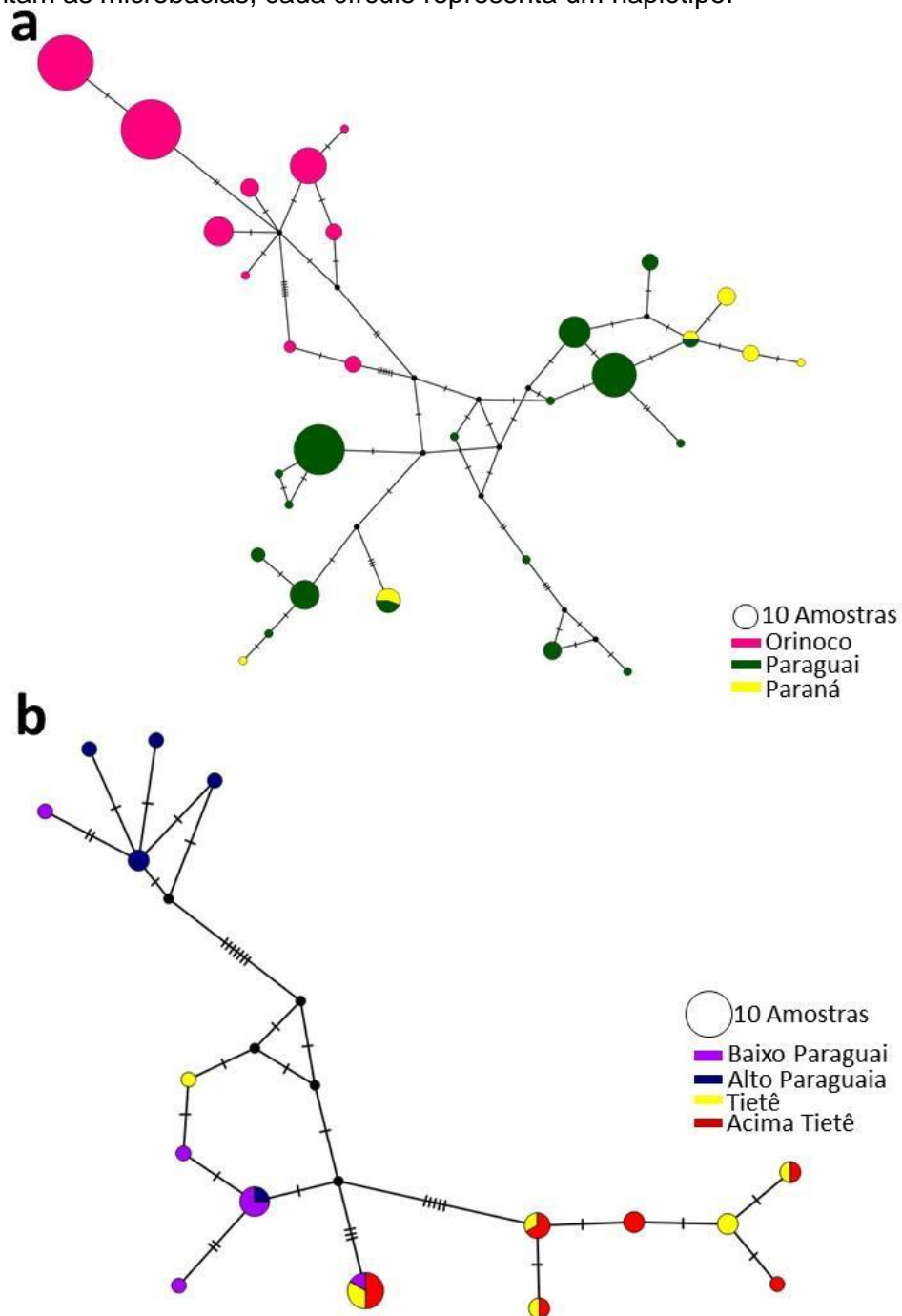
Agrupamentos	N	Número de haplótipos (h)	Diversidade haplotípica (Hd)	Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ )	Número de Sítios polimórficos (S)	Sítios parcimoniosamente informativos
Entre Bacias (386 pb)						
Bacia Alto Paraná	18	6	0,824	0,015	15	12
Bacia Paraguai	123	17	0,815	0,011	22	19
Bacia Orinoco	152	10	0,751	0,006	17	15
Total	293	31	0,9	0,015	34	32
Entre microbacias (486 pb)						
Bacia do Alto Paraná	18	8	0,889	0,013	17	14
Microbacia Tietê	8	6	0,929	0,015	17	12
Acima do Tietê	10	6	0,889	0,013	15	13
Bacia do Paraguai	13	9	0,910	0,015	18	13
Pantanal Norte	6	5	0,933	0,010	14	0
Pantanal Sul	7	5	0,857	0,012	20	1
Total	31	16	0,938	0,01677	25	22

## 4.2 DISTRIBUIÇÃO DOS HAPLÓTIPOS E ESTRUTURAÇÃO

Quando analisamos a rede de haplótipos para a comparação entre bacias (*dataset 1*), observamos os haplótipos pertencentes a bacia do Orinoco separada das demais localidades, enquanto as bacias do Alto Paraná e Paraguai compartilham haplótipos (Fig. 2a). A rede haplotípica que representa a comparação entre microbacias (*dataset 2*) evidencia haplótipos exclusivos nas bacias do Alto Paraná e do Paraguai e haplótipos compartilhados entre as bacias representados no centro da rede, porém destacamos que não há uma separação nítida entre as microbacias (Fig. 2b). A diferenciação entre as bacias foi corroborada pela análise de  $F_{ST}$  que foi significativa para todos os pares de combinações (Tabela 4). Enquanto para microbacias, a análise de  $F_{ST}$  não apontou diferenciação entre os grupos analisados (Tabela 5). Esse resultado é reforçado pela AMOVA, que mostrou maior porcentagem de variação entre as bacias hidrográficas do que entre microbacias, ainda que a variação dentro de bacias e microbacias se mantenha maior (Tabela 6).



Figura 2 - Rede de haplótipos para sequências de *Hydrochoerus hydrochaeris* nas bacias do Orinoco, Paraguai e Alto Paraná (a) e para as microbacias brasileiras nas Bacias do Paraguai e Alto Paraná (b). Os traços representam a quantidade de passos mutacionais, as cores representam as microbacias, cada círculo representa um haplótipo.



Fonte: elaborada pelo autor

Tabela 4 -  $F_{st}$  par-a-par entre os agrupamentos de *Hydrochoerus hydrochaeris* entre as bacias hidrográficas da América do Sul. \*Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

	Orinoco	Alto Paraná	Paraguai
Orinoco	0		
Alto Paraná	0,221*	0	
Paraguai	0,218*	0,172*	0

Tabela 5 -  $F_{st}$  par-a-par entre os agrupamentos de *Hydrochoerus hydrochaeris* entre as microbacias hidrográficas das bacias do Paraguai e do Alto Paraná em território brasileiro. \*Valores significativos ( $p < 0,05$ ).

	Acima do Tietê	Tietê	Pantanal Norte	Alto Paraguai
Acima do Tietê	0			
Tietê	0,045	0		
Pantanal Norte	0,060	0	0	
Pantanal Sul	0,058	0	0	0

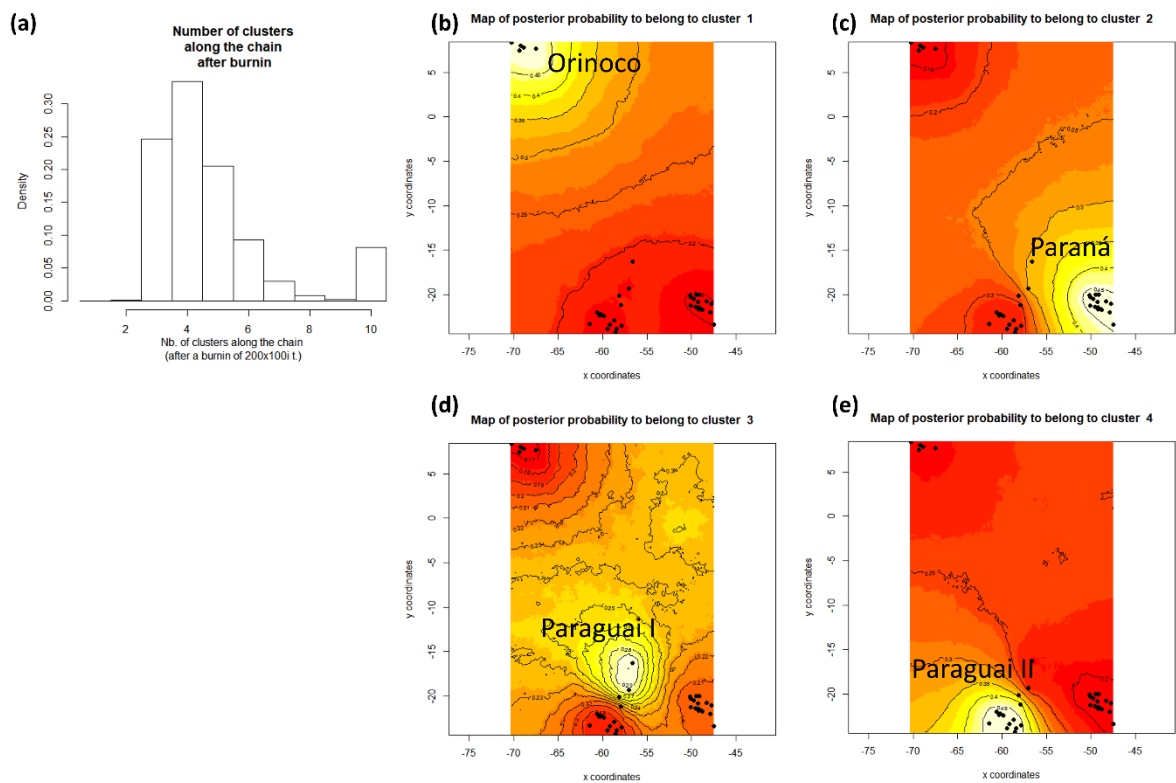
Tabela 6 - Análise de Variância Molecular (AMOVA) dos agrupamentos de *Hydrochoerus hydrochaeris* entre as bacias hidrográficas da América do Sul e entre microbacias hidrográficas das bacias do Paraguai e do Alto Paraná em território brasileiro.

Fonte da variação	Porcentagem da variação (g.l.)
<i>Dataset 1</i>	
Entre bacias	21,33 (2)
Dentro de bacias	78,67 (290)
<i>Dataset 2</i>	
Entre microbacias	3,17 (3)
Dentro de microbacias	96,83 (27)

Ao avaliar essa estruturação de forma espacializada, os resultados do Geneland indicam a existência de quatro grupos para o *dataset 1*, mostrando uma separação entre as bacias do Orinoco, Alto Paraná e dois grupos dentro da bacia do Paraguai (indicados na figura como Paraguai I, que inclui as amostras do Pantanal Norte e Pantanal Sul, e Paraguai II) (Fig. 3). Para as amostras somente do Brasil (*dataset 2*), os resultados do Geneland indicam a formação de três grupos genéticos, representados pelas amostras da Bacia do Alto Paraná, Pantanal Norte e Pantanal Sul (Fig. 4). Na avaliação da correlação entre a distância genética e a distância geográfica, observamos uma correlação positiva ( $r = 0$ ,

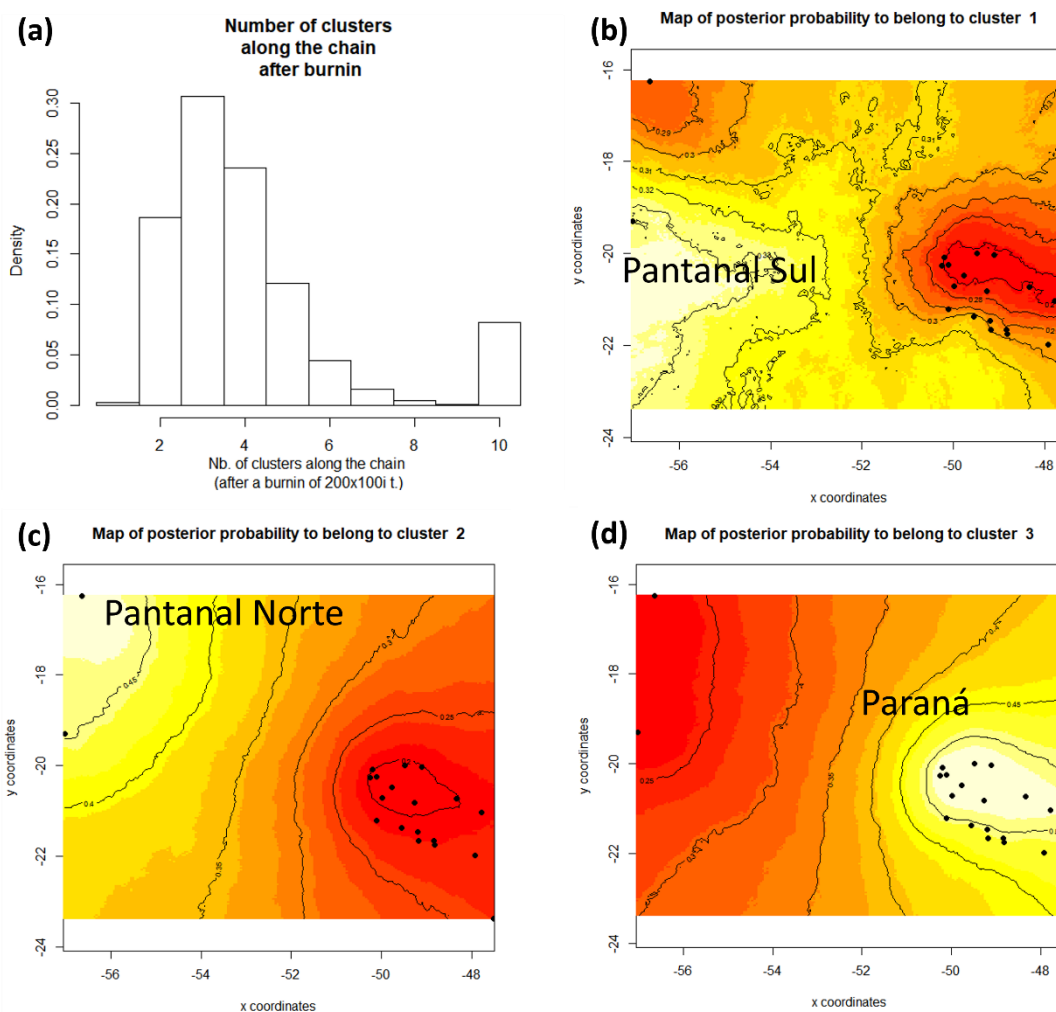
consideramos os haplótipos nas bacias hidrográficas da América do Sul (*dataset 1*), porém ausência de correlação ( $r= 0,047$ ,  $p=0,191$ ) quando analisamos apenas as amostras das bacias hidrográficas brasileiras (*dataset 2*).

Figura 3 - Grupos genéticos identificados na análise de estruturação espacial conduzida no Geneland para *Hydrochoerus hydrochaeris* para as bacias da América do Sul. Em (a), número de clusters estimados, sendo  $K=4$  com maior densidade ao longo das MCMC. Os mapas de calor (b), (c), (d) e (e) representam a probabilidade posterior das amostras pertencerem aos clusters 1 (Orinoco), 2 (Alto Paraná), 3 (Paraguai I) e 4 (Paraguai II), respectivamente. Os pontos pretos representam as amostras, as linhas de contorno representam a mudança espacial na probabilidade de atribuição e as cores mais claras representam maior probabilidade de as amostras pertencerem ao cluster.



Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 4 - Grupos genéticos identificados na análise de estruturação espacial conduzida no Geneland para *Hydrochoerus hydrochaeris* para as bacias do Brasil. Em (a), número de clusters estimados, sendo  $K=3$  com maior densidade ao longo das MCMC. Os mapas de calor (b), (c) e (d) representam a probabilidade posterior das amostras pertencerem aos clusters 1 (Pantanal Sul), 2 (Pantanal Norte) e 3 (Alto Paraná), respectivamente. Os pontos pretos representam as amostras, as linhas de contorno representam mudança espacial na probabilidade de atribuição e as cores mais claras representam maior probabilidade de as amostras pertencerem ao cluster.



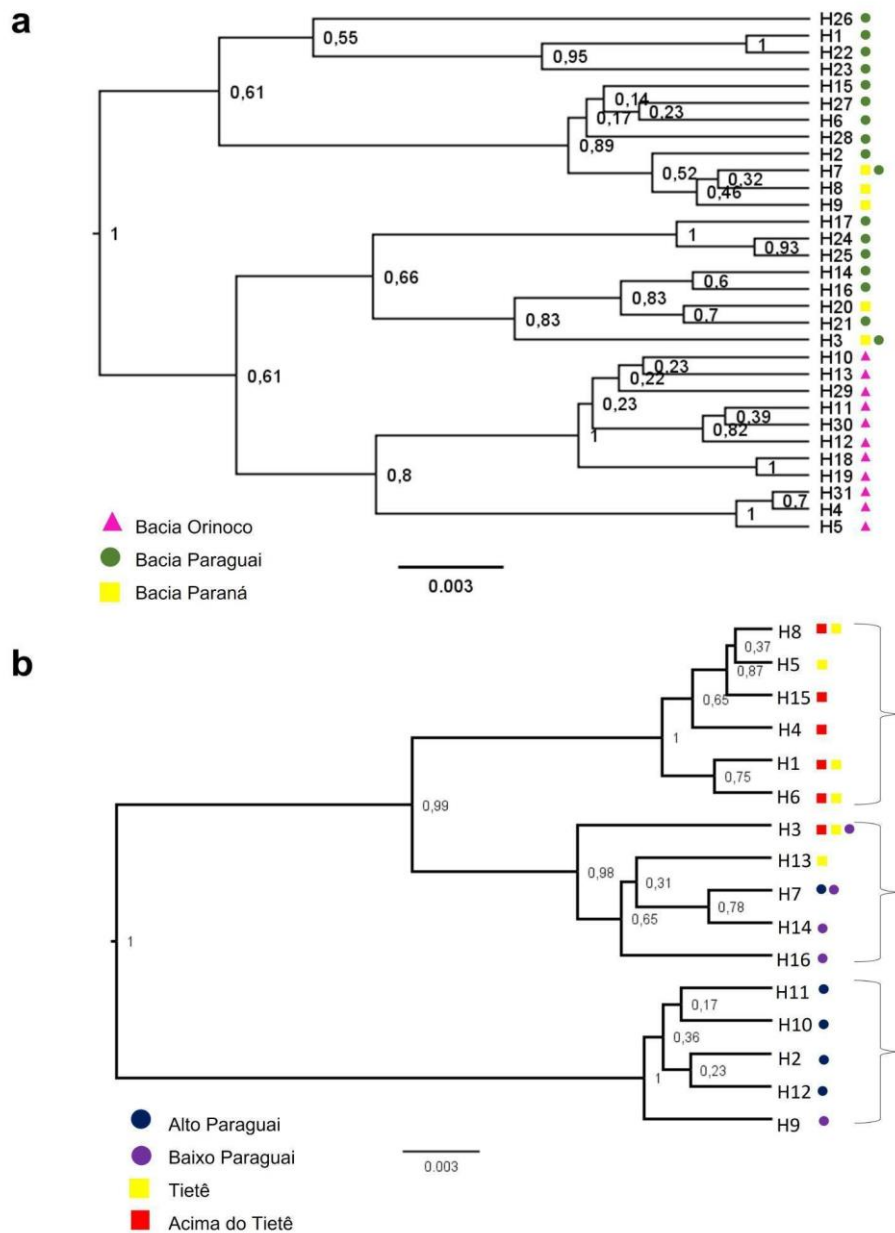
Fonte: elaborada pelo autor.

### 4.3 ANÁLISE FILOGENÉTICA E DEMOGRAFIA HISTÓRICA

Na análise filogenética conseguimos visualizar a separação entre os haplótipos pertencentes apenas à bacia do Orinoco e os demais haplótipos (Fig. 5a), porém os valores de probabilidade posterior não corroboram a formação de nenhum clado. Quando observamos os resultados para as comparações entre microbacias das amostras brasileiras, três clados são evidenciados (Fig. 5b). Um dos haplogrupos

englobam apenas haplótipos presentes na bacia do Alto Paraná, outro apenas na bacia do Paraguai, e o terceiro apresenta haplótipos compartilhados entre os quatro grupos analisados. Não há distinção entre as microbacias por esses haplogrupos (Fig. 5b).

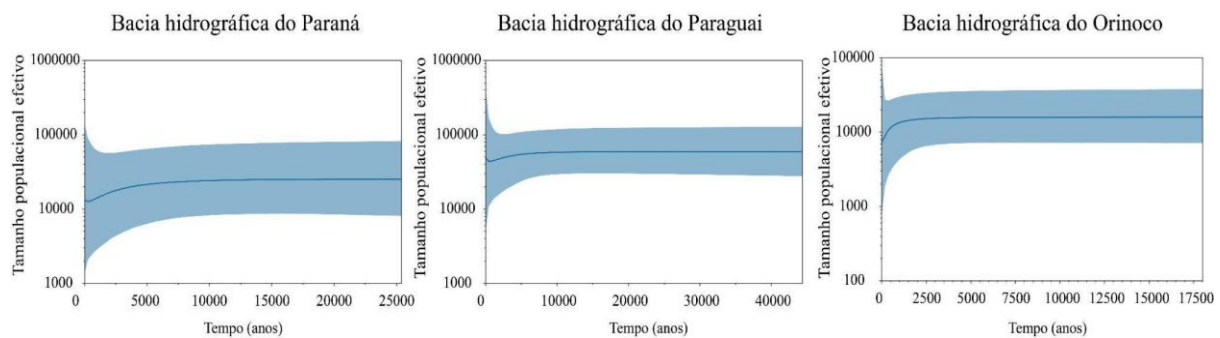
Figura 5 - Árvore filogenética construída a partir da inferência Bayesiana com probabilidades posteriores para comparações de populações de *Hydrochoerus hydrochaeris* entre as bacias hidrográficas da América do Sul (a) e entre microbacias hidrográficas das bacias do Paraguai e do Alto Paraná em território brasileiro, onde as chaves representam os grupos formados com suporte maiores que 0,9 (b).



Fonte: elaborada pelo autor.

Ao avaliar a história demográfica das populações nas diferentes bacias hidrográficas, a qual foi utilizado apenas o *dataset 1*, nós observamos um padrão de estabilidade ao longo do tempo até aproximadamente 1000 anos, quando ambas as populações experimentam um declínio populacional (Fig. 6). Para a população do Orinoco esse declínio é mais acentuado corroborando a diversidade genética menor desse grupo em relação às demais bacias hidrográficas. Para as populações das bacias do Alto Paraná e do Paraguai, após esse leve declínio observamos uma tendência a um aumento populacional.

Figura 6 - Reconstrução da dinâmica populacional histórica (*Bayesian skyline plot*) de *H. hydrochaeris* nas três bacias hidrográficas analisadas baseada no marcador mitocondrial D-Loop. O eixo Y representa o tamanho populacional efetivo, enquanto o eixo X representa o tempo em anos.



Fonte: elaborada pelo autor.

## 5 DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou pela primeira vez os padrões genéticos de populações brasileiras de *H. hydrochaeris* utilizando o marcador mitocondrial D-loop. Nossos resultados corroboraram, em ampla escala, a estruturação populacional entre as populações de bacias hidrográficas distintas. Por outro lado, dentro das bacias hidrográficas, não houve diferenciação significativa entre as populações, uma vez que os rios não representam uma barreira ao fluxo gênico, mas sim corredores de dispersão para a espécie. A diversidade genética também foi avaliada e considerada alta em ampla e fina escala. O padrão de estrutura e diversidade genética provavelmente são resultado da história evolutiva distinta das bacias hidrográficas e recentes oscilações demográficas sofridas pelas populações, respectivamente.

As populações de *H. hydrochaeris* apresentaram, de maneira geral, altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, o que pode ser reflexo de seu grande tamanho populacional, especialmente na parte mais ao sul de sua distribuição (FERRAZ et al., 2007), capacidade de dispersão possivelmente não restrita às conexões fluviais (BYRNE et al., 2015), e tolerância à mudanças na paisagem (CAMPOS-KRAUER & WISELY, 2011), características que minimizam os efeitos da deriva genética como uma força evolutiva que diminui a diversidade genética intraespecífica (ALLENDORF & LUIKART, 2007). Porém, somente as populações da bacia do Orinoco não apresentaram esse padrão. Além disso, se mostraram mais distantes geneticamente das bacias do Alto Paraná e Paraguai. A distribuição dos haplótipos evidencia essa distância entre as populações da bacia do Orinoco, que apresenta haplótipos exclusivos, enquanto Paraguai e Alto Paraná compartilham haplótipos (Fig. 2a). Dada a distância geográfica (isolamento por distância) e a história evolutiva das bacias, seria esperada essa estruturação entre as bacias do Orinoco e as demais. Nossa hipótese de estruturação entre as três bacias avaliadas foi corroborada pelos testes de  $F_{ST}$  e AMOVA (Tabelas 4 e 6), que evidenciaram essas diferenças entre esses grandes agrupamentos. Essa evidência foi reforçada pela análise de estruturação que considera a localização dos haplótipos na distribuição dessa diversidade. Esse padrão de estruturação em uma macroescala já foi observado por outros autores (BYRNE et al., 2021; RUIZ-GARCÍA et al., 2016) e representa um importante resultado, pois revela que cada bacia hidrográfica possui

um *pool* gênico único, o que na biologia da conservação é considerado uma unidade evolutiva significativa.

Além de conseguir identificar os grupos das bacias hidrográficas, a análise de estruturação encontrou uma subdivisão entre os haplótipos do Paraguai, separando as sequências do Pantanal brasileiro (tanto dos subgrupos Pantanal Norte e Pantanal Sul) e as do Chaco mais ao Norte (Paraguai I) das demais sequências do Chaco (Paraguai II). Essa subdivisão pode sugerir um menor fluxo gênico entre as populações das microbacias do Alto Paraguai e Baixo Paraguai, ainda que essa divisão não seja tão forte, dado o baixo valor de atribuição dos indivíduos nesses subgrupos (Fig. 3a). Embora os resultados não suportem de forma significativa essa estruturação do Paraguai, Campus-Krauer e Wisely (2011) observaram a presença dessa estrutura em fina escala, denominando-os de “filogrupos”, cuja origem provavelmente tenha se dado a partir do isolamento desses grupos em refúgios decorrentes das oscilações climáticas no final do Pleistoceno.

A estruturação entre as microbacias não foi corroborada quando analisamos as populações brasileiras (Tabelas 5 e 6). Ainda que a análise de estruturação com componente espacial tenha separado as amostras da bacia do Paraguai no território brasileiro em dois subgrupos (Pantanal Norte e Pantanal Sul), novamente o valor de atribuição dos indivíduos nesses grupos é baixo. As análises também indicaram compartilhamento de haplótipos entre os agrupamentos geográficos analisados e baixa diferenciação entre as microbacias. Esse resultado pode ser explicado pela capacidade de dispersão da espécie e seu comportamento generalista que a permite ocupar diferentes habitats semi-aquáticos (CAMPOS-KRAUER & WISELY, 2011), além da conexão fluvial dentro das bacias. Portanto, a estruturação entre bacias, mas não entre as microbacias de cada bacia é explicada pelo Modelo de Hierarquia Fluvial (The Stream Hierarchy Model) proposto por Meffe e Vrijenhoek (1988), que prevê maior fluxo de indivíduos dentro do que entre bacias hidrográficas.

Nas análises filogenéticas, ainda que notemos a separação dos haplótipos da bacia do Orinoco em relação às demais, as baixas probabilidades posteriores dos nós não suportam a divisão das três bacias. Um ponto que vale ser destacado é que o compartilhamento de haplótipos observado na rede haplotípica entre as bacias do Paraguai e Alto Paraná também ocorre na árvore filogenética (Fig. 5a). Esse padrão sugere a presença de polimorfismos ancestrais compartilhados entre essas bacias



hidrográficas. Além disso, há evidências de um intenso fluxo fluvial entre essas bacias que permitem a conectividade e assim, o fluxo gênico das capivaras (BYRNE et al., 2019). Nota-se, também, que quando avaliamos os clados das populações brasileiras, na finalidade de observar a estruturação entre microbacias, não encontramos divisão entre microbacias, mas notamos novamente a divisão entre Alto Paraná e Paraguai com dois clados bem suportados e um clado intermediário com haplótipos compartilhados entre as bacias (Fig. 5b), sugerindo a existência de um polimorfismo ancestral.

A análise de demografia histórica, considerando as três bacias estudadas, revelou que as populações de *H. hydrochaeris* apresentaram um padrão de estabilidade no tamanho populacional, seguido por um declínio populacional suave próximo ao presente (< 2500 anos atrás). Adicionalmente, as bacias do Paraguai e Alto Paraná apresentaram um indício de uma recuperação populacional após esse declínio, indicando expansão populacional relativamente recente. Enquanto na bacia do Orinoco, as populações apresentaram apenas um sinal de declínio. A redução populacional sofrida pelas populações das três bacias hidrográficas parece decorrer de eventos climáticos cíclicos durante o Holoceno. Utilizando análises de pólen e sedimentos, Stevaux (2000) estimou um episódio de clima seco entre 3500-1500 antes do presente provavelmente ocorrendo na bacia do Alto Paraná, e na porção central do Brasil e Nordeste da Argentina. Em episódios assim espera-se uma redução da descarga fluvial e conseqüente redução do habitat adequado para a espécie seguido de redução populacional. Observando os efeitos globais das mudanças climáticas na América do Sul, Coltrinari (1993) inclusive reconhece um generalizado evento seco na porção norte do continente decorrente da concentração de fogo induzido pelo homem e na recessão de umidade na floresta Amazônica, o que ajudaria a construir a narrativa da redução populacional no Orinoco, embora a estimativa do tempo seja maior que a observada na análise de BSP (5000-4000 antes do presente).

O padrão de diversidade genética observado corrobora a histórica demográfica observada nas populações de cada bacia hidrográfica. De acordo com Grant e Bowen (1998), populações com altos valores de diversidade haplotípica e nucleotídica, como é o caso das populações do Paraguai e Alto Paraná, indicam uma grande população estável que apresenta longa história evolutiva ou também pode ser atribuída a

ocorrência de um contato secundário entre linhagens diferenciadas por alopatria. Esse última parece explicar inclusive a detecção do leve aumento populacional efetivo para as bacias do Alto Paraná e Paraguai. Campus-Krauer e Wisely (2011) também evidenciaram o contato secundário, provavelmente fruto dos períodos de umidade que permite o reestabelecimento das conexões fluviais.

Além dos eventos históricos que modelaram o padrão genético das populações, também acreditamos que eventos mais atuais influenciaram as populações. A expansão populacional nas regiões da bacia do Paraguai e Alto Paraná também podem estar relacionadas à mudança da paisagem, que tem criado novas áreas adequadas para sua sobrevivência, com a conversão de florestas secas para áreas agrícolas irrigadas, com presença de lagos e represas criados para manter essas plantações (CAMPOS-KRAUER & WISELY, 2011). No Brasil, *H. hydrochaeris* é considerada muitas vezes como tendo um crescimento populacional sem controle, causando danos agrícolas (FERRAZ et al., 2003). Esse cenário é diferente ao encontrado nas populações amostradas na bacia do Orinoco, que consistem em populações ativamente manejadas em que a caça para consumo é permitida, e que certo isolamento já foi detectado (BORGES-LANDÁEZ et al., 2012). Vale ressaltar que essa diminuição nas populações da bacia do Orinoco também explica a menor diversidade genética que encontramos, o que sugere que possivelmente essas populações realmente estejam com fluxo gênico limitado em comparação com as demais bacias hidrográficas e que tenham sofrido perda de diversidade genética devido a um *bottleneck*.

## 6 CONCLUSÕES

Em síntese, as populações de *H. hydrochaeris* encontram-se estruturadas entre bacias, mas ainda mantêm polimorfismos ancestrais e possivelmente um fluxo de indivíduos entre as bacias do Paraguai e Alto Paraná. Enquanto a diversidade genética, tanto haplotípica quanto nucleotídica, das bacias do Paraguai e Alto Paraná são elevadas e as populações apresentam um crescimento demográfico relativamente recente, as populações da bacia do Orinoco apresentam baixas diversidades e um declínio populacional. Porém, esses dados podem ser resultado de uma amostragem enviesada para populações manejadas e caçadas, com possível isolamento entre elas (BORGES-LANDÁEZ et al., 2012). As diferenças podem ser

relacionadas à diferentes histórias evolutivas de cada bacia hidrográfica, e também à presença de barreiras que podem estar mantendo populações isoladas na bacia do Orinoco (BORGES-LANDÁEZ et al., 2012). Dentro de cada bacia, o fluxo gênico mantém as populações não estruturadas, devido a conexões fluviais que permitem o fluxo gênico nas bacias do Paraguai e Alto Paraná.

## 7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

1. O compartilhamento de haplótipos observado entre as bacias do Paraguai e Alto Paraná e a alta diferenciação significativa entre elas evidenciam um contato secundário pós-isolamento populacional ou a existência de polimorfismo ancestral. Outros marcadores mais sensíveis podem ser empregados para que seja feita a datação desse evento e testar a hipótese se as oscilações climáticas do Pleistoceno/Holoceno foram o evento promotor do contato entre essas populações.
2. Embora corroborem a hipótese de ausência de estrutura dentro das bacias hidrográficas (entre microbacias), sugerimos um aumento na área de amostragem para testar a possibilidade de haver isolamento por distância dentro das bacias.
3. Mesmo a espécie sendo catalogada pela IUCN como “Pouco preocupante” e os dados de diversidade genética obtidos aqui sugerirem que as populações apresentem uma boa saúde genética, os diferentes *pools* gênicos aqui observados e que estão associadas as bacias hidrográficas revelam o potencial de cada população em contribuir com a diversidade genética da espécie como todo. Sabendo que cada uma dessas bacias passa por pressões antrópicas distintas, é interessante continuar a monitorar os padrões genéticos e assim manter o potencial evolutivo dessas populações com características genéticas únicas.

## 8 REFERÊNCIAS

ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. 1997. **Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques.** *Nucleic Acids Research*, 25(22): 4692–4693.

ALDANA-DOMÍNGUEZ, J.; FORERO-M, J.; BETANCUR, J.; CAVELIER, J. 2002. **Dinámica y estructura de la población de chigüiros (*Hydrochoerus hydrochaeris*: Rodentia, Hydrochaerinae) de Caño Limón, Arauca, Colombia.** *Caldasia*, 24(2): 445-458.

ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. H. 2007. Population subdivision. In: **Conservation and the Genetics of Populations.** John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, p. 197–232

ANTOINE, P. O.; MARIVAUX, L.; CROFT, D. A.; BILLET, G.; GANEROD, M.; JARAMILLO, C.; MARTIN, T.; ORLIAC, M. J.; TEJEDA, J.; ALTAMIRANO, A. J.; DURANTHON, F.; FANJAT, G.; ROUSSE, S.; GISMONDI, R. S. 2012. **Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern and timing of caviomorph origin and biogeography.** *Proceedings of the Royal Society*, 279(1732): 1319–1326.

BARRETO, G.; QUINTANA, R. D. 2012. Feeding habits of capybaras. In: Moreira, J. R.; Ferraz, K. M. P.; Herrera, E. A.; Macdonald, D. W. (Eds.). **Capybara: Biology, Use and Conservation of an Exceptional Neotropical Species.** Springer Science & Business Media. 416p.

BORGES-LANDÁEZ, P. A.; DOMINGUEZ-BELLO, M. G.; HERRERA, E. A. 1996. **Digestive physiology of wild capybara.** *Journal of Comparative Physiology B*, 166(1): 55-60.

BORGES-LANDÁEZ, P. A.; PERDOMO, G.; HERRERA, E. A. 2012. **Estructura y diversidad genética en poblaciones manejadas de chigüire en los llanos venezolanos.** *Interciencia*, 37(3): 227-233.

BOUCKAERT, R.; HELED, J.; KÜHNERT, D.; VAUGHAN, T.; WU, C. H.; XIE, D.; ... DRUMMOND, A. J. 2014. **BEAST 2: a software platform for Bayesian evolutionary analysis.** *PLoS Computational Biology*, 10(4): e1003537.

BYRNE, M. S.; QUINTANA, R. D.; BOLKOVIC, M. L.; CASSINI, M. H.; TÚNEZ, J. I. 2015. **The role of river drainages in shaping the genetic structure of capybara populations.** *Genetica*, 143(6): 645–656.

BYRNE, S.; QUINTANA, R. D.; BOLKOVIC, M. L.; TÚNEZ, J. I. 2019. **Population genetics of the capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, in the Chaco-pampean region.** *Mammalian Biology*, 96: 14–22.

BYRNE, M. S.; RUIZ-GARCÍA, M.; TÚNEZ, J. I. 2021. **Phylogeography of the capybara, *Hydrochoerus hydrochaeris*, in a large portion of its distribution area in South America.** *Journal of Mammalian Evolution*, 29(1): 191-206

CAMPOS-KRAUER, J. M.; WISELY, S. M. 2011. **Deforestation and cattle ranching drive rapid range expansion of capybara in the Gran Chaco ecosystem.** *Global Change Biology*. 17(1): 206–218.

CARO, C.; LÓPEZ, H. F.; SÁNCHEZ, P.; MESA, E.; ATUESTA, N.; LENIS, A. R.; ... HERNÁNDEZ, Y. 2005. **Fortalecimiento al control y seguimiento a las poblaciones naturales de chigüiro para la implementación de proyectos de uso sostenible en Casanare-Municipios de Paz de Ariporo y Hato Corozal.** Fase III. Informe final. UNILLANOS-Ministerio de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial, Villavicencio.

CLARK, J. D.; OLFERT, E. D. 1986. Rodents. In: Fowler, M.E. (2 ed). **Zoo and Wild Animal Medicine**, p.727-747.

COLTRINARI, L. 1993. **Global Quaternary changes in South America**. *Global and Planetary Change*, 7: 11-23.

CONGDON, E. R. 2007. **Natal dispersal and new group formation in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in a seasonally flooded savanna of Venezuela**. (Ph.D. dissertation) - University of Missouri at Saint Louis, Saint Louis, Missouri.

CORRIALE, M. J.; HERRERA, E. A. 2014. **Patterns of habitat use and selection by the capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*): A landscape-scale analysis**. *Ecological Research*. 29(2): 191–201.

DRUMMOND, A. J.; RAMBAUT, A.; SHAPIRO, B. E. T. H.; PYBUS, O. G. 2005. **Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences**. *Molecular Biology and Evolution*, 22(5): 1185-1192.

DRUMMOND, A. J.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; RAMBAUT, A. 2012. **Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7**. *Molecular Biology and Evolution*, 29(8): 1969–1973.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. 2010. **Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows**. *Molecular Ecology Resources*. 10(3): 564–567.

FRANKHAM, R.; BALLOU, S. E. J. D.; BRISCOE, D. A.; BALLOU, J. D. 2002. **Introduction to conservation genetics**. Cambridge university press.

FERRAZ, K. M. P. B.; LECHEVALIER, M.A.; COUTO, H.T.Z.D.; VERDADE, L. M. 2003. **Damage caused by capybaras in a corn field**. *Scientia Agricola*, 60(1): 191-194.

FERRAZ, K. M. P. B.; FERRAZ, S. F. B.; MOREIRA, J. R.; COUTO, H. T. Z.; VERDADE, L. M. 2007. **Capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) distribution in agroecosystems: a cross-scale habitat analysis**. *Journal of Biogeography*, 34(2): 223-230.

FESTA-BIANCHET, M. 2003. Exploitative wildlife management as a selective pressure for the life history evolution of large mammals. pp. 191–208. In: Festa-Bianchet, M.; Apollonio, M. (eds.) **Animal behavior and wildlife conservation**. Island Press, Washington, D.C.

FITZGIBBON, C. 1998. The management of subsistence harvesting; behavioral ecology of hunters and their mammalian prey. pp. 449– 473. In: Caro, T. (ed.). **Behavioral ecology and conservation biology**. Oxford University Press, New York.

FONSECA, G. A. B.; HERMAN, G.; LEITE, Y. L. R.; MITTEMEIER, R. A.; RYLANDS, A. B.; PATTON, J. L. 1996. Lista anotada dos mamíferos do Brasil, vol 4. In: **Occasional papers in conservation biology**, pp 1-38

FOSTER, V. C.; SARMENTO, P.; SOLLMANN, R.; TÔRRES, N.; JÁCOMO, A. T.; NEGRÕES, N.; ... SILVEIRA, L. 2013. **Jaguar and puma activity patterns and predator-prey interactions in four Brazilian biomes**. *Biotropica*, 45(3): 373-379.

GRANT, W.S.; BOWEN, B.W.; HERED, J. 1998. **Shallow population histories in deep evolutionary lineages of marine fishes: insights from the sardines and anchovies and lessons for conservation**. *Journal of Heredity*, 89(5): 415-426.

GREEN, M. R.; SAMBROOK, J. 2012. **A laboratory manual**. John Inglis.

GOMES, A. C.; LESSA, G.; CARTELLE, C.; KERBER, L. 2019. **New fossil remains of Quaternary capybaras (Rodentia: Caviomorpha: Caviidae) from the intertropical region of Brazil: morphology and taxonomy**. *Journal of South American Earth Sciences*. 91: 36–46.

GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. 2005. **GENELAND: a computer package for landscape genetics**. *Molecular Ecology Notes*, 5(3): 712–715.

HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. 1987. **Group stability and the structure of a capybara population**. *Symposia of the Zoological Society of London*, 5: 115–130.

HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. 1989. **Resource utilization and territoriality in group-living capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. *The Journal of Animal Ecology*. 667-679.

HERRERA, E. A. 2012. **Capybara social behavior and use of space: patterns and processes**. *Capybara* p.195-207. Springer, New York.

KEARSE, M.; MOIR, R.; WILSON, A.; STONES-HAVAS, S.; CHEUNG, M.; STURROCK, S.; BUXTON, S.; COOPER, A.; MARKOWITZ, S.; DURAN, C. 2012. **Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data**. *Bioinformatics*, 28(12): 1647–1649.

KERBER, L. 2017. **Imigrantes em um continente perdido :O registro fóssilífero de roedores Caviomorpha (Mammalia: Rodentia: Ctenohystrica) do Cenozoico do Brasil**. *Terrae Didactica*, 185-211.

KNOWLES, L. L.; KUBATKO, L. S. 2010. Estimating species trees: an introduction to concepts and models. **Estimating species trees: practical and theoretical aspects**, 1: 14.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. 2016. **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets**. *Molecular Biology and Evolution*, 33(7), 1870-1874.

LARKIN, M. A.; BLACKSHIELDS, G.; BROWN, N. P.; CHENNA, R.; MCGETTIGAN, P. A.; MCWILLIAM, H.; VALENTIN, F.; WALLACE, I. M.; WILM, A.; LOPEZ, R. 2007. **Clustal W and Clustal X version 2.0**. *Bioinformatics*, 23(21): 2947–2948.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. 2015. **Popart: full-feature software for haplotype network construction**. *Methods in Ecology and Evolution*, 6(9): 1110–1116.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. 2009. **DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. *Bioinformatics*, 25(11): 1451–1452.

LIS, J. T.; SCHLEIF, R. 1975. **Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol**. *Nucleic Acids Research*, 2(3): 383–390.

MACDONALD, D. W. 1981. **Dwindling resources and the social behavior of capybaras, (*Hydrochoerus hydrochaeris*)**. *Journal of Zoology*, 194(3), 371-391.

MANTEL, N. 1967. **The detection of disease clustering and a generalized regression approach**. *Cancer Research*, 27: 209-220.

MALDONADO-CHAPARRO, A.; BLUMSTEIN, D. T. 2008. **Management implications of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) social behavior**. *Biological Conservation*, 141(8): 1945-1952.

MALDONADO-CHAPARRO, A.; BERNAL-PARRA, L. M.; FORERO-ACOSTA, G.; RUIZ-GARCIA, M. 2011. **Estructura genética de un grupo de capibaras, *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia: Hydrocheridae) en los Llanos orientales colombianos**. *Revista de Biología Tropical*, 59(4): 1777-1793.

MEFFE, G. K.; VRIJENHOEK, R. C. 1988. **Conservation genetics in the management of desert fishes**. *Conservation Biology*, 2(2): 157-169.

MONES, A. 1984. **Estudios sobre la familia Hydrochoeridae. XIV. Revisión sistemática**. *Senckenbergiana Biológica*, 65:1–17.

MONES, A.; OJASTI, J. 1986. ***Hydrochoerus hydrochaeris***. *Mammalian Species*, 264:

1–7.

MOREIRA, J.R. 2004. Avaliação do atual estado de uso e da conservação da capivara no Brasil. In: **XLI Reunião Anual da sociedade Brasileira de Zootecnia**. Embrapa Gado de corte, Campo Grande, pp. 517-527

MOREIRA, J. R.; FERRAZ, K. M. P. M. B.; HERRERA, E. A.; MACDONALD, D. W. 2012. **Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**. Springer Science & Business Media.

NOGUEIRA-FILHO, S. L. G.; NOGUEIRA, S. S. C. 2004. Captive breeding program as an alternative for wild-life conservation in Brazil. In: KIRSTEN, S.; FRAGOSO, J. M. V., BODMER, R. (eds) **People in nature: wildlife management and conservation in Latin America**. Columbia University Press, New York, pp. 171-190.

OJAST, J. 1973. **Estudio biológico del chigüire o capibara**. FONAIAP, Caracas.

OJASTI, J. 1983. Ungulates and large rodents of South America. In: BOURLIÈRE, F. (ed.) **Tropical savannas**. Elsevier Scientific, Amsterdam, pp. 427–439.

OLIVEIRA, J. A., BOVINCIO, C. R. 2006. Ordem Rodentia. In: Reis N. R.; PERACCHI, A. L.; PEDRO, W. A.; DE LIMA, I. P. (eds.). **Mamíferos do Brasil**. Londrina, pp. 347-406.

OKSANEN, J.; KINDT, R.; LEGEMBRE, P.; O'HARA, B.; SIMPSON, G. L.; SOLYMOS, P.; STEVENS, M. H. H.; WAGNER, H. 2019. Vegan: Community Ecology Package R package version 2.5-6.

PÉREZ, M. E.; POL, D. 2012. **Major radiations in the evolution of caviid rodents: reconciling fossils, ghost lineages, and relaxed molecular clocks**. PLOS One 7(10), 1-21.

PAULA, T. A. R.; WALKER, N. J. 2012. Reproductive morphology and physiology of the male capybara. In: MOREIRA, J. R., FERRAZ, K. M. P. M. B., HERRERA, E. A., MACDONALD, D. W. (eds.) **Capybara: biology, use and conservation of an exceptional neotropical species**. Springer, New York, pp 107–129.

POSADA, D. 2008. **jModelTest: Phylogenetic model averaging**. Molecular Biology and Evolution, 25(7): 1253–1256.

QUINTANA, R. D. 1999. **Relationship between a wetland landscape structure and wildlife: the capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*) as a study case**. Tópicos sobre humedales subtropicales y templados de Sudamérica. ORCyT–MAB/UNESCO, Montevideo, p. 185-204.

R CORE TEAM. 2021. R: A language and environment for statistical computing (R Version 4.0.3, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2020).

RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. J. 2012. **FigTree version 1.4.0**.

RAMBAUT, A.; SUCHARD, M. A.; XIE, D.; DRUMMOND, A. J. 2014. **Tracer v1.6**. Disponível em: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>

RAMOS, Y. G. C.; AXIMOFF, I. A.; ROSA, C. A. 2018. **Capybaras (Rodentia: Caviidae) in highlands: Environmental variables related to distribution and herbivory effects on a common plant species**. Journal of Natural History, 52(27-28): 1801-1815.

REID, F. 2016. ***Hydrochoerus hydrochaeris***. The IUCN Red List of Threatened Species 2016: e.T10300A22190005. <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2016-2.RLTS.T10300A22190005.en>. Acessado em 02 May 2022.

RINALDI, A. R., 2014. **Ecologia de capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*, Linnaeus, 1766) em região alterada pela formação de um reservatório hidrelétrico**. (Tese de Doutorado em Ecologia e Conservação) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 204p.

RODRÍGUEZ, M.; VÉLEZ, N.; BEJARANO, P.; TORRIJOS, P.; BURGOS, N.; LADINO, E.; ... GONZÁLEZ, R. 2003. **Caracterización de las poblaciones silvestres de chigüiro y sus hábitats en las sabanas anegables del departamento de Casanare con miras a formular una propuesta de conservación y uso sostenible.** Informe final. Grupo de Estudios Ecológicos OIKOS–Gobernación de Casanare, Bogotá.

ROSENFIEL, D. A.; PIZZUTO, C. S. 2019. On the importance of alpha behavior integrity in male *Capybara Hydrochoerus hydrochaeris* (Mammalia: Rodentia Caviidae) following immuno-contraceptive treatment. *Journal of Threatned Taxa*, 13967-13976.

RUIZ-GARCÍA, M.; LUENGAS-VILLAMIL, K.; PINEDO-CASTRO, M.; LEAL, L.; BERNAL-PARRA, L. M.; SHOSTELL, J. M. 2016. **Continuous Miocene, Pliocene and Pleistocene Influences on Mitochondrial Diversification of the Capybara (*Hydrochoerus Hydrochoeris*; Hydrochoeridae, Rodentia): Incapacity to Determine Exclusive Hypotheses on the Origins of the Amazon and Orinoco Diversity for This Species.** *Journal of Phylogenetics & Evolutionary Biology*, 4(02): 1-20.

SALAS, V. 1999. **Social organisation of capybaras in the Venezuelan Llanos.** (Tese de Doutorado) Cambridge University, Cambridge, United Kingdom.

SCHALLER, G. B.; CRAWSHAW, P. G. 1981. Social organization in capybara population. *Säugetierkundlichen Mitteilungen*, 29: 3-16.

STEVAUX, J. C. 2000. **Climatic events during the Late Pleistocene and Holocene in the Upper Parana River: Correlation with NE Argentina and South-Central Brazil.** *Quaternary International*, 72(1): 73–85.

SWENSON, J. E. 2003. Implications of sexually selected infanticide for the hunting of large carnivores. **Animal behavior and wildlife conservation. Island Press, Washington, DC, USA**, p. 171-190.

TUYTTENS, F. A. M.; MACDONALD, D. W. 2000. Consequences of social perturbation for wildlife management and conservation. Pp. 315–329 In: GOSLING, L. M.; SUTHERLAND, W. J. (eds.). **Behaviour and Conservation.** Cambridge University Press, Cambridge, United Kingdom.