

Tesis para optar por el grado de Licenciado en Ciencias Biológicas

Patrones filogeográficos de *Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766) en el sur de su distribución, utilizando marcadores mitocondriales



Matías González Barboza

Junio 2021

Orientadora: Dra. Mariana Cosse

Co-orientadora: Mag. Nadia Bou

Departamento de Biodiversidad y Genética, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Tribunal: Dra. Ivanna Tomasco y Dr. Marcelo Loureiro

Agradecimientos

A Mariana Cosse por la oportunidad de realizar este trabajo, por el asesoramiento y por sobre todo, la confianza y el apoyo.

A Nadia Bou por las enseñanzas, los consejos y siempre darme para adelante.

A todos los compañeros del Departamento de Biodiversidad y Genética por su buena onda y compañerismo.

A los miembros del tribunal por su disposición y los valiosos aportes al trabajo.

Al Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP), a Sebastián Horta y a Lucía Bartesaghi por el apoyo al proyecto y a todos los guardaparques que colaboraron con colecta de muestras en las áreas protegidas. A Antonella Bruno, Claudia Elizondo, Natalia Mannise y Claudia Parodi que también aportaron muestras.

A Soledad Byrne y Juan Ignacio Túnez que colaboraron con secuencias para poder elaborar este trabajo.

A mis amigos de la Facultad, que hicieron esta etapa tan disfrutable. A mis amigos de la vida, por su apoyo incondicional y todas las alegrías.

A Fati, por compartir conmigo este viaje, siempre con tanto cariño, optimismo y paciencia.

A mi familia por todo el apoyo. Especialmente a mis padres que siempre estuvieron ahí y me alentaron a cumplir mis sueños.

Índice

Resumen	1
Introducción	2
<i>Historia evolutiva de los caviomorfos</i>	2
<i>El carpincho</i>	3
<i>Filogeografía y ADN mitocondrial</i>	5
<i>Justificación del estudio</i>	6
Objetivos	8
<i>Objetivo general</i>	8
<i>Objetivos específicos</i>	8
Materiales y métodos	9
<i>Área de estudio</i>	9
<i>Muestras</i>	9
<i>Extracción y amplificación del ADN</i>	10
<i>Amplificación por PCR</i>	11
<i>Secuenciación</i>	11
<i>Análisis de datos</i>	11
<i>Análisis de estructura poblacional</i>	12
<i>Historia demográfica</i>	13
<i>Análisis filogenéticos y red de haplotipos</i>	14
Resultados	16
<i>Análisis de estructura poblacional</i>	19
<i>Historia demográfica</i>	22
<i>Análisis filogenéticos y red de haplotipos</i>	23
Discusión	27
<i>Variabilidad genética en la especie</i>	27
<i>Patrones filogeográficos</i>	27
<i>Historia demográfica</i>	30
<i>Implicancias para la conservación</i>	30
<i>Conclusiones</i>	30
<i>Perspectivas</i>	31
Bibliografía	32
Anexo	42

Resumen

El carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*), el roedor actual más grande del mundo, es una especie ampliamente distribuida a lo largo de Sudamérica. Su presencia se asocia a ambientes con cuerpos de agua como humedales, bosques riparios y sabanas inundables. Es una especie emblemática de gran importancia biológica, social y económica. Sin embargo, es escasa la información generada a nivel nacional para esta especie y no existen hasta el momento estudios filogeográficos que incluyan a Uruguay. En este estudio se evaluó mediante el uso de secuencias de la región control (D-loop) del ADN mitocondrial la diversidad genética y estructura de las poblaciones de carpinchos en la región sur de su distribución.

Se obtuvieron 45 secuencias pertenecientes a poblaciones ubicadas en localidades uruguayas, a las que se le adicionaron otras correspondientes a poblaciones de Argentina y Paraguay, haciendo un total de 221. Se determinaron 19 haplotipos del D-loop, con 18 sitios polimórficos. El análisis de estructura genética reveló que las poblaciones de Uruguay son genéticamente distintas al resto y que existirían conexiones entre algunas poblaciones de Argentina y Paraguay, en concordancia con estudios previos. Finalmente, dentro de Paraguay existen distintos grupos, aunque poco es sabido sobre su origen geográfico. En general, la diversidad genética del carpincho en el Chaco y la Pampa fue menor que la encontrada en regiones tropicales.

Se propone que el patrón filogeográfico hallado en la región Chaco-Pampeana se debe a la expansión del área de distribución de esta especie hacia el sur, datada entre el final del Pleistoceno y el Holoceno, mediada por diferentes corredores y sistemas de cuencas: por un lado, los ríos Paraná y Paraguay, y por otro el río Uruguay y el sistema de ríos y lagunas costeros. La marcada estructura genética sugiere que las poblaciones de Uruguay podrían pertenecer a una Unidad de Manejo distinta a la de las poblaciones de Argentina y Paraguay.

Introducción

Historia evolutiva de los caviomorfos

Rodentia es el orden más grande de mamíferos, abarcando por lo menos el 40% de las especies de este grupo. Se encuentran en todos los continentes con excepción de la Antártida (Volobouev et al., 2006). La clasificación más reciente propone 5 subórdenes: Anomaluromorpha, Castorimorpha, Hystricomorpha, Myomorpha y Sciuromorpha (Carleton & Musser, 2005). Los caviomorfos son un clado de roedores histricomorfos endémicos de América y las islas del Caribe. Este clado consiste en 4 superfamilias, 4 familias extintas y 10 vivientes, con al menos 244 especies, las cuales se distribuyen principalmente en Sudamérica (Upham & Patterson, 2015; D'Elía et al., 2019; Verde Arregoitia et al., 2020). Se estima que invadieron este continente durante el Eoceno medio (hace aproximadamente 42 Ma). La hipótesis más aceptada es que el ancestro común de este grupo atravesó el océano Atlántico (Lavocat, 1969). Sin embargo, hay evidencias que sustentan la posibilidad de un origen asiático y rutas de migración alternativas (Huchon & Douzery, 2001). Desde su arribo se ha vuelto uno de los grupos más diversos, particularmente por la riqueza de especies y diversidad de características ecológicas y morfológicas, especialmente en términos de plano corporal (Volocho et al., 2013; Morgan, 2015). Una característica remarcable de este clado es la enorme variación de tamaño, especialmente cuando se considera el registro fósil (Álvarez et al., 2017). Por ejemplo, el extinto dinómido *Josephoartigasia monesi* Rinderknecht & Blanco, 2008 podría haber alcanzado la tonelada de peso (Millien, 2008).

Uno de los grupos más llamativos dentro de los caviomorfos son los “capibaras”, un grupo registrado desde el Mioceno medio (Pérez et al., 2017). Los restos fósiles más antiguos de este grupo corresponden a *Cardiatherium chasicoense* Pascual & Bondesio, 1968 de edad Chasiquense (Mioceno, 10-9 Ma), y derivan exclusivamente de Argentina, con registros en la provincia de Buenos Aires y San Juan (Deschamps et al., 2007; Deschamps et al., 2009; Vucetich et al., 2012; Deschamps et al., 2013). Para el Huayqueriense (Mioceno, 9,0-6,8 Ma) los capibaras estaban distribuidos por gran parte de Sudamérica, desde Venezuela hasta el oeste de Brasil, suroeste de Uruguay y diversas localidades de Argentina. Durante el Pleistoceno-Holoceno este grupo se distribuía desde Norteamérica hasta Argentina central (Vucetich et al., 2012). En la actualidad solo existen 2 especies de capibaras: el capibara menor (*Hydrochoerus isthmius* Goldman, 1912) cuya distribución se limita a algunas zonas de Panamá, Colombia y Venezuela; y el capibara, chigüire o carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris* (Linnaeus, 1766)) distribuido ampliamente por Sudamérica (Moreira et al., 2013b).



Figura 1. Individuo de *Hydrochoerus hydrochaeris*. Foto tomada por Ezequiel Vera. Extraído de iNaturalist (<https://www.inaturalist.org/observations/36240396>).

El carpincho

El carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*) con un peso promedio de 50 kg es, en la actualidad, el roedor más grande del mundo. Es un animal robusto, con un largo aproximado de 1,2 m y 0,6 m de altura a la cruz (Mones & Ojasti, 1986; Moreira et al., 2013b). Sus extremidades son cortas, siendo las posteriores mayores que las anteriores. Poseen diversas adaptaciones al medio acuático como las patas palmeadas, junto a los ojos, las orejas y las narinas que se encuentran en posición dorsal (Ojasti, 1973; Mones & Ojasti, 1986; Moreira et al., 2013b) (Figura 1).

Es endémico de Sudamérica y presenta una amplia distribución que abarca Colombia, Venezuela, las Guayanas, Ecuador, Perú y Bolivia, Paraguay, Brasil, Uruguay y norte de Argentina hasta el río Quequén (38°17' S) en la provincia de Buenos Aires (Mones & Ojasti, 1986; Doumecq Milieu et al., 2012; Moreira et al., 2013b) (Figura 2).

Ocupan una gran variedad de hábitats asociados al agua, desde humedales a sabanas inundables y bosques riparios. La mayoría del forraje que consumen se encuentra asociado a los cuerpos de agua y recurren al medio acuático para aparearse o al escapar de algún depredador. Además, el agua es esencial para su termorregulación debido a que sus glándulas sudoríparas son poco efectivas (Ojasti, 1973; Bolkovic et al., 2006; Ferraz et al., 2007; Schivo et al., 2010).

Los carpinchos viven en manadas que varían desde parejas o familias hasta complejos grupos de numerosos adultos y sus crías (Campos Krauer, 2009). En general estos grupos



Figura 2. Distribución de *Hydrochoerus hydrochaeris* (IUCN, 2016).

sociales varían entre 6 y 16 adultos, aunque se han observado congregaciones mayores a 100 individuos (Ojasti, 1973; Herrera et al., 2011). Los carpinchos se vuelven sexualmente maduros entre los 1,5-2 años, cuando alcanzan los 30-40 kg (Moreira et al., 2013a). El período de gestación dura aproximadamente 150 días (López-Barbella, 1987; Ángel-Escobar & Aldana-Domínguez, 2007). Las hembras dan a luz, en promedio, 1,55 veces al año, y el tamaño de camada suele ser de 4 crías (Ojasti, 1973; Perdomo, 2005; Maldonado-Chaparro & Blumstein, 2008).

El carpincho, a nivel internacional está catalogado por la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, por sus siglas en inglés) como preocupación menor (Reid, 2016). La principal amenaza de esta especie es la caza por su carne y cuero (Aldana-Domínguez et al., 2013; Quintana & Bolkovic, 2013; Reid, 2016), posible transmisión de enfermedades y/o conflictos vinculados al daño de cosechas (Ferraz et al., 2007). La deforestación no representaría una amenaza significativa para esta especie, por el contrario, se han documentado casos en los que la conversión de bosques a pasturas ha provocado su expansión (Moreira & Macdonald, 1996; Ferraz et al., 2007; Ferraz et al., 2009; Campos-Krauer & Wisely, 2010). De hecho, el carpincho es considerado plaga en algunas partes Brasil debido a su adaptabilidad a agroecosistemas y la desaparición de sus depredadores naturales (Ferraz et al., 2003).

En Argentina, la lista roja más reciente clasifica al carpincho como preocupación menor

debido a su amplia distribución, a que las poblacionales se consideran relativamente estables y por su reciente ampliación del rango de distribución, particularmente en las provincias de Buenos Aires y Santiago del Estero (Bolkovic et al., 2019). Esta especie también está categorizada como preocupación menor en Brasil (ICMBio/MMA, 2018) y Paraguay (Saldívar et al., 2017).

En Uruguay se considera prioritaria para la conservación por los criterios de especial consideración debido a su valor emblemático y ecológico; y cuya explotación debería ser considerada en forma sostenible (Soutullo et al., 2013). En la actualidad hay poca información generada a nivel nacional para esta especie. No obstante, Mones (1975) ya reportaba que la caza indiscriminada de esta especie había reducido el número y provocado su desaparición en varias regiones del país. Aunque su caza es ilegal en Uruguay, el carpincho sigue siendo una fuente de alimento para numerosas familias, principalmente en el interior del país (González & Martínez-Lanfranco, 2010). En Uruguay la desecación de bañados le ha restado grandes extensiones de hábitat (González & Martínez-Lanfranco, 2010), y actualmente la expansión de la forestación también podría afectar la disponibilidad de ambientes adecuados (Brazeiro et al., 2018). Recientemente, se han realizado esfuerzos para conservar las poblaciones de esta especie como, por ejemplo, refuerzos poblacionales y reintroducciones de este animal en distintas localidades del Paisaje Protegido Laguna de Rocha (SEA, 2020). A su vez, se han instalado criaderos comerciales con la intención de lograr una explotación sustentable del carpincho. Debido a la importancia biológica, emblemática y socioeconómica de esta especie es necesario generar información de las poblaciones uruguayas de carpinchos.

Filogeografía y ADN mitocondrial

La filogeografía se define como la disciplina que estudia la distribución geográfica de los linajes genealógicos. Se basa en dos aspectos de la variabilidad intraespecífica del ADN i) la magnitud y el patrón de divergencia filogenética entre alelos; y ii) la distribución geográfica de estos clados (Avise et al., 1987). Los análisis filogeográficos permiten inferir procesos demográficos históricos como flujo génico, patrones de migración, tamaño efectivo poblacional, secuencias de colonización, cuellos de botella, expansiones y también identificar unidades de conservación (Hewitt, 2004; Domínguez-Domínguez & Vázquez-Domínguez, 2009). Los estudios filogeográficos en animales suelen utilizar marcadores moleculares del ADN mitocondrial (ADNmit) (Beebe & Rowe, 2008).

El ADNmit es un ADN extranuclear que se ubica en los organelos celulares conocidos como mitocondrias. El genoma mitocondrial se compone de una doble hebra circular de aproximadamente 15000-20000 pares de bases. Tiene 13 genes codificantes de proteínas, 2 para ARN ribosómico, 22 para ARN de transferencia y un segmento no codificante de aproximadamente 1000 pares de bases, denominado Región Control (D-loop), donde inicia la replicación y la transcripción (Taberlet, 1996).

Su popularidad como marcador molecular se debe a ciertas características que lo diferencian del ADN nuclear (ADNn). Existen múltiples copias por célula, por lo tanto, resulta

más sencillo de amplificar que al ADNn, del cual existen solamente 2 copias por célula (Waits & Paetkau, 2005). Esto es particularmente útil cuando se trabajan con muestras no invasivas como fecas, que se caracterizan por poca cantidad de ADN y de pobre calidad (Maturrano et al., 2012). Además, es libre de histonas y tiene limitada actividad reparadora, por lo tanto, su tasa de fijación es alta (5-10 veces mayor que el ADN nuclear) (Arif et al., 2011). Asimismo, se considera que la mayoría de los polimorfismos intraespecíficos son efectivamente neutros, por lo cual la distribución de los haplotipos está influenciada principalmente por eventos demográficos y no por selección (Beebee & Rowe, 2008). Por otro lado, es transmitido sin recombinación por vía materna. Esto constituye tanto una ventaja como una limitación ya que permite seguir los linajes hacia atrás en el tiempo de manera sencilla, pero solo refleja una porción de la variabilidad genética a través del linaje materno (Taberlet, 1996; Pakendorf & Stoneking, 2005; Iglesias, 2008).

La Región Control (D-loop) presenta niveles de variación mayores que las secuencias codificantes de proteínas debido a su baja presión selectiva (Arif & Khan, 2009). Básicamente, esta región está dividida en 3 dominios: un dominio conservado central y dos periféricos altamente divergentes (Saccone et al., 1991). La variación intraespecífica que presenta el D-loop mitocondrial lo vuelve un marcador adecuado para estudios de variabilidad genética, filogeografía y asignación de unidades de manejo (Kohn & Wayne, 1997).

Respecto al carpincho, a la fecha se han llevado varios estudios filogeográficos en los cuales se utilizó la región control como marcador molecular (Perdomo, 2005; Campos-Krauer & Wisely, 2010; Borges-Landáez et al., 2012; Byrne et al., 2015; Ruiz-García et al., 2016; Alonso Moreno, 2017; Byrne et al., 2019). Sin embargo, sólo unos pocos se han enfocado en poblaciones en el sur de la distribución de esta especie. Por ejemplo, Byrne et al. (2019) evaluaron la diversidad genética y estructuración de las poblaciones naturales de carpincho en la región Chaco-Pampeana y concluyeron que los ríos Paraguay y Paraná estarían actuando como corredores biológicos, conectando las poblaciones de carpincho entre las 2 regiones. Sin embargo, su estudio no incluyó poblaciones en la porción uruguaya y brasilera de la provincia Pampeana. Esta región no está asociada a los ríos Paraná y Paraguay; y además no limita con la provincia Chaqueña. En este sentido, es posible que los procesos históricos hayan sido distintos.

Justificación del estudio

A pesar de la relevancia del carpincho como especie emblemática y de recurso potencial para Uruguay, existen escasos estudios dedicados a las poblaciones silvestres y sólo uno que aborda aspectos genéticos. Cosse et al. (2019) estudiaron poblaciones uruguayas utilizando seis microsatélites como marcadores moleculares. Sus resultados indicarían que la especie en Uruguay se comporta como una única población alejada del equilibrio de Hardy-Weinberg. Sin embargo, los autores sostienen que su muestreo no alcanzó los niveles esperados para poder detectar patrones genéticos, y que utilizar marcadores mitocondriales sería interesante para poder estudiar patrones filogeográficos de esta

especie.

Por otro lado, todos los estudios regionales genéticos y filogeográficos que existen hasta el momento no incluyen muestras de Uruguay, que constituye gran parte de la región pampeana. Actualmente, el límite austral de distribución del carpincho se encuentra en la Pampa y por lo tanto es de gran importancia evaluar la diversidad genética de estas poblaciones, cómo se generó la misma y qué rol pueden haber cumplido los ríos, como por ejemplo el río Uruguay.

Este trabajo busca analizar la variación genética de los carpinchos en Uruguay utilizando marcadores mitocondriales y analizar cómo se estructura esta variación a nivel regional. En este sentido el trabajo pretende complementar los resultados obtenidos por Cosse et al. (2019) sobre la conectividad de las poblaciones de carpincho dentro de Uruguay. Asimismo, permite conocer cómo se inserta ésta porción de la región pampeana dentro de la filogeografía regional, complementando así el trabajo realizado por Byrne et al. (2019) sobre poblaciones en el Chaco y la Pampa. Por otro lado, estudiar el estatus de las poblaciones uruguayas y su afinidad genética es necesario para el desarrollo de estrategias de conservación.

Objetivos

Objetivo general

Analizar cómo se estructura geográficamente la variación genética en poblaciones de carpincho (*H. hydrochaeris*) en el sur de su distribución desde una aproximación filogeográfica.

Objetivos específicos

- Caracterizar la variación genética intraespecífica del carpincho en el sur de su distribución con el marcador D-Loop del ADNmit.
- Estimar el grado de estructuración genética del carpincho en el sur de su distribución. Establecer los niveles de flujo génico entre los grupos identificados y analizar los patrones de migración entre estos.
- Evaluar la existencia de eventos de expansión – contracción de las poblaciones de carpinchos.

Materiales y métodos

Área de estudio

El trabajo se desarrolla en el extremo sur de la distribución del carpincho, con muestras de Uruguay, del noreste de Argentina y del oeste y norte de Paraguay (Figura 3).

La hidrografía del área abarca principalmente la cuenca del Plata, aunque además se consideró una porción del sureste de Uruguay que corresponde a las cuencas del Atlántico y de la Laguna Merín que vierten sus aguas directamente al Océano Atlántico (Vidal, 2003).

La cuenca del Plata se encuentra en el sudeste de Sudamérica (Figura suplementaria 1). Cubre aproximadamente $3,6 \times 10^6$ km², siendo la segunda cuenca más grande de Sudamérica y drena parte de 5 países: Argentina, Bolivia, Brasil, Paraguay y Uruguay (Mechoso et al., 2001; Su et al., 2008). Tiene 3 subcuencas principales: las cuencas del Paraná, Paraguay y Uruguay. La cuenca del Paraná es la de mayor tamaño, representando un 48,7% del área total de la cuenca del Plata. Le siguen la cuenca del Paraguay y Uruguay con 35,3% y 11,8% respectivamente (Popescu et al., 2012). Los ríos Uruguay y Paraná desembocan en el río de la Plata, así como algunos ríos menores de la porción sur-oeste de Uruguay (por ejemplo, el río Santa Lucía) y noreste de la provincia de Buenos Aires, Argentina.

Por otro lado, se clasificó el área de estudio según la regionalización de Morrone (2014), que en general se limita principalmente a las provincias biogeográficas del Chaco y la Pampa. El Chaco abarca el sur de Bolivia, oeste de Paraguay, sur de Brasil y el centro-norte de Argentina. Se caracteriza principalmente por la presencia de bosques caducifolios xéricos, con un estrato de gramíneas, cactáceas y bromeliáceas terrestres; también son frecuentes las sabanas y las estepas halófilas (Morrone, 2000; Morrone 2001). En cambio, la Pampa se ubica en el centro-oeste de Argentina entre los 30 y 39 grados latitud sur, Uruguay y la porción sur del estado brasileño de Río Grande del Sur. Esta provincia se caracteriza por la presencia de sabanas con hierbas y arbustos, bosques xéricos, sabanas inundables y bosques de galería a lo largo de los ríos (Morrone, 2000; Morrone 2001). A su vez, 2 poblaciones de Paraguay corresponden a la provincia biogeográfica de Rondônia y una de Argentina a la provincia de Bosque Paranaense (Figura suplementaria 2).

Muestras

Las muestras uruguayas que se analizaron se encuentran en el banco de tejidos y ADN del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE. Al momento se contaba con 91 muestras que corresponden a fecas, pelos y tejidos. Proviene de 13 localidades: Santa Lucía, Rocha, Laguna de Rocha, Potrerillo, Maldonado, Paso Averías, Flores, Florida, Paso Centurión, Queguay, Salto, Farrapos y Rincón de Franquía (Figura 3; Tabla suplementaria 1). La mayoría de las muestras fueron colectadas por guardaparques del SNAP-DINAMA-MVOTMA (en la actualidad, SNAP-DINABISE-MA) y por investigadores del Departamento

de Biodiversidad y Genética del IIBCE. El muestreo fue oportunista. Por otro lado, las muestras colectadas en Maldonado provienen de un criadero.

Adicionalmente, mediante una colaboración con el grupo argentino liderado por el investigador Juan Ignacio Túnez (INEDES-CONICET-Universidad de Luján) se recibieron 12 productos de PCR para secuenciar, provenientes de 4 localidades: San Javier, Cerro Tuna, Estancia el Socorro (Iberá) y Bajo Delta del Paraná.

También se contó con las secuencias de los 14 haplotipos identificados por Byrne et al. (2019), que fueron brindadas por Juan Ignacio Túnez. Éstas se corresponden con 54 secuencias de muestras argentinas provenientes de 5 localidades, que fueron amplificadas para ese mismo trabajo; también se corresponden con 110 secuencias de muestras provenientes de 13 localidades paraguayas y que fueron generadas en el trabajo de Campos-Krauer & Wisely (2010) (Tabla suplementaria 1). Las últimas están disponibles en GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (números de acceso: GU456363-376).

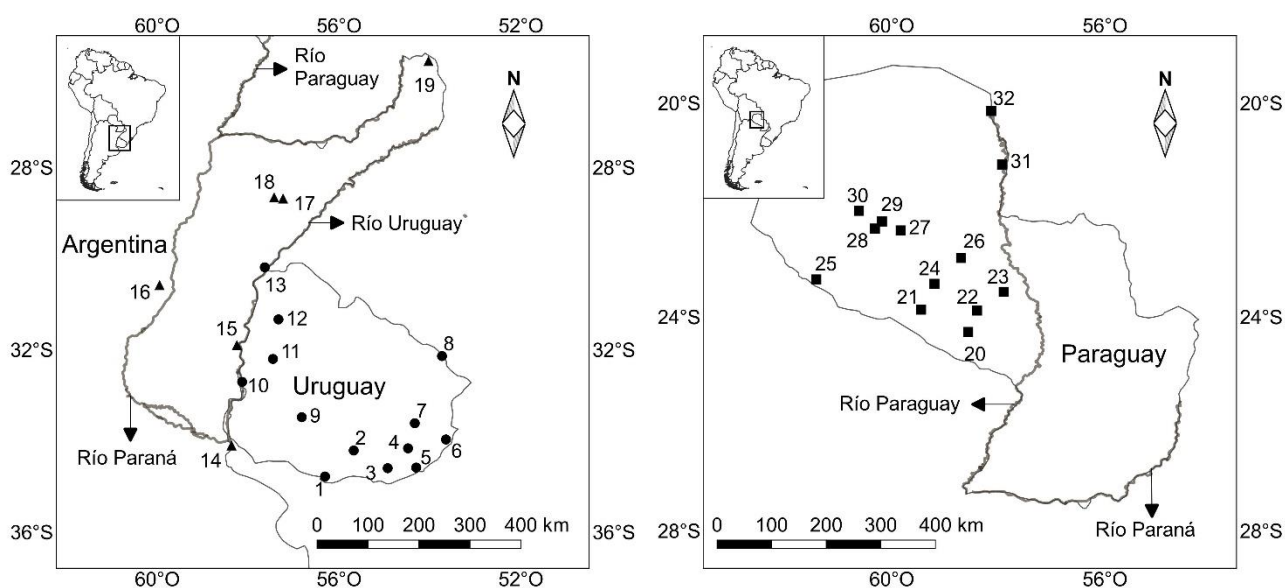


Figura 3. Izquierda: sitios de muestreo en Argentina y Uruguay. Derecha: sitios de muestreo en Paraguay. Los números corresponden a poblaciones. Uruguay (●): 1 Santa Lucía, 2 Florida, 3 Maldonado, 4 Rocha, 5 Laguna de Rocha, 6 Potrerillo, 7 Averías, 8 Paso Centurión, 9 Flores, 10 Farrapos, 11 Queguay, 12 Salto, 13 Rincón de Franquía. Argentina (▲) 14 Bajo Delta, 15 El Palmar, 16 San Javier, 17 Cerro Tuna, 18 Iberá, 19 Andresito. Paraguay (■): 20 Eñe, 21 Loreto, 22 Arizona, 23 Maroma, 24 Jerovia, 25 Sauces, 26 Laguna Rey, 27 Loma Plata, 28 Toledo, 29 Lapacho, 30 Mariscal, 31 Olimpo, 32 Bahía Negra.

Extracción y amplificación del ADN

La extracción de ADN se realizó siguiendo el protocolo de González et al. (1998) para tejidos. En el caso de fecas se utilizó un kit comercial, QIAamp DNA Stool Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La cantidad (ng/ul) y pureza (relación de absorbancia a 260nm y 280nm) del ADN aislado se cuantificaron

utilizando espectrofotómetro UV-VIS Nano Drop TM ND-1000 (Thermo Scientific, Waltham, MA, Estados Unidos).

Amplificación por PCR

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó siguiendo el protocolo de Perdomo (2005) para amplificar un fragmento de la región control del ADNmit de 545 pb y utilizando el par de primers HV1-F (5'-CCCACCATCAGTACCCAAAA-3') y HV1-R (5'-CGAGATGTCTTATTTAAGGGGAAC-3'). Las reacciones de PCR tuvieron un volumen de 20 µL y contenían buffer Invitrogen a una concentración final de 1X, 1,5 mM de MgCl₂, 0,2 mg/ml de BSA y aproximadamente 4 ng/µL de ADN. Se utilizaron 0,3 µM de cada primer, 0,1 mM de dNTPs y 0,03-0,04 U de Taq Polimerasa. Las amplificaciones se realizaron en un termociclador Benchmark TC9639 y consistieron en desnaturalización inicial a 94°C por 3 minutos, 35 ciclos de la siguiente manera: desnaturalización a 94°C por 45 segundos, hibridación a 50°C por 45 segundos y extensión a 72°C por 1 minuto. Por último, se agregó un ciclo de extensión final a 72°C por 7 minutos. En todas las reacciones se utilizaron controles negativos para comprobar si existía contaminación y controles positivos para verificar que no existieran errores de manipulación.

Para verificar la eficiencia de la reacción de PCR se realizaron corridas electroforéticas en geles de agarosa al 1% en buffer TBE (Tris-Borato EDTA) 1X y utilizando intercalante GoodView, los tamaños de los fragmentos fueron establecidos utilizando un marcador de tamaño molecular HyperLadder IV (Meridian-Bioline BIO-33029 Marcador 100 pb). Ésta técnica se basa en la migración diferencial de macromoléculas cargadas a través de una matriz de gel cuando son sometidas a un campo eléctrico.

Secuenciación

Los productos de PCR amplificados de muestras uruguayas y los proporcionados por los colaboradores argentinos se enviaron a la Unidad de Biología Molecular del Institut Pasteur de Montevideo para su secuenciación. La unidad cuenta con un analizador genético Applied Biosystems 3130. El método de secuenciación empleado fue el Método Enzimático de Sanger (Sanger et al., 1977).

Análisis de datos

Las secuencias fueron alineadas utilizando ClustalW en el software MEGA X (Kumar et al., 2018) para observar los distintos polimorfismos. Si bien el fragmento amplificado tiene un largo de aproximadamente 500 pb, solamente se utilizaron 245 pb para poder hacer un análisis que incluya las secuencias utilizadas por Byrne et al. (2019), que comprenden ese fragmento menor. Se clasificaron las secuencias en haplotipos de forma manual, y también, como un modo de verificación, se colapsaron las secuencias en haplotipos con el software DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009).

Análisis de estructura poblacional

Utilizando Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010) se realizó un Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) para evaluar la significancia de las divisiones geográficas entre poblaciones (Excoffier et al., 1992). Este método estadístico involucra la varianza en la frecuencia haplotípica pero a su vez considera el número de mutaciones entre los haplotipos. Es un enfoque jerárquico donde las correlaciones entre distancias genotípicas son designadas como estadísticos Phi (ϕ), versiones análogas a los estadísticos F de Wright (1951) (Excoffier et al., 1992). ϕ_{ST} estima el grado de diferenciación de las poblaciones respecto al total, ϕ_{SC} estima la diferenciación entre poblaciones asignadas a un mismo grupo y ϕ_{CT} estima la diferenciación entre los grupos. Las agrupaciones que maximizan la varianza entre los grupos y minimizan la varianza dentro de los grupos, se asumen que reflejan la subdivisión geográfica más probable (Excoffier et al., 1992; Boyd et al., 2020). La significancia se testeó mediante 10.000 permutaciones y se tomó $\alpha = 0,05$ como nivel de significancia estadística.

Primero, para evaluar la distribución de la variación genética se testeó si las poblaciones se comportaban como una gran población panmítica. Consecutivamente, se testearon 2 hipótesis a priori de estructuración geográfica: en base a cuencas y en base a provincias biogeográficas (Tabla suplementaria 2). Para evaluar la primera hipótesis se armaron 6 grupos: cuenca alta del río Paraguay, cuenca baja del río Paraguay, cuenca del río Paraná, cuenca del río Uruguay, cuenca del río Santa Lucía y la cuenca de la Laguna Merín y el Océano Atlántico. En la segunda situación, se agruparon las poblaciones por provincias biogeográficas, según la clasificación de Morrone (2014). Se determinaron 4 grupos: Pampa, Chaco, Bosque Paranaense y Rondônia.

Adicionalmente se ejecutó un Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA, por sus siglas en inglés) implementado en el software SAMOVA 2.0 (Dupanloup et al., 2002). Este método implementa una aproximación para definir grupos de poblaciones geográficamente homogéneas y diferenciadas entre ellas. En base a un número arbitrario de grupos (K) el análisis determina la composición de las agrupaciones al maximizar el valor de ϕ_{CT} . Se probaron distintos números de agrupaciones geográficas, considerando que el mínimo de estas a testear debía ser de 2 o 3. Para estos análisis se utilizaron las configuraciones estándares y distancias pareadas entre haplotipos, y para simplificar la selección solo se evaluaron los agrupamientos con constricciones geográficas. El criterio para determinar el número de grupos se basó en que el valor de ϕ_{CT} fuera el mayor posible y que todos los grupos reunieran al menos 2 localidades.

Se calcularon los valores de ϕ_{ST} en base a diferencias pareadas para evaluar la diferenciación genética entre los grupos formados para la mejor clasificación. En base a esto se estimó el flujo génico entre grupos mediante el número de hembras migrantes entre poblaciones por generación (Nm), utilizando la expresión:

$$\phi_{ST} = \frac{1}{1 + 2Nm}$$

donde N es el tamaño poblacional efectivo de las hembras y m es la tasa de migración de las hembras (Weir, 1996; González et al., 2015).

Variabilidad genética

Se evaluaron los niveles de variabilidad genética, mediante la proporción de sitios polimórficos (S), la diversidad haplotípica (Hd), y diversidad nucleotídica (π).

Se calculó la proporción de sitios polimórficos para el fragmento analizado siguiendo la definición de Hartl (2000):

$$S = \text{sitios polimórficos} / \text{sitios totales}.$$

La diversidad haplotípica indica la probabilidad de que dos haplotipos muestreados al azar sean idénticos dentro de la muestra. Se calcula como:

$$Hd = \frac{n}{n-1} \left(1 - \sum_{i=1}^k p_i^2 \right)$$

dónde n es el número de copias del gen en la muestra, k el número de haplotipos y p_i la frecuencia en la muestra del i -ésimo haplotipo (Nei, 1987).

La diversidad nucleotídica indica la probabilidad de que dos nucleótidos homólogos y tomados al azar sean diferentes. Se calcula con la siguiente fórmula:

$$\pi = \sum_{ij} p_i p_j \pi_{ij}$$

dónde p_i es la frecuencia de la secuencia i , p_j la frecuencia de la secuencia j y π_{ij} la proporción de diferentes nucleótidos entre la secuencia i y la secuencia j (Tajima, 1983; Nei, 1987).

Los 2 últimos indicadores fueron calculados en DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009).

Historia demográfica

La historia demográfica de las poblaciones se evaluó utilizando 2 aproximaciones distintas para el mejor agrupamiento. Primero, se realizaron los test de neutralidad D de Tajima (Tajima, 1989) y F_s de Fu (Fu, 1997), empleando el software Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Para ambos test se realizaron 1000 simulaciones. La significancia del test D fue $\alpha = 0,05$ y la del F_s $\alpha = 0,02$. Estos test se basan en el modelo de alelos infinitos (Holsinger, 2012). La hipótesis nula de ambos test asume que el tamaño de la población es constante y que esta no está estructurada (Nielsen, 2001).

El test D de Tajima compara el número de sitios segregantes con el número promedio de diferencias pareadas. Bajo una situación de evolución neutral ambos valores deberían ser iguales, pero pueden existir diferencias debido a selección y/o a eventos demográficos.

Valores negativos sugieren expansión poblacional o selección purificadora; mientras que valores positivos sugieren un cuello de botella reciente o selección balanceadora (Perfectti et al., 2009; Holsinger, 2012).

Por otro lado, el test F_s de F_u sugiere estimar la probabilidad de observar una muestra al azar con un número de alelos igual o menor al valor observado, dada la asunción de que los alelos en cuestión son selectivamente neutros. Valores negativos del F_s se deben a un exceso de alelos, que es esperable bajo una expansión poblacional repentina o por “efecto autostop” (“genetic hitchhiking”, en inglés), es decir, cambios en la frecuencia de un alelo debido a proximidad con un gen bajo selección. Por otro lado, valores positivos es evidencia de una deficiencia de alelos que puede deberse a cuellos de botella recientes o selección sobredominante (Holsinger, 2012).

Como segunda aproximación se utilizó la distribución de las diferencias pareadas (mismatch distribution) (Rogers & Harpending, 1992). El análisis consiste en la comparación del número observado de diferencias entre pares de haplotipos, en contraste con la distribución esperada bajo un modelo de expansión poblacional. La distribución de las diferencias pareadas es multimodal en poblaciones en equilibrio demográfico y unimodal en aquellas que han pasado por una expansión demográfica reciente. Los gráficos se realizaron con DnaSP v5 (Librado & Rozas, 2009) mientras que los parámetros bajo un modelo de expansión repentina fueron calculados con Arlequin 3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Se calcularon los intervalos de confianza para los parámetros estimados mediante 1000 réplicas de Bootstrap. Para evaluar la validez del modelo, se calcularon la suma de los desvíos cuadrados (SSD) (Schneider & Excoffier, 1999) y el índice de irregularidad de Harpending (“Raggedness”, r) (Harpending, 1994). Se esperan valores bajos y no significativos de estos test si ocurrió un proceso de expansión. Cuando se detectaron señales de expansión poblacional, se calculó el tiempo en el cual este suceso ocurrió a partir de la expresión:

$$\tau = 2\mu t$$

dónde τ es el parámetro de expansión poblacional, μ es la tasa de mutación por generación y t es el tiempo desde la expansión (en generaciones) (Rogers & Harpending, 1992). Siguiendo un procedimiento similar al de Horn et al. (2014), se utilizaron tasas de sustitución de 3×10^{-7} , 5×10^{-7} y 7×10^{-7} sustituciones/sitio/año. Esto debido a que en la bibliografía no se encontraron estimativos robustos de la tasa de sustitución del D-loop para el carpincho. Se asumió un tiempo generacional de 2 años para esta especie, dado que las hembras alcanzan la madurez sexual a los 1,5-2 años aproximadamente (Moreira et al., 2013a) y el tiempo de gestación es aproximadamente 150 días (López-Barbella, 1987; Ángel-Escobar & Aldana-Domínguez, 2007).

Análisis filogenéticos y red de haplotipos

La reconstrucción filogenética de los haplotipos se obtuvo empleando los métodos de máxima parsimonia y máxima verosimilitud con MEGA X (Kumar et al., 2018). Para el

método de máxima verosimilitud, se utilizó jModelTest 2 (Darriba et al., 2012) con el fin de determinar el mejor modelo de sustitución nucleotídica para los datos. De acuerdo al criterio de información bayesiano (BIC, por sus siglas en inglés) (Schwarz, 1978) el mejor modelo fue el de Hasegawa-Kishino-Yano (HKY85) (Hasegawa et al., 1985) con distribución gamma. El apoyo de los nodos se evaluó utilizando 1000 réplicas de Bootstrap para ambos métodos (Felsenstein, 1985). Como grupo externo se utilizaron 3 secuencias de *Cavia porcellus* (Linnaeus, 1758), especie que pertenece a la misma familia que el carpincho, Caviidae (Pérez et al., 2014). Las secuencias fueron obtenidas de GenBank (número de acceso: MF278290, MF278293 y MF278294).

Para explorar las relaciones entre haplotipos se generó una red utilizando el algoritmo de unión por la mediana (Median Joining Network, por su nombre en inglés) (Bandelt et al., 1999) implementado en el software PopArt (Leigh & Bryant, 2015), con la configuración estándar.

Resultados

Se lograron amplificar por PCR exitosamente 45 muestras (23 fecas, 15 muestras de tejido y 7 muestras de pelo) de Uruguay (Tabla suplementaria 3). Adicionalmente, se contó con 66 secuencias de Argentina y 110 de Paraguay, totalizando así, 221 secuencias de carpinchos en la región de estudio (Tabla 1).

Para las muestras uruguayas se obtuvieron 6 haplotipos determinados por 5 sitios polimórficos y todas las sustituciones observadas fueron transiciones. Al incluir las secuencias obtenidas de Paraguay y Argentina se obtuvieron 19 haplotipos determinados por 18 sitios polimórficos. Entre ellos se encontraron 17 transiciones y 1 transversión, además 15 sitios fueron informativos para parsimonia. La proporción de sitios polimórficos fue de 0,0735 aproximadamente.

Solo el haplotipo I es compartido entre poblaciones de los 3 países. Este se encuentra en una muestra uruguaya proveniente de Farrapos, mientras que el mismo se encontró en 6 muestras de Toledo, Paraguay y 3 muestras de Argentina, 1 de San Javier y 2 de Cerro Tuna. Aparte de este caso, Uruguay no comparte ningún otro haplotipo con Paraguay, pero si comparte 3 haplotipos con Argentina: O, Q y S. Argentina y Paraguay además comparten el haplotipo A, el más abundante (Tabla 1; Figura 4).

Tabla 1. Distribución de los haplotipos del D-loop mitocondrial de carpincho. Se indican los tamaños muestrales (N) y el número de individuos por haplotipo para cada localidad (n).

Sitio de muestreo	N	Haplotipos (n)
<i>Uruguay</i>	45	
Santa Lucía	5	O(5)
Florida	2	O(2)
Maldonado	6	O(1), Q(1), S(4)
Rocha	1	Q(1)
Laguna de Rocha	2	O(2)
Potreriillo	2	O(2)
Averías	6	O(5), Q(1)
Paso Centurión	1	O(1)
Flores	1	O(1)
Farrapos	7	I(1), O(3), P(2), Q(1)
Queguay	7	O(2), Q(5)
Salto	3	Q(2), R(1)
Rincón de Franquía	2	O(2)
<i>Argentina</i>	66	
Bajo Delta	19	A(11), B(2), C(1), E(2), F(1), Q(1), R(1)
El Palmar	4	B(1), C(3)
San Javier	11	A(10), I(1)
Cerro Tuna	3	I(2), R(1)
Iberá	26	A(8), B(2), C(9), D(1), O(5), R(1)
Andresito	3	A(3)
<i>Paraguay</i>	110	
Eñe	8	A(8)
Loreto	11	A(3), G(8)
Arizona	10	A(4), G(6)
Maroma	6	A(6)
Jerovia	8	A(8)
Sauces	11	A(1), G(10)
Laguna Rey	4	G(3), N(1)
Loma Plata	10	A(5), G(5)
Toledo	13	A(4), G(3), I(6)
Lapacho	5	G(5)
Mariscal	3	A(3)
Olimpo	12	A(2), G(1), H(9)
Bahía Negra	9	A(1), H(2), J(3), K(1), L(1), M(1)

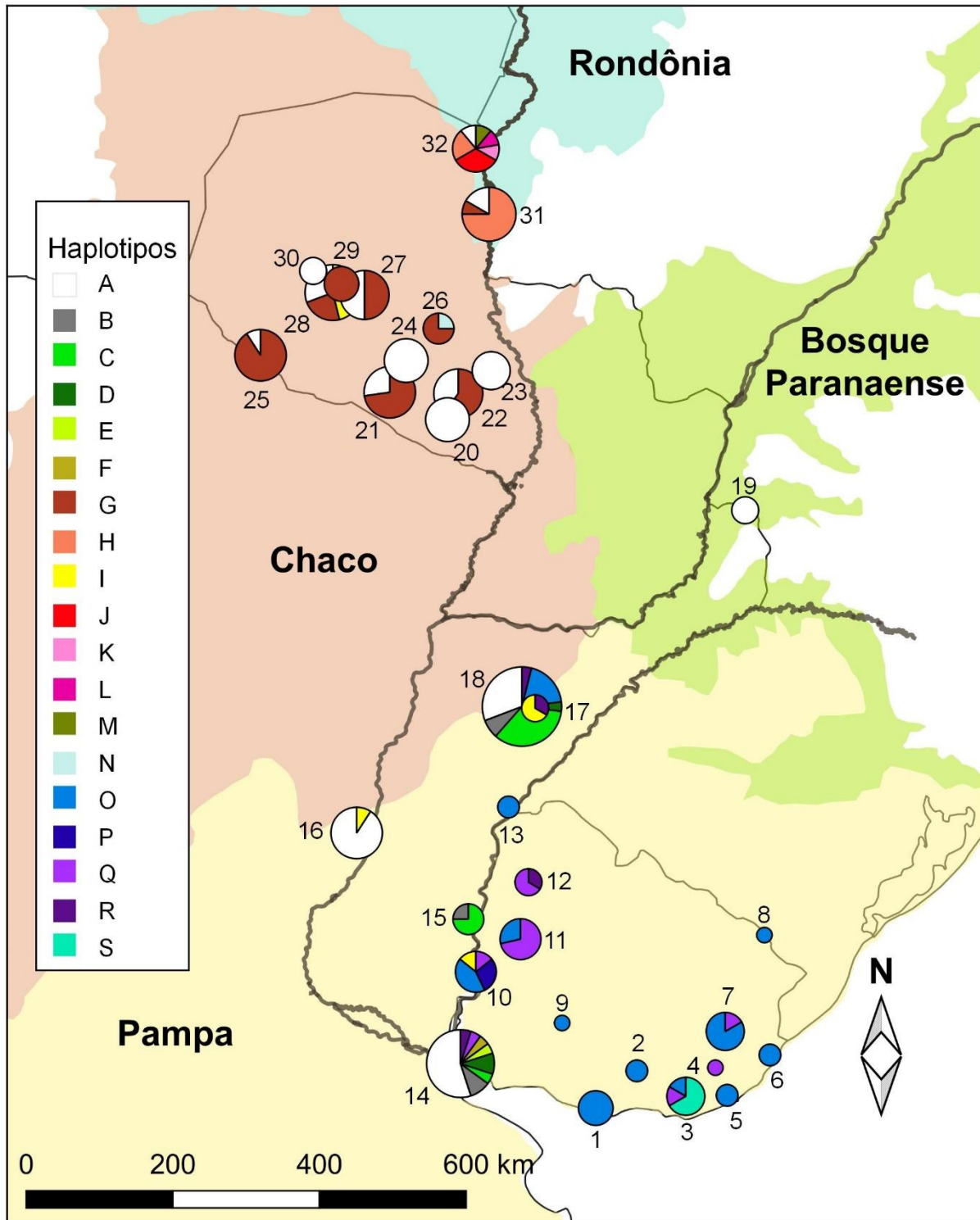


Figura 4. Mapa de haplotipos del fragmento de D-loop por localidad: 1 Santa Lucía, 2 Florida, 3 Maldonado, 4 Rocha, 5 Laguna de Rocha, 6 Potrerillo, 7 Averías, 8 Paso Centurión, 9 Flores, 10 Farrapos, 11 Queguay, 12 Salto, 13 Rincón de Franquía, 14 Bajo Delta, 15 El Palmar, 16 San Javier, 17 Cerro Tuna, 18 Iberá, 19 Andresito, 20 Eñe, 21 Loreto, 22 Arizona, 23 Maroma, 24 Jerovia, 25 Sauces, 26 Laguna Rey, 27 Loma Plata, 28 Toledo, 29 Lapacho, 30 Mariscal, 31 Olimpo, 32 Bahía Negra. El tamaño de los círculos es proporcional al número de muestras por localidad.

Análisis de estructura poblacional

El AMOVA confirmó una significativa diferenciación genética entre las poblaciones estudiadas (54,90% de la variación genética, $\phi_{ST} = 0,54897$, $p < 0,001$) (Tabla 2).

La agrupación basada en provincias biogeográficas no fue aceptada como única hipótesis. Si bien, la proporción de la variación entre las provincias biogeográficas fue considerable (31,18%), la variación entre poblaciones dentro de estas tuvo un valor similar (29,15%); además, la principal fuente de variación se halló dentro de las poblaciones (39,66%). Por otro lado, la agrupación basada en cuencas explicó de mejor manera la distribución de la variación genética ya que se obtuvieron grupos más homogéneos. La variación entre poblaciones dentro de las cuencas (20,09%) fue considerablemente menor que la variación entre estas (38,76%). La principal fuente de variación, como en el caso anterior, se encontró dentro de las poblaciones (41,15 %) (Tabla 2).

Con el análisis de SAMOVA el mejor modelo determinó 4 grupos: Uruguay, Argentina-Paraguay, Paraguay II y Paraguay III (Figura 5; Tabla suplementaria 4). La principal fuente de la variación se encontró entre los grupos (57,64%), además minimizó considerablemente el porcentaje de variación dentro de los grupos (4,78%). El valor de ϕ_{CT} (0,57642) fue considerablemente mayor que el de ϕ_{SC} (0,11278). En base a estos resultados se consideró la agrupación del SAMOVA como la más adecuada (Tabla 2).

Se evaluaron los valores pareados de ϕ_{ST} para las agrupaciones según el SAMOVA. Todas las comparaciones entre grupos fueron significativas e indicaron estructuración genética alta ($\phi_{ST} \geq 0,30$) (Tabla 3). Las estimaciones del número de migrantes por generación entre los grupos fueron menores a 1 en la mayoría de los casos. La excepción fue entre Paraguay II y Paraguay III con aproximadamente un migrante por generación.

Los índices de diversidad genética fueron calculados para los grupos obtenidos por SAMOVA. En general se encontraron niveles moderados de diversidad haplotípica y nucleotídica (Tabla 4).

Tabla 2. Análisis de la Varianza Molecular (AMOVA) para los 4 agrupamientos. La significancia se testeó mediante 10.000 permutaciones. Todos los valores fueron significativos ($p < 0,001$).

	Componentes de la varianza	% total de la varianza	Estadísticos ϕ
Sin regionalización	Entre poblaciones	54,90	$\phi_{ST} = 0,54897$
	Dentro de las poblaciones	45,10	
Cuencas	Entre cuencas	38,76	$\phi_{CT} = 0,38759$
	Entre poblaciones dentro de las cuencas	20,09	$\phi_{SC} = 0,32802$
	Dentro de las poblaciones	41,15	$\phi_{ST} = 0,58847$
Provincias biogeográficas	Entre provincias	31,18	$\phi_{CT} = 0,31182$
	Entre poblaciones dentro de las provincias	29,15	$\phi_{SC} = 0,42364$
	Dentro de las poblaciones	39,66	$\phi_{ST} = 0,60336$
SAMOVA	Entre grupos	57,64	$\phi_{CT} = 0,57642$
	Entre poblaciones dentro de grupos	4,78	$\phi_{SC} = 0,11278$
	Dentro de las poblaciones	37,58	$\phi_{ST} = 0,62419$

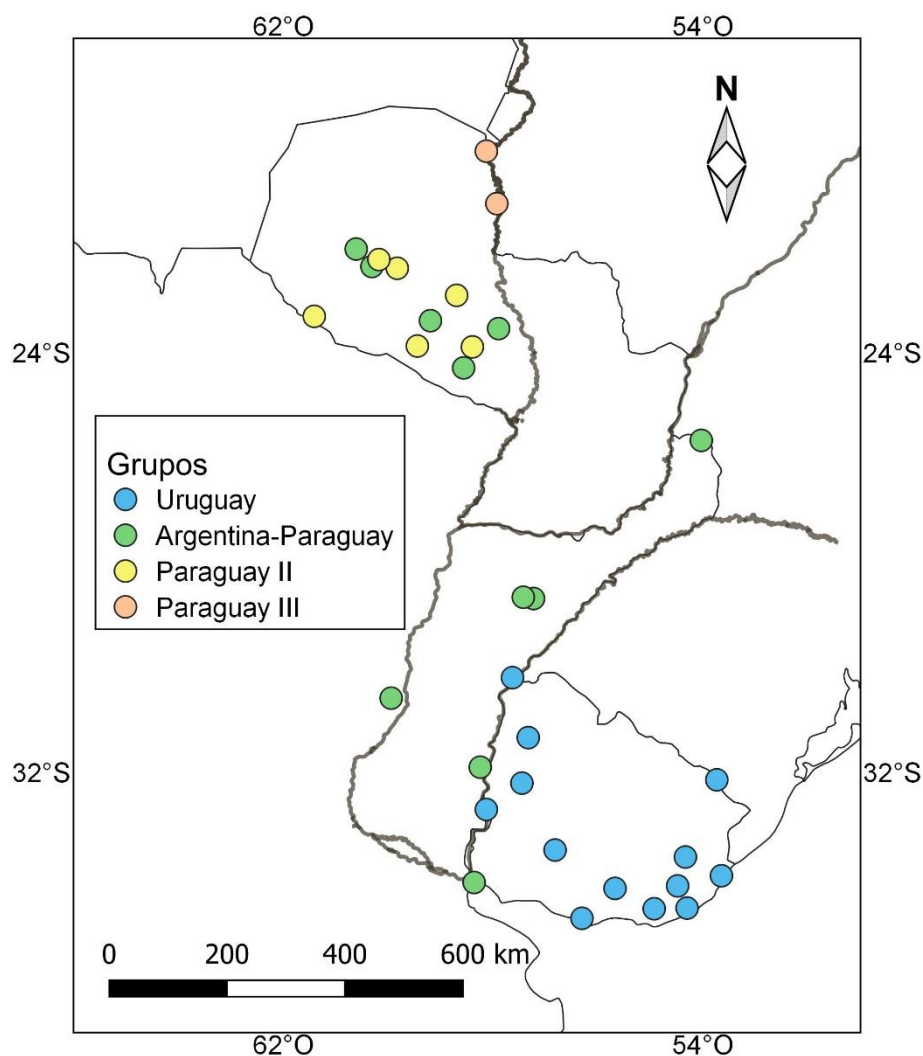


Figura 5. Agrupación geográfica sugerida por el Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA).

Tabla 3. Diferenciación entre los grupos detectados por el Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA) y estimaciones de flujo génico. Debajo de la diagonal: comparaciones pareadas de los índices de fijación (ϕ_{ST}). La significancia se testeó mediante 10.000 permutaciones. Todos los valores fueron significativos ($p < 0,001$). Encima de la diagonal: número de migrantes (N_m) entre grupos, calculados a partir de las comparaciones pareadas.

	Uy	Ar-Py	Py II	Py III
Uy		0,39853	0,23281	0,21211
Ar-Py	0,55646		0,37213	0,25065
Py II	0,68230	0,57331		1,14879
Py III	0,70214	0,66609	0,30325	

Tabla 4. Diversidad genética, y parámetros y estadísticos demográficos para los 4 grupos identificados por el Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA). SSD: suma de los desvíos cuadrados. r: índice de irregularidad de Harpending. N/A: El procedimiento de mínimos cuadrados para ajustar el modelo de la distribución de las diferencias pareadas y la distribución observada no convergió después de 2000 pasos.

	Uy	Ar-Py	Py II	Py III
Número de individuos	45	104	51	21
Diversidad genética				
Número de haplotipos	6	11	3	7
Diversidad haplotípica	0,609	0,632	0,416	0,710
Diversidad nucleotídica	0,00311	0,00438	0,00679	0,01535
Número de transiciones	5	7	5	12
Número de transversiones	0	1	0	0
Número de sustituciones	5	8	5	12
Historia demográfica				
D de Tajima (p)	-0,82769 (0,215)	-0,72447 (0,266)	1,20095 (0,885)	0,45326 (0,732)
Fs de Fu (p)	-1,98961 (0,087)	-4,61625 (0,029)	3,99090 (0,955)	0,82470 (0,689)
τ	0,875	1,010	0.000	7,564
τ qt 2.5%	0,35937	0,14452	0.00000	2,29498
τ qt 97.5%	1,21680	2,65236	3,05667	44,56504
SSD (p)	N/A	0,00131 (0,406)	N/A	0,08724 (0,056)
r (p)	N/A	0,04864 (0,610)	N/A	0,21186 (0,048)

Historia demográfica

Los valores de los test D de Tajima y Fs de Fu fueron negativos para Uruguay y Argentina-Paraguay, y positivos para Paraguay II y III, aunque estos no fueron significativos en ninguno de los casos (Tabla 4).

Respecto a los análisis de “mismatch distribution” las gráficas para Uruguay y Argentina-Paraguay presentaron una distribución unimodal, mientras que para los demás grupos la distribución fue multimodal (Figura 6). Para el grupo Argentina-Paraguay los estadísticos r y el SSD presentan valores no significativos, indicadores de expansión demográfica (Tabla 4).

La distribución unimodal de las diferencias pareadas y valores no significativos para el r y el SSD sugieren que para el grupo Argentina-Paraguay no se puede rechazar el modelo de expansión repentina. El tiempo desde la expansión demográfica para los tres valores de tasas de sustitución 3×10^{-7} , 5×10^{-7} y 7×10^{-7} sustituciones/sitio/año fue estimado en 6871, 4122 y 2945 años respectivamente, con un intervalo de confianza total de entre 18000-400 años. La precisión del estimativo τ fue baja debido a la amplitud del intervalo de confianza de 95% para este grupo (Tabla 4).

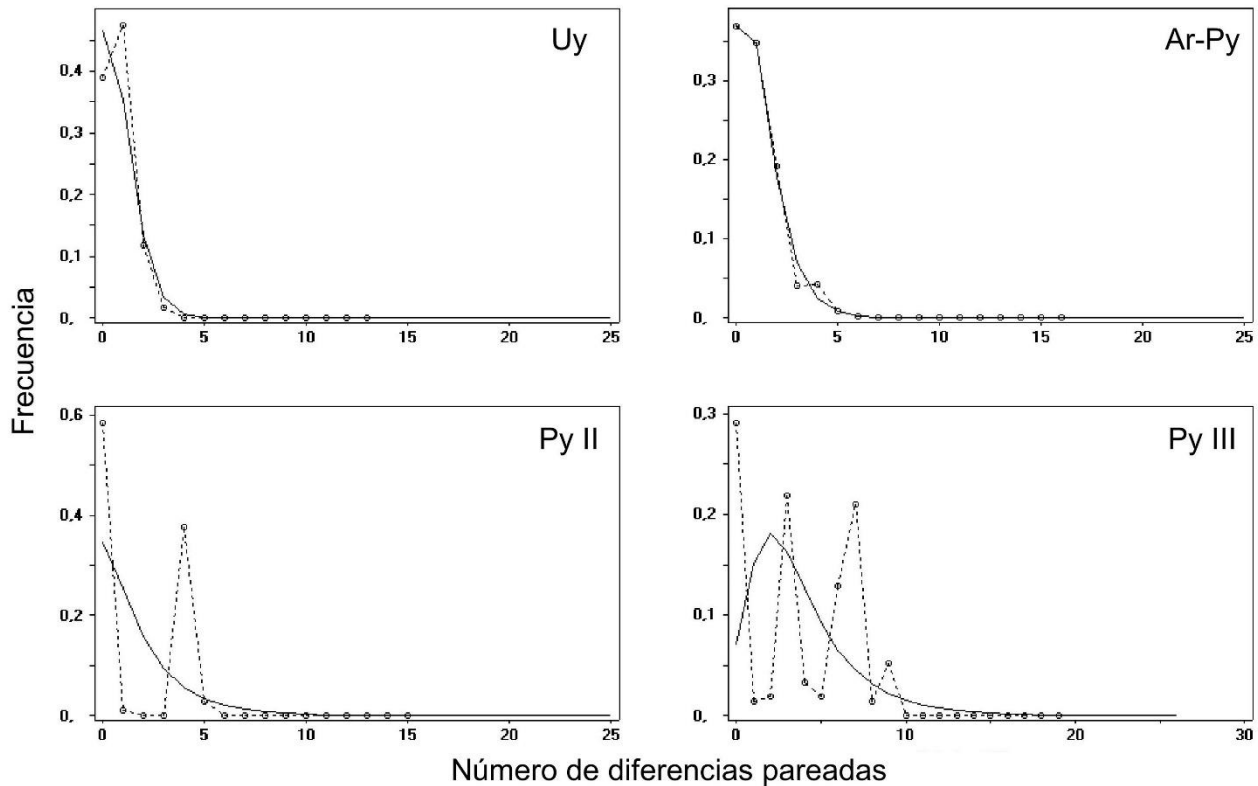


Figura 6. Análisis demográficos utilizando el modelo de distribución de las diferencias pareadas (“mismatch distribution”) para los grupos identificados. Con línea solida se representa la distribución esperada y con línea punteada la distribución observada.

Análisis filogenéticos y red de haplotipos

Mediante el método de máxima parsimonia se obtuvieron 5 árboles igualmente parsimoniosos de 63 pasos y un índice de consistencia (número mínimo de pasos/ número de pasos observado) de 0,88. Por otra parte, el árbol de máxima verosimilitud obtuvo un valor de logaritmo de verosimilitud de -623,60. Ambas filogenias generaron topologías concordantes. En ninguno de los casos se pudieron resolver las relaciones a nivel intraespecífico. Ambos árboles sugieren la presencia de 2 clados con alto soporte de Bootstrap: haplotipos G, H y J y haplotipos K y L. Para los demás haplotipos no se pudieron dilucidar las relaciones, ninguna agrupación tuvo suficiente apoyo estadístico (Bootstrap $\geq$

50) y todos colapsaron en una gran topología basal (Figura 7).

La red de haplotipos se clasificó acorde al agrupamiento propuesto por SAMOVA. Por un lado, un conjunto de 14 haplotipos (A, B, C, D, E, F, I, M, N, O, P, Q, R y S) se encuentran muy interconectados y se diferencian por un sólo paso mutacional. Estos haplotipos coinciden con los que forman la topología basal en los árboles filogenéticos. Por otro lado, se observa que los haplotipos G, H y J y los haplotipos K y L conforman 2 grupos identificables y separados de la red por 3 pasos mutacionales en ambos casos (Figura 8) y que corresponden a los clados identificados en los árboles filogenéticos. Se observa que Paraguay III presenta los haplotipos más divergentes y que Paraguay II parece estar representado principalmente por la alta frecuencia del haplotipo G. En cambio, Argentina-Paraguay es el grupo con mayor número de haplotipos, la mayoría de estos forman parte de la red compleja. Finalmente, la mayoría de los haplotipos hallados en Uruguay son compartidos con los del grupo anterior (I, O, R y Q) y dos haplotipos se encontraron sólo aquí (S y P). Cabe mencionar, que Uruguay es el único grupo que no tiene representantes de los haplotipos más abundantes, A y G.

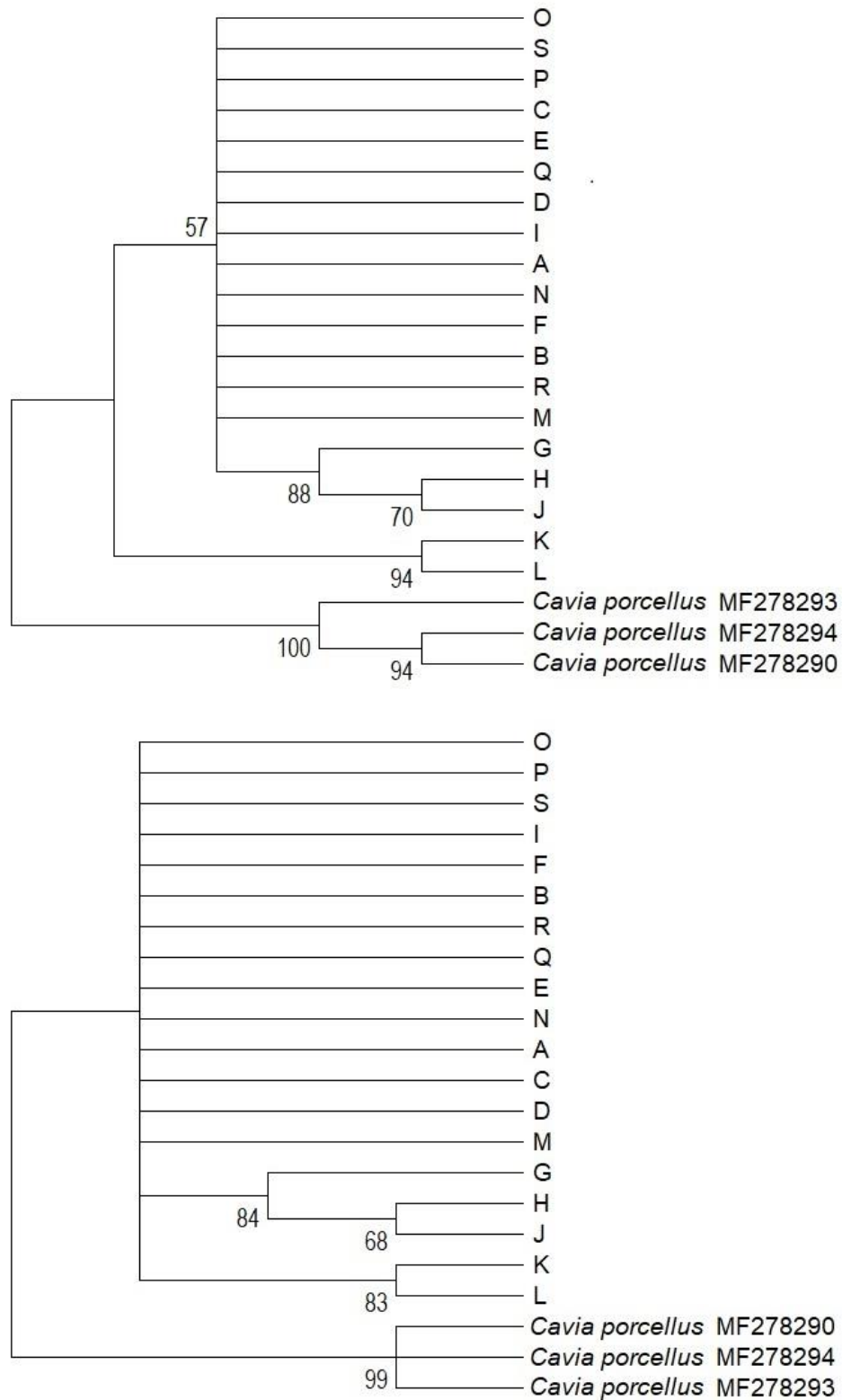


Figura 7. Árboles filogenéticos construidos a partir de los métodos de máxima parsimonia (arriba) y máxima verosimilitud (abajo) para el fragmento de D-Loop. Se muestran los nodos con apoyo de Bootstrap ≥ 50 .

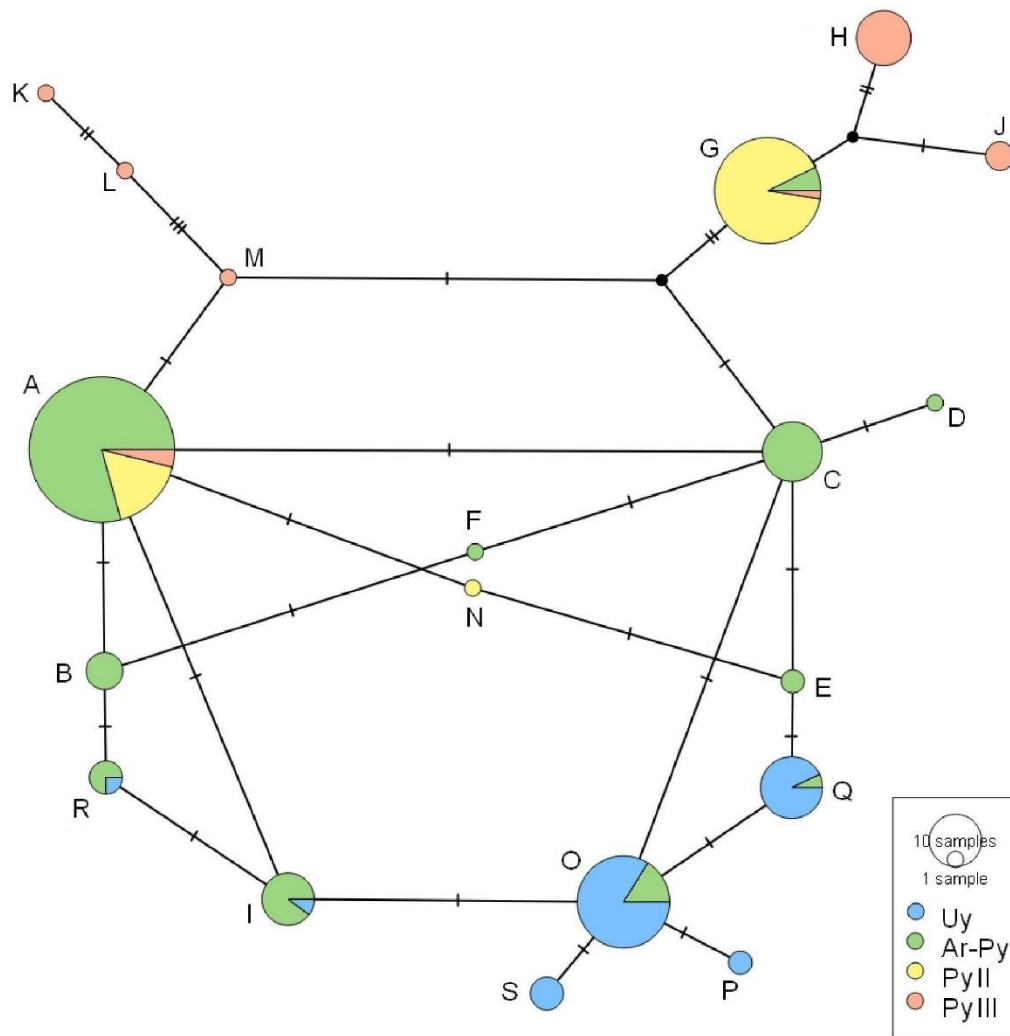


Figura 8. Red de haplotipos a partir del método de unión por la mediana. Los colores corresponden a la clasificación propuesta por el Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA).

Discusión

Variabilidad genética en la especie

La alta variabilidad de la región D-loop mitocondrial se distribuye de forma diferencial a lo largo del fragmento. Siguiendo la determinación de la región control para algunos roedores histricomorfos por Silva et al. (2011) se determinó que 91 pb del fragmento de 245 pb corresponden al dominio central de la región control (aproximadamente el 37,1% del fragmento). Esta región es bastante conservada, incluso entre géneros, por lo cual es esperable que la variación intraespecífica sea baja. Mora et al. (2006) estudiaron la filogeografía del tuco-tuco del sur (*Ctenomys australis* Rusconi, 1934), un cávido, utilizando un fragmento de 403 pb de la región control para 70 individuos e identificaron 24 haplotipos determinados por 19 sitios polimórficos (GenBank, números de acceso: DQ416717-DQ416740). El fragmento que emplearon contiene en su totalidad al utilizado en este estudio. Al alinear y reducir la longitud de las secuencias de tuco-tuco en base a las de carpincho se obtuvieron secuencias de 243 pb y solamente se identificaron 9 haplotipos determinados por 6 sitios polimórficos.

Para el fragmento analizado en este trabajo la proporción de sitios polimórficos fue baja y solamente se encontraron 18 sitios variables en un fragmento de 245 pb. La mayoría fueron transiciones, sólo se encontró una transversión y ninguna inserción/delección. Además, sólo se hallaron 19 haplotipos a partir de 221 individuos. En comparación, utilizado un fragmento de 386 pb se hallaron 26 sitios variables y 21 haplotipos para los 155 individuos de Uruguay y Paraguay.

Patrones filogeográficos

Se halló diferenciación genética significativa entre las poblaciones. Las hipótesis de estructura poblacional según provincias biogeográficas o cuencas no fueron adecuadas para explicar las diferencias genéticas entre las muestras de carpinchos estudiadas. Alternativamente, la clasificación propuesta por SAMOVA maximiza el porcentaje de varianza entre grupos y minimiza los porcentajes de varianza dentro de los grupos, aunque es compleja de explicar desde un punto de vista estrictamente geográfico, por lo que otros procesos deben ser tomados en cuenta.

El grupo Paraguay III, que comprende las poblaciones de Olimpo y Bahía Negra también fue considerado en el trabajo de Campos-Krauer & Wisely (2010). Los autores proponen que la persistencia de bosque tropical seco habría aislado estas poblaciones de aquellas ubicadas en el centro y oeste del Gran Chaco. Por otro lado, estas poblaciones se localizan en el Pantanal, el humedal más grande y biodiverso del planeta (Lourival et al., 2009), en el cual los carpinchos están ampliamente distribuidos (Lacher & Gonçalves, 1988; Alho, 2008). Tamaños poblacionales grandes y dispersión entre parches podrían ser los factores que explican la alta diversidad genética del grupo Paraguay III (Figura 4; Tabla 4).

Los otros dos grupos (Paraguay II y Argentina-Paraguay) se encuentran en simpatría en el Chaco Paraguayo. Campos-Krauer & Wisely (2010) mediante un análisis filogenético detectaron la presencia de 2 filogrupos distintos que contactaron secundariamente a lo largo del Chaco. Según sus resultados, estos habrían divergido hace 40.000-10.000 años, durante el Pleistoceno Tardío. Carlini et al. (2004) sugieren condiciones áridas o semiáridas durante intervalos del Pleistoceno para el centro-norte de Argentina, Paraguay y el sur de Bolivia, por lo cual es posible que las poblaciones de carpincho estuvieran aisladas en refugios pleistocénicos. Lamentablemente, no se cuenta con información sobre el origen geográfico de estos filogrupos debido a que el estudio de Campos-Krauer & Wisely (2010) se enfocó en poblaciones que se habrían expandido recientemente por el Chaco Paraguayo. El análisis de estructura genética del presente estudio otorga evidencia a favor de la teoría del contacto secundario entre filogrupos, aunque la diferenciación entre Paraguay II y Argentina-Paraguay debe ser tomada con cautela. Es probable que el número de migrantes entre las poblaciones de los grupos este subestimado debido al estadístico utilizado. Los estadísticos ϕ contemplan el número de sustituciones entre haplotipos, por lo cual la presencia mayoritaria del haplotipo G en Paraguay II, que está a numerosos pasos mutacionales de los haplotipos de Argentina-Paraguay es una de las causas principales del marcado resultado en la estructura genética.

El grupo Argentina-Paraguay comprende un continuo a través de las provincias biogeográficas del Chaco y la Pampa. Esto concuerda con los resultados de Byrne et al. (2019), que proponen que los ríos Paraná y Paraguay actuarían como corredores biológicos conectando las poblaciones de estas provincias.

Finalmente, las poblaciones de Uruguay se identifican como un grupo diferenciado del resto. Por un lado, la diferenciación respecto a los grupos identificados exclusivamente en Paraguay podría deberse a las grandes distancias geográficas y que no hay cursos de agua que conecten las localidades. No obstante, es sorprendente la alta diferenciación entre Uruguay y el grupo Argentina-Paraguay ya que existe una gran proximidad con las muestras de Argentina y porque el río Uruguay no debería ser una barrera para el carpincho. Sin embargo, los resultados sugieren que hay menos de un migrante por generación entre estas unidades. Ya que no es fácil explicar esta diferenciación por aspectos geográficos, se evalúan otros factores como causas históricas y/o comportamentales. Según Kerber & Ribeiro (2011) el límite de distribución de esta especie durante el Pleistoceno estaba en el norte de Uruguay, mientras que hoy está en la provincia de Buenos Aires; por lo cual se puede asumir que el desplazamiento de la especie, en la región, fue de norte a sur. Es posible que el carpincho haya colonizado la mesopotamia argentina principalmente por el río Paraná, mientras que la colonización de Uruguay podría haber ocurrido principalmente por el río Uruguay y el sistema de lagunas y ríos costeros. La presencia del haplotipo A desde Bahía Negra hasta Bajo Delta, y su ausencia en las poblaciones uruguayas está en concordancia con esta hipótesis.

A su vez ciertos aspectos comportamentales podrían contribuir a mantener esta diferenciación. Congdon (2007) halló que la dispersión en los carpinchos de los llanos venezolanos está sesgada principalmente a los machos, con la mayoría de éstos emigrando

de sus grupos natales antes de reproducirse por primera vez; en cambio las hembras serían filopátricas. Por otro lado, Herrera et al. (2011) sostienen que este fenómeno está vinculado a grandes densidades poblacionales. Los marcadores mitocondriales únicamente reflejan los procesos históricos de las hembras, por lo tanto, estudios basados en marcadores nucleares o en el cromosoma sexual Y de los machos pueden revelar un patrón distinto al hallado en este estudio. Por otro lado, Herrera (2013) describe a los grupos de carpinchos como sociedades cerradas, estables y territoriales. Es probable entonces que exista una preferencia por reproducirse con individuos que identifican como más cercanos a su grupo. Para poner a prueba éstas hipótesis, sería necesario avanzar en el estudio del comportamiento, áreas de actividad ("home ranges", en inglés) y estado de las poblaciones en el litoral del río Uruguay.

Byrne et al. (2019) postularon que la diversidad genética para las poblaciones de la región Chaco-Pampeana es baja en relación a lo reportado en otros estudios. Particularmente, la diversidad genética del grupo Uruguay ($H_d = 0,609$, $\pi = 0,00311$) fue incluso menor que la hallada para el grupo Argentina-Paraguay ($H_d = 0,632$, $\pi = 0,00438$). En concordancia con lo postulado, los valores obtenidos en este estudio son menores que los hallados en poblaciones al norte de Sudamérica, como reportan Borges-Landáez et al. (2012) en los llanos venezolanos ($H_d = 0,76$, $\pi = 0,0065$) o Alonso Moreno en los llanos colombianos ($\pi = 0,010$). La diferencia podría deberse al tamaño y región comprendida del fragmento analizado (ver más arriba) o cuestiones de muestreo. Sin embargo, no deben descartarse otros fenómenos que puedan estar afectando las poblaciones de la región Chaco-Pampeana.

Respecto a los árboles filogenéticos, ambos determinaron la presencia de 2 clados con alto soporte estadístico: haplotipos G, H y J y haplotipos K y L. Estos son fácilmente identificables en la red de haplotipos por estar a varios pasos mutacionales del conjunto de haplotipos separados por un paso. Como mencionan Campos-Krauer & Wisely (2010) las fluctuaciones climáticas del Pleistoceno favorecieron los fenómenos de vicarianza y divergencia en la megafauna asociada a cuerpos de agua. Por ejemplo, Márquez et al. (2006) reportan este tipo de fenómenos para las poblaciones más australes del ciervo de los pantanos (*Blastocerus dichotomus* (Illiger, 1815)). En concordancia con lo mencionado previamente, la separación de las poblaciones de carpincho en refugios pleistocénicos es una hipótesis plausible para explicar la divergencia encontrada entre haplotipos en Paraguay.

Por otro lado, las relaciones filogenéticas entre los demás haplotipos son inciertas, por lo cual es difícil realizar inferencias sobre estos. Posiblemente el tamaño del fragmento no haya permitido una buena discriminación. Cabe mencionar que a diferencia de lo que hallaron Byrne et al. (2019), en este estudio no se encontró evidencia robusta de que los haplotipos A, B, I, M y N; y C, D, E y F correspondan a 2 clados distintos.

Historia demográfica

Aunque los valores de los test de neutralidad no fueron significativos, el análisis de “mismatch distribution” no descarta la existencia de un proceso de expansión poblacional para el grupo Argentina-Paraguay, que según los estimativos habría ocurrido hace 7000-3000 años. Este intervalo coincide en su mayoría con un período del Holoceno conocido como *Optimum Climaticum* que ocurrió hace unos 8500-3500 años atrás y en el cual se comenzó a registrar un incremento en la temperatura, la humedad y las precipitaciones en la planicie Chaco-Pampeana (Iriondo & García, 1993). Estos cambios podrían haber aumentado los ambientes adecuados para la especie favoreciendo su expansión. De hecho, Byrne et al. (2019) en su análisis dataron la expansión poblacional de un haplogrupo (formado por los haplotipos C, D, E y F, hallados exclusivamente en el grupo Argentina-Paraguay de este trabajo) hace aproximadamente 4000 años. No obstante, es importante destacar que el intervalo de confianza al 95% calculado en este trabajo fue amplio, por lo cual el rango en el cual habría ocurrido la expansión poblacional se ubicaría entre el final del Pleistoceno y el Holoceno.

Implicancias para la conservación

Uno de los objetivos de la genética de la conservación es determinar unidades de manejo (UMs), que representan poblaciones demográficamente independientes. Originalmente se identificaban, en base a diferencias estadísticamente significativas de frecuencias alélicas (nucleares o mitocondriales) sin considerar la diferenciación filogenética de los alelos en cuestión (Moritz, 1994; Fraser & Bernatchez, 2001). Adicionalmente, Wang (2004) sostiene que menos de un migrante efectivo por generación es un umbral válido para determinar que 2 poblaciones pertenecen a UMs distintas. En base a esto, se podría considerar que las poblaciones de carpinchos de Uruguay pertenecen a una UM distinta a la de Argentina y Paraguay. No obstante, algunos autores sostienen que una formulación más adecuada de las UMs requiere de objetivos de manejo claros y evaluaciones de riesgos (Taylor & Dizon, 1999), así como el uso información demográfica (Palsbøll et al., 2007).

Conclusiones

- No se encontró estructuración dentro de Uruguay, en concordancia con lo propuesto por Cosse et al. (2019). Por otro lado, en base a las frecuencias alélicas se halló que las poblaciones analizadas de Uruguay son diferentes a aquellas en Argentina y en Paraguay. Se propone que la divergencia entre éstas, se habría dado por la pertenencia a distintos sistemas de cuencas.
- Se corroboró que existen conexiones entre algunas poblaciones de Argentina y Paraguay, probablemente por los ríos Paraguay y Paraná. La presencia de distintos grupos en Paraguay podría explicarse debido a que las oscilaciones climáticas del Pleistoceno favorecieron fenómenos de vicarianza y divergencia.

- En general se encontraron niveles bajos a moderados de variación genética para las agrupaciones de las poblaciones. El grupo genéticamente más diverso corresponde al bioma Pantanal, el cual presenta condiciones favorables para la especie. Por otro lado, los niveles de variabilidad genética hallados para las poblaciones del Chaco y la Pampa fueron menores, incluso al compararlas con poblaciones de regiones tropicales.
- No se descarta la hipótesis de expansión poblacional para el grupo Argentina-Paraguay, que según los estimativos habría ocurrido durante el *Optimum Climaticum* del Holoceno, cuando las condiciones ambientales de la llanura Chaco-Pampeana se volvieron favorables para la especie.
- En este estudio se utilizaron primers que permitieron amplificar un fragmento de aproximadamente 500 pb de la región mitocondrial D-loop, incluso a partir de fecas. Sin embargo, se utilizó un fragmento de menor tamaño para poder estudiar la situación regional. Este fue apropiado para estudiar la estructura genética de las poblaciones de carpincho. No obstante, no permitió una discriminación certera de la genealogía de los haplotipos.

Perspectivas

El estudio fue concordante con los trabajos previos. Desafortunadamente no se pudo brindar más información sobre la historia de los filogrupos. Para aclarar el patrón hay ciertas localidades que serían importantes considerar en un futuro estudio: i) límite de distribución de la especie en Buenos Aires, Argentina; ii) Río Grande del Sur, Brasil; iii) región chaqueña, Argentina; iv) Sureste de Paraguay; y v) Pantanal. Adicionalmente, es necesario utilizar un fragmento mayor del D-loop para entender la genealogía de los haplotipos y los procesos que puedan haber afectado a los distintos grupos. El uso de otro marcador mitocondrial, como el citocromo b (cit b), que es más conservado (Arif & Khan, 2009) puede ser útil para entender procesos históricos más antiguos. Por otro lado, el uso de técnicas de modelación de distribución de especies junto a estimativos de los paleoclimas suele emplearse como aproximación complementaria al análisis filogeográfico. Los paleomodelos de distribución se han utilizado para identificar posibles refugios durante las glaciaciones, así como posibles corredores (Richards et al., 2007). El uso de estos quizá pueda brindar información sobre las condiciones que favorecieron la divergencia de los grupos detectados.

Finalmente, para determinar UMs en la región es necesario aumentar el número de muestras para reafirmar este resultado y contrastar principalmente las poblaciones de Uruguay con las de Argentina. Además, se podría complementar el estudio con marcadores nucleares, principalmente microsatélites para analizar procesos recientes. Existen zonas en el litoral del río Uruguay en las cuales se deberían priorizar los muestreos para evaluar el flujo génico entre poblaciones de los 2 países. Profundizar en la situación, así como incorporar estudios demográficos, ecológicos y etológicos es necesario para generar conocimiento que permita desarrollar estrategias de conservación y uso sustentable de esta especie a nivel nacional.

Bibliografía

- Aldana-Domínguez, J., Vieira-Muñoz, M. I. & Bejarano, P. (2013). Conservation and use of the capybara and the lesser capybara in Colombia. En: 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, 321-332.
- Alho, C. J. R. (2008). Biodiversity of the Pantanal: response to seasonal flooding regime and to environmental degradation. *Brazilian Journal of Biology*, 68(4), 957-966.
- Alonso Moreno, Y. L. (2017). Filogeografía y estructura genética del chigüiro *Hydrochoerus hydrochaeris* (Rodentia: Hydrochoeridae) en los llanos orientales de Colombia. Tesis de maestría, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Álvarez, A., Arévalo, R. L. M. & Verzi, D. H. (2017). Diversification patterns and size evolution in caviomorph rodents. *Biological Journal of the Linnean Society*, 121(4), 907-922.
- Ángel-Escobar, D. C. & Aldana-Domínguez, J. (2007). Estructura de las poblaciones del chigüiro (Rodentia: *Hydrochoerus hydrochaeris*) en el departamento del Casanare, Colombia. En: Aldana-Domínguez, J., Vieira-Muñoz, M. I. & Ángel-Escobar, D. C. (Eds.). *Estudios sobre la ecología del chigüiro (Hydrochoerus hydrochaeris): enfocados a su manejo y uso sostenible en Colombia*, Instituto Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, Bogotá D.C., 71-83.
- Arif, I. A. & Khan, H. A. (2009). Molecular markers for biodiversity analysis of wildlife animals: a brief review. *Animal biodiversity and conservation*, 32(1), 9-17.
- Arif, I. A., Khan, H. A., Bahkali, A. H., Al Homaidan, A. A., Al Farhan, A. H., Al Sadoon, M. & Shobrak, M. (2011). DNA marker technology for wildlife conservation. *Saudi journal of biological sciences*, 18(3), 219-225.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., Reeb, C. A. & Saunders, N. C. (1987). Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 489-522.
- Bandelt, H. J., Forster, P. & Röhl, A. (1999). Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, 16(1), 37-48.
- Beebee, T. J. C. & Rowe, G. (2008). *An introduction to molecular ecology*. Oxford University Press, New York.
- Bolkovic, M.L., Quintana, R.D., Ramadori, D., Elisetch, M. & Rabinovich, J. (2006). Proyecto Carpincho. Propuesta para el uso sustentable del Carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en la Argentina. En: Bolkovic, M.L., Ramadori, D. (Eds.). *Manejo de*

Fauna Silvestre en la Argentina, Programas de uso sustentable, Dirección de Fauna Silvestre, Secretaría de Ambiente y Desarrollo Sustentable, Buenos Aires, 105–199.

- Bolkovic, M. L., Quintana, R., Cirignoli, S., Perovic, P. G.; Eberhardt, A., Byrne, S., Bareiro, R., Porini, G. (2019). *Hydrochoerus hydrochaeris*. En: SAyDS–SAREM (Eds.). *Categorización 2019 de los mamíferos de Argentina según su riesgo de extinción*. Lista Roja de los mamíferos de Argentina. Versión digital: <http://cma.sarem.org.ar>.
- 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.
- Boyd, O. F., Philips, T. K., Johnson, J. R. & Nixon, J. J. (2020). Geographically structured genetic diversity in the cave beetle *Darlingtonia kentuckensis* Valentine, 1952 (Coleoptera, Carabidae, Trechini, Trechina). *Subterranean Biology*, 34, 1.
- Brazeiro, A., Cravino, A., Fernández, P., & Haretche, F. (2018). Forestación en pastizales de Uruguay: Efectos sobre la diversidad de aves y mamíferos a escala de rodal y del paisaje. *Revista Ecosistemas*, 27(3), 48-59.
- 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(1), 14-22.
- 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.
- Campos Krauer J. M. (2009). Landscape ecology of the capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) in the Chaco region of Paraguay. Ph.D. dissertation, Kansas State University, Manhattan.
- Campos-Krauer, J. M. & Wisely, S. M. (2010). Deforestation and cattle ranching drive rapid range expansion of capybara in the Gran Chaco ecosystem. *Global Change Biology*, 17(1), 206-218.
- Carleton, M.D. & Musser, G.G. (2005). Order Rodentia. En: Wilson, D. E., Reeder, D. M. (Eds.). *Mammal Species of the World: A Taxonomic and Geographic reference*. Johns Hopkins University Press, Baltimore, 745–752.
- Carlini, A. A., Zurita, A. E., Gasparini, G. & Noriega, J. L. (2004). Los mamíferos del Pleistoceno de la Mesopotamia argentina y su relación con los del Centro Norte de La Argentina, Paraguay, y sur de Bolivia, y los de Sur de Brasil y Oeste de Uruguay: Paleobiogeografía y Paleoambientes: Tucumán, Insugeo. *Miscelánea*, 12(8), 83-90.
- 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.

- Cosse, M., Mannise, N., Bou, N. & Bruno, A. (2019). Genética del paisaje: el carpincho como herramienta para evaluar conectividad de humedales en Uruguay. Presentado a la división Sistema Nacional de Áreas Protegidas (SNAP).
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. & Posada, D. (2012). jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature methods*, 9(8), 772-772.
- D'Elía, G., Fabre, P. H. & Lessa, E. P. (2019). Rodent systematics in an age of discovery: recent advances and prospects. *Journal of Mammalogy*, 100(3), 852-871.
- Deschamps, C. M., Olivares, A. I., Vieytes, E. C. & Vucetich, M. G. (2007). The oldest capybaras (Rodentia, Hydrochoeridae; Late Miocene of Argentina): ontogeny and diversity. *Journal of vertebrate Paleontology*, 27(3), 683-692.
- Deschamps, C. M., Vieytes, E. C., Olivares, A. I. & Vucetich, M. G. (2009). Primer registro de *Cardiatherium chasicoense* (Rodentia, Hydrochoeridae) fuera del área pampeana (Argentina) y su valor bioestratigráfico. *Ameghiniana*, 46 (2), 295-305.
- Deschamps, C. M., Vucetich, M. G., Montalvo, C. I. & Zárate, M. A. (2013). Capybaras (Rodentia, Hydrochoeridae, Hydrochoerinae) and their bearing in the calibration of the late Miocene–Pliocene sequences of South America. *Journal of South American Earth Sciences*, 48, 145-158.
- Domínguez-Domínguez, O. & Vázquez-Domínguez, E. (2009). Filogeografía: aplicaciones en taxonomía y conservación. *Animal biodiversity and conservation*, 32(1), 59-70.
- Doumecq Milieu, R. E., Morici, A. & Nigro, N. A. (2012). Ampliación de la distribución austral del carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en la provincia de Buenos Aires, Argentina. *Nótulas Faunísticas*, 92, 1-10.
- Dupanloup, I., Schneider, S. & Excoffier, L. (2002). A simulated annealing approach to define the genetic structure of populations. *Molecular ecology*, 11(12), 2571-2581.
- Excoffier, L. & Lischer, H. E. (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.
- Excoffier, L., Smouse, P. E. & Quattro, J. M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), 479-491.
- Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *evolution*, 39(4), 783-791.

- Ferraz, K. M. P. M. 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. M. 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.
- Ferraz, K. M. P. M. B., Peterson, A. T., Scachetti-Pereira, R., Vettorazzi, C. A. & Verdade, L. M. (2009). Distribution of capybaras in an agroecosystem, Southeastern Brazil, based on ecological niche modeling. *Journal of Mammalogy*, 90(1), 189-194.
- Fraser, D. J. & Bernatchez, L. (2001). Adaptive evolutionary conservation: towards a unified concept for defining conservation units. *Molecular ecology*, 10(12), 2741-2752.
- Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2), 915-925.
- González, E. M. & Martínez Lanfranco J. A. (2010). *Mamíferos de Uruguay. Guía de campo e introducción a su estudio y conservación*. Vida Silvestre-Museo Nacional de Historia Natural. Ediciones de la Banda Oriental, Montevideo.
- González, S., Cosse, M., del Rosario Franco, M., Emmons, L., Vynne, C., Duarte, J. M. B., Beccacesi, M. D & Maldonado, J. E. (2015). Population structure of mtDNA variation due to Pleistocene fluctuations in the South American maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*, Illiger, 1815): management units for conservation. *Journal of Heredity*, 106(S1), 459-468.
- González, S., Maldonado, J. E., Leonard, J. A., Vilà, C., Barbanti Duarte, J. M., Merino, M., Brum-Zorilla, N. & Wayne, R. K. (1998). Conservation genetics of the endangered Pampas deer (*Ozotoceros bezoarticus*). *Molecular ecology*, 7(1), 47-56.
- Harpending, H. C. (1994). Signature of ancient population growth in a low-resolution mitochondrial DNA mismatch distribution. *Human biology*, 591-600.
- Hartl, D. L. (2000). *A primer of population genetics*. Sinauer Associates, Sunderland.
- Hasegawa, M., Kishino, H. & Yano, T. A. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of molecular evolution*, 22(2), 160-174.
- Herrera, E. A. (2013). Capybara social behavior and use of space: patterns and processes. En: 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, 195-207.
- Herrera, E. A., Salas, V., Congdon, E. R., Corriale, M. J. & Tang-Martínez, Z. (2011). Capybara social structure and dispersal patterns: variations on a theme. *Journal of Mammalogy*, 92(1), 12-20.

- Hewitt, G. M. (2004). The structure of biodiversity—insights from molecular phylogeography. *Frontiers in zoology*, 1(1), 4.
- Holsinger, K. E. (2012). Tajima's D, Fu's FS, Fay and Wu's H, and Zeng et al.'s E. *Lecture Notes in Population Genetics*, 211-215.
- Horn, S., Prost, S., Stiller, M., Makowiecki, D., & Kuznetsova, T., Benecke, N., Pucher, E., Hufthammer, A., Schouwenburg, C., Shapiro, B. & Hofreiter, M. (2014). Ancient mitochondrial DNA and the genetic history of Eurasian beaver (*Castor fiber*) in Europe. *Molecular Ecology*, 23(7), 1717-1729.
- Huchon, D. & Douzery, E. J. (2001). From the Old World to the New World: a molecular chronicle of the phylogeny and biogeography of hystricognath rodents. *Molecular phylogenetics and evolution*, 20(2), 238-251.
- ICMBio/MMA (2018). *Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção: Volume I*. Brasília, DF.
- Iglesias, V. A. (2008). Estudio multidisciplinar de la variabilidad del ADN mitocondrial en poblaciones humanas. Tesis de doctorado, Universidad de Santiago de Compostela, Santiago de Compostela.
- Iriondo, M. H., & García, N. O. (1993). Climatic variations in the Argentine plains during the last 18,000 years. *Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology*, 101(3-4), 209-220.
- IUCN (2016). *Hydrochoerus hydrochaeris*. *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2020-3*. <https://www.iucnredlist.org>. Descargado el 24 de diciembre de 2020.
- Kerber, L., & Ribeiro, A. M. (2011). Capybaras (Rodentia: hystricognathi: Hydrochoeridae) from the late Pleistocene of southern Brazil. *Neues Jahrbuch für Geologie und Paläontologie-Abhandlungen*, 261(1), 1.
- Kohn, M. H. & Wayne, R. K. (1997). Facts from feces revisited. *Trends in Ecology & Evolution*, 12(6), 223-227.
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C. & Tamura, K. (2018). MEGA X: molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547-1549.
- Lacher, T. E. & Gonçalves, H. C. (1988). Environmental degradation in the Pantanal ecosystem. *Bioscience*, 38(3), 164-171.
- Lavocat, R. (1969). La systématique des rongeurs hystricomorphes et la dérive des continents. *CR Acad Sci Paris Sér D*, 269, 1496-1497.
- 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.
- López-Barbella, S. (1987). Consideraciones generales sobre la gestación del chigüire (*Hydrochoerus hydrochaeris*). *Acta Científica Venezolana*, 38, 84-89.
- Lourival, R., McCallum, H., Grigg, G., Arcangelo, C., Machado, R. & Possingham, H. (2009). A systematic evaluation of the conservation plans for the Pantanal wetland in Brazil. *Wetlands*, 29(4), 1189-1201.
- Löwenberg-Neto, P. (2014). Neotropical region: a shapefile of Morrone's (2014) biogeographical regionalisation. *Zootaxa*, 3802(2), 300-300.
- Maldonado-Chaparro, A. & Blumstein, D. T. (2008). Management implications of capybara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) social behavior. *Biological Conservation*, 141(8), 1945-1952.
- Márquez, A., Maldonado, J. E., González, S., Beccaceci, M. D., Garcia, J. E., & Duarte, J. M. B. (2006). Phylogeography and Pleistocene demographic history of the endangered marsh deer (*Blastocerus dichotomus*) from the Río de la Plata Basin. *Conservation Genetics*, 7(4), 563-575.
- Maturrano, H., M Aguilar, J., Krüger, D., Chávez, I., Rosadio, A. & Wheeler, J. C. (2012). Optimización de una técnica para la extracción de ADN de heces de vicuña (*Vicugna vicugna mensalis*). *Revista de Investigaciones Veterinarias del Perú*, 23(3), 369-376.
- Mechoso, C. R., Dias, P. S., Baetghen, W., Barros, V., Berbery, E. H., Clarke, M., Cullen, H., Ereño, C., Grassi, B. & Lettenmaier, D. (2001). Climatology and hydrology of the La Plata Basin. *Document of VAMOS/CLIVAR document*, 55.
- Millien, V. (2008). The largest among the smallest: the body mass of the giant rodent *Josephoartigasia monesi*. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 275(1646), 1953-1955.
- Mones, A. (1975). El carpincho. *Boletín del Museo Nacional de Historia Natural*, 10, 1-4.
- Mones, A. & Ojasti, J. (1986). *Hydrochoerus hydrochaeris*. *Mammalian Species*, (264), 1-7.
- Mora, M. S., Lessa, E. P., Kittlein, M. J., & Vassallo, A. I. (2006). Phylogeography of the subterranean rodent *Ctenomys australis* in sand-dune habitats: evidence of population expansion. *Journal of Mammalogy*, 87(6), 1192-1203.
- Moreira, J. R., & Macdonald, D. W. (1996). Capybara use and conservation in South America. En: Taylor, V. J., & Dunstone, N. (Eds.). *The exploitation of mammal populations*. Springer, Dordrecht, 88-101.

- Moreira, J. R., Wiederhecker, H., Ferraz, K. M. P. M. B., Aldana-Domínguez, J., Verdade, L. M., & Macdonald, D. W. (2013a). Capybara demographic traits. En: 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, 147-167.
- Moreira, J. R., Alvarez, M. R., Tarifa, T., Pacheco, V., Taber, A., Tirira, D. G., Herrera, E. A., Ferraz, K. M. P. B. M., Aldana-Domínguez, J. & Macdonald, D. W. (2013b). Taxonomy, natural history and distribution of the capybara. En: 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, 3-37.
- Morgan, C. C. (2015). The postcranial skeleton of caviomorphs: morphological diversity, adaptations and patterns. En: Vassallo, A. I., Antenucci, D. (Eds.). *Biology of Caviomorph Rodents: Diversity and Evolution*. Series A: Mammalogical Research, vol. 1. Sociedad Argentina para el Estudio de los Mamíferos, Mendoza, 167-198.
- Moritz, C. (1994) Defining 'Evolutionarily Significant Units' for conservation. *Trends Ecology and Evolution*, 9, 373–375
- Morrone, J. J. (2000). What is the Chacoan subregion? *Neotropica*, 46, 51-51.
- Morrone, J. J. (2001). *Biogeografía de América latina y el Caribe*. Manuales & Tesis SEA, Zaragoza.
- Morrone, J. J. (2014). Biogeographical regionalisation of the Neotropical region. *Zootaxa*, 3782(1), 1-110.
- Nei M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. Columbia university press, New York.
- Nielsen, R. (2001). Statistical tests of selective neutrality in the age of genomics. *Heredity*, 86(6), 641-647.
- Ojasti, J. (1973). *Estudio biológico del chigüire o capibara*. Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, Caracas.
- Pakendorf, B. & Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and human evolution. *Annual Review of Genomics Human Genetics*, 6, 165-183.
- Palsbøll, P. J., Berube, M. & Allendorf, F. W. (2007). Identification of management units using population genetic data. *Trends in Ecology & Evolution*, 22(1), 11-16.
- Perdomo, G. (2005). Estructura genética en tres poblaciones de chigüires (*Hydrochoerus hydrochaeris*) de los llanos venezolanos. Tesis de licenciatura, Universidad Simón Bolívar, Caracas.
- Pérez, M. E., Vucetich, M. G., & Deschamps, C. M. (2014). Mandibular remains of

- Procardiomys martinoi* Pascual, 1961 (Hystricognathi, Caviioidea) from the Arroyo Chasicó Formation (early late Miocene) of Argentina: anatomy and the phylogenetic position of the genus within Caviidae. *Historical Biology*, 26(1), 16-25.
- Pérez, M. E., Vallejo-Pareja, M. C., Carrillo, J. D. & Jaramillo, C. (2017). A new Pliocene capybara (Rodentia, Caviidae) from Northern South America (Guajira, Colombia), and its implications for the great American biotic interchange. *Journal of Mammalian Evolution*, 24(1), 111-125.
- Perfectti, F., Picó, F. X., & Gómez, J. M. (2009). La huella genética de la selección natural. *Revista Ecosistemas*, 18(1).
- Popescu, I., Brandimarte, L., Perera, M. S. U. & Peviani, M. (2012). Assessing residual hydropower potential of the La Plata Basin accounting for future user demands. *Hydrology and Earth System Sciences*, 16(8), 2813-2823.
- Quintana, R. D. & Bolkovic, M. L. (2013). Use of capybaras in Argentina. En: 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, 345-356.
- 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>. Descargado el 24 de noviembre de 2020.
- Richards C. L., Carstens B. C. & Knowles L. L. (2007). Distribution modeling and statistical phylogeography: an integrative framework for testing biogeographic hypotheses. *Journal of Biogeography*, 34, 1833–1845.
- Rogers, A. R. & Harpending, H. (1992). Population growth makes waves in the distribution of pairwise genetic differences. *Molecular biology and evolution*, 9(3), 552-569.
- 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 hydrochaeris*; 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(2), 1-20.
- Saccone, C., Pesole, G. & Sbisà, E. (1991). The main regulatory region of mammalian mitochondrial DNA: structure-function model and evolutionary pattern. *Journal of Molecular Evolution*, 33(1), 83-91.
- Saldívar, S., Rojas, V., Giménez, D., Abba, A. M., Ayala, R., Barreto, R., Cartes, J. L., del Castillo, H., Cuéllar, E., de La Sancha, N. U., Gamarra de Fox, I., Giordano, A. J., Kowalewski, M., López, J., Martínez, V., Mujica, N., Neris, N., Ortiz, M. L., Ramírez,

- F., ... Weiler, A. (2017). Los Mamíferos Amenazados del Paraguay. En: Saldívar, S., Rojas, V. & Giménez, D. (Eds.). *Libro Rojo de los Mamíferos del Paraguay: especies amenazadas de extinción*. Asociación Paraguaya de Mastozoología y Secretaría del Ambiente. Editorial CREATIO, Asunción.
- Sanger, F., Nicklen, S., & Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 74(12), 5463-5467.
- Schivo, F., Kandus, P., Minotti, P. & Quintana, R. (2010). Mapa de aptitud ecológica potencial para el carpincho (*Hydrochoerus hydrochaeris*) en la provincia de Corrientes, Argentina. *RASADep*, 1, 83-100.
- Schneider, S., & Excoffier, L. (1999). Estimation of past demographic parameters from the distribution of pairwise differences when the mutation rates vary among sites: application to human mitochondrial DNA. *Genetics*, 152(3), 1079-1089.
- Schwarz, G. (1978). Estimating the dimension of a model. *The annals of statistics*, 461-464.
- SEA (2020). Recuperar para conservar. <http://sea.com.uy/recuperar-para-conservar/>.
- Silva, A., Artiles, A., Suárez, W., & Silva, G. (2011). Sequence and structure of the mitochondrial control region of the Cuban rodent *Capromys pilorides* (Rodentia: Capromyidae). *Biotecnología Aplicada*, 28(3), 136-141.
- Soutullo, A., Clavijo, C. & Martínez-Lanfranco, J. A. (2013). *Especies prioritarias para la conservación en Uruguay. Vertebrados, moluscos continentales y plantas vasculares*. Sistema Nacional de Áreas Protegidas/Dirección Nacional de Medio Ambiente/Ministerio de Vivienda Desarrollo Territorial y Medio Ambiente/Dirección de Ciencia y Tecnología/Ministerio de Educación y Cultura, Montevideo.
- Su, F., Hong, Y., & Lettenmaier, D. P. (2008). Evaluation of TRMM Multisatellite Precipitation Analysis (TMPA) and its utility in hydrologic prediction in the La Plata Basin. *Journal of Hydrometeorology*, 9(4), 622-640.
- Taberlet, P. (1996). The use of mitochondrial DNA control region sequencing in conservation genetics. *Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, New York, 125-142.
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105(2), 437-460.
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123(3), 585-595.
- 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.

- Upham, N. S. & Patterson, B. D. (2015). Evolution of caviomorph rodents: a complete phylogeny and timetree for living genera. En: Vassallo & Daniel Antenucci (Eds.). *Biology of caviomorph rodents: diversity and evolution*. SAREM Series A, Buenos Aires, 63-120.
- Verde Arregoitia, L. D., Teta, P. & D'Elía, G. (2020). Patterns in research and data sharing for the study of form and function in caviomorph rodents. *Journal of Mammalogy*, 101(2), 604-612.
- Vidal, A. M. (2003). Anexo 7-Uruguay. *Administración de derechos de agua*. Food & Agriculture Org, 281-302.
- Volobouev V. T., Gallardo, M. H. & Graphodatsky, A. S. (2006). Order Rodentia. En: O'Brien, S. J., Menninger, J. C. & Nash, W. G. (Eds.). *Atlas of mammalian chromosomes*. John Wiley & Sons, New Jersey, 173-176.
- Voloch, C. M., Vilela, J. F., Loss-Oliveira, L. & Schrago, C. G. (2013). Phylogeny and chronology of the major lineages of New World hystricognath rodents: insights on the biogeography of the Eocene/Oligocene arrival of mammals in South America. *BMC Research Notes*, 6(1), 160.
- Vucetich, M. G., Deschamps C. M. & Pérez M. E. (2012). Paleontology, evolution and systematics of capybara. En: 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 39–59.
- Waits, L. P., & Paetkau, D. (2005). Noninvasive genetic sampling tools for wildlife biologists: a review of applications and recommendations for accurate data collection. *The Journal of Wildlife Management*, 69(4), 1419-1433.
- Wang, J. (2004). Application of the one-migrant-per-generation rule to conservation and management. *Conservation Biology*, 18(2), 332-343.
- Weir, B. S. (1996). *Genetic data analysis II: methods for discrete population genetic data*. Sinauer Associates, Sunderland.

Anexo



Figura suplementaria 1. Cuenca del Plata. Las principales subcuencas son las de Paraná, Paraguay y Uruguay. Estas a su vez pueden subdividirse en distintos tramos. Fuente: CIC Plata (<https://cicplata.org/es/mapas-de-la-cuenca/>).

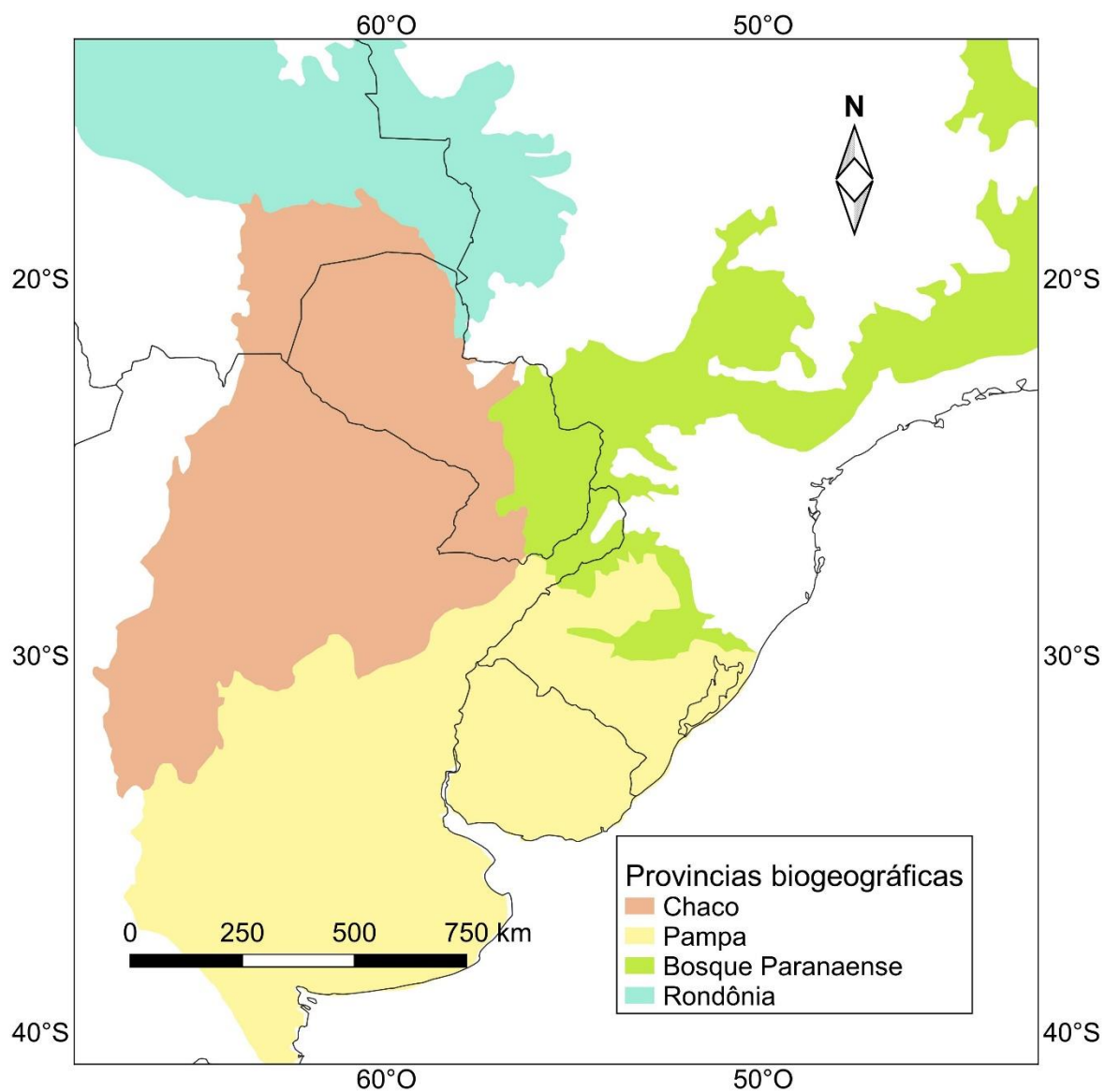


Figura suplementaria 2. Clasificación de provincias biogeográficas según el criterio de Morrone (2014) para la región de estudio. Shapefile obtenido de Löwenberg-Neto (2014).

Tabla suplementaria 1. Sitios de muestreo con sus respectivas coordenadas.

<i>Sitio de muestreo</i>	<i>Coordenadas</i>
<i>Uruguay</i>	
Santa Lucía	34°46' S, 56°19' O
Florida	34°13' S, 55°40' O
Maldonado	34°36' S, 54°56' O
Rocha	34°10' S, 54°29' O
Laguna de Rocha	34°35' S, 54°18' O
Potrillo	33°58' S, 53°39' O
Averías	33°36' S, 54°20' O
Paso Centurión	32°08' S, 53°44' O
Flores	33°28' S, 56°49' O
Farrapos	32°42' S, 58°08' O
Queguay	32°09' S, 57°28' O
Salto	31°20' S, 57°20' O
Rincón de Franquía	30°12' S, 57°37' O
<i>Argentina</i>	
Bajo Delta	34°06' S, 58°22' O
El Palmar	31°54' S, 58°15' O
San Javier	30°35' S, 59°57' O
Cerro Tuna	28°41' S, 57°14' O
Iberá	28°40' S, 57°26' O
Andresito	25°40' S, 54°02' O
<i>Paraguay</i>	
Eñe	24°17' S, 58°34' O
Loreto	23°52' S, 59°27' O
Arizona	23°53' S, 58°24' O
Maroma	23°32' S, 57°54' O
Jerovia	23°23' S, 59°12' O
Sauces	23°18' S, 61°25' O
Laguna Rey	22°54' S, 58°42' O
Loma Plata	22°23' S, 59°50' O
Toledo	22°21' S, 60°19' O
Lapacho	22°13' S, 60°11' O
Mariscal	22°01' S, 60°37' O
Olimpo	21°09' S, 57°56' O
Bahía Negra	20°09' S, 58°08' O

Tabla suplementaria 2. Composición de las agrupaciones según cuencas y provincias biogeográficas. N: número de individuos.

	Grupo (N)	Poblaciones
Cuencas	Santa Lucía (7)	Santa Lucía, Florida
	Océano Atlántico-Laguna Merín (18)	Maldonado, Rocha, Laguna de Rocha, Potrerillo, Averías, Paso Centurión
	Uruguay (27)	Flores, Farrapos, Queguay, Salto, Rincón de Franquía, El Palmar y Cerro Tuna
	Paraná (59)	Bajo Delta, San Javier, Iberá, Andresito
	Paraguay (89)	Eñe, Loreto, Arizona, Maroma, Jerovia, Sauces, Laguna Rey, Loma Plata, Toledo, Lapacho, Mariscal
	Paraguay Alto (21)	Olimpo y Bahía Negra
Provincias biogeográficas	Pampa (82)	Santa Lucía, Florida, Maldonado, Rocha, Laguna de Rocha, Potrerillo, Averías, Paso Centurión, Flores, Farrapos, Queguay, Salto, Rincón de Franquía, Bajo Delta, El Palmar, San Javier, Cerro Tuna
	Chaco (115)	Iberá, Eñe, Loreto, Arizona, Maroma, Jerovia, Sauces, Laguna Rey, Loma Plata, Toledo, Lapacho y Mariscal
	Bosque Paranaense (3)	Andresito
	Rondônia (21)	Olimpo y Bahía Negra

Tabla suplementaria 3. Muestras uruguayas amplificadas en este estudio. Las mismas se encuentran en el banco de tejidos y ADN del Departamento de Biodiversidad y Genética del IIBCE

	Localidad	Tipo de muestra	Haplotipo
ANI37	Paso Centurión	Feca	O
HH4	Maldonado	Pelo	S
HH5	Maldonado	Pelo	Q
HH6	Maldonado	Pelo	S
HH7	Maldonado	Pelo	S
HH8	Maldonado	Pelo	S
HH9	Maldonado	Pelo	O
HH10	Salto	Tejido	Q
HH11	Flores	Feca	O
HH12	Rocha	Feca	Q
HH16	Queguay	Feca	Q
HH17	Queguay	Feca	Q
HH18	Queguay	Feca	Q
HH19	Queguay	Feca	Q
HH22	Queguay	Feca	Q
HH23	Queguay	Feca	O
HH24	Queguay	Feca	O
HH27	Farrapos	Feca	O
HH28	Farrapos	Feca	P
HH35	Farrapos	Feca	O
HH41	Farrapos	Feca	P
HH47	Farrapos	Feca	I
HH48	Farrapos	Feca	O
HH51	Potrillo	Tejido	O
HH53	Potrillo	Tejido	O
HH59	Santa Lucía	Feca	O
HH60	Santa Lucía	Feca	O
HH62	Santa Lucía	Feca	O
HH63	Santa Lucía	Feca	O
HH64	Santa Lucía	Feca	O
HH67	Salto	Tejido	Q
HH68	Salto	Tejido	R
HH69	Laguna de Rocha	Pelo	O
HH70	Laguna de Rocha	Tejido	O
HH72	Farrapos	Tejido	Q
HH73	Rincón de Franquía	Tejido	O
HH75/HH76	Rincón de Franquía	Tejido	O

HH77	Averías	Tejido	O
HH79	Averías	Tejido	Q
HH80	Averías	Tejido	O
HH81	Averías	Tejido	O
HH84	Averías	Tejido	O
HH86	Averías	Tejido	O
HH88	Florida	Feca	O
HH89	Florida	Feca	O

Tabla suplementaria 4. Composición de la agrupación sugerida por el Análisis Espacial de la Varianza Molecular (SAMOVA). N: número de individuos.

	Grupo (N)	Poblaciones
SAMOVA	Uruguay (45)	Santa Lucía, Florida, Maldonado, Rocha, Laguna de Rocha, Potrerillo, Averías, Paso Centurión, Flores, Farrapos, Queguay, Salto y Rincón de Franquía
	Argentina-Paraguay (104)	Bajo Delta, El Palmar, San Javier, Cerro Tuna, Iberá, Andresito, Eñe, Maroma, Jerovia, Toledo y Mariscal
	Paraguay II (51)	Loreto, Arizona, Sauces, Laguna Rey, Loma Plata y Lapacho
	Paraguay III (21)	Olimpo y Bahía Negra