



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA - PPGZOO**

**FILOGEOGRAFIA DE *CUNICULUS PACA* (LINNAEUS, 1766): UMA ESPÉCIE COM  
AMPLA DISTRIBUIÇÃO NO BRASIL**

**WILLIAM DE OLIVEIRA SANTOS**

**MANAUS – AMAZONAS**

**JUNHO/2024**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ZOOLOGIA - PPGZOO**

**Filogeografia de *Cuniculus paca* (Linnaeus, 1766): uma espécie com  
ampla distribuição no Brasil**

**Discente William de Oliveira Santos**

**Orientador: Izeni Pires Farias**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Zoologia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Zoologia

**Manaus – Amazonas**

**Junho/2024**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237f Santos, William de Oliveira  
Filogeografia de *Cuniculus paca* (Linnaeus, 1766): uma espécie com ampla distribuição no Brasil / William de Oliveira Santos . 2024 39 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Izeni Pires Farias  
Dissertação (Mestrado em Zoologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Variabilidade genética. 2. DNA Barcoding. 3. COI-Citocromo Oxidase subunidade 1. 4. Delimitação. 5. Linhagens evolutivas e estruturação de populações. I. Farias, Izeni Pires. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente eu agradeço à minha humilde e amorosa família, a qual me ensinou sobre a importância de investirmos em nossos estudos desde que eu era pequenino e por sempre confiar nas minhas capacidades. Ao meu pai Welington Nascimento por todo apoio incondicional, financeiro, psicológico e sentimental. À minha mãe Ana Paula Santos por ser meu porto seguro e ter um abraço acalentador, seguido dos conselhos mais sábios. Aos meus irmãos, Ygor Santos e Enzo Santos, por serem meus segundos e terceiros corações fora do peito, que me possibilitaram alguns momentos de lazer, seja assistindo um filme, jogando videogames ou indo à praia, em contato com a natureza a qual amamos tanto. Amo vocês!!!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas pelo financiamento deste projeto de pesquisa através do Edital POSGRAD-2022, tornando possível meu sonho de contribuir erradicando lacunas de conhecimento da sociedade brasileira e de realizar minha pós graduação num dos biomas mais ricos e diversos do planeta. Pelo bolsa auxílio responsável por pagar minha estadia enquanto estava em Manaus.

Ao Programa de Pós-Graduação em Zoologia (UFAM), especialmente à Professora Dra. Cintia Cornelius, Coordenadora do Curso, a qual atendia minhas solicitações sempre prontamente e da melhor maneira possível.

À parceria PPG-FAPEAM, a qual foi possível apresentar resultados prévios deste trabalho 66a comunidade científica no XXXV Congresso Brasileiro de Zoologia, que aconteceu do dia 26 a 29 de fevereiro de 2024 em Porto de Galinhas, PE, Brasil. Além de contribuir ainda mais para a minha formação como pesquisador brasileiro.

À Universidade Federal do Amazonas (UFAM) e ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por todo o apoio estrutural, docente e amparo às nossas necessidades dentro do curso de pós-graduação, assim como agradecer pela doação de amostras que compuseram o escopo deste trabalho.

Aos professores associados ao PPG Zoologia, pelas aulas muito enriquecedoras, de excelente didática e atualizadas, objetivando a melhor formação possível para os discentes matriculados.

À professora Dra. Izeni Pires Farias, minha orientadora, por me acolher no Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) sem mesmo me conhecer, me dando um voto de confiança para desenvolver este trabalho da melhor maneira possível, com responsabilidade, ética, assiduidade e comprometimento. Por me permitir estudar um animal tão carismático como as pacas e por todos os ensinamentos compartilhados, sejam pessoais ou profissionais. Por ser uma mulher de fibra, mãe, multifacetada e que inspira outras meninas e mulheres na Ciência.

À professora Dra. Waleska Gravena, ao professor Dr. Aureo Banhos, à Valéria Nogueira Machado, ao Antônio Rossano, ao Leandro Jerusalinsky por terem cedido amostras para compor o presente estudo.

Ao meus colegas LEGAIS (que fazem parte do LEGAL e que são legais também rs) Adriano Cantuária, Aline Ximenes, Edvaldo Mota, Ingrid Nunes, Juliana Silva, Maria Agostini, Mario Nunes, Mikaela Lima, Nasrah Hamdan, Nayene Silveira, Pedro Bittencourt, Sandra Rangel, todos com sua devida importância, seja com conselhos, dicas, ajuda nos procedimentos laboratoriais e nas análises computacionais. Em especial à Nasrah Hamdan, Mário Nunes e Pedro Bittencourt, que muito pacientemente me recomendaram leituras, me auxiliaram e ensinaram etapas laboratoriais e computacionais complexas com louvor. Vocês são parte integrante do esforço para construir o presente trabalho.

Aos meus amigos da turma de mestrado, Bruna Silva, Fernanda Penafort, Mikaela Lima, Rebeca Cavalcante e Naylana Melo pelas piadas de mau gosto, sem graça, mas que muito fizeram eu me sentir como parte de uma família. Pelas conversas e discussões de nossos projetos, sempre objetivando ampliar nossas visões de mundo, oportunidades acadêmicas e profissionais.

E por último a todos os meus amigos e amigas que construí durante 8 anos vivendo em Manaus sendo apenas um cidadão da Baixada Fluminense/RJ. Adryene Motta, Brenda Pena, Caio Coutinho e Joana Caroline, agradeço por me acompanharem desde a graduação até o fimzinho da pós, atualmente. Vocês foram essenciais para a manutenção de minha saúde mental em dias que me sentia sozinho, longe da família e de minha cidade natal. Obrigado pelos abraços apertados, convites para eventos de socialização, por me abrigarem quando eu não tinha família para passar as festividades quando eu estive longe de casa. Amo vocês!!

Em um mundo onde a interdependência é a essência da nossa jornada, reconheço com humildade que alcançar qualquer coisa significativa é verdadeiramente um esforço coletivo.

Cada passo, cada conquista e cada desafio superado foi possível graças ao apoio, orientação e colaboração de todos vocês. Desde os momentos em que enfrentei dificuldades até os triunfos que celebramos juntos, suas mãos estenderam-se para me ajudar, seus ouvidos estiveram abertos para ouvir e seus corações estiveram sempre alinhados com os meus.

Hoje, estou aqui não como um indivíduo isolado, mas como parte de uma teia intrincada de conexões, onde cada fio contribui para a solidez do todo. Cada palavra encorajadora, cada gesto de bondade e cada momento compartilhado fortaleceu o meu caminho e moldou a pessoa que sou hoje.

## EPÍGRAFE

“Nunca deixe uma alma no mundo dizer que você não pode ser exatamente quem você é!”

- Lady Gaga

## RESUMO

*Cuniculus paca* é o segundo maior roedor dentro do Brasil, pertencente à família Cuniculidae e que tem sua área de distribuição nos neotrópicos, desde Uruguai e Argentina até o Sul do México, amplamente distribuída no território brasileiro. No Brasil, são conhecidas duas subespécies: *C. paca paca* com localidade tipo para Pernambuco e *C. paca mexiana* com localidade tipo para a Ilha de Mexiana no Pará, mas seus limites e área de distribuição ainda são desconhecidos. *Cuniculus paca* é amplamente utilizada como recursos de subsistência pelas comunidades tradicionais, devido aos custos e pela similaridade organoléptica com a proteína de frango, com uma pressão de caça de 0,4 indivíduos/km<sup>2</sup> e estima-se que cerca de 8% de toda carne selvagem consumida seja da espécie. Alguns trabalhos já foram desenvolvidos para a Amazônia internacional, mas ainda nenhum para a Amazônia brasileira, nem em outros biomas do país. Estudos esses que apresentaram resultados parciais por apresentarem N amostral restrito e insuficiente. Neste trabalho utilizamos como marcador molecular o gene mitocondrial da Citocromo Oxidase I (COI), amostrando a maior área possível dentro da distribuição da espécie para o território brasileiro com maior número possível de amostras, também incorporando as sequências geradas em outros estudos para a Amazônia Internacional. Com o auxílio do protocolo de DNA Barcoding, foram analisadas 69 sequências de 26 localidades diferentes ao longo do território brasileiro. Foram realizadas análises de estruturação das populações e delimitações de linhagens evolutivas intraespecíficas para o táxon. Ao todo foram encontradas três populações bem definidas pela análise do fastBAPS, sendo duas na Amazônia e uma na Mata Atlântica, com distâncias genéticas que variaram de 1,92% a 4,52%. Dentro da Amazônia essa variação populacional é observada como duas grandes populações, uma que ocorre no norte da Amazônia e outra que ocorre ao longo das proximidades do Rio Madeira e escudo brasileiro. Quanto às linhagens evolutivas, foram encontradas duas para o território brasileiro, sendo uma amazônica e outra da mata atlântica, identificadas por quatro análises de delimitação: Locmin, PTP, bGMYC e ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery). Essas linhagens não estão associadas à distribuição das subespécies sugeridas para o Brasil, logo, outras amostras de outras regiões devem ser incorporadas em trabalhos futuros para um melhor entendimento das diversidade dentro de *C. paca*.

**Palavras-chave:** Variabilidade genética, DNA Barcoding, COI, Delimitação, Linhagens evolutivas e estruturação de populações

**ABSTRACT**

*Cuniculus paca* is the second largest rodent in Brazil, belonging to the Cuniculidae family and which has its distribution area in the Neotropics, from Uruguay and Argentina to Southern Mexico, widely distributed in Brazilian territory. In Brazil, two subspecies are known: *C. paca paca* with type locality for Pernambuco and *C. paca mexiana* with type locality for Ilha de Mexiana in Pará, but its limits and distribution area are still unknown. *Cuniculus paca* is widely used as subsistence resources by traditional communities, due to the costs and organoleptic similarity with chicken protein, with a hunting pressure of 0.4 individuals/km<sup>2</sup> and it is estimated that around 8% of all meat wild consumed is of the species. Some work has already been developed for the international Amazon, but none yet for the Brazilian Amazon, nor in other biomes in the country. These studies presented partial results due to a restricted and insufficient sample size. In this work, we used the mitochondrial Cytochrome Oxidase I (COI) gene as a molecular marker, sampling the largest possible area within the distribution of the species for the Brazilian territory with the largest possible number of samples, also incorporating sequences generated in other studies for the International Amazon. With the help of the DNA Barcoding protocol, 69 sequences were analyzed from 26 different locations throughout Brazilian territory. Population structuring analyzes and delimitations of intraspecific evolutionary lineages for the taxon were carried out. In total, three well-defined populations were found by the fastBAPS analysis, two in the Amazon and one in the Atlantic Forest, with genetic distances ranging from 1.92% to 4.52%. Within the Amazon this variation is observed as two large populations, one that occurs in the north of the Amazon and another that occurs along the Madeira River and Brazilian shield. Regarding evolutionary lineages, two were found for Brazilian territory, one from the Amazon and the other from the Atlantic forest, identified by four delimitation analyses: Locmin, PTP, bGMYC and ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery). These lineages are not associated with the distribution of the subspecies suggested for Brazil, and therefore other samples from other regions should be incorporated in future work to better understand the diversity within *C. paca*.

**Keywords:** Genetic variability, DNA Barcoding, COI, delimitation, Evolutionary lineages, Population structure

## SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xi
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Uma recente disciplina chamada Filogeografia.....	1
1.2. O objeto de estudo: Aspectos gerais de <i>Cuniculus paca</i> .....	1
1.3. História de vida e conservação de <i>Cuniculus paca</i> .....	3
1.4. Estudos genéticos sobre <i>Cuniculus paca</i> .....	4
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	7
2.1. Área de estudo.....	7
2.2. Obtenção dos tecidos biológicos.....	8
2.3. Obtenção de dados moleculares.....	8
2.3.1. Extração de DNA, quantificação e integridade.....	8
2.3.2. Amplificação do gene COI via Reação em Cadeia da Polimerase.....	9
2.3.3. Purificação e Sequenciamento.....	10
2.4. Análise de Dados.....	10
2.4.1. Alinhamento e edição das sequências.....	10
2.4.2. Análise ABGD (Automatic Barcode Gap Discovery).....	11
2.4.3. Delimitação das linhagens evolutivas.....	11
2.4.4. Análise Bayesiana de estruturação das populações.....	13
2.4.5. Distribuição e frequência de haplótipos.....	14
2.4.6. Distâncias genéticas.....	14
3. RESULTADOS.....	14

3.1. Análise primária para a delimitação das espécies (ABGD).....	17
3.2. Delimitação das linhagens evolutivas.....	18
3.3. Estrutura das populações (Grupos biológicos).....	20
3.4 Genealogia dos haplótipos.....	23
3.5. Estimativas de distância genética.....	25
4. DISCUSSÃO.....	25
4.1. Linhagens evolutivas independentes.....	25
4.2. Estruturação genética na Amazônia.....	27
4.3. Conservação de <i>Cuniculus paca</i> .....	29
5. CONCLUSÃO.....	30
6. REFERÊNCIAS.....	32

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1. Instituições que colaboraram com amostras neste estudo, seus respectivos laboratórios e a quantidade N de amostras cedidas por cada instituição.....	8
Tabela 2. Primers usados no presente estudo para amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial COI (citocromo oxidase subunidade I) (Ivanova <i>et al.</i> ,2012).....	10
Tabela 3. Amostras de <i>Cuniculus paca</i> que compuseram o presente estudo, incluindo sua identificação, haplótipo (H), localidade, Número da Localidade (NL), correspondente ao mapa da figura 8, e linhagem à qual pertence .....	15
Tabela 4. Matriz de distância genética gerada no programa MEGA11 com base na estrutura de populações gerada pelo fastBAPS.....	24

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Perfil de *Cuniculus paca*, Manicoré-AM.....2
- Figura 2. Indivíduos de *Cuniculus paca* descansando em cativeiro.....2
- Figura 3. Distribuição das subespécies de *Cuniculus paca*. Os números indicam a localidade-tipo das subespécies reconhecidas: 1- *C. paca guanta*, 2- *C. paca mexiana*, 3- *C. paca nelsoni*, 4- *C. paca paca*, 5- *C. paca virgatus*. Os limites entre as subespécies não são mostrados pois não são bem definidos. Ilustração por William Santos (2024), adaptado de Pérez (1992) e UICN (2024).....5
- Figura 4. Área amostrada para *C. paca*. Pontos amostrados no ES pertencem à reserva florestal de Sooretama e lá existem sequências geradas no LEGAL/UFAM e também outras obtidas no genbank.....7
- Figura 5. Histograma da distribuição das distâncias genéticas intraespecíficas de *C. paca* gerado na plataforma ABGD web. Nota: nbr= número de comparações pareadas (NBR) que se enquadram nesse intervalo de distância; Dist. value= valores de distância genética.....17
- Figura 6. Esquema resumido das diferentes análises das linhagens evolutivas. Da esquerda pra direita: Árvore ultramétrica gerada no BEAST2; locmin; mPTP; PTP; bGMYC; GMYC; Consensus.....18
- Figura 7. Distribuição geográfica das Linhagens Evolutivas encontradas à luz da delimitação.....19
- Figura 8. Análise populacional obtida através do fastBAPS, onde cada cor representa a clusterização (agrupamento) de sequências genéticas semelhantes.....20
- Figura 9. Mapa de calor (Heatmap) obtido através do fastBAPS do banco de dados de *C. paca* com *Dasyprocta leporina* como outgroup.....22
- Figura 10. Rede reticulada de haplótipos obtida pelo programa POPART. Nela é possível observar os haplótipos por populações, bem como a quantidade de sequências que compartilham aquele haplótipo.....23
- Figura 11. Haplótipos obtidos pelo programa POPART, agora associados à sua coordenada. O tamanho dos círculos representa a quantidade de sequências.....24
- Figura 12. Mapa das áreas que precisam ser mais amostradas para *Cuniculus paca* em vermelho. Pontos brancos correspondem às sequências geradas neste estudo; pretos, sequências provenientes do genbank; azuis, localidades-tipo aproximadas de *Cuniculus paca mexiana* (Ilha Mexiana, PA) e *Cuniculus paca paca* (Pernambuco).....30

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Uma recente disciplina chamada Filogeografia

Desde que foi criada em 1987, a filogeografia vem se consolidando como uma disciplina promissora dentro da área biológica, especialmente porque sumariza conceitos e estudos da genética populacional pautados em processos microevolutivos (mutação, deriva genética e outros) com conceitos da filogenética pautados em macroevolução (especiação e extinção), associando ao tempo e ao espaço geográfico.

Simplificando, a disciplina veio como uma ferramenta muito poderosa para investigar potenciais variações genéticas nas dimensões espaciais e temporais (Avise *et al.*, 1987; Avise *et al.*, 2009). O DNA mitocondrial passou a ser utilizado como recurso genético nas análises filogeográficas para acessar a biodiversidade, investigando o quão próximas e ligadas estão duas ou mais sequências genéticas, devido à algumas propriedades intrínsecas às mitocôndrias animais, a seguir resumidas:

- a) Molécula de DNA matrilinear com recombinação ausente;
- b) Elevado estresse oxidativo, contribuindo para uma maior taxa de mutações dos trechos gênicos;
- c) Alguns genes inacessíveis para a seleção natural, obedecendo ao modelo de neutralidade;
- d) Fornece homologia válida para comparação e análises tanto filogenéticas quanto de genética populacional (Avise *et al.*, 1987; Moritz *et al.*, 1987).

Com um pouco mais de 20 anos de existência, a área acumula mais de 140 mil publicações, distribuídas entre diversas áreas como Biologia Evolutiva, Ecologia, Zoologia, Bioquímica entre outras.

### 1.2. O objeto de estudo: Aspectos gerais de *Cuniculus paca*

A espécie *Cuniculus paca* (Linnaeus, 1766) é conhecida popularmente como paca (Figs. 1 e 2). É uma espécie neotropical de ampla distribuição geográfica (Fig. 3), ocupando a maior parte do território brasileiro, e presente também na maioria dos países da América Central, do sudeste do México ao Panamá, e em outros países da América do Sul, como Uruguai e norte da Argentina (IUCN, 2022). É um dos maiores roedores do Brasil, atrás somente da capivara; possui pelos duros e eriçados, com coloração variando do vermelho ao cinza-escuro; pesam cerca de 6 kg,

podendo atingir o dobro desse peso; apresentam manchas brancas na lateral do corpo; cauda pequena, quase imperceptível, sem pelagem. Seu hábito compreende áreas de ambientes florestados, como mangues, cerrado e áreas ripárias, mas também conseguem ocupar áreas com relativa interferência humana, como pomares e fazendas (Bonvicino, 2008; Patton *et al.*, 2015).



Figura 1. Perfil de *C. paca*, Manicoré - AM  
 Autor: André Ambrozio para iNaturalist



Figura 2. Indivíduos de *C. paca* descansando em cativeiro.  
 Fonte: Adobe Stock

Os estudos de Antoine (2012) concluíram que os estes animais, incluídos na parvordem Caviomorpha, são do clado mais diverso no quesito ecomorfológico, com modificações que surgiram no Eoceno. Seus primeiros registros foram no Peru e, ao longo da sua jornada evolutiva, se dispersaram e passaram a ocupar a região central e Sul das Américas, nos mais diversos ambientes, como Dunas, Pampas, Cerrado, Chaco e Caatingas, Amazônia e florestas úmidas, e a porção mais alta dos Andes. Essa diversidade de ambientes vivenciados refletiu em diferentes hábitos: semiaquático, fossorial, subterrâneo e arbóreo. Estes cenários são perfeitos para estudos relacionados a filogeografia das espécies caviomorfas, onde é possível relacionarmos critérios taxonômicos e evolutivos para saber a história natural das espécies, que no presente estudo será focado na história evolutiva de *Cuniculus paca* (Álvarez *et al.*, 2017).

### 1.3 História de vida e conservação de *Cuniculus paca*

*Cuniculus paca* é uma espécie monogâmica com um casal para a vida, vivendo em média 12 anos. Normalmente fazem uso de uma área de 3 hectares e apresentam organização patriarcal, onde o macho precisa urinar na fêmea para expressar sua dominância. Caso a fêmea não permita, o macho tende a ficar mais agressivo, não ocorrendo a reprodução. São animais solitários e formam famílias bem dispersas, com macho, fêmea e seu filhote (Dubost *et al.*, 2005; Lima, 2017; Bonilla-Morales *et al.*, 2013).

As fêmeas da espécie costumam ter um a dois filhotes por ano, com tempo de gestação de 97 a 118 dias para indivíduos silvestres, e de 148 dias em média para indivíduos em cativeiro. Ambos os sexos normalmente alcançam maturidade sexual entre 8 a 12 meses, com desmame ocorrendo a partir do terceiro mês (Dubost *et al.*, 2005; Lima, 2017; Bonilla-Morales *et al.*, 2013).

Devido ao gosto de sua carne extremamente palatável e apreciada, a espécie vem sofrendo pressão de caça predatória e comércio ilegal nas regiões de sua ocorrência, entretanto quando a população está muito grande, pode causar danos às plantações (Van Vuuren *et al.*, 2003; Bonilla-Morales *et al.*, 2013). Uma das soluções apontadas em estudos recentes é sua criação zootécnica em cativeiros, com ensaios no Brasil, Equador, México e Panamá. Além disso, pode-se utilizar deste artifício para estudos de conservação e pesquisa (Bonilla-Morales *et al.*, 2013; Lima *et al.*, 2017).

O trabalho de Van Vuuren (2003) reporta que apesar da espécie ter importância como recurso de subsistência, existem poucos estudos acerca da genética de populações para pacas. Tal lacuna do conhecimento é preocupante, pois não se conhece a estrutura populacional desse mamífero neotropical (Van Vuuren *et al.*, 2003). A espécie é categorizada como menos preocupante (LC) pela IUCN (União Internacional para a Conservação da Natureza). Mas ao mesmo tempo sofre ameaças como caça e captura terrestre. Estima-se que até 8% da carne selvagem consumida na Amazônia seja de paca (Patton *et al.*, 2015). A caça a esses animais normalmente acontece à noite, com a iluminação da Lua, com uma pressão de caça de 0,4 indivíduos/Km<sup>2</sup> (Bizri *et al.*, 2018; Aquino *et al.*, 2009).

#### 1.4. Estudos genéticos sobre *Cuniculus paca*

Álvarez et al. (2017) realizou um estudo amplo e recente com várias espécies de caviomorfos, incluindo duas espécies do gênero *Cuniculus*: *C. paca* e *C. taczanowskii*, para obter o sequenciamento de quatro marcadores moleculares: dos genes mitocondriais 12S e 16S, de citocromo b (cytb) e de citocromo oxidase I (COI) para lançar inferências sobre a história evolutiva dos caviomorfos. Com isso, então, obtiveram topologias que demonstram as relações evolutivas entre o tamanho corporal e a diversificação dos caviomorfos (Álvarez et al., 2017). Nesta filogenia *Cuniculus paca* e *Cuniculus taczanowskii* (Stolzmann, 1865) formam um clado monofilético. A espécie *C. taczanowskii* ocorre no Peru, Equador, Colômbia e Venezuela, apresentando uma certa sobreposição com a distribuição de *C. paca* no oeste amazônico, Venezuela e algumas ilhas do Caribe (Ríos-Uzeda et al., 2004).

Um estudo específico realizado com *C. paca* por Van Vuuren et al. (2004) para o escudo das guianas demonstrou através do sequenciamento do gene mitocondrial citocromo b que existem ao menos quatro linhagens evolutivas na referida região de estudo. Testes de estrutura populacional (Análises de variância molecular) determinaram que 87% de variação genética é intrapopulacional e 17% de variação genética encontra-se entre as populações amostradas. As análises genealógicas foram baseadas em 22 haplótipos nas populações amostradas e analisadas sob as premissas de máxima verossimilhança, distância genética e métodos de parcimônia. Porém, o estudo não conseguiu identificar áreas de endemismo dos grupos dos haplótipos, ou seja, todas as quatro linhagens tiveram distribuição simpátrica, o que exige cautela na interpretação desses resultados. Estudos como esse que avaliam as variações moleculares e analisam possíveis linhagens evolutivas existentes são escassos na literatura e é de fundamental importância para compreender sua história evolutiva, taxonomia, manejo e conservação desses mamíferos roedores (Van Vuuren et al., 2003).

Trabalhos recentes utilizando o gene COI para identificar animais mortos em estradas utilizaram a metodologia de DNA barcoding e testaram se a metodologia pode ser aplicada em tecidos para identificar taxonomicamente estes animais (Hebert & Gregory, 2005; Klippel et al., 2015). Os resultados mostraram que 138 (cerca de 60%) amostras coletadas puderam ser identificadas a partir da associação à plataforma BOLD (Barcode Of Life Data). Além disso, foram encontradas 62 espécies para a região do Espírito Santo, onde estudos anteriores já relataram a sua ocorrência, reforçando os resultados moleculares com DNA barcoding. (Klippel et al., 2015). Com o uso da metodologia de Barcoding foi possível identificar, entre as amostras,

tecidos de *Cuniculus paca*. Tal espécie possui ampla distribuição e ocorre em todo o Brasil e em outros países (Argentina, Belize, Bolívia, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Trinidad e Tobago, Uruguai e Venezuela) (Fig. 3) (IUCN, 2022).



Figura 3. Distribuição das subespécies de *Cuniculus paca*. Os números indicam a localidade-tipo das subespécies reconhecidas: 1- *C. paca guanta*, 2- *C. paca mexiana*, 3- *C. paca nelsoni*, 4- *C. paca paca*, 5- *C. paca virgatus*. Os limites entre as subespécies não são mostrados pois não são bem definidos. Ilustração por William Santos (2024), adaptado de Pérez (1992) e UICN (2024).

De acordo com Pérez (1992), são conhecidas cinco subespécies para a espécie *Cuniculus paca* (Fig. 3, Pérez 1992) baseadas em padrões de cor e morfologia. A subespécie *Cuniculus paca guanta* (Lonnberg, 1921) ocorre no Equador e leste do Peru, *Cuniculus paca mexiana* (Hagmann, 1913) está distribuída na Ilha Mexiana, no Estado do Pará, Brasil, *Cuniculus paca nelsoni* (Goldmann, 1913) tem sua distribuição associada ao leste do México e já *Cuniculus paca paca* (Linnaeus, 1766) tem maior distribuição dentro do território brasileiro. Por último, a subespécie *Cuniculus paca virgatus* (Bangs, 1902) tem distribuição na América Central, no Panamá e países vizinhos (Wilson & Reeder, 2005).

O uso do DNA barcoding em grupos zoológicos iniciou-se com Hebert et al. (2003) para determinar a identificação taxonômica das espécies através de análises de Citocromo oxidase I (COI) do DNA mitocondrial. É uma ferramenta importante para a identificação de espécies a qual tem tido muito sucesso para diversos grupos animais (Frézal, 2008).

A partir de então, o método de DNA barcoding vem sendo utilizado em muitos trabalhos, uma vez que permite maior agilidade e certeza nas identificações taxonômicas. Auxilia ainda no conhecimento acerca da diferenciação genética populacional, testando modelos e análises distintos (Borisenko et al. 2008, Wilson-Wilde et al. 2010). O uso de tal metodologia no trabalho será importante para testar a presença de linhagens diferentes de *Cuniculus paca* em diferentes regiões do Brasil, bem como, reconstruir árvores filogenéticas para entender a história evolutiva da espécie.

Hipotetizamos que para o território brasileiro é possível que exista mais de uma linhagem evolutiva dentro do táxon *Cuniculus paca* uma vez que se trata de uma grande área geográfica e os estudos genéticos são escassos para o táxon. Porém, acredita-se que rios não exerçam papel de influência no fluxo gênico das populações, uma vez que a espécie tem alta capacidade natatória.

Neste contexto, este estudo se propõe a:

1. Testar a presença de linhagens evolutivas para o táxon de *C. paca* dentro, utilizando o marcador molecular COI associado com o protocolo de DNA barcoding;
2. Inferir sobre a possível estruturação populacional da espécie dentro da região amostrada, ao longo da distribuição das linhagens evolutivas;
3. Estimar a variabilidade genética inter e intrapopulacional para a espécie-alvo deste estudo;
4. Inferir sobre processos evolutivos e filogeográficos causadores das possíveis estruturas genéticas.

Dessa maneira, esperamos conseguir entender a história evolutiva de *Cuniculus paca* no Brasil através do protocolo de DNA barcoding.

## **2. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **2.1. Área de estudo**

Este estudo se propôs a buscar o máximo de amostras dentro da área de distribuição de *C. paca*, conforme mostrado na Figura 2. Para isso, várias coleções biológicas e Museus foram contatados via e-mail da coleção/curador responsável para verificar a existência de tecidos biológicos em

seus respectivos acervos. Além disso, através de uma rede de colaboração prévia em outros trabalhos realizados pelo LEGAL/UFAM, também conseguimos doações/empréstimos destes colaboradores. No entanto, vale ressaltar que apesar de ser uma espécie bem distribuída pelo Brasil, encontramos certo déficit amostral em regiões específicas do Brasil, incluindo coleções bem conhecidas em nosso país.

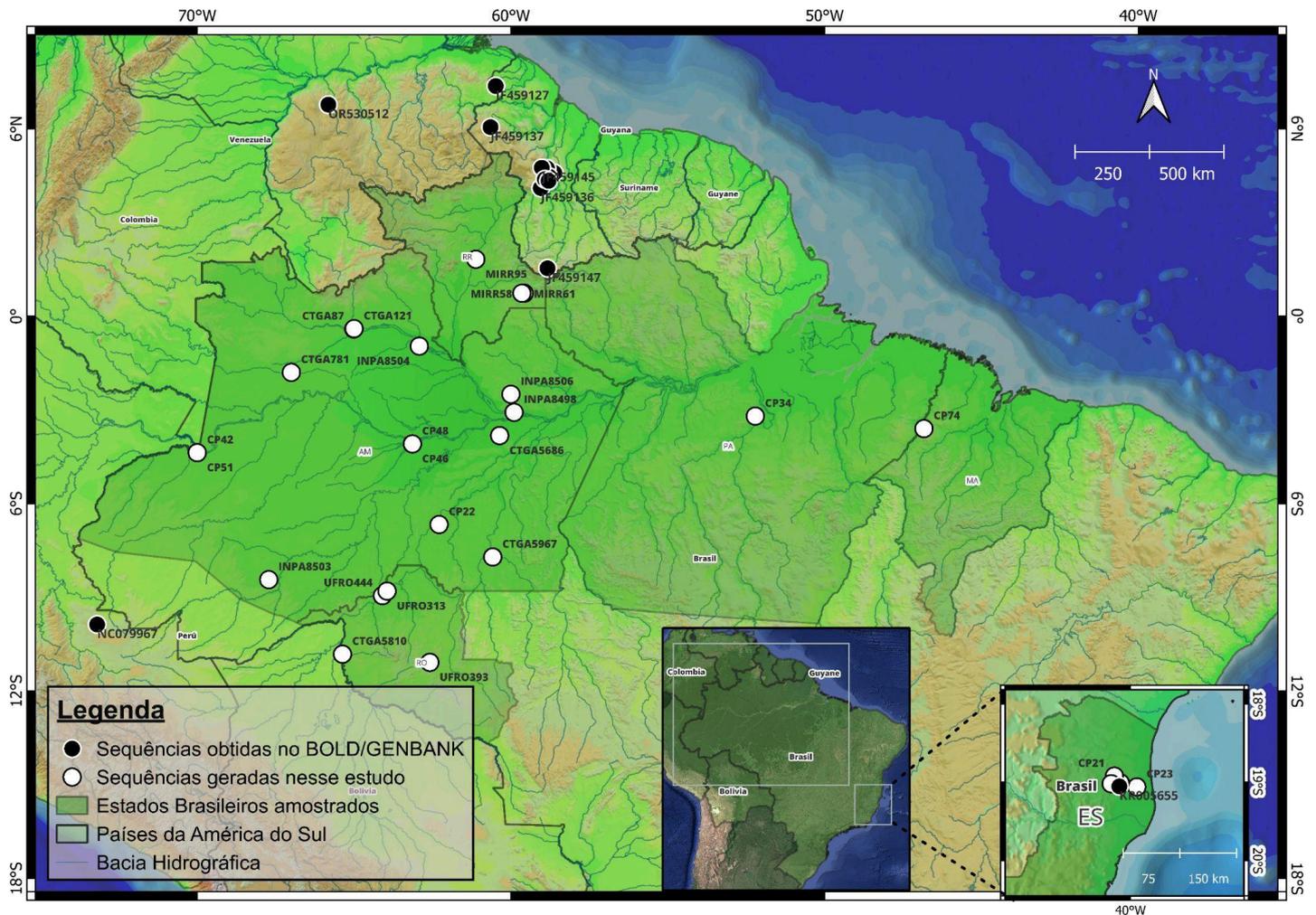


Figura 4. Área amostrada para *C. paca*. Pontos amostrados no ES pertencem à reserva florestal de Sooretama e lá existem sequências geradas no LEGAL/UFAM e também outras obtidas no genbank.

## 2.2. Obtenção dos tecidos biológicos

Diversos Museus e Coleções Biológicas de diferentes estados do território brasileiro foram contatadas para levantamento do material a ser amostrado e o projeto contou com as contribuições abaixo listadas:

Tabela 1. Instituições que colaboraram com amostras neste estudo, seus respectivos laboratórios e a quantidade N de amostras cedidas por cada instituição.

Instituição	Setor/Laboratório	N
Universidade Federal do Amazonas	Coleção de Tecidos e Genética Animal	13
Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia	Coleção Zoológica de Mamíferos	4
Universidade Federal de Roraima	Coleção de Mamíferos	4
Universidade Federal de Rondônia	Laboratório de Mastozoologia e Vertebrados Terrestres	4
Doação de Pesquisadores	Não aplicável	14

A maior parte das amostras foram obtidas em colaboração a partir de doações/empréstimos de outras coleções, o que reforça o caráter importante e constitutivo das redes de colaboração científica para futuros projetos de pesquisa (Tabela 1). O Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL/UFAM), local também onde foram feitos todos os protocolos, realizou expedições entre os anos de 2013 e 2015 pelo projeto SISBIOTA e coletou algumas amostras de *Cuniculus paca* pela Amazônia Brasileira e que foram usadas no presente estudo.

## 2.3. Obtenção de Dados Moleculares

### 2.3.1 Extração de DNA, quantificação e integridade

Recebemos diferentes tipos de tecidos biológicos, dentre eles tecido muscular, conjuntivo, hepático, todos preservados em álcool etílico 96%, além de couro (tecido epitelial associado a uma finíssima camada de tecido conjuntivo frouxo e acompanhado de pelos ainda no bulbo) taxidermizado. Esses tecidos foram submetidos à extração via protocolo de fenol-clorofórmio (McKiernan & Danielson, 2017) devido ao fato deste protocolo apresentar diversas lavagens e conseguir reter o DNA com menor proporção de impurezas, isto porque o Fenol promove a desnaturação das proteínas de maneira mais eficiente que nos outros métodos (Oliveira *et al.*, 2017).

Após fragmentação do tecido com auxílio de um bisturi e pinça, retirou-se o excesso de álcool 96% e o resultado da fragmentação foi depositado em um tubo de eppendorf 1,5 mL, com solução composta por detergente SDS, tampão de lise STE e proteinase k em banho-maria a 55°C durante 12 horas para a digestão das proteínas presentes no tecido. O intuito de fragmentar o tecido é aumentar a superfície de contato com a solução e maximizar o processo de digestão. Então o

produto da digestão foi submetido a 3 lavagens consecutivas, com Fenol, Fenol-Clorofórmio-Álcool isoamílico, e Clorofórmio, em ordem cronológica. O DNA foi precipitado com uso de NaCl e Álcool 70% e ressuspendido em 30  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  Mili-q.

A quantificação de DNA presente nas amostras foi realizada no NanoDrop 2000<sup>TM</sup>, um espectrofotômetro da Thermo Fisher Scientific<sup>TM</sup>, e objetivou-se chegar a concentração de 50 ng/ $\mu\text{L}$ , fazendo diluições das amostras com valores superiores a este. Já a integridade do DNA das amostras foi verificada em gel de agarose 1%.

### 2.3.2. Amplificação do gene COI via Reação em Cadeia da Polimerase

O gene a ser amplificado é o da Citocromo Oxidase subunidade I (COI), mitocondrial, através da técnica da PCR. A técnica permite obter cópias da fita de DNA de modo exponencial, a depender do número de ciclos. Os *primers*, ou regiões de pareamento, foram usados em coquetel para amplificar o gene da Citocromo oxidase. Ao todo, o coquetel continha quatro *primers Forward* e quatro *Reverses* (Tabela 2).

As reações foram preparadas para um volume final de 15  $\mu\text{L}$  por amostra, compostos por: 5,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1,5  $\mu\text{L}$  de dNTP (2,5 mM); 1,5  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  (25 mM); 1,5  $\mu\text{L}$  do tampão PCR Buffer 10x (750 mM Tris-HCl (pH 8.8, 25°C); 1,5  $\mu\text{L}$  de *cada primer, forward e reverse*; 1,0  $\mu\text{L}$  de BSA 10% (*Bovine Serum Albumin Blocker*); 0,5 de Taq DNA Polimerase (1U/ $\mu\text{L}$ ) e 2,0  $\mu\text{L}$  do DNA extraído (50 ng/ $\mu\text{L}$ ). O termociclador Veriti<sup>®</sup> Thermal Cycler (Applied Biosystems<sup>®</sup>) foi configurado para uma desnaturação inicial a 94°C por minuto, seguidos por uma desnaturação cíclica de 94°C por 15 segundos, anelamento cíclico a 50°C por 30 segundos, extensão cíclica a 72°C por minuto e extensão final a 72°C de 5 minutos. A desnaturação, anelamento e extensão cíclicas foram repetidas trinta e cinco (35) vezes e o seu resultado foi verificado em gel de agarose 1% para checar presença/ausência e tamanho da banda de DNA amplificada.

Tabela 2. Primers usados no presente estudo para amplificação e sequenciamento do gene mitocondrial COI (citocromo oxidase subunidade I). Fonte: Ivanova *et al.*, 2012.

Primer	Sequência 5'-3'	Uso
LepF1_t1	TGTA AACGACGGCCAGTATTCAACCAATCATAAAGATATTGG	Amplificação
VF1_t1	TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAAAGACATTGG	Amplificação
VF1d_t1	TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCACAARGAYATYGG	Amplificação
VF1i_t1	TGTA AACGACGGCCAGTTCTCAACCAACCAIAAIGAIATIGG	Amplificação
LepR1_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAAACTTCTGGATGTCCAAAAAATCA	Amplificação
VR1_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCAAAGAATCA	Amplificação
VR1d_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGGCCRAARAAYCA	Amplificação
VR1i_t1	CAGGAAACAGCTATGACTAGACTTCTGGGTGICCIAAIAAICA	Amplificação
M13F	TGTA AACGACGGCCAGT	Sequenciamento
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Sequenciamento

### 2.3.3 Purificação e Sequenciamento

A purificação do produto de PCR foi realizada com 3 µL de ExoSAP-IT (Exonuclease I e Shrimp Alcalino Phosphatase) seguindo o protocolo do fabricante. Após o protocolo, o produto desta etapa foi para a reação de sequenciamento, composto por: 2.0 µL do produto de PCR purificado; 2.0 µL do primer de sequenciamento, 0.3 µL do BigDye Terminator v3.1, 2,5 µL do tampão do BigDye e 3,2 µL de ddH<sub>2</sub>O. As condições da reação foram as sugeridas no protocolo do fabricante do Kit BigDye. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com etanol e EDTA, e posteriormente ressuscitado em 10 µL de formamida deionizada para ser injetados e analisados no sequenciador automático ABI 3500 (Applied Biosystems).

## 2.4 Análise de dados

### 2.4.1. Alinhamento e edição das sequências

As sequências de mtDNA referentes ao gene COI, depois de obtidas através do sequenciamento, foram exportadas e visualizadas no programa Ali View (Larsson, 2017), alinhadas utilizando o algoritmo ClustalW (Hung & Weng, 2016), acompanhada de revisão manual de

inserções/deleções, realizadas no software MEGA 11 (Tamura & Kumar, 2021). Também foram traduzidas com auxílio do programa MEGA 11 para verificação de códons de parada no meio das sequências, a fim de evitar erros associados à leitura do sequenciador. Não foram encontrados códons de parada.

#### **2.4.2. Análise ABGD (*Automatic Barcode Gap Discovery*)**

A análise ABGD é uma ferramenta muito utilizada, primariamente, como ferramenta de auxílio dentro da taxonomia molecular para identificar grupos de sequências agrupadas em espécies ou linhagens, para fins de barcoding (Puillandre *et al.*, 2012). Este tipo de análise identifica lacunas (ou *gaps*, no inglês) no espaço das distâncias (seguindo o modelo K2P) e pressupõe uma diferença observada entre a variação genética intraespecífica (dentro da mesma espécie) e a variação genética interespecífica (entre espécies diferentes). Num cenário ideal para o código de barras do DNA, a distância genética entre quaisquer dois indivíduos da mesma espécie (distância intraespecífica) é menor do que a distância genética entre indivíduos de espécies diferentes (distância interespecífica). Isto cria uma lacuna ou separação clara que pode ser usada para identificar espécies com precisão. É um recurso a ser usado dentro da Taxonomia e identificação de novas espécies com base em dados moleculares dentro do protocolo do DNA barcoding.

Desse modo, o arquivo de entrada dessa análise foi a matriz de sequências genéticas organizadas no formato fasta e a análise é rodada de maneira automática e online no endereço: [abgd web \(mnhn.fr\)](http://abgd.web.mnhn.fr).

#### **2.4.3. Delimitação das linhagens evolutivas**

Para inferir acerca das linhagens evolutivas em nosso banco de dados, implementamos os métodos de delimitação de espécies de locus único (*Single-Locus Species-Delimitation* - SLSD). Os métodos SLSD consistem em identificar quais grupos de indivíduos constituem populações de uma única espécie e quais constituem espécies diferentes através da utilização de dados moleculares e algoritmos heurísticos, geralmente fundamentados nas propriedades da teoria coalescente e no conceito filogenético de espécie ou em distâncias genéticas e no conceito de DNA barcoding (Rannala & Yang, 2020). Para as análises foram utilizados cinco diferentes métodos de SLSD: GMYC (*General Mixed Yule Coalescent*), método que classifica os intervalos entre eventos coalescentes de uma árvore ultramétrica enraizada em duas classes através de um

estimador de máxima verossimilhança: aqueles dentro das espécies e cuja taxa é determinada pelo processo coalescente, e aqueles entre espécies e cuja taxa é determinada por uma generalização do modelo de processo de Yule para divergência entre espécies (Pons et al., 2006); bGMYP (*Bayesian Implementation of GMYC*), uma implementação Bayesiana do método GMYC (Reid & Carstens, 2012); LocMin (Local Mínima), método inspirado no conceito de DNA Barcoding e distâncias genéticas que aplica um corte (*threshold*) ajustado ao banco de dados para definir distâncias intra e interespecíficas entre grupos de sequências ao invés de um *threshold* fixo e determinado *a priori* (Brown et al., 2012); PTP (*Poisson Tree Process*) que identifica espécies a partir da distribuição dos comprimentos dos ramos em uma filogenia, modelando uma árvore não ultramétrica (filograma) como uma mistura de duas classes de distribuição de comprimentos de ramos: ramos entre espécies e dentro de espécies (Zhang et al., 2013); mPTP, uma implementação do método PTP que assume múltiplas taxas de coalescência e especiação (Kaplí et al., 2017).

A partir de um arquivo fasta contendo todas as sequências geradas neste estudo, bem como sequências oriundas do GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), foi gerado um novo arquivo fasta contendo apenas haplótipos únicos através da função ‘hapCollapse’ (<http://github.com/legalLab/protocols-scripts>). A partir deste arquivo de haplótipos únicos foram geradas duas árvores: uma árvore ultramétrica gerada no software BEAST 2.6.2 (Bouckaert et al., 2019) com as seguintes configurações: modelo de substituição de nucleotídeos (TN93+I+G) estimado pelo pacote bModelTest (Bouckaert & Drummond, 2017); modelo de partição de dados baseado na posição de cada nucleotídeo do códon (1º, 2º e 3º posição); relógio molecular estrito; *tree prior Constant-Coalescent*; uma árvore de máxima verossimilhança (filograma) no software RaxML-NG (Kozlov et al., 2019), utilizando o modelo TN93+I+G4 estimado no programa ModelTest-NG (Darriba et al., 2020), partição do banco de dados por posição do códon (1+2+3), estimativa da árvore de máxima verossimilhança a partir de 25 árvores de parcimônia e 25 árvores randomizadas iniciais e *bootstrap* de 1,000 réplicas.

Para a árvore ultramétrica, foram realizadas três corridas independentes para gerar 20 milhões de árvores filogenéticas através do método Monte Carlos via Cadeia de Markov (MCMC), amostrando topologias e parâmetros das árvores a cada 2,000 gerações. O software TRACER 1.7.1 (Rambaut et al., 2018) foi usado para verificar a qualidade das corridas, que precisavam apresentar tamanho Efetivo da Amostra superiores a 200 (ESS>200). Combinou-se então as três corridas após a remoção dos 10% iniciais de cada réplica (*burn-in*) usando o *Log Combiner*

(Drummond et al., 2012) para produzir 9 mil topologias que foram utilizadas para gerar uma árvore filogenética de Máxima Credibilidade (MCT) no TREEANNOTATOR (Bouckaert et al., 2019).

A Árvore de Máxima Credibilidade (MCT) serviu de arquivo de entrada para os métodos GMYC e bGMYC, através dos pacotes ‘splits 1.0--19’ (Fujisawa & Barraclough, 2013) e ‘bGMYC 1.0.2’ (Reid & Carstens, 2012) com modificações para compatibilidade com as versões do software R  $\geq 4.0$  (Bittencourt *et al.*, não publicado). Para os métodos PTP e mPTP, a árvore de máxima verossimilhança obtida no software RaxML-NG foi usada de *input* no software mptp 0.2.3 (Kapli et al., 2017).

Todas as análises e a visualização dos resultados foram geradas utilizando *scripts* escritos na linguagem R (R Core Team, 2017), executados no software R Studio (*Integrated Development for R Team*, 2020) através dos pacotes e programas mencionados anteriormente, bem como funções auxiliares do pacote ‘*delimtools*’ 1.0.0 (Bittencourt *et al.*, não publicado) para integração e visualização de dados.

Baseadas nas topologias obtidas provenientes da filogenia das populações, as inferências filogeográficas estão pautadas em comparações por sobreposição dos clados de diferentes áreas (sul/norte da Amazônia e sul/norte da floresta atlântica) (Costa, 2003; Morrone, 2013). Em outras palavras, esta etapa do método consistiu na testagem de relações cladísticas entre os grupos-irmãos a fim de obter monofilia (assim estando relacionadas e com fluxo gênico) ou parafilia (não estando relacionadas e com pouco fluxo gênico) (Costa, 2003; Morrone, 2013).

#### **2.4.4. Análise Bayesiana de estruturação das populações**

Para compreendermos o padrão da estrutura genética das populações amostradas a partir do mtDNA faz-se necessária a utilização de uma análise Bayesiana intencionada a formar grupos biológicos, implementada no pacote fastBAPS (Tonkin-Hill *et al.*, 2019) disponível no *software* R 3.4.1 (R Core Team, 2017). Tal pacote utiliza um algoritmo estocástico para calcular a distribuição posterior dos parâmetros do modelo, com base nos dados observados, que neste caso são as frequências nucleotídicas das sequências de mtDNA. Para determinar o número mais provável de populações (K), foi realizada uma análise da mistura de populações. O número de grupos biológicos (K) é estimado como um dos parâmetros, e a partição dos dados com maior probabilidade é identificada como a melhor, indicando o número de *clusters*. Essa técnica é

poderosa para incorporar incertezas e atualizá-las à medida que novos dados são disponibilizados.

#### 2.4.5. Distribuição e frequência de haplótipos

O programa POPART (Leigh *et al.*, 2015) foi utilizado para gerar, visualizar e ajustar a rede de haplótipos entre as amostras deste estudo. Essas redes reticuladas mostram as relações genealógicas entre os indivíduos amostrados com base na similaridade genética entre os haplótipos. O *software* agrupa os haplótipos semelhantes em *clusters* e os conecta com linhas que representam a relação genética entre eles, mostrando ainda os passos mutacionais que levaram de um haplótipo ao outro. A entrada de dados, entretanto, precisou ser tratada no *software* DNAsp 6 (Rozas *et al.*, 2017) que tomou como base a matriz de dados das sequências genéticas de *C. paca* agrupando-as em haplótipos.

#### 2.4.6. Distâncias genéticas

A diferenciação genética, tanto inter como intra populacional, foi calculada com o auxílio do *software* MEGA 11. A matriz de distância genética entre as 74 sequências (Tabela 4) se baseia no número de mutações dos haplótipos amostrados no presente estudo. Tal cálculo é obtido em comparações par a par e foram conduzidos usando o modelo *Maximum Composite Likelihood* que inclui substituições dos tipos transição e transversão, incluindo as posições dos códons 1<sup>o</sup>+2<sup>o</sup>+3<sup>o</sup>+codificante. As posições ambíguas foram removidas para cada par de sequências e, ao todo, o banco de dados apresenta 609 pares de bases (pb). Os clados amostrados na tabela 4 são definidos *a posteriori* observando a análise bayesiana de estruturação das populações obtida no fastBAPS.

### 3. RESULTADOS

Para a espécie *C. paca* foram geradas, neste estudo, 41 sequências genéticas de 609 pb de 26 localidades dentro da sua área de distribuição. O conjunto de dados foi complementado, ainda, com o acréscimo de 28 sequências depositadas no Genbank e na plataforma BOLD, totalizando 69 espécimes. Este banco de dados apresentou 440 sítios conservados e 164 variáveis sendo 139 informativos para parcimônia.

O alinhamento dessas sequências foi colapsado em 30 haplótipos únicos e adicionamos mais 5 sequências do gênero *Dasyprocta* como grupo externo nas análises de delimitação das linhagens

evolutivas.

Tabela 3. Amostras de *Cuniculus paca* que compuseram o presente estudo, incluindo sua identificação, haplótipo (H), localidade, Número da Localidade (NL), correspondente ao mapa da figura 8, e linhagem à qual pertence.

<b>Identificação</b>	<b>H</b>	<b>Localidade</b>	<b>NL</b>	<b>Região</b>	<b>L</b>
INPA8503	1	Pauini, Amazonas	1	Sudoeste da Amazônia Brasileira	L1
INPA8504	2	Serra do Aracá, Barcelos, Amazonas	2	Amazônia Central Brasileira	L1
INPA8506	3	Balbina, Presidente Figueiredo, Amazonas	3	Amazônia Central Brasileira	L1
JF459147	3	Rio Essequibo-Tukutu, Guiana	4	Norte da Amazônia Internacional	L1
INPA8498	4	Manaus, Amazonas	5	Amazônia Central Brasileira	L1
UFRO313	4	Rondônia, Brasil	6	Sudoeste da Amazônia Brasileira	L1
CP45	4	Coari, Amazonas	7	Amazônia Central Brasileira	L1
CP48	4	Coari, Amazonas	7	Amazônia Central Brasileira	L1
CP50	4	Coari, Amazonas	7	Amazônia Central Brasileira	L1
CTGA121	4	Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas	8	Amazônia Central Brasileira	L1
CTGA122	4	Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brasil	8	Amazônia Central Brasileira	L1
MIRR58	4	Caroebe, Roraima, Brasil	9	Norte da Amazônia Brasileira	L1
CTGA781	4	Japurá, Amazonas, Brasil	10	Amazônia Central Brasileira	L1
OR530512	4	Venezuela	11	Noroeste da Venezuela	L1
NC079967	4	Rio Javari -Mirim, Pifayal, Ucayali, Peru	12	Leste do Peru	L1
CP20	5	Reserva de Sooretama, Espírito Santo, Brasil	13	Mata atlântica	L3
CP21	5	Reserva de Sooretama, Espírito Santo, Brasil	13	Mata atlântica	L3
CP23	5	Reserva de Sooretama, Espírito Santo, Brasil	13	Mata atlântica	L3
CP24	5	Reserva de Sooretama, Espírito Santo, Brasil	13	Mata atlântica	L3
KR005655	5	Reserva de Sooretama, Espírito Santo, Brasil	13	Mata atlântica	L3
CP22	6	Rio Madeira, Amazonas, Brasil	14	Amazônia Central Brasileira	L2
CTGA5405	6	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L2
CTGA5686	6	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L2
UFRO393	7	Rondônia, Brasil	6	Sudoeste da Amazônia Brasileira	L2
UFRO444	8	Rondônia, Brasil	6	Sudoeste da Amazônia Brasileira	L2
CP34	8	Altamira, Pará, Brasil	16	Amazônia Central Brasileira	L2
UFRO404	9	Rondônia, Brasil	6	Sudoeste da Amazônia Brasileira	L1
CTGA5810	10	Guayaramerin, Bolívia	17	Norte da Bolívia	L1
CP42	11	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	18	Sudoeste da Amazônia Brasileira	L1

CP46	12	Coari, Amazonas, Brasil	7	Amazônia Central Brasileira	L1
CP49	12	Coari, Amazonas, Brasil	7	Amazônia Central Brasileira	L1
CP47	13	Coari, Amazonas, Brasil	7	Amazônia Central Brasileira	L1
CP51	14	Benjamin Constant, Amazonas, Brasil	18	Sudoeste da Amazônia Brasileira	L1
CTGA87	15	Santa Isabel do Rio Negro, Amazonas, Brasil	8	Amazônia Central Brasileira	L1
CTGA5407	16	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L1
CTGA5408	17	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L1
CTGA5685	17	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L1
MIR95	17	Caracaraí, Roraima, Brasil	19	Norte da Amazônia Brasileira	L1
JF459145	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459143	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459142	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459140	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459139	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459133	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459131	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459130	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459128	17	Potaro-Siparuni, Iwokrama Forest, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459127	17	Barima-Waini, Baramita, Old World, Guiana	21	Norte da Amazônia Internacional	L1
CTGA5411	18	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L1
CTGA5684	18	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L1
CTGA8403	18	Careiro Castanho, Amazonas, Brasil	15	Amazônia Central Brasileira	L1
CP74	19	Rebio Gurupi, Maranhão, Brasil	22	Amazônia Central Brasileira	L2
CTGA5967	20	Aripuanã-Guariba, Amazonas, Brasil	23	Amazônia Central Brasileira	L2
MIR61	21	Caroebe, Roraima, Brasil	9	Norte da Amazônia Brasileira	L1
JF459148	21	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
MIR16	22	Caracaraí, Roraima, Brasil	19	Norte da Amazônia Brasileira	L1
JF459129	22	Potaro-Siparuni, Iwokrama Forest, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459149	23	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459135	23	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459134	23	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459150	24	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459146	25	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459136	25	Rio Essequibo-Tukutu, Guiana	24	Norte da Amazônia Internacional	L1

JF459126	25	Potaro-Siparuni, Guiana	25	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459144	26	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459141	27	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459138	28	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459137	29	Cuyuni-Mazaruni, Mazaruni river, Guiana	26	Norte da Amazônia Internacional	L1
JF459132	30	Potaro-Siparuni, Iwokrama Reserve, Guiana	20	Norte da Amazônia Internacional	L1

### 3.1. Análise primária para a delimitação das espécies

A análise do ABGD, usada para reconhecer variações intraespecíficas e interespecíficas, foi realizada sem as sequências dos grupos externos com o objetivo de inferir somente os *gaps* das variações dentro de *C. paca*, o qual resultou no histograma abaixo evidenciando dois grupos com um *gap* da distribuição da variação intraespecífica ao redor de 3%:

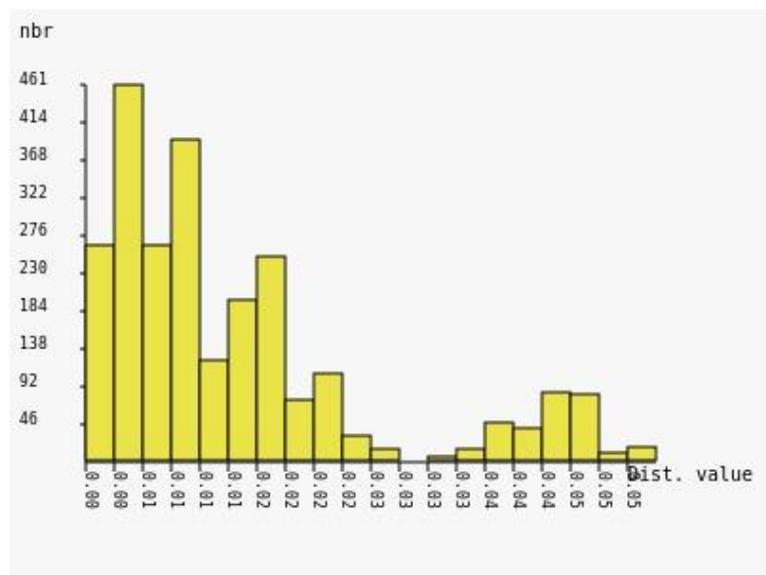


Figura 5. Histograma da distribuição das distâncias genéticas intraespecíficas de *C. paca* gerado na plataforma ABGD web. Nota: nbr= número de comparações pareadas (NBR) que se enquadram nesse intervalo de distância; Dist. value= valores de distância genética.

Neste tipo de gráfico o eixo Y representa o Número de comparações de distâncias genéticas pareadas, e no eixo X a distância genética das comparações par a par dentro do banco de dados usado como arquivo de entrada. É um recurso visual para entendermos como as comparações das

distâncias genéticas entre as sequências se agrupam e se distanciam dentro do banco de dados. Esta informação nos auxilia na identificação de lacunas no espaço amostral das distâncias genéticas e indica os potenciais limites entre os grupos de espécies/linhagens. Na figura 5 é possível observar que a análise do ABDG infere a presença de duas linhagens evolutivas dentro de *C. paca* com um evidente *gap* nas comparações pareadas das distâncias genéticas.

### 3.2 Delimitação das linhagens evolutivas

Ao todo, foram empregadas cinco análises de delimitação das linhagens evolutivas e foi gerado o consenso entre todas elas, resultando na figura abaixo apresentada:

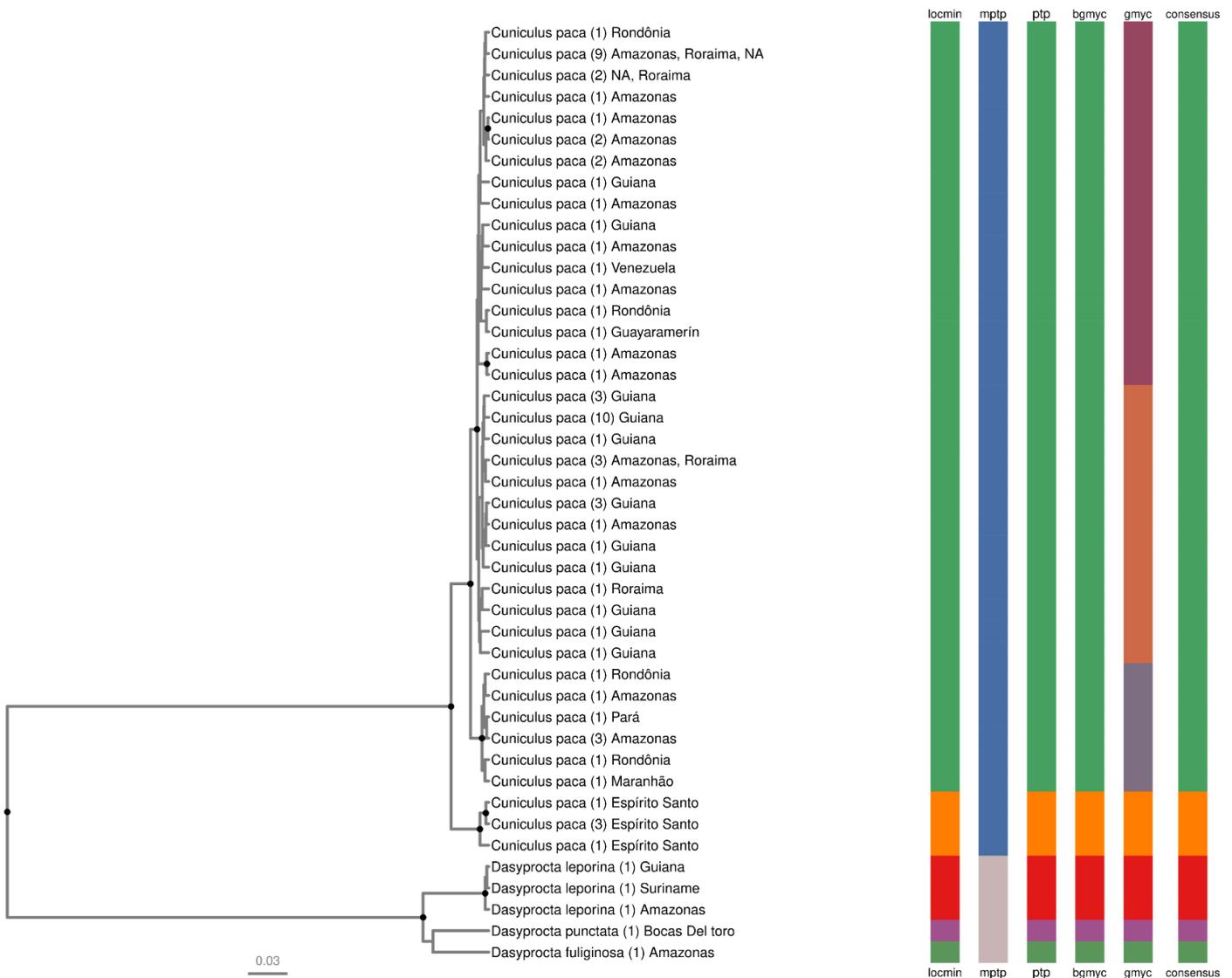


Figura 6. Esquema resumido das diferentes análises das linhagens evolutivas. Da esquerda pra direita: Árvore ultramétrica gerada no BEAST2; locmin; mPTP; PTP; bGMYP; GMYP; Consensus.

O número de linhagens evolutivas encontradas em cada análise foi diferente em alguns casos. A análise Locmin, PTP, bGMYC recuperaram 5 linhagens evolutivas, sendo 2 delas intraespecíficas para *C. paca*. A análise de mPTP e GMYC discordaram, a primeira recuperou apenas 1 linhagem evolutiva para *C. paca* e a segunda 4 linhagens evolutivas intraespecíficas para *C. paca*. O consenso entre as análises resultou em duas linhagens evolutivas intraespecíficas para *C. paca*, representadas pelos indivíduos do bioma Amazônia e do bioma da Mata Atlântica, representada pelos indivíduos provenientes do Espírito Santo. Outras três linhagens foram observadas dentro dos grupos externos.

Tais linhagens, se associadas geograficamente às coordenadas das amostras, nos permite chegar num mapa de distribuição (Fig. 7) onde vemos um padrão predominantemente amazônico e outro associado à Mata Atlântica, presente no estado do Espírito Santo.

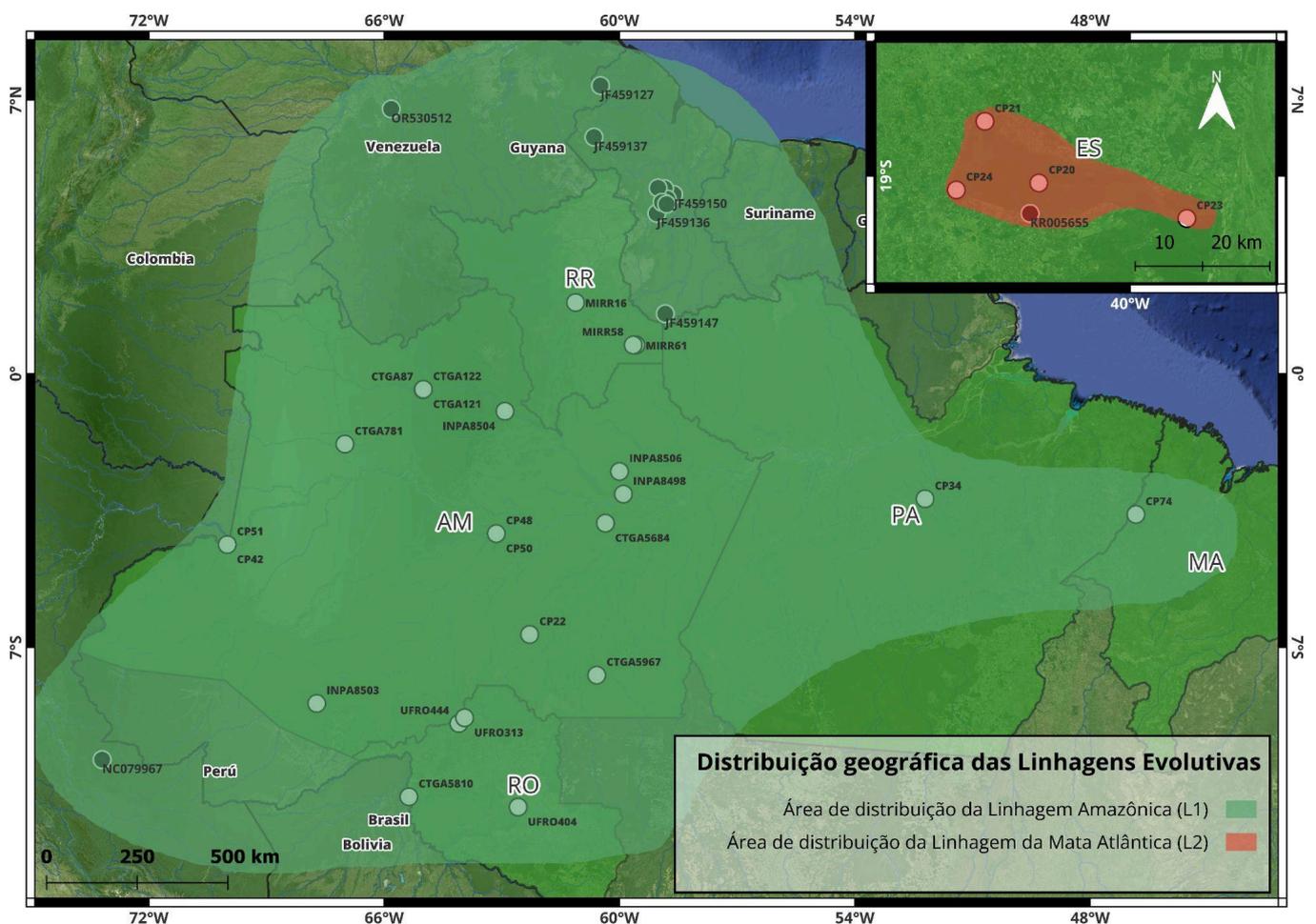


Figura 7. Distribuição geográfica das Linhagens Evolutivas encontradas à luz da delimitação.

### 3.3. Estrutura das populações (Grupos biológicos)

Tratando-se da análise da estrutura populacional, o total de populações (k) encontradas pelo fastBAPS foi três. Elas correspondem a um grupo ao Norte da Amazônia (**em Roxo**), acima do rio Amazonas que se estende até o oeste Amazônico, e outra população localizada ao sul e leste da Amazônia (**em Verde-Lima**) - ambas associadas à área geográfica da linhagem evolutiva amazônica - e outro grupo associado à Mata Atlântica (**em Laranja**).

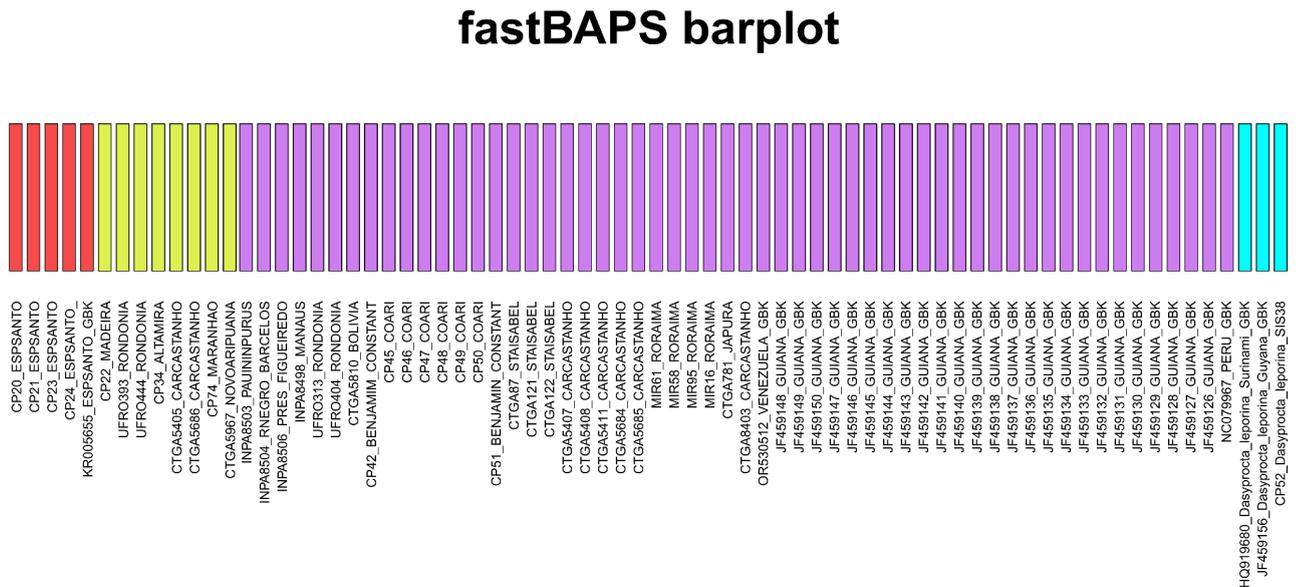


Figura 8. Análise populacional obtida através do fastBAPS, onde cada cor representa a clusterização (agrupamento) de sequências genéticas semelhantes.

Na imagem acima, desse modo, percebe-se que as sequências geradas por este estudo, de código CP 20, 21, 23 e 24, estão associadas ao mesmo grupo populacional da sequência do Genbank de código KR005655, coincidindo com a linhagem evolutiva referente à Mata Atlântica. O grupo populacional representado pelo verde-lima apresenta sequências da localidade do rio Madeira, Rondônia, Altamira (PA), Careiro Castanho, Rebio Gurupi (MA) e Novo Aripuanã, estando assim associadas ao sul/sudoeste da amazônia até o nordeste da amazônia, na divisa entre o Pará e Maranhão. A terceira população de *C. paca*, de cor roxa, apresenta as demais localidades da região amazônica, ao norte e noroeste, como por exemplo região das guianas proveniente do Genbank, similares geneticamente às sequências geradas neste estudo das localidades de Coari, Benjamin Constant, Manaus, Roraima entre outras. Essas duas últimas populações, como já falado anteriormente, estão associadas à linhagem evolutiva da Amazônia.

Juntamente com a análise de clusterização, também é gerado um mapa de calor associado a uma árvore filogenética mostrando detalhadamente a similaridade par a par entre cada sequência (nesse caso concatenada em haplótipos) presente no banco de dados utilizado como arquivo de entrada (*input*). Neste tipo de imagem, as sequências que têm uma célula com cor mais clara na interseção indicam que eles compartilham uma maior similaridade genética entre si. Isso pode sugerir que esses *clusters* pertencem à mesma população ou têm uma origem genética comum. Células com cores mais escuras indicam uma menor similaridade genética entre os *clusters* correspondentes. Isso sugere que esses *clusters* são geneticamente distintos e podem representar populações separadas ou grupos divergentes dentro da amostra.

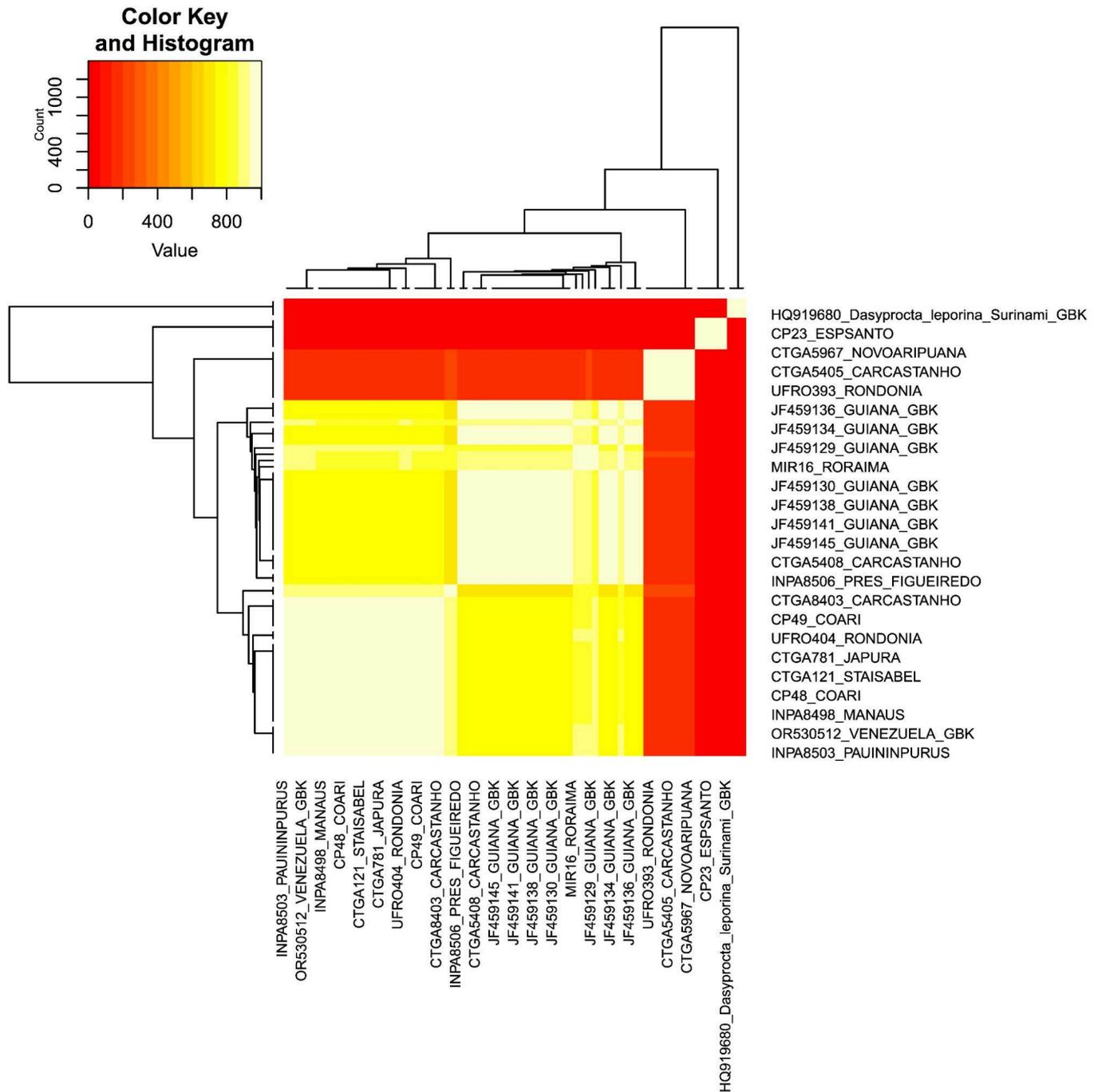


Figura 9. Mapa de calor (Heatmap) obtido através do fastBAPS do banco de dados de *C. paca* com *Dasyprocta leporina* como outgroup.

Na figura 9 temos então o mapa de calor (*heatmap*) cuja leitura e interpretação foi elucidada acima. Percebe-se que a localidade do Espírito Santo difere de todas as demais em nosso banco de dados. As sequências obtidas do Genbank referente à localidade das Guianas foram muito similares geneticamente às sequências de Careiro Castanho, Presidente Figueiredo, Coari,

Manaus, Rondônia, Japurá, Rondônia e Venezuela. As comparações entre essas sequências foi significativa e similar para cerca de 80% das combinações geradas e topologias geradas. As demais sequências com quadro branco foram comparações par a par entre as mesmas.

### 3.4. Genealogia dos haplótipos

Ao todo foram 30 haplótipos observados na rede de haplótipos obtida pelo POPART, na qual foi observado três agrupamentos de haplótipos entre as populações definidas com base na análise Bayesiana de estruturação das populações.

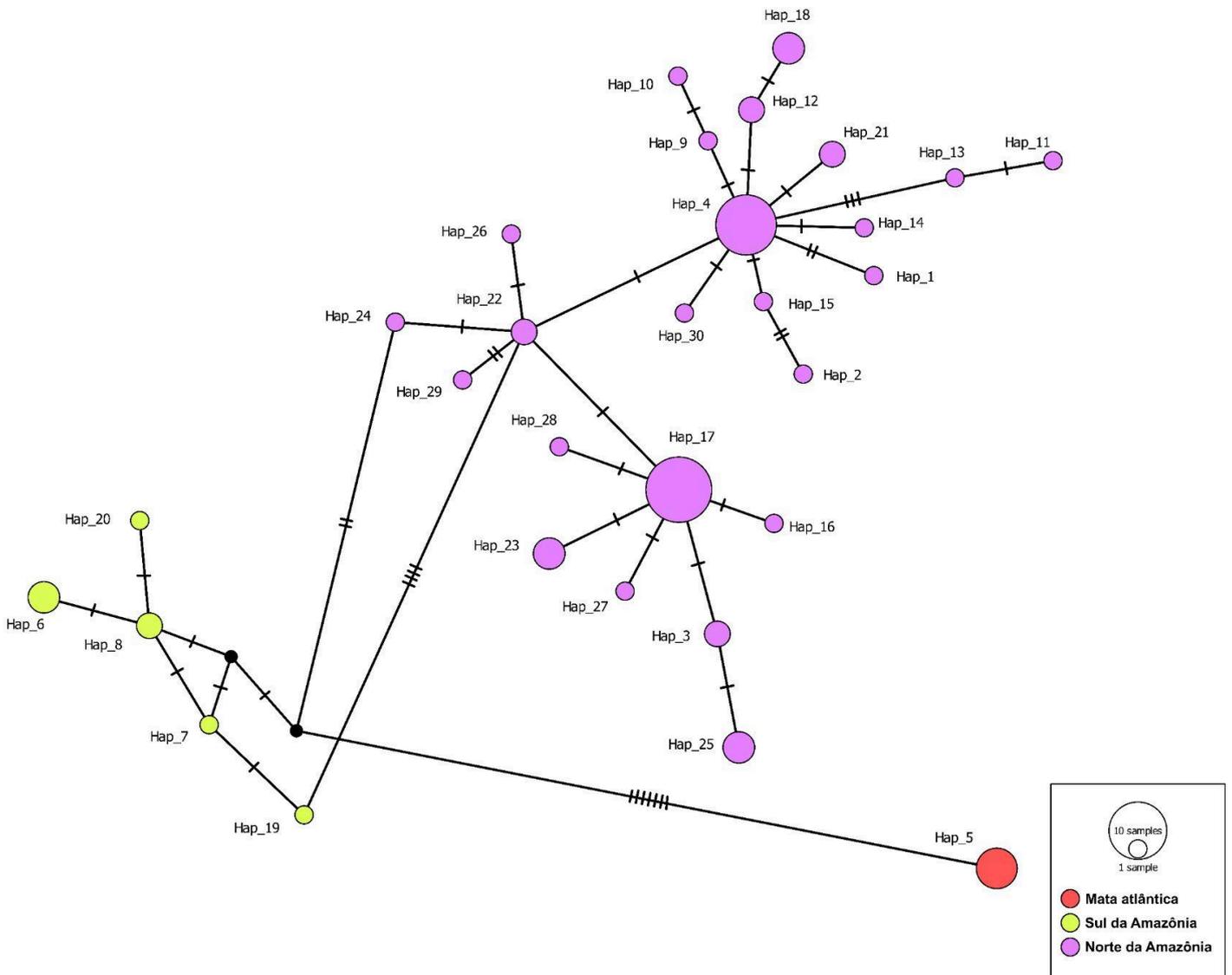


Figura 10. Rede reticulada de haplótipos obtida pelo programa POPART. Nela é possível observar os haplótipos por populações, bem como a quantidade de sequências que compartilham aquele haplótipo.

Ao associar os haplótipos a sua coordenada geográfica, obtivemos também o seguinte mapa na figura abaixo:

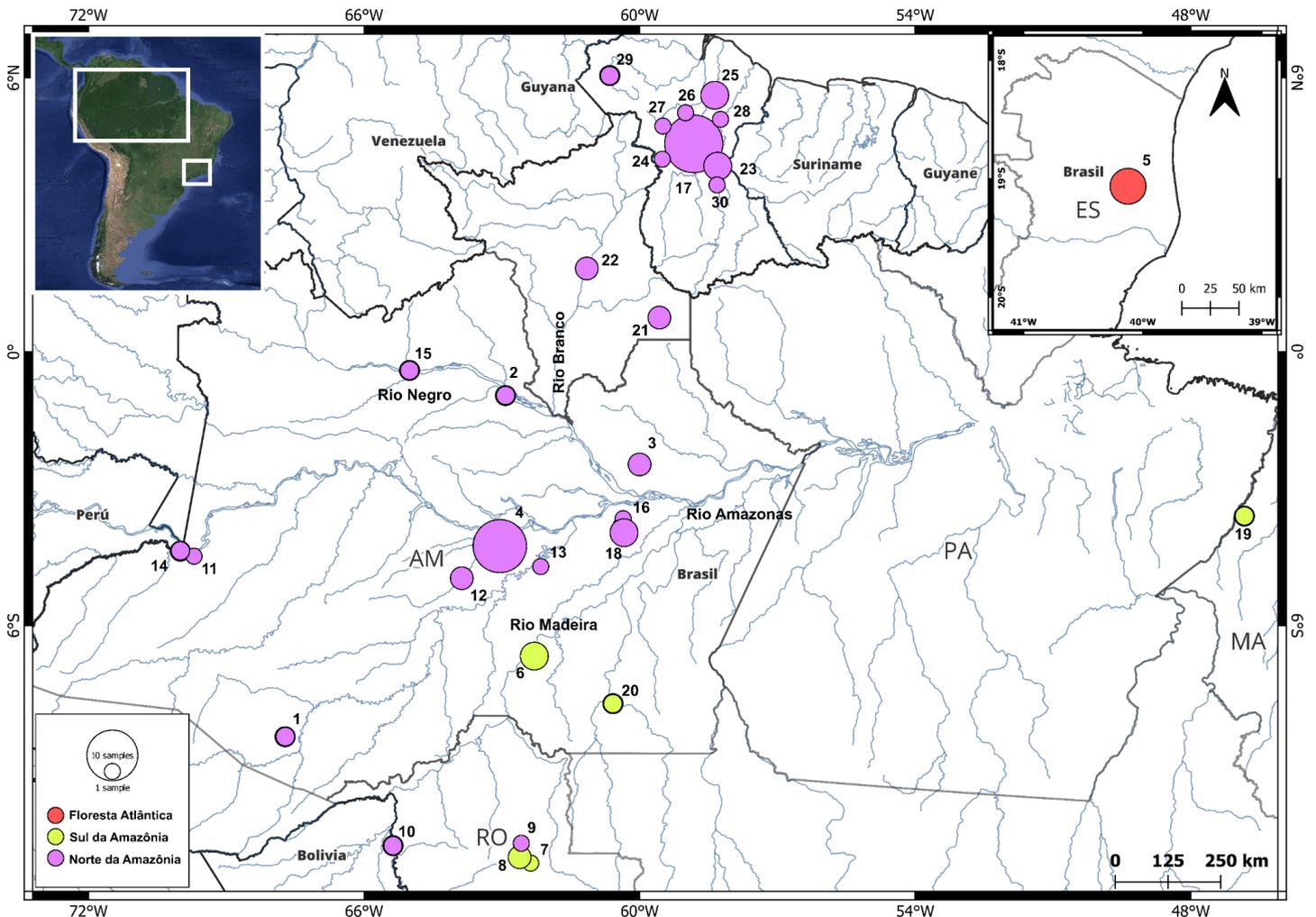


Figura 11. Haplótipos obtidos pelo programa POPART, agora associados à sua coordenada. O tamanho dos círculos representa a quantidade de sequências.

Coloridos da mesma maneira que na análise Bayesiana de estruturação das populações, conseguimos perceber três cores de haplótipos presentes no mapa separados por vários passos mutacionais. No extremo norte, na localização da Guiana, percebemos um número grande no compartilhamento de haplótipos da mesma população. Do mesmo modo percebemos nas localidades associadas às margens do rio Amazonas o mesmo padrão de compartilhamentos de haplótipos. Adicionalmente, observamos uma substituição quase completa do haplótipo roxo pelo verde-lima, com a exceção da porção da cabeceira do rio Madeira, onde se nota a coexistência de ambos os haplótipos, cada um predominando em uma das margens fluviais. No que tange à localidade do Espírito Santo, o algoritmo dos *softwares* empregados realizou a concatenação de

todas as cinco sequências da região em uma única sequência, resultando na formação de um único haplótipo laranja.

### 3.5. Estimativas de distância genética

Para todas as sequências de COI de *Cuniculus paca*, que compuseram o escopo deste trabalho, foram estimadas as distâncias genéticas (Modelo Kimura-2P) par a par que variaram de 0,49% a 4,52% (Tabela 4). Também foram estimadas distâncias genéticas dentro da área das populações (intrapopulacional), sendo a menor delas entre os indivíduos do sul da Amazônia com 0,48% e a maior entre os indivíduos do norte da Amazônia com 0,74%. Também são mostrados valores de desvio-padrão (em negrito). As estimativas incluíram as sequências do gênero *Dasyprocta* como grupo externo, as quais foram *D. leporina*, *D. fuliginosa* e *D. punctata*.

Tabela 4. Matriz de distância genética gerada no programa MEGA11 com base na estrutura de populações gerada pelo fastBAPS

Populações	Norte da amazônia	Sul da Amazônia	Mata Atlântica	Outgroup	Intra Po.
Norte da Amazônia	NA	0,49%	0,85%	<b>2,11%</b>	0,74%
Sul da Amazônia	1,92%	NA	0,81%	<b>2,07%</b>	0,48%
Mata Atlântica	4,52%	4,19	NA	<b>2,09%</b>	0,5%
Outgroup	21,98%	21,71%	21,32%	NA	5,24%

## 4. DISCUSSÃO

Mediante ao uso do marcador molecular da Citocromo Oxidase subunidade I para as amostras de *C. paca* no espaço geográfico amostrado podemos observar certo grau de variação intraespecífica, tanto na estruturação de suas populações, quanto na distância genética e linhagens evolutivas.

### 4.1 Linhagens evolutivas independentes

De acordo com os resultados obtidos pelos métodos de delimitação, duas linhagens evolutivas independentes e bem suportadas foram encontradas dentro do território brasileiro, sendo uma delas distribuída na Amazônia e outra na Mata Atlântica. A distância genética entre as duas é maior que 4,5%, 2 vezes maior que o limite protocolado de 2% para várias espécies pelo

*Barcoding* (Hebert *et al.*, 2003).

O fato de termos encontrado duas linhagens evolutivas independentes para o território brasileiro significa que temos dois grandes grupos populacionais, os quais apresentam grande distância genética, e provavelmente passaram por pressões evolutivas distintas em suas trajetórias.

Existem duas subespécies de *Cuniculus paca* com localidades-tipo conhecidas para o Brasil. São elas: *Cuniculus paca mexiana* e *Cuniculus paca paca*. Unindo esse conhecimento com os achados no presente estudo, evidencia-se dois padrões de distribuição das linhagens associados às localidades-tipo. Referindo-se a *Cuniculus paca mexiana*, com localidade tipo descrita para ilha Mexiana, no Pará, é possível a existência de uma linhagem independente para essa região, isso devido ao isolamento por água salgada numa ilha distante do continente. Sendo assim, existiriam então duas linhagens amazônicas, uma restrita à ilha Mexiana, no arquipélago do Marajó, e outra linhagem continental, encontrada no presente estudo. A localidade-tipo da outra subespécie, *Cuniculus paca paca*, está no estado de Pernambuco. Considerando que o estado possui, ainda que em poucas porções, fragmento de Mata Atlântica nativa, o que pode associar a distribuição desta subespécie neste bioma à linhagem evolutiva encontrada no Espírito Santo. Ambas pertenceriam a um grupo maior que se estende pela Mata Atlântica, do nordeste até o sudeste brasileiro, restrita a esse bioma. Para corroborar essas hipóteses, não só seria necessária uma amostragem que se estenda mais pela Mata Atlântica e inclua Pernambuco, mas também amostragens na Ilha Mexiana.

Todavia existe uma lacuna (*gap*) amostral em diversas regiões do Brasil, como Nordeste, Centro-oeste e Sul, incluindo também o sudeste, que apesar de apresentar algumas amostras cedidas dessa região (Espírito Santo), ainda é um número baixo, sendo a maioria das amostras coletadas em uma reserva florestal (Reserva Biológica de Sooretama). Mas mesmo com um baixo número amostral, a localidade da Mata Atlântica representa um grupo distinto, o que se reflete em todas as análises realizadas evidenciando que esta população se trata de uma linhagem evolutiva independente.

Vários estudos têm evidenciado espécies/linhagens de mamíferos estruturados em grupos da Amazônia - Mata Atlântica. O estudo de Machado *et al.*, (2021) reporta três rotas que conectam esses dois biomas e são usadas por uma variedade de animais para dispersão, no entanto animais com ampla distribuição, como no caso das pacas, encontram-se isolados populacionalmente. Tal fato se deve ao surgimento do Cerrado e da Caatinga, cujas estimativas de surgimento são de, no

mínimo, 7 e 20 milhões de anos, respectivamente (Ratter *et al.*, 1997; Simon *et al.*, 2009; Werneck, 2011). Menezes *et al.*, (2021) encontrou 4 morfotipos alopátricos dentro do complexo de *Coendou prehensilis*, com uma distribuição muito similar a de *C. paca*. Um morfotipo associado à Caatinga, outro ao Cerrado, o terceiro associado à Amazônia e o último associado à região de Baturité, no Ceará. Caracteres morfológicos e moleculares foram concatenados e o resultado foi de quatro linhagens evolutivas, as quais foram consideradas espécies taxonomicamente válidas para o gênero *Coendou*. Outro estudo, de Malcher *et al.*, (2017), também encontrou distribuição disjunta para outro pequeno mamífero, também da ordem rodentia, da espécie *Oecomys catherinae* e obtiveram monofilia recíproca bem suportada entre dois grupos populacionais, um presente na Amazônia e outro na Mata Atlântica. Adicionalmente, o gênero *Bradypus* também foi investigado por Barros & Morgante., 2003 com complementação molecular de Moraes-barros *et al.*, (2011). Esses estudos sugerem que algumas espécies do gênero *Bradypus* também seguem o mesmo padrão de disjunção entre Amazônia e Mata Atlântica, sendo a espécie *B. torquatus* a primeira a surgir em decorrência desta divisão há aproximadamente 12 milhões de anos. Também é sabido que algumas espécies de primatas apresentam esse mesmo padrão, entre os gêneros *Brachyteles* e *Lagothrix*. O primeiro, restrito ao bioma da Mata Atlântica, teria se separado do segundo, restrito à Amazônia, há aproximadamente 10 milhões de anos (Goodman *et al.*, 1998)

Desse modo, percebemos que provavelmente os processos que levaram à formação das linhagens citadas foram semelhantes a outros mamíferos. Pela similaridade entre os casos, achamos que os achados para a espécie *Cuniculus paca* são bem suportados e racionalmente possíveis.

#### **4.2. Estruturação genética na Amazônia**

Em nossas análises encontramos ao todo três populações (grupos biológicos) presentes no Brasil para o táxon *Cuniculus paca*, sendo duas delas presentes na Amazônia. O grupo que se estende desde o Oeste até o Norte da Amazônia (representado pela cor roxa na estruturação genética) apresentou ampla distribuição geográfica dentro das três populações encontradas e apresentou uma distância genética em média de 1,92% ao compararmos com a população que se estende do Sul até o Leste da Amazônia. A média da distância genética deste grupo com a população da Mata Atlântica foi de 4,52%. A distribuição deste grupo ultrapassa os grandes rios da bacia amazônica, como rio Amazonas, Negro e Solimões, o que já esperávamos devido a espécie ter

uma proximidade rotineira com os cursos d'água e uma excelente habilidade natatória (Aquino *et al.*, 2009). O segundo grupo, que se estende do Sul ao Leste da Amazônia, apresentou uma distribuição distinta, provavelmente também em decorrência da amostragem, que vai da região do do lado direito do Rio Madeira subindo até a divisa do Pará com Maranhão, na REBIO Gurupi. Com exceção das regiões das cabeceiras da drenagem do alto rio Madeira, onde alguns haplótipos co-ocorrem, parece que este rio é o único que funciona como um limitante na distribuição das duas populações do bioma Amazônia. O rio Madeira limita, também, duas áreas de endemismo para distribuição de macacos do gênero *Pithecia*, Inambari (porção oeste) e Rondônia (porção leste) (Marsh, 2014), e parece limitar em sua maior extensão as duas populações de pacas do bioma Amazônia. Este padrão populacional do oeste-leste da Amazônia é muito semelhante ao observado por Bittencourt *et al.* (2019) para a espécie de jacaré *Paleosuchus trigonatus*, lagartos do gênero *Enyalius* (Rodrigues *et al.*, 2014) e anfíbios do gênero *Dendrophryniscus* e *Amazophrynella* (Fouquet *et al.*, 2012; Rojas *et al.*, 2018). Assim, o efeito como barreira populacional pode ser forte para alguns rios, como o Madeira, mas não para outros; como no caso da paca, onde o rio Madeira parece ser o único a ter um efeito na estrutura populacional deste mamífero. Mesmo sendo bons nadadores, os indivíduos de *C. paca* podem ter sua dispersão aquática limitada pelas descargas do rio Madeira que é a terceira maior depois do Amazonas e Orinoco (Godinho & Silva, 2018). Entretanto, isso não explica porque o rio Amazonas não funciona como uma barreira efetiva para as populações das pacas. Isso nos leva a crer que outros fatores históricos ou ecológicos possam estar por trás da estruturação observada.

Apesar do grupo verde-lima não ter sido sugerido como uma linhagem diferente pelos diversos métodos de delimitação, claramente é um grupo que merece mais atenção em trabalhos futuros, uma vez que a média da distância genética com os outros grupos foi de 1,9%. Esta distância é muito próxima à sugerida para espécies diferentes (2%), e também, apresentou monofilia recíproca na distribuição dos haplótipos e nas análises filogenéticas, além de uma distribuição geográfica específica. Estes dois grupos do bioma Amazônia apresentaram monofilia recíproca nas duas análises de reconstrução filogenética (Neighbor-Joining e Máxima Verossimilhança), bem como todas as populações encontradas pela análise do fastBAPS.

O terceiro grupo populacional foi o composto somente por indivíduos do Espírito Santo (Mata Atlântica), o qual foi confirmado por todas as análises realizadas como sendo uma linhagem independente dos grupos populacionais do bioma Amazônia.

### **4.3. Conservação de *Cuniculus paca***

Conforme dito anteriormente, a espécie é um importante recurso econômico e alimentício para as comunidades no interior do Amazonas e de outros estados, tanto indígenas como não-indígenas (Patton et al., 2015, Bizri et al., 2018; Aquino et al., 2009). Além disso, as pacas são excelentes dispersores de frutos dentro de áreas florestas e não florestadas, ajudando na manutenção ecológica do ambiente e na sucessão de espécies nativas da floresta, contribuindo para a conservação de outras espécies associadas (Bonvicino, 2008; Patton et al., 2015). Conservar a espécie alvo deste estudo é conservar outras espécies também.

É surpreendente que uma espécie que ocorra em praticamente todo o território brasileiro não possua uma amostragem nas várias coleções zoológicas. É preciso aumentar os esforços de amostragem e deposição nas principais coleções Zoológicas e museus, no intuito de amenizar as lacunas de amostragem conforme a figura abaixo, para que possamos conhecer melhor este roedor tão importante para os ecossistemas onde ocorre:

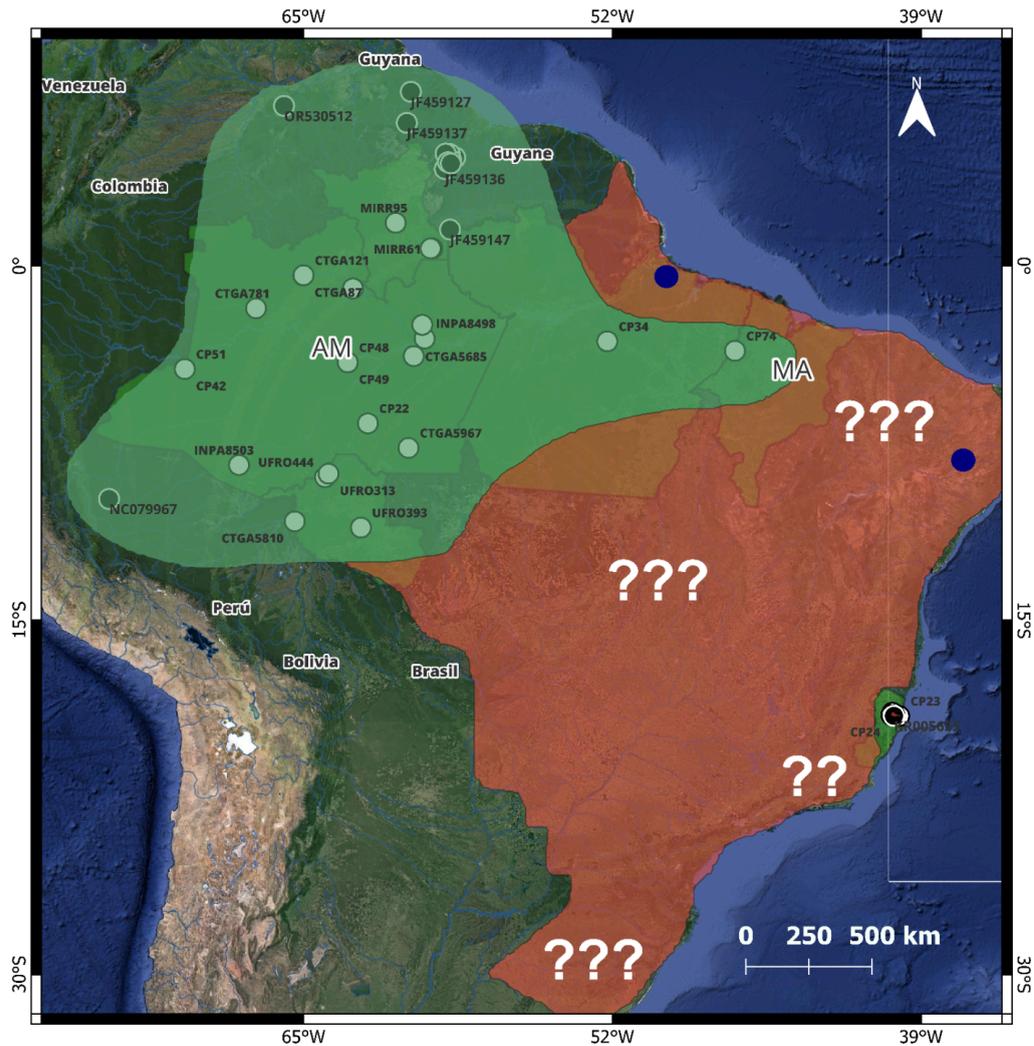


Figura 12. Mapa das áreas que precisam ser mais amostradas para *Cuniculus paca* em vermelho. Pontos brancos correspondem às sequências geradas neste estudo; pretos, sequências provenientes do genbank; azuis, localidades-tipo aproximadas de *Cuniculus paca mexicanae* (Ilha Mexiana, PA) e *Cuniculus paca paca* (Pernambuco).

## 5. CONCLUSÃO

Portanto, as populações de *C. paca* para o território brasileiro foram três ao total, com distâncias genéticas que variam de 1,49% a 4,19%. Essas variações podem estar atreladas a fatores antropogênicos e/ou geográficos (populações amazônicas), mas também fatores biogeoclimáticos (populações amazônicas x população mata atlântica). Todas as populações apresentaram monofilia recíproca nos métodos de reconstrução filogenética, incluindo Neighbor Joining e Máxima Verossimilhança.

As população que se estendem do Oeste ao Norte da Amazônia conseguem perpassar rios de grande extensão e volume d'água, como Rio Negro, Solimões e Amazonas, porém a partir do

lado esquerdo Rio Madeira (com exceção de suas cabeceiras) já encontramos outro grupo populacional. Este grupo se estende do Sul da Amazônia até a divisa do Pará com Maranhão, na REBIO Gurupi.

No contexto das linhagens evolutivas foram encontradas duas, uma Amazônica (englobando as duas populações encontradas pelo fastBAPS) e uma presente na Mata Atlântica (englobando as amostras da Reserva Biológica de Sooretama). A causa provável do acúmulo de passos mutacionais está no isolamento biogeoclimático das linhagens evolutivas.

A comunidade científica precisa aumentar o esforço na amostragem em diversas regiões do Brasil, por exemplo, Centro-oeste, Nordeste, Sul e Sudeste, apesar desta última ainda apresentar algumas poucas amostras depositadas em coleções. Infelizmente, apesar da espécie alvo deste estudo ser amplamente conhecida e até apreciada por algumas comunidades tradicionais, temos certo nível de negligência na amostragem com poucos exemplares disponíveis em coleções/museus.

É interessante que um animal tão comum como a paca possa apresentar uma diversidade ainda não conhecida. É necessário uma maior atenção dos pesquisadores e sociedade quanto às ameaças e aos riscos de eventual extinção de linhagens evolutivas devido a falta de conhecimento sobre sua distribuição, ecologia, e biologia, para podermos assim conservá-las.

## 6. REFERÊNCIAS

- Abreu, E. F., Casali, D. M., Garbino, G. S. T., Loretto, D., Loss, A. C., Marmontel, M., ... & Tirelli, F. P. (2020). Lista de Mamíferos do Brasil. Comitê de Taxonomia da Sociedade Brasileira de Mastozoologia (CT-SBMz).
- Alho, C. J., Mamede, S. B., Benites, M., Andrade, B. S., & Sepúlveda, J. J. (2019). Threats to the biodiversity of the Brazilian Pantanal due to land use and occupation. *Ambiente & Sociedade*, 22..
- 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.
- Antoine, P. O., Marivaux, L., Croft, D. A., Billet, G., Ganerød, M., Jaramillo, C., ... & Gismondi, R. S. (2012). Middle Eocene rodents from Peruvian Amazonia reveal the pattern and timing of caviomorph origins and biogeography. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1732), 1319-1326.
- Aquino, R., Gil, D., & Pezo, E. (2009). Ecological aspects and hunting sustainability of paca (*Cuniculus paca*) in the Itaya river basin, Peruvian Amazonia. *Revista Peruana de Biología*, 16(1), 67-72.
- Avise, J. C., Arnold, J., Ball, R. M., Bermingham, E., Lamb, T., Neigel, J. E., ... & 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.
- Avise, J. C. (2009). Phylogeography: retrospect and prospect. *Journal of biogeography*, 36(1), 3-15.
- Bonilla-Morales, M. M., Rodríguez Pulido, J., & Murillo Pacheco, R. (2013). Biología da Paca (*Cuniculus paca* Brisson): uma perspectiva para sua criação em cativeiro. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, 8(1), 129-142.
- Borisenko, A. V., Lim, B. K., Ivanova, N. V., Hanner, R. H., & Hebert, P. D. (2008). DNA barcoding in surveys of small mammal communities: a field study in Suriname. *Molecular Ecology Resources*, 8(3), 471-479.
- Bonvicino, C. E. A., Oliveira, J. D., & D'Andrea, P. S. (2008). Guia dos roedores do Brasil, com chaves para gêneros baseadas em caracteres externos. *Série de Manuais Técnicos*; 11.

- Bouckaert, R. R., & Drummond, A. J. (2017). bModelTest: Bayesian phylogenetic site model averaging and model comparison. *BMC evolutionary biology*, *17*, 1-11.
- Bouckaert, R., Vaughan, T. G., Barido-Sottani, J., Duchêne, S., Fourment, M., Gavryushkina, A., ... & Drummond, A. J. (2019). BEAST 2.5: An advanced software platform for Bayesian evolutionary analysis. *PLoS computational biology*, *15*(4), e1006650.
- Brown, S. D., Collins, R. A., Boyer, S., LEFORT, M. C., Malumbres-Olarte, J. A. G. O. B. A., Vink, C. J., & Cruickshank, R. H. (2012). Spider: an R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular ecology resources*, *12*(3), 562-565.
- Corander, J., Waldmann, P., & Sillanpää, M. J. (2003). Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, *163*(1), 367-374.
- Corander, J., Marttinen, P., Sirén, J., & Tang, J. (2008). Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC bioinformatics*, *9*, 1-14.
- Costa, L. P. (2003). The historical bridge between the Amazon and the Atlantic Forest of Brazil: a study of molecular phylogeography with small mammals. *Journal of biogeography*, *30*(1), 71-86.
- Darriba, D., Posada, D., Kozlov, A. M., Stamatakis, A., Morel, B., & Flouri, T. (2020). ModelTest-NG: a new and scalable tool for the selection of DNA and protein evolutionary models. *Molecular biology and evolution*, *37*(1), 291-294.
- de Moraes Barros, N., Silva, J. A., & Morgante, J. S. (2011). Morphology, molecular phylogeny, and taxonomic inconsistencies in the study of *Bradypus* sloths (Pilosa: Bradypodidae). *Journal of Mammalogy*, *92*(1), 86-100.
- de Oliveira, G., Araújo, M. B., Rangel, T. F., Alagador, D., & Diniz-Filho, J. A. F. (2012). Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change. *Biodiversity and Conservation*, *21*, 2913-2926.
- Dias, F., Bortolotto, F., & Mila Silveira, ã. (2016). New records of *Cuniculus paca* (Rodentia: Cuniculidae) in a temperate grassland dominated landscape of the Pampa region of Brazil and Uruguay. *Mammalia*.

- Dobrovolny, S., Blaschitz, M., Weinmaier, T., Pechatschek, J., Cichna-Markl, M., Indra, A., ... & Hoehegger, R. (2019). Development of a DNA metabarcoding method for the identification of fifteen mammalian and six poultry species in food. *Food chemistry*, 272, 354-361.
- Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Molecular biology and evolution*, 29(8), 1969-1973.
- Dubost, G., Henry, O., & Comizzoli, P. (2005). Seasonality of reproduction in the three largest terrestrial rodents of French Guiana forest. *Mammalian Biology*, 70(2), 93-109.
- El bizri, H. R., Fa, J. E., Bowler, M., Valsecchi, J., Bodmer, R., & Mayor, P. (2018). Breeding seasonality in the lowland paca (*Cuniculus paca*) in Amazonia: interactions with rainfall, fruiting, and sustainable hunting. *Journal of Mammalogy*, 99(5), 1101-1111.
- Eisenberg, J. F., & Redford, K. H. (1989). *Mammals of the Neotropics, Volume 3: Ecuador, Bolivia, Brazil* (Vol. 3). University of Chicago Press.
- Folmer, O., Hoeh, W. R., Black, M. B., & Vrijenhoek, R. C. (1994). Conserved primers for PCR amplification of mitochondrial DNA from different invertebrate phyla. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 3(5), 294-299.
- Fouquet, A., Recoder, R., Teixeira Jr, M., Cassimiro, J., Amaro, R. C., Camacho, A., ... & Rodrigues, M. T. (2012). Molecular phylogeny and morphometric analyses reveal deep divergence between Amazonia and Atlantic Forest species of *Dendrophryniscus*. *Molecular phylogenetics and evolution*, 62(3), 826-838.
- Frézal, L., & Leblois, R. (2008). Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infection, Genetics and Evolution*, 8(5), 727-736.
- Fujita, M. K., Leaché, A. D., Burbrink, F. T., McGuire, J. A., & Moritz, C. (2012). Coalescent-based species delimitation in an integrative taxonomy. *Trends in ecology & evolution*, 27(9), 480-488.
- Godinho, M. B. D. C., & Da Silva, F. R. (2018). The influence of riverine barriers, climate, and topography on the biogeographic regionalization of Amazonian anurans. *Scientific Reports*, 8(1), 3427.

- Goodman, M., Porter, C. A., Czelusniak, J., Page, S. L., Schneider, H., Shoshani, J., ... & Groves, C. P. (1998). Toward a phylogenetic classification of primates based on DNA evidence complemented by fossil evidence. *Molecular phylogenetics and evolution*, 9(3), 585-598.
- Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1989). *Principles of population genetics*. Sinauer Assoc. Inc, Sunderland, Massachusetts.
- Hebert, P. D., Cywinska, A., Ball, S. L., & DeWaard, J. R. (2003). Biological identifications through DNA barcodes. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 270(1512), 313-321.
- Hebert, P. D., & Gregory, T. R. (2005). The promise of DNA barcoding for taxonomy. *Systematic biology*, 54(5), 852-859.
- Hung, Jui-Hung; Weng, Zhiping. Sequence alignment and homology search with BLAST and ClustalW. Cold Spring Harbor Protocols, 2016, 2016.11: pdb. prot093088.
- IUCN. 2016. The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2016-2. Available at: [www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org). (Acessado: 05 Novembro 2022).
- Ivanova, N.V., Clare, E.L., Borisenko, A.V. (2012). DNA Barcoding in Mammals. In: Kress, W., Erickson, D. (eds) DNA Barcodes. Methods in Molecular Biology, vol 858. Humana Press, Totowa, NJ. [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6\\_8](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-591-6_8)
- Kapli, P., Lutteropp, S., Zhang, J., Kobert, K., Pavlidis, P., Stamatakis, A., & Flouri, T. (2017). Multi-rate Poisson tree processes for single-locus species delimitation under maximum likelihood and Markov chain Monte Carlo. *Bioinformatics*, 33(11), 1630-1638.
- Kennerley, R. J., Lacher Jr, T. E., Hudson, M. A., Long, B., McCay, S. D., Roach, N. S., ... & Young, R. P. (2021). Global patterns of extinction risk and conservation needs for Rodentia and Eulipotyphla. *Diversity and Distributions*, 27(9), 1792-1806.
- Klippel, A. H., Oliveira, P. V., Britto, K. B., Freire, B. F., Moreno, M. R., Dos Santos, A. R., ... & Paneto, G. G. (2015). Using DNA barcodes to identify road-killed animals in two atlantic forest nature reserves, Brazil. *Plos one*, 10(8), e0134877.

- Kozlov, A. M., Darriba, D., Flouri, T., Morel, B., & Stamatakis, A. (2019). RAxML-NG: a fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference. *Bioinformatics*, 35(21), 4453-4455.
- Larsson, A. (2014). AliView: a fast and lightweight alignment viewer and editor for large datasets. *Bioinformatics*, 30(22), 3276-3278.
- Leigh, J. W., Bryant, D., & Nakagawa, S. (2015). POPART: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology & Evolution*, 6(9).
- Leite, R. N., & Rogers, D. S. (2013). Revisiting Amazonian phylogeography: insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Organisms Diversity & Evolution*, 13, 639-664.
- Lima, J. J. S. D. (2017). Avaliação da sustentabilidade do consumo de paca (*Cuniculus paca*) na RDS Amanã através da estrutura sexo-etária.
- Machado, A. F., Ritter, C. D., Miranda, C. L., Bredin, Y. K., Ramos Pereira, M. J., & Duarte, L. (2021). Potential mammalian species for investigating the past connections between Amazonia and the Atlantic Forest. *PloS one*, 16(4), e0250016.
- Malcher, S. M., Pieczarka, J. C., Geise, L., Rossi, R. V., Pereira, A. L., O'Brien, P. C. M., ... & Nagamachi, C. Y. (2017). *Oecomys catherinae* (Sigmodontinae, Cricetidae): Evidence for chromosomal speciation?. *PloS one*, 12(7), e0181434.
- Marsh, L. K. (2014). A taxonomic revision of the saki monkeys, *Pithecia* Desmarest, 1804. *Neotropical primates*, 21(1), 1-165.
- McKiernan, H. E., & Danielson, P. B. (2017). Molecular diagnostic applications in forensic science. In *Molecular diagnostics* (pp. 371-394). Academic Press.
- MENEZES, Fernando Heberon, et al. Integrative systematics of Neotropical porcupines of *Coendou prehensilis* complex (Rodentia: Erethizontidae). *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, 2021, 59.8: 2410-2439.
- Mittermeier, R. A. (2004). *Hotspots revisited*. Cemex.

- Monaghan, M. T., Wild, R., Elliot, M., Fujisawa, T., Balke, M., Inward, D. J., ... & Vogler, A. P. (2009). Accelerated species inventory on Madagascar using coalescent-based models of species delineation. *Systematic biology*, 58(3), 298-311.
- Moraes-Barros, N. D., & Morgante, J. S. (2003). Estudo da variabilidade e estrutura genética em populações de preguiças do gênero *Bradypus* (Xenarthra).
- Moritz, C. T. E. D., Dowling, T. E., & Brown, W. M. (1987). Evolution of animal mitochondrial DNA: relevance for population biology and systematics. *Annual review of ecology and systematics*, 18(1), 269-292.
- Morrone, J. J. (2014). Cladistic biogeography of the Neotropical region: identifying the main events in the diversification of the terrestrial biota. *Cladistics*, 30(2), 202-214.
- Oliveira Neto, J. R., Lopes de Macedo, I. Y., Lopes de Oliveira, N. R., de Queiroz Ferreira, R., & de Souza Gil, E. (2017). Antioxidant capacity and total phenol content in hop and malt commercial samples. *Electroanalysis*, 29(12), 2788-2792.
- Paiva, R. M. S. (2014). Nota técnica sobre modificações na metodologia de extração para obtenção do material genético de macrófitas aquáticas das grades do PPBio do estado de Roraima. *Boletim do Museu Integrado de Roraima (Online)*, 8(02), 68-74.
- Patton, J. L., Pardiñas, U. F., & D'Elía, G. (Eds.). (2015). *Mammals of South America, volume 2: rodents*. University of Chicago Press.
- Pérez, E. M. (1992). Agouti paca. *Mammalian species*, (404), 1-7.
- Puillandre N, Lambert A, Brouillet S, Achaz G. ABGD, Automatic Barcode Gap Discovery for primary species delimitation. *Mol Ecol*. 2012; 21(8): 1864-1877. doi: 10.1111/j.1365-294X.2011.05239.x.
- Ratter, J. A., Ribeiro, J. F., & Bridgewater, S. (1997). The Brazilian cerrado vegetation and threats to its biodiversity. *Annals of botany*, 80(3), 223-230.
- Rambaut, A. (2014). FigTree. Version 1.4. 2. University of Edinburgh, Edinburgh, UK.

- Reid, N. M., & Carstens, B. C. (2012). Phylogenetic estimation error can decrease the accuracy of species delimitation: a Bayesian implementation of the general mixed Yule-coalescent model. *BMC evolutionary biology*, 12(1), 1-11.
- Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C., Miyaki, C. Y., & Cracraft, J. (2012). A palaeobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1729), 681-689.
- Ríos-Uzeda, B., Wallace, R. B., & Vargas, J. (2004). La jayupa de la altura (*Cuniculus taczanowskii*, Rodentia, Cuniculidae), un nuevo registro de mamífero para la fauna de Bolivia. *Mastozoología neotropical*, 11(1), 109-114.
- Rodrigues, M. T., Bertolotto, C. E. V., Amaro, R. C., Yonenaga-Yassuda, Y., Freire, E. M. X., & Pellegrino, K. C. M. (2014). Molecular phylogeny, species limits, and biogeography of the Brazilian.
- Rodríguez-Ruíz, E. R., Castro-Arellano, I., & Valencia-Herverth, J. (2012). New records and proposed geographical range of pacas (*Cuniculus paca*) in northeastern Mexico. *The Southwestern Naturalist*, 57(2), 219-221.
- Rojas, Rommel R., et al. A Pan-Amazonian species delimitation: high species diversity within the genus *Amazophrynella* (Anura: Bufonidae). *PeerJ*, 2018, 6: e4941.
- Rozas, J., Ferrer-Mata, A., Sánchez-DelBarrio, J. C., Guirao-Rico, S., Librado, P., Ramos-Onsins, S. E., & Sánchez-Gracia, A. (2017). DnaSP 6: DNA sequence polymorphism analysis of large data sets. *Molecular biology and evolution*, 34(12), 3299-3302.
- Santini, M. P., Renz, D., & Doerfler, W. (2001). *A comparison of methods to extract pure DNA from mammalian intestinal contents and from feces* (Vol. 2, No. 1, pp. 51-57). Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH.
- Simon, M. F., Grether, R., de Queiroz, L. P., Skema, C., Pennington, R. T., & Hughes, C. E. (2009). Recent assembly of the Cerrado, a neotropical plant diversity hotspot, by in situ evolution of adaptations to fire. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(48), 20359-20364.
- Tamura, Koichiro; Stecher, Glen; Kumar, Sudhir. MEGA11: molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 2021, 38.7: 3022-3027.

- Team, R. C., & R Core Team. (2017). R: a language and environment for statistical computing. R Found. *Stat Comput Vienna Austria*.
- Tonkin-Hill, G., Lees, J. A., Bentley, S. D., Frost, S. D., & Corander, J. (2019). Fast hierarchical Bayesian analysis of population structure. *Nucleic acids research*, 47(11), 5539-5549.
- Van Vuuren, B. J., Kinet, S., Chopelet, J., & Catzeflis, F. (2004). Geographic patterns of genetic variation in four Neotropical rodents: conservation implications for small game mammals in French Guiana. *Biological Journal of the Linnean Society*, 81(2), 203-218.
- 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.
- Werneck, F. P. (2011). The diversification of eastern South American open vegetation biomes: historical biogeography and perspectives. *Quaternary Science Reviews*, 30(13-14), 1630-1648.
- Wilson, D. E., & Reeder, D. M. (Eds.). (2005). *Mammal species of the world: a taxonomic and geographic reference* (Vol. 1). JHU press.
- Wilson-Wilde, L., Norman, J., Robertson, J., Sarre, S., & Georges, A. (2010). *Current issues in species identification for forensic science and the validity of using the cytochrome oxidase I (COI) gene* (Vol. 6, pp. 233-241). Springer US.