

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA  
E BIOLOGIA MOLECULAR

UESLEI DA CONCEIÇÃO LOPES

Caracterização genético-populacional  
de *Prochilodus nigricans* (Prochilodontidae)  
na sub-bacia do rio Tapajós

São Carlos

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA EVOLUTIVA  
E BIOLOGIA MOLECULAR

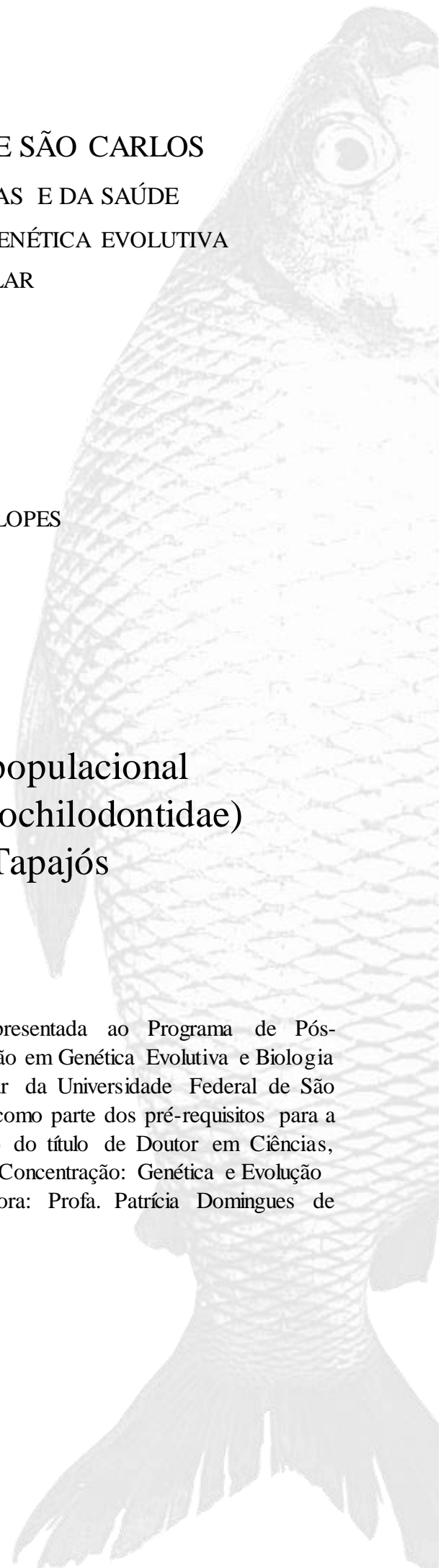
UESLEI DA CONCEIÇÃO LOPES

Caracterização genético-populacional  
de *Prochilodus nigricans* (Prochilodontidae)  
na sub-bacia do rio Tapajós

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular da Universidade Federal de São Carlos, como parte dos pré-requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências, Área de Concentração: Genética e Evolução  
Orientadora: Profa. Patrícia Domingues de Freitas

São Carlos

2018



da Conceição Lopes, Ueslei

Caracterização genético-populacional de *Prochilodus nigricans*  
(Prochilodontidae) na sub-bacia do rio Tapajós / Ueslei da Conceição Lopes.  
-- 2018.

97 f. : 30 cm.

Tese (doutorado)-Universidade Federal de São Carlos, campus São Carlos,  
São Carlos

Orientador: Patrícia Domingues de Freitas

Banca examinadora: Patrícia Domingues de Freitas, Orlando Moreira  
Filho, Luiz Antonio Carlos Bertollo, Evoy Zaniboni Filho, Luís Fernando  
Carvalho Costa

Bibliografia

1. Genética de populações. 2. Genética da Conservação. 3. Barragens. I.  
Orientador. II. Universidade Federal de São Carlos. III. Título.

Ficha catalográfica elaborada pelo Programa de Geração Automática da Secretaria Geral de Informática (SIn).

DADOS FORNECIDOS PELO(A) AUTOR(A)

Bibliotecário(a) Responsável: Ronildo Santos Prado – CRB/8 7325



# UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular

---

## Folha de Aprovação

---

Assinaturas dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a Defesa de Tese de Doutorado do candidato Ueslei da Conceição Lopes, realizada em 03/07/2018:

---

Profa. Dra. Patrícia Domingues de Freitas  
UFSCar

---

Prof. Dr. Orlando Moreira Filho  
UFSCar

---

Prof. Dr. Luiz Antonio Carlos Bertollo  
UFSCar

---

Prof. Dr. Evoy Zaniboni Filho  
UFSC

---

Prof. Dr. Luís Fernando Carvalho Costa  
UFMA

Dedico este trabalho aos meus pais,  
os melhores pais que um filho  
poderia ter, e às minhas avós (*in  
memorian*) por todo carinho e amor.

## AGRADECIMENTOS

Um agradecimento muito especial à minha querida orientadora, Pat! Muito obrigado por todos esses anos de apoio, orientação, pelos puxões de orelha tão importantes para o meu crescimento profissional e pessoal, pela confiança depositada e, sobretudo, pela amizade. Gostaria que soubesse que sinto uma imensa gratidão por tudo que você fez por mim e por ter me dado a oportunidade de fazer parte da turma do LabBMC, onde tive a chance de aprender muito e, também, a sorte de fazer amigos para uma vida inteira.

Ao professor Pedro pela confiança depositada, pelas discussões do meu trabalho e valiosíssimas contribuições. Ter estado em seu laboratório foi uma experiência muito enriquecedora para mim. É sempre muito cativante e inspirador ver a sua empolgação e brilho nos olhos com os nossos resultados!

Ao meu grande amigo Bruno Saranholi, um irmão que a vida me presenteou! Sou extremamente grato por todos esses anos de amizade, apoio, incentivo e, sobretudo, pela sua generosidade sem tamanho! Obrigado por ter me ajudado a coletar os peixes no Mato Grosso e, também com alguns programas. Aprendi e sempre aprendo muito com você! Obrigado por tudo!

Aos meus queridos amigos Alexandra (Lelê) e Luiz Fernando (Luizão), um casal nota mil! Agradeço a Deus por tê-los em minha vida e pela belíssima amizade que construímos nesses anos! Agradeço por todo cuidado, pelo carinho e pela amizade. Agradeço por todo apoio que vocês sempre me deram e dão, por comemorarem comigo as minhas vitórias, por torcerem por mim. Muito obrigado por tudo. De coração!

Um agradecimento especial à minha amiga Josi Ribolli pelas fantásticas discussões e *insights*, os quais foram essenciais para a construção do meu pensamento crítico. Obrigado por despender parte do seu tempo para ler meus manuscritos e contribuir para sua melhora. Além disso, agradeço pelas longas e inúmeras discussões por telefone e *WhatsApp*. Você tem uma participação muito especial em meu trabalho! Muito obrigado!!

Aos amigos da faculdade Thaís Dória e Gustavo Moura pelo companheirismo e amizade, por estarem sempre presentes.

Ao meu amigo Pedro Gallo, por toda sua ajuda, disposição e boa vontade em fazer a minha coleta acontecer. Não tenho dúvidas de que, sem seu apoio, dificilmente teria conseguido

atravessar o estado do Mato Grosso praticamente de uma ponta a outra em busca desses peixes. Obrigado por ter topado o desafio!

A Pati e ao Luciano por toda força, carinho e amizade ao longo de todos esses anos, mesmo eu ainda devendo aquela moqueca de camarão... Que irei pagar! rs

À Carolina Machado, essa pesquisadora recifense *arretada* que muito me ajudou e que tanto me inspira. Quando eu crescer, quero ser igual a você! Obrigado por me ajudar com alguns programas e por discutir comigo o meu trabalho!!

À Carmen Helena pela superajuda com o QGIS! *Gracias Carmencita!!!*

À Rosane Santos (Rosaninha, Carnaval Cidade) pela amizade e por toda sua alegria que animavam os sábados, domingos e feriados de trabalho no lab.! Obrigado pela força nessa reta final de nossos doutoramentos e por sempre repetir a célebre frase “*A gente vai vencer, Snipes!*”.

À Eliana Paviotti-Fischer e Andreia Magro, minhas grandes parceiras de bancada nesse trabalho sem fim que são os microssatélites! Obrigado pela companhia nos finais de semana e por sempre conseguirem uns espaços nas placas de genotipagem para mim!

À Carolina Machado, Jorge Ramirez, Carmen Helena, Karen Rodriguez, Rosane Santos, Carla Gestich e Gilmar Perbiche por terem lido meus textos e me dado valiosas sugestões para a sua melhoria.

Ao Prof. Orlando Moreira Filho por todo seu apoio e torcida pelo meu sucesso! Muito obrigado pelas palavras de incentivo, professor!

Ao Dr. Paulo Venere, Dr. Luís Fernando Carvalho Costa, Dra. Solange Arrolho, Dr. Jorge Porto, Dr. Marcelo Brito, Dra. Carolina Dória, Dr. Mário de Pinna e Michel Donato, Milianny Campos, Rômulo Paixão pela doação e/ou empréstimo de amostras biológicas.

Ao senhor Ademir, Sr. Erzídio, Seu Gaúcho da Ponte, Seu Miguel Pires, Dona Julita da Colônia de Pescadores de Sinop, Seu Walter Bioldi, ao Rogério de Juína por toda ajuda no campo e, também, por colaborarem com o meu projeto.

Aos companheiros da Lagoa do Sino, Thales Medeiros, Leonardo Niero, André Pereira, Caetano Troiani, Thiago Calsolari e Sinara Dal Farra por terem me auxiliado durante o período que em precisei me afastar para finalizar as atividades do meu doutoramento.

Ao Alex Elias Carlino (“Elias”), Daniel Campos, Heber Lombardi, Luiz Manoel, Naja Santana, Henrique Carmona, Caetano Troiani, Fernando Periotto, André Pereira, Leonardo Niero e Leandro Silva pelas incontáveis e longas caronas até São Carlos e, sobretudo, pelas muitas horas de risadas.

Ao Gustavo Mastrodomenico e toda “galera da SIn” por, de tempos em tempos, me socorrem quando o computador resolvia não querer colaborar! Vocês são feras!

Aos meus chefes Luiz Manoel e Alberto Carmassi por todo o apoio!

Agradeço também aos queridos amigos Alexandra Sanches, Gilmar Perbiche, Roberta Lovaglio, José David, Juliano Baltazar, Fabiana Cotrim e Vinícius São Pedro por todo o suporte e compreensão nessa fase final do doutorado!

Aos professores, à Ivanildes e ao Programa de Pós-Graduação em Genética Evolutiva e Biologia Molecular (PPGGEv) por toda assistência.

A todos os amigos do LabBMC, velhos e novos. Gostaria de nominalmente agradecer um por um, mas não quero esquecer ninguém. Muita gente passou por aqui ao longo desses quase sete anos que morei em São Carlos, e cada um teve uma participação especial na minha história. Obrigado a todos pela ótima convivência e pelo espírito de equipe, marcas registradas de nosso laboratório.

Aos membros da banca pelas valiosíssimas contribuições.

À ONG IDEA WILD pelo fornecimento de equipamentos e *software*.

À CAPES pela concessão da bolsa, a qual foi extremamente importante para a minha manutenção em São Carlos.

E, por fim, a toda minha família, meus queridos pais e amigos, que mesmo estando longe fisicamente, sempre fizeram as distâncias parecerem menores. Agradeço a todos vocês pelo amor incondicional, amizade e carinho. Obrigado!



“The saddest aspect of life right now  
is that science gathers knowledge  
faster than society gathers wisdom”

**Isaac Asimov**

“A menos que modifiquemos nossa  
maneira de pensar, não seremos  
capazes de resolver os problemas  
causados pela forma como nos  
acostumamos a ver o mundo”

**Albert Einstein**

## RESUMO

*Prochilodus nigricans* é um peixe migrador, de hábito detritívoro e que apresenta corpo com coloração cinza prateada, com faixas transversais escuras e inconspícuas na nadadeira caudal. Esta espécie possui ampla distribuição nas bacias do rio Amazonas e do rio Tocantins, e destaca-se pela grande importância econômica e social em virtude da pesca de subsistência. Devido às incertezas recentemente levantadas acerca da validade da espécie, este trabalho se propôs a acessar a diversidade genética de *P. nigricans* na região do escudo brasileiro e caracterizar parâmetros genético-populacionais dessa espécie na sub-bacia do rio Tapajós durante um período não reprodutivo. Para testar a ocorrência de diversidade oculta, utilizamos os marcadores mitocondriais COI e ATP6/8 em amostras oriundas das sub-bacias dos rios Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia, e conduzimos uma análise de GMYC com o COI, considerando as sequências geradas no presente estudo e sequências do Genbank de indivíduos amostrados em outras regiões da bacia Amazônica. As análises de estrutura populacional e diversidade genética foram realizadas para oito loci de microssatélites e para os genes ATP6/8 e a região controle do DNA mitocondrial. Tanto para o COI quanto para o ATP6/8 evidenciou-se significativa divergência entre indivíduos amostrados no rio Tapajós, com valores de distância variando entre 1% e 1,9% entre esse grupo e os demais indivíduos amostrados no escudo brasileiro. A análise do GMYC identificou que esses indivíduos constituem outra MOTU (unidade taxonômica operacional molecular), os quais foram excluídos das análises populacionais conduzidas na sub-bacia do rio Tapajós. Os dados mitocondriais e de microssatélites evidenciaram três populações geneticamente diferenciadas, Tapajós, Teles Pires e Juruena, sendo esta última a que se apresentou geneticamente mais diferenciada. As três populações avaliadas apresentaram valores de diversidade genética elevados e similares aos de outras espécies de *Prochilodus*, não demonstrando sinais de expansão ou declínio populacional nos últimos 200 mil anos. Os resultados obtidos no presente estudo acerca da diversidade de *P. nigricans* possuem especial relevância, uma vez que possibilitam um diagnóstico prévio do status genético das populações de *P. nigricans* nos afluentes e calha principal do rio Tapajós, antes dos eventuais efeitos ocasionados pela implantação de barragens. Tais dados servirão de base para estudos futuros que visem avaliar o impacto dessas construções sobre o padrão de distribuição da diversidade genética de espécies migradoras, servindo como um importante instrumento para observar modificações na estrutura genética das populações em áreas fragmentadas por barragens, e subsidiar programas de manejo que visem a conservação da ictiofauna nestas regiões.

## ABSTRACT

*Prochilodus nigricans* is a migratory detritivorous fish, with a silvery grey colored body and dark, irregular, wavy, bar-like patterns on the caudal-fin lobes. This species is widely distributed in the Amazon and Tocantins river basins and stands out for its great economic importance and social relevance due to subsistence fisheries. Because of the uncertainties recently raised regarding the validity of the species, the aims of this work were to assess the genetic diversity of *P. nigricans* in the region of the Brazilian shield and to characterize the genetic-population parameters of this species in the sub-basin of the Tapajós river during a non-reproductive period. In order to test the occurrence of hidden diversity, we used the mitochondrial markers COI and ATP6/8 in samples from the Tapajós, Xingu and Tocantins-Araguaia sub-basins, and conducted a GMYC analysis with COI, considering the sequences generated in the present study and Genbank sequences of individuals sampled in other regions of the Amazon basin. Population structure and genetic diversity analyzes were performed using eight microsatellite loci and, the ATP6/8 genes and the mitochondrial DNA control region. For both COI and ATP6/8, there was a significant divergence between individuals sampled in the Tapajós river, with genetic distance values ranging from 1% to 1.9% between this group and the other individuals sampled in the Brazilian shield. The GMYC analysis identified that these individuals constitute another MOTU (molecular operational taxonomic unit), which were excluded from the population analyzes conducted in the Tapajós sub-basin. Mitochondrial and microsatellite data evidenced three genetically differentiated populations, Tapajós, Teles Pires and Juruena, the latter of which was genetically more differentiated. The three evaluated populations presented high and similar genetic diversity values to those of other species of *Prochilodus* and showed no signs of population expansion or decline in the last 200 thousand years. The results obtained in the present study on the diversity of *P. nigricans* are of particular relevance, since they make possible a previous diagnosis of the genetic status of *P. nigricans* populations in the tributaries and the main channel of the Tapajós river, before the eventual effects caused by the implantation of dams. Such data will serve as a basis for future studies to evaluate the impact of these constructions on the distribution pattern of the genetic diversity of migratory species, serving as an important tool to observe changes in the genetic structure of populations in areas fragmented by dams, and to subsidize management programs that aim at the conservation of the ichthyofauna in these regions.

## LISTA DE FIGURAS

		Página
<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>		
<b>Figura 2.1</b>	Mapa da sub-bacia do rio Tapajós.	21
<b>Figura 2.2</b>	Exemplar de curimatá, <i>Prochilodus nigricans</i> .	24
<b>CAPÍTULO I</b>		
<b>Figura I.1</b>	Mapa com os pontos de amostragem nas sub-bacias dos rios Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia.	35
<b>Figura I.2</b>	Inferência Bayesiana usada para delimitar linhagens de <i>Prochilodus nigricans</i> na bacia Amazônica usando a análise GMYC. Os clados azul e verde representam, respectivamente, os clados do oeste e do leste da Amazônia. Clado laranja representa a linhagem recém-detectada (Cluster 2). Valores de probabilidade posteriores (> 0,99) são representados por asteriscos acima dos nós.	39
<b>Figura I.S1</b>	Redes haplotípicas de <i>Prochilodus nigricans</i> amostrados dentro das sub-bacias dos rios Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia, mostrando a relação de amostras por haplótipo. (A) ATP6/8. (B) COI.	51
<b>CAPÍTULO II</b>		
<b>Figura II.1</b>	Mapa da área de estudo com destaque para os pontos de coleta de <i>Prochilodus nigricans</i> .	56
<b>Figura II.2</b>	Prancha com imagens das atividades de coleta. A= Rio Teles Pires, município de Sorriso. B= Ponte sobre o rio do Sangue, afluente do rio Juruena. C e D= Fixação da rede de emalhar. E= Captura e	58

soltura de exemplar de *Prochilodus nigricans*. F=Entrada de uma lagoa marginal no rio do Sangue, afluente do rio Juruena. G e H= Marcas de ranhuras nas rochas resultantes do hábito detritívoro de *Prochilodus nigricans*.

- Figura II.3** Gráficos de estruturação genética realizados no programa BAPS com os marcadores ATP6/8 e d-loop e de dinâmica populacional realizado no BEAST somente com os dados de d-loop. A= Estrutura populacional de *Prochilodus nigricans* utilizando o marcador ATP6/8. B= Estrutura populacional de *Prochilodus nigricans* utilizando o marcador d-loop. C= Gráfico do BSP da população Juruena. D= Gráfico do BSP da população Teles Pires. E= Gráfico do BSP da população Tapajós. As barras de mesma cor nos gráficos de estruturação representam o mesmo grupo populacional e os números de cada grupo representam os locais de coleta (1-rio Sangue, 2-rio Arinos, 3-rio Vermelho, 4-Cotriguaçu, 5-Sorriso, 6-Sinop, 7-Colíder, 8-rio Apiacás e 9-rio Tapajós). Nos gráficos de dinâmica populacional, o eixo y representa tamanho populacional x tempo de geração (medido em milhões de anos) e o eixo x representa o tempo (indicado em mil anos atrás). O tempo de geração é medido em milhões de anos. **65**
- Figura II.4** Rede de haplótipos baseada na variação dos genes ATP6/8 nas populações amostrais de *Prochilodus nigricans* da sub-bacia do rio Tapajós. As cores referem-se aos pontos amostrais ao longo da sub-bacia e os traços transversais correspondem à quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos. **68**
- Figura II.5** Rede de haplótipos baseada na variação do marcador d-loop nas populações amostrais de *Prochilodus nigricans* da sub-bacia do rio Tapajós. As cores referem-se aos pontos amostrais ao longo da sub-bacia e os traços transversais correspondem à quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos. **69**

<b>Figura II.6</b>	Resultado da análise bayesiana para determinação do número de grupos de <i>Prochilodus nigricans</i> , por meio do logaritmo de probabilidade médio e valores de DeltaK, segundo Evanno (2005).	<b>71</b>
<b>Figura II.7</b>	Gráficos da probabilidade de atribuição de indivíduos de <i>Prochilodus nigricans</i> . As linhas verticais representam a probabilidade de os indivíduos pertencerem aos grupos inferidos, sendo estes indicados pelas diferentes cores. A) $K=2$ . B) $K=3$ .	<b>72</b>
<b>Figura II.8</b>	Gráfico com o número de clusters ( $K=3$ ) mais provável fornecido pelo pacote Geneland	<b>73</b>
<b>Figura II.9</b>	Mapas de probabilidade posterior de atribuição espacial das populações amostrais de <i>Prochilodus nigricans</i> na sub-bacia do rio Tapajós. Agrupamento espacial sugere três clusters distintos ao longo da área geográfica estudada ( <i>Membership</i> ).	<b>74</b>
<b>Figura II.10</b>	Gráfico da análise discriminante de componentes principais evidenciando a existência de três populações distintas de <i>Prochilodus nigricans</i> dentro da sub-bacia do rio Tapajós. JUR= Juruena. TEL= Teles Pires. TAP= Tapajós.	<b>75</b>
<b>Figura A</b>	Gráfico da probabilidade de atribuição de indivíduos de <i>Prochilodus nigricans</i> , considerando indivíduos coletados no rio Apiacás. As linhas verticais representam a probabilidade de os indivíduos pertencerem aos grupos inferidos, sendo estes indicados pelas diferentes cores.	<b>96</b>

## LISTA DE TABELAS

	<b>Página</b>
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>Tabela I.S1</b>	Dados de coleta das amostras utilizadas no presente estudo. <b>49</b> <sup>a</sup> Amostra amplificada com o COI. <sup>b</sup> Amostra amplificada com o ATP6/8.
<b>Tabela I.S2</b>	Números de acesso das sequências de COI de <i>Prochilodus nigricans</i> obtidas no GenBank. <b>50</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	
<b>Tabela II.1</b>	Informações sobre os pontos de coleta de <i>Prochilodus nigricans</i> ao longo da sub-bacia do rio Tapajós. As coordenadas geográficas são dadas em graus decimais. N= número de indivíduos utilizados no presente estudo. <b>57</b>
<b>Tabela II.2</b>	Quantidade de indivíduos de <i>Prochilodus nigricans</i> empregados nas análises com mtDNA, por ponto de coleta ao longo da sub-bacia do rio Tapajós. <b>60</b>
<b>Tabela II.3</b>	Diferenciação genética par-a-par entre indivíduos de <i>Prochilodus nigricans</i> na sub-bacia do rio Tapajós, estimada através de marcadores mitocondriais. Para cada combinação são fornecidos os valores de $\Phi_{ST}$ (com o p e o desvio-padrão). JUR = Juruena, TEL= Teles Pires, TAP = Tapajós. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) encontram-se com asterisco. <b>66</b>
<b>Tabela II.4</b>	Análise de Variância Molecular (AMOVA) das populações estudadas de <i>Prochilodus nigricans</i> da sub-bacia do rio Tapajós utilizando os marcadores mitocondriais ATP6/8 e d-loop, com os valores de porcentagem da variação dentro e entre as populações. <b>66</b>

<b>Tabela II.5</b>	Parâmetros de variação genética nas populações amostrais de <i>Prochilodus nigricans</i> baseados no mtDNA. Para cada marcador são fornecidos o número de sequências analisadas (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).	<b>67</b>
<b>Tabela II.6</b>	Diferenciação genética par-a-par entre indivíduos de <i>Prochilodus nigricans</i> na sub-bacia do rio Tapajós, estimada através de marcadores microssatélites. Para cada combinação são fornecidos os valores de $F_{ST}$ (com o p e o desvio-padrão), $F_{ST}$ calculado com a correção ENA (IC 95%) no software FreeNA e $D_{EST}$ (com o p). JUR = Juruena, TEL= Teles Pires, TAP = Tapajós. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) encontram-se destacados em negrito.	<b>75</b>
<b>Tabela II.7</b>	Análise de Variância Molecular (AMOVA) das populações estudadas de <i>Prochilodus nigricans</i> da sub-bacia do rio Tapajós com oito locos microssatélites, com os valores de porcentagem da variação dentro e entre as populações.	<b>75</b>
<b>Tabela II.8</b>	Parâmetros de variação genética nas populações amostrais de <i>Prochilodus nigricans</i> baseados em oito locos microssatélites. Para cada loco são apresentados o número de indivíduos (N), número de alelos ( $N_a$ ), número de alelos efetivos ( $N_e$ ), número de alelos privados ( $A_p$ ), riqueza alélica ( $R_a$ ), heterozigosidade observada ( $H_o$ ), heterozigosidade esperada ( $H_e$ ), conteúdo de informação polimórfica (PIC), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), valores de p para déficit de heterozigotos ( $p_L$ ), valores de p para excesso de heterozigoto ( $p_S$ ), desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $p_{HWE}$ ). Valores significativos para $F_{IS}$ encontram-se em itálico ( $p = 0.00208$ ); valores significativos de p para EHW ( $0,006 < \alpha < 0,05$ ) após correção sequencial de Bonferroni encontram-se com asteriscos.	<b>77</b>



<b>Tabela A</b>	Sequências dos <i>primers</i> de marcadores do DNA mitocondrial utilizados no presente estudo e suas respectivas temperaturas de anelamento.	<b>95</b>
<b>Tabela B</b>	Painel de loci microssatélites polimórficos para espécies de <i>Prochilodus</i> utilizados no presente trabalho. N= número de alelos.	<b>95</b>
<b>Tabela C</b>	Frequência estimada dos alelos nulos através do <i>software</i> FreeNA.	<b>95</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AMOVA</b>	Análise de variância molecular
<b>ATP6/8</b>	Subunidades 6 e 8 da ATP sintase
<b>BIC</b>	Critério de informação Bayesiana
<b>BSP</b>	<i>Bayesian Skyline Plot</i>
<b>CEUA</b>	Comitê de Ética em Uso Animal da UFSCar
<b>COI</b>	Subunidade I da citocromo c oxidase
<b>DAPC</b>	Análise discriminante de componentes principais ( <i>Discriminant Analysis of Principal Components</i> )
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>EHW</b>	Equilíbrio de Hardy-Weinberg
<b>EPE</b>	Empresa de Pesquisas Energéticas
<b>ESS</b>	Tamanho efetivo da amostragem ( <i>Effective Sample Size</i> )
$F_{IS}$	Coeficiente de endogamia
$F_{ST}$	Índice de fixação de Wright
<b>GMYC</b>	<i>Generalized Mixed Yule-coalescent</i>
<b>He</b>	Heterozigosidade esperada
<b>Ho</b>	Heterozigosidade observada
<b>IUCN</b>	União Internacional para Conservação da Natureza ( <i>World Conservation Union</i> )
<b>IB</b>	Inferência Bayesiana
<b>IBD</b>	Isolamento por distância ( <i>Isolation by distance</i> )
<b>ICMBio</b>	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
<b>K2P</b>	Kimura 2-parâmetros
<b>MCMC</b>	Monte Carlo via Cadeias de Markov ( <i>Markov chain Monte Carlo</i> )
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	Cloreto de Magnésio

<b>MOTU</b>	Unidades Taxonômicas Moleculares Operacionais
<b>mtDNA</b>	DNA mitocondrial
<b>Na</b>	Número de alelos
<b>pb</b>	Pares de base
<b>PCH</b>	Pequena central hidrelétrica
<b>PCR</b>	Reação em cadeia da polimerase ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polietilenoglicol
<b>PHE</b>	Plano Hidroviário Estratégico
<b>PIC</b>	Conteúdo de informação polimórfica
<b>SISBIO</b>	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
<b>SSRs</b>	Sequências simples repetidas ( <i>Simple Sequence Repeats</i> )
<b>UFSCAR</b>	Universidade Federal de São Carlos
<b>UHE</b>	Usina hidrelétrica

## SUMÁRIO

<b>1 APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>19</b>
2.1 Genética da Conservação .....	20
2.2 Área de estudo: Sub-bacia do rio Tapajós .....	21
2.3 A espécie <i>Prochilodus nigricans</i> Agassiz, 1829 .....	23
<b>3 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>25</b>
<b>CAPÍTULO 1: Diversidade oculta em <i>Prochilodus nigricans</i>: detecção de uma nova linhagem na sub-bacia do rio Tapajós</b> .....	<b>30</b>
<b>Resumo</b> .....	<b>32</b>
<b>I.1 Introdução</b> .....	<b>33</b>
<b>I.2 Material e métodos</b> .....	<b>34</b>
I.2.1 Amostragem e requerimentos éticos .....	34
I.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA .....	36
I.2.3 Análises moleculares .....	36
<b>I.3. Resultados e discussão</b> .....	<b>38</b>
<b>Materiais Suplementares</b> .....	<b>40</b>
<b>Agradecimentos</b> .....	<b>40</b>
<b>Contribuições do autor</b> .....	<b>41</b>
<b>Conflitos de interesse</b> .....	<b>41</b>
<b>Referências</b> .....	<b>42</b>
<b>CAPÍTULO II: Estrutura genético-populacional de <i>Prochilodus nigricans</i> na sub-bacia do rio Tapajós</b> .....	<b>52</b>
<b>II.1 Introdução</b> .....	<b>53</b>
<b>II.2 Hipóteses e objetivos</b> .....	<b>54</b>
II.2.1 Hipóteses .....	54
II.2.2 Objetivo geral .....	55
II.2.2 Objetivos específicos .....	55
<b>II.3 Material e métodos</b> .....	<b>56</b>
II.3.1 Amostragem .....	56
II.3.2 Conduta ética e legal .....	59
II.3.3 Extração de DNA e ampliações .....	59
II.3.3.1 Marcadores mitocondriais.....	59

II.3.3.2 Marcadores microsatélites .....	60
II.3.4 Análises estatísticas .....	60
II.3.4.1 Análise com DNA mitocondrial .....	60
II.3.4.2 Análises dos locos microsatélites .....	62
<b>II.4. Resultados .....</b>	<b>64</b>
II.4.1 DNA mitocondrial .....	64
II.4.1.1 Edição de seqüências, estruturação populacional e demografia histórica .....	64
II.4.1.2 Diversidade genética e redes haplotípicas .....	66
II.4.2 Microsatélites .....	70
II.4.2.1 Estruturação genética .....	70
II.4.2.2. Estimativa de diversidade genética .....	76
<b>II.5 Discussão .....</b>	<b>78</b>
II.5.1. Implicações para a conservação .....	82
<b>II.6 Considerações finais .....</b>	<b>84</b>
<b>Referências .....</b>	<b>85</b>
<b>Anexo .....</b>	<b>95</b>
<b>4 CONCLUSÕES .....</b>	<b>97</b>

## 1 APRESENTAÇÃO

Para melhor posicionar o leitor e apresentar o conteúdo de nosso estudo, esta tese foi organizada em uma Introdução Geral e dois capítulos, sendo que o primeiro deles apresentado na forma de artigo científico, aqui traduzido para o português. No Capítulo I, intitulado “Diversidade oculta em *Prochilodus nigricans*: detecção de uma nova linhagem na sub-bacia do rio Tapajós” objetivamos testar a hipótese de que o escudo brasileiro abriga diferentes linhagens de *P. nigricans*, sendo os indivíduos dessa região pertencentes a mais de uma unidade taxonômica molecular operacional. Os achados do Capítulo I foram extremamente importantes para condução das análises posteriores que estão apresentadas no Capítulo II. Além de um melhor conhecimento acerca da real diversidade existente, a detecção e delimitação de unidades moleculares distintas elimina eventuais ruídos nas análises e favorece uma interpretação adequada dos resultados, uma vez que a diversidade populacional verificada pode ser atribuída a uma única MOTU.

Em um cenário de grandes transformações e de perda de diversidade promovidas pelas implantações de empreendimentos hidrelétricos, estudos que tem por finalidade avaliar o status de populações, especialmente de peixes, são extremamente importantes pois geram subsídios para que ações de manejo mais eficazes sejam tomadas. Nesse contexto, o Capítulo II, intitulado “Estrutura genético-populacional de *Prochilodus nigricans* na sub-bacia do rio Tapajós” teve por objetivo estimar parâmetros genético-populacionais e avaliar a estrutura genética de populações dessa espécie de peixe em uma sub-bacia Amazônica que ainda não sofreu severamente os impactos promovidos pelos barramentos, mas que, devido ao seu elevado potencial energético, tem ocupado uma posição de destaque no cenário nacional no que tange à construção desses empreendimentos.

Essa pesquisa ressalta não apenas a importância de estudos diagnósticos prévios, como também traz algumas considerações importantes sobre *P. nigricans* e as implicações desses estudos para a conservação da ictiofauna, em especial, na área de estudo. Para cada uma das seções apresentadas nesta tese, nós disponibilizamos suas próprias referências bibliográficas. Por fim, resumimos nossas conclusões com relação à pesquisa desenvolvida.

## 2 INTRODUÇÃO GERAL

Apesar de toda a água doce do mundo representar apenas 0,01% do total e estar distribuída em uma faixa equivalente a 0,8% da superfície do planeta, os ambientes dulcícolas abrigam uma porção significativa da biodiversidade (DARWALL et al., 2008; DUDGEON et al., 2006), com estimativas superiores a 126 mil espécies (BALIAN et al., 2008). Estes ecossistemas, no entanto, encontram-se extremamente ameaçados devido a fatores como a superexploração, a poluição, a introdução de espécies exóticas, a alteração do curso de rios, a proliferação de barragens, além das mudanças climáticas (BECKER; CRICHIGNO; CUSSAC, 2017; CUCHEROUSSET; OLDEN, 2011; SALA et al., 2000; TANIWAKI et al., 2017). A biodiversidade nesses ambientes tem apresentado sinais de declínio (GARDNER et al., 2015; GLEICK; PALANIAPPAN, 2010), sendo o grupo dos peixes de água doce aquele cujo número de espécies extintas é o mais expressivo em comparação com os demais vertebrados (BURKHEAD, 2012).

O estabelecimento de medidas que visem mitigar os efeitos das ações antrópicas negativas sob a biodiversidade configura um tema de extrema importância (MATTHEWS, 2016), sobretudo em países megadiversos, tais como algumas nações africanas, asiáticas e latino-americanas (WINEMILLER et al., 2016). Nesse contexto, o Brasil atrai a atenção mundial por despontar como uma das principais nações quando o quesito é diversidade biológica (COLLEN et al., 2014; MYERS et al., 2000). Segundo o Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2012), o país detém 9% da biodiversidade do planeta, tendo sido registradas no Catálogo Taxonômico da Fauna Brasileira, até o momento, mais 118 mil espécies válidas (BRASIL, 2018). Os registros mostram que a grande maioria dos taxons identificados pertence ao filo Arthropoda (com quase 94 mil espécies), sendo este seguido pelos cordados, os quais representam 10% do total. Já para os peixes ósseos marinhos e continentais, existem cerca de 4400 espécies registradas.

Apesar da riqueza de espécies da ictiofauna brasileira, e do crescente número de novas descrições, tendo mais de 260 taxons sido descritos apenas entre os anos de 2001 e 2005 (BUCKUP; MENEZES; GHAZZI, 2007), aspectos da biologia, comportamento, ecologia e genética de diversas espécies de peixes ainda são incipientes ou completamente desconhecidos. Além disso, a rapidez com que os ambientes dulcícolas têm sido impactados tem levado diversas espécies a figurar listas de espécies ameaçadas de extinção (ICMBIO, 2016) ou mesmo a desaparecerem da natureza sem ao menos terem sido efetivamente estudadas.

## 2.1 Genética da Conservação

A necessidade de conservar a diversidade genética é reconhecida pela União Internacional para Conservação da Natureza, *World Conservation Union* (IUCN), o maior grupo internacional de conservação, como um dos três pilares para a manutenção da biodiversidade (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Nesse contexto, a Genética da Conservação surge como uma disciplina que se concentra nos efeitos da distribuição da variabilidade genética atual sobre a sobrevivência das espécies a longo prazo (WAN et al., 2004). O seu grande desafio consiste justamente no manejo de populações fragmentadas a fim de minimizar a depressão endogâmica e a perda de diversidade genética (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013).

Diversos são os grupos animais e vegetais que têm sido estudados sob a óptica da Genética da Conservação, assim como as ferramentas utilizadas. Para o grupo dos peixes, os microssatélites ou *Simple Sequence Repeats* (SSRs) correspondem a um dos marcadores moleculares mais amplamente empregados em estudos populacionais (PIORSKI et al., 2008). Os microssatélites consistem em sequências curtas, de poucos nucleotídeos (1-6 pares de bases) repetidos em tandem e amplamente distribuídas pelo genoma, que apresentam codominância e um alto grau de polimorfismo (TAUTZ, 1989). Esses marcadores permitem a individualização de amostras e podem fornecer informações sobre fluxo gênico, distribuição variabilidade genética, detecção de reduções recentes do tamanho populacional, além de outras abordagens (ALLENDORF, 2017; SARANHOLI; CHÁVEZ-CONGRAINS; GALETTI, 2017).

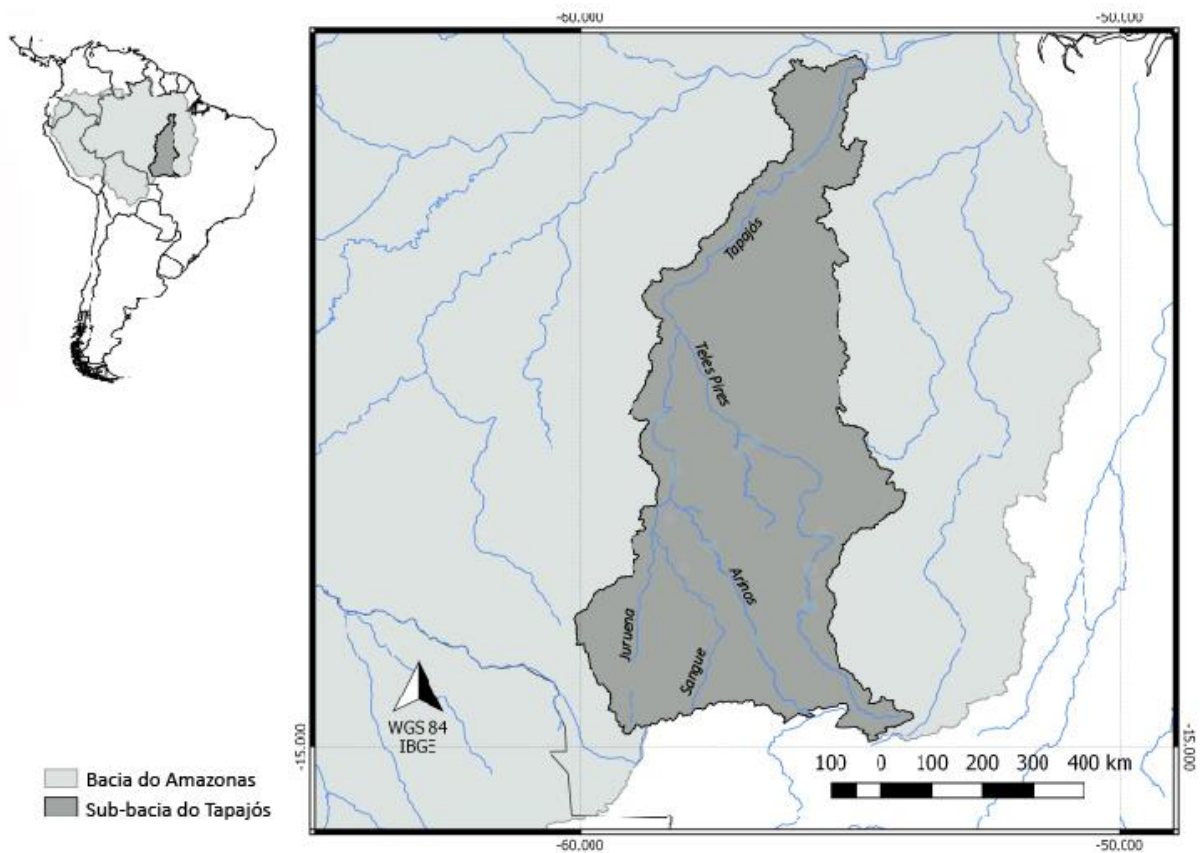
O uso de marcadores do DNA mitocondrial (mtDNA), por sua vez, também tem sido empregado em estudos que podem ter implicações sobre a conservação da biodiversidade. Aspectos que envolvem a resolução de questões taxonômicas, descrição de novas espécies (ou complexos de espécies), além da identificação de espécies a partir de amostras biológicas de tecidos (*e.g.* identificação molecular de fauna atropelada e de amostras de caça apreendida, etc.) (MACHADO et al., 2017; PIRES et al., 2017; RODRÍGUEZ-CASTRO et al., 2017) são extremamente importantes do ponto de vista da conservação. Somado a isso, o acesso à diversidade genética intrapopulacional, bem como o estudo de eventos populacionais como a detecção de sinais de declínio ou expansão em populações naturais (FERREIRA et al., 2017; MONDIN et al., 2018), também constituem temas estudados a partir do emprego de marcadores do genoma mitocondrial (ou mitogenoma), como é caso da região controle, da subunidade I da citocromo c oxidase (COI) e das subunidades 6 e 8 da ATP sintase (ATP6/8) (SILVA et al., 2016).



## 2.2 Área de estudo: Sub-bacia do rio Tapajós

A sub-bacia do rio Tapajós (Figura 2.1) destaca-se por ser uma das maiores regiões hidrográficas que compõem a bacia Amazônica, abarcando um total de 493.986 ha (ANA, 2015) e contribuindo com aproximadamente 6% de toda água doce carreada para o rio Amazonas (LATRUBESSE; STEVAUX; SINHA, 2005). Localizada na porção central da bacia Amazônica, sua área abrange parte dos estados do Amazonas, Mato Grosso e Pará, e abriga porções dos biomas Cerrado e Amazônico (SCOLES, 2016). O clima na região do Tapajós é considerado tropical úmido, sendo o período mais chuvoso compreendido entre os meses de dezembro e março, no verão e outono, ao passo que menores precipitações são detectadas no inverno e primavera, entre junho e setembro (INMET, 2018). A sazonalidade pluviométrica na porção sul da sub-bacia, no entanto, é um pouco diferente da extensão norte, apresentando uma maior estação seca (SCOLES, 2016).

Figura 2.1 Mapa da sub-bacia do rio Tapajós.



O rio Tapajós apresenta uma extensão de 780 km e sua formação se dá após a confluência dos rios Juruena e Teles Pires, os quais constituem duas sub-bacias de segunda ordem (ICMBIO, 2011a), em Barra de São Manoel, entre os estados do Mato Grosso (MT) e do Pará (PA). Já o tributário Teles Pires, assim como os demais rios da sub-bacia, apresenta águas claras e percorre uma extensão de 1.482 km desde suas nascentes, nas serras Azul e do Finca Faca, até o encontro com o rio Juruena. Esse rio se constitui um divisor natural entre os estados do MT e PA, sendo sua região hidrográfica quase que inteiramente localizada no estado de Mato Grosso, perfazendo uma área aproximada de 142 mil km<sup>2</sup>. Dentre seus principais tributários destacam-se os rios Verde, Paranaíta, Apiacás e Ximari na margem esquerda e os rios Paranatinga, Caiapó, Peixoto Azevedo, São Benedito e Cururu-Açu, na margem direita (EPE, 2011). No médio Teles Pires, mais precisamente à montante da foz do rio Apiacás, localizam-se várias corredeiras, nas quais se situava a região de Sete Quedas, a qual encontra-se atualmente submersa devido à construção da usina hidrelétrica (UHE) Teles Pires. Já no seu baixo curso, cuja área é de aproximadamente 39.137,44km<sup>2</sup>, o rio Teles Pires é mais largo e as águas são vagarosas (ICMBIO, 2011a; OHARA et al., 2017).

O rio Juruena, por sua vez, possui 1.240 km de extensão e é o que mais contribui para a vazão do rio Tapajós. Suas nascentes estão localizadas na Chapada dos Parecis, a uma altura média de 750 m, na porção mais ocidental do escudo brasileiro (ASSIS et al., 2015; OHARA; LOEB, 2016). A região hidrográfica do rio Juruena tem uma área de 188.000km<sup>2</sup>, cheia de meandros, com diversas corredeiras e cachoeiras presentes ao longo de seu curso. Seus principais tributários são os rios Arinos, Sangue e Pagagaio e, na sua porção mais baixa, os rios São Tomé, Santana e Matrinxã ou São João da Barra. Suas águas claras possuem coloração variando entre o verde e o verde-oliva (ICMBIO, 2011a, 2011b).

A sub-bacia do rio Juruena situa-se em uma região que possui 27 unidades de conservação, 35 terras indígenas, além de mais de 200 assentamentos, sendo a população humana estimada nesta área superior a 1.200.000 habitantes (MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES, 2013). Atualmente, ela se configura como uma região de destaque no cenário nacional, sendo considerada uma área estratégica para implantação de empreendimentos hidrelétricos, visto que seus principais rios (Tapajós, Apiacás, Jamanxin, Teles Pires e Juruena), juntos, têm um potencial energético para gerar cerca de 17.500 MW. Somado a isso, os rios Teles Pires e Tapajós estão incluídos no Plano Hidroviário Estratégico - PHE, o qual os indica como área prioritária para navegação fluvial, uma vez que favorecerá o escoamento da produção

do estado do Mato Grosso para o rio Amazonas e, conseqüentemente, para o oceano Atlântico (ANA, 2015; MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES, 2013), gerando mais divisas.

### 2.3 A espécie *Prochilodus nigricans* Agassis, 1829

*Prochilodus nigricans*, conhecida popularmente como curimatá, destaca-se como uma das espécies com a maior distribuição na bacia do rio Amazonas, sendo encontrada na sua calha e nos principais tributários, além da bacia do rio Tocantins (CARVALHO; MERONA, 1986). É um peixe de corpo alto, coloração cinza prateada, faixas transversais escuras e inconspícuas no dorso, podendo ultrapassar os 40 cm de comprimento (MOTA; RUFFINO, 1997) (Figura 2.2). Assim como os demais representantes da família Prochilodontidae, *P. nigricans* é uma espécie que possui alterações em sua estrutura buco-faríngea (e.g. dentes diminutos e espatulados, e lábios carnosos em forma de ventosa), que favorecem a coleta e o processamento de microorganismos, detritos, perifítons, além de matéria orgânica em decomposição, geralmente depositada no fundo dos rios (DOS SANTOS; FERREIRA; ZUANON, 2006). Essa espécie, assim como os demais peixes detritívoros migradores, tem acesso a uma abundante fonte de energia (CASTRO; VARI, 2004; FLECKER, 1996) e contribui para modular o fluxo de carbono e a produtividade dos ecossistemas (TAYLOR; FLECKER; HALL, 2006).

Trata-se de uma espécie que apresenta rápido crescimento, alta fecundidade atrelada a um período curto de desova e que não possui qualquer tipo de cuidado parental. Segundo Winemiller (1989), esses traços biológicos correspondem a uma estratégia sazonal, a qual lhe permite tirar proveito tanto das variações temporais quanto sazonais, garantindo aos indivíduos juvenis maiores chances de crescimento e sobrevivência, além de propiciar uma rápida reposição populacional (SILVA; STEWART, 2017). Esses peixes, que são potamódramos, organizam-se em grandes cardumes para realizar migrações com fins reprodutivos, ou em resposta a fatores bióticos e abióticos (SILVA; STEWART, 2006). Segundo a pesquisa de Montreuil e Rodriguez (2001) realizada com curimatás em uma porção peruana da bacia amazônica, os machos e as fêmeas da espécie atingem seu comprimento médio de maturação com 23,4 e 24,3 cm, respectivamente, e apresentam um período de reprodução no rio Amazonas entre os meses de dezembro e março, com o ápice em janeiro.

Aparentemente essa espécie possui mais de um tipo de padrão migratório. Nos rios Amazonas e Madeira, indivíduos adultos de *P. nigricans* migram entre sucessivas áreas de várzea no período seco, deixando-as durante as cheias para desovar na entrada dos lagos. Já no

rio Tocantins, antes da construção da barragem de Tucuruí, eles abandonavam as áreas alagadas durante o período de seca e migravam rumo à montante. A desova só acontecia em uma área extensa na porção alta do rio após a elevação do nível das águas, sendo posteriormente os ovos e larvas carregados passivamente rio abaixo (ARAUJO-LIMA; RUFFINO, 2003).

Figura 2.2. Exemplar de curimatá, *Prochilodus nigricans*.



Foto: Ueslei Lopes.

Conhecidas popularmente como curimatá no Brasil e como *sábalo*, *bocachico* e *boquichico* na Bolívia, Colômbia e Peru, respectivamente (ARAUJO-LIMA; RUFFINO, 2003), as espécies viventes desse gênero estão entre as mais abundantes e amplamente distribuídas da América do Sul (SIVASUNDAR; BERMINGHAM; ORTI, 2001). *Prochilodus nigricans* é extremamente importante do ponto de vista econômico, destacando-se com uma das espécies mais pescadas nas águas continentais brasileiras (FERRAZ; BARTHEM, 2016; FERRAZ; LIMA; AMARAL, 2012), além de muito utilizada na pesca de subsistência (ISAAC et al., 2015; ZACARKIM et al., 2015).

De acordo com uma das maiores revisões taxonômicas da família Prochilodontidae baseada em dados morfológicos (CASTRO; VARI, 2004), o gênero *Prochilodus* seria constituído por 13 espécies nominais, das quais apenas três (*Prochilodus britskii* Castro, 1993, *Prochilodus nigricans* Agassiz, 1829 e *Prochilodus rubrotaeniatus* Jardine, 1841) têm registros para a bacia Amazônica. Contudo, a partir do uso de marcadores nucleares e mitocondriais, a validade taxonômica de *P. nigricans* foi contestada, devido a detecção de duas grandes

linhagens na bacia amazônica, uma delas constituída por indivíduos das sub-bacias Tapajós e Tocantins-Araguaia e outra pelos demais indivíduos da bacia amazônica, além de representantes de *P. rubrotaeniatus* agrupados em ambos os *clusters* (MELO et al., 2016). Em outro trabalho, os autores reduziram as unidades que compõem o gênero *Prochilodus* a oito linhagens, sendo quatro delas formadas por quatro espécies nominais válidas e as demais constituídas por espécies que taxonomicamente requerem revisão (MELO et al., 2018).

### 3. REFERÊNCIAS

- ALLENDORF, F.; LUIKART, G.; AITKEN, S. **Conservation and the genetics of populations, 2nd edition.** [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
- ALLENDORF, F. W. Genetics and the conservation of natural populations: allozymes to genomes. **Molecular Ecology**, v. 26, n. 2, p. 420–430, 2017.
- ANA. **Conjuntura dos recursos hídricos no Brasil: regiões hidrográficas brasileiras.** Brasília: [s.n.].
- ARAÚJO-LIMA, C. A. R. M.; RUFFINO, M. L. Migratory fishes of the Brazilian Amazon. In: CAROLSFELD, J. et al. (Eds.). **Migratory fishes of South America: biology and conservation status.** [s.l.: s.n.]. p. 237–301.
- ASSIS, C. et al. Hydroclimatic regionalization of the Tapajós river watershed. **Revista Geográfica Acadêmica**, v. 99, n. 11, p. 32–51, 2015.
- BALIAN, E. V. et al. The Freshwater Animal Diversity Assessment: An overview of the results. **Hydrobiologia**, v. 595, n. 1, p. 627–637, 2008.
- BECKER, L. A.; CRICHIGNO, S. A.; CUSSAC, V. E. Climate change impacts on freshwater fishes: a Patagonian perspective. **Hydrobiologia**, p. 1–18, 2017.
- BRASIL. **Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil.** Disponível em: <<http://fauna.jbrj.gov.br>>. Acesso em: 21 maio. 2018.
- BUCKUP, P. A.; MENEZES, N. A.; GHAZZI, M. S. **Catálogo das espécies de peixes de água doce do Brasil.** Rio de Janeiro: Museu Nacional, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2007.
- BURKHEAD, N. M. Extinction Rates in North American Freshwater Fishes, 1900–2010. **BioScience**, v. 62, n. 9, p. 798–808, 2012.

- CARVALHO, J. L. DE; MERONA, B. DE. Estudos sobre dois peixes migratórios do Baixo Tocantins, antes do fechamento da barragem do Tucuruí. **Amazoniana**, v. 9, n. 4, p. 595–607, 1986.
- CASTRO, R. M. C.; VARI, R. P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei:Ostariophysi:Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. **Smithsonian Contributions to Zoology**, n. 622, p. 1–189, 2004.
- COLLEN, B. et al. Global patterns of freshwater species diversity, threat and endemism. **Global Ecology and Biogeography**, v. 23, n. 1, p. 40–51, 2014.
- CUCHEROUSSET, J.; OLDEN, J. D. Ecological Impacts of Non-native Freshwater Fishes. **Fisheries Bethesda**, v. 36, n. 5, p. 215–230, 2011.
- DARWALL, W. et al. Freshwater biodiversity – a hidden resource under threat. In: VIÉ, J. C.; HILTON-TAYLOR, C.; STUART, S. N. (Eds.). . **The 2008 Review of The IUCN Red List of Threatened Species**. Gland: IUCN, 2008. p. 1–11.
- DOS SANTOS, G. M.; FERREIRA, E. J. G.; ZUANON, J. A. S. **Peixes comerciais de Manaus**. [s.l.] IBAMA, PróVarzea, 2006.
- DUDGEON, D. et al. Freshwater biodiversity : importance , threats , status and conservation challenges. v. 81, p. 163–182, 2006.
- EPE. **RIMA: Relatório de Impacto Ambiental da Usina hidrelétrica São Manoel** Brasília, 2011. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-247/Rima - UHE São Manoel.pdf>>
- FERRAZ, P.; BARTHEM, R. **Estatística do monitoramento do desembarque pesqueiro na região de Tefé – Médio Solimões: 2008-2010**. Tefé: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2016.
- FERRAZ, P.; LIMA, D.; AMARAL, E. **Estatística do Monitoramento do Desembarque Pesqueiro na Região de Tefé - Médio Solimões: Os primeiros 16 anos (1992-2007)**. Tefé: Instituto de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, 2012.
- FERREIRA, D. G. et al. Genetic structure and diversity of migratory freshwater fish in a fragmented Neotropical river system. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v. 27, n. 1, p. 209–231, 2017.
- FLECKER, A. S. Ecosystem Engineering by a Dominant Detritivore in a Diverse Tropical Stream. **Ecology**, v. 77, n. 6, p. 1845–1854, 1996.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. **Fundamentos de Genética da Conservação**. Ribeirão Preto: Editora SBG, 2008.

GARDNER, R. C. et al. **State of the World's Wetlands and Their Services to People: A Compilation of Recent Analyses**. 12th Meeting of the Conference of the Parties to the Convention on Wetlands (Ramsar, Iran, 1971). **Anais...Punta del Leste: Ramsar Briefing Note 7, 2015** Disponível em: <[www.ramsar.org](http://www.ramsar.org)>

GLEICK, P. H.; PALANIAPPAN, M. Peak water limits to freshwater withdrawal and use. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, n. 25, p. 11155–11162, 2010.

ICMBIO. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Juruena. Encarte 2**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/Encarte2.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2018a.

ICMBIO. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Juruena. Encarte 3**. 2011b.

ICMBIO. **Sumário Executivo Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**. Instituto ed. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, 2016.

INMET. **Banco de Dados Meteorológicos para Ensino e Pesquisa**. Brasília: [s.n.]. Disponível em: <<http://www.inmet.gov.br>>.

ISAAC, V. J. et al. Artisanal fisheries of the Xingu River basin in Brazilian Amazon. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 3, p. 125–137, 2015.

LATRUBESSE, E. M.; STEVAUX, J. C.; SINHA, R. Tropical rivers. v. 70, p. 187–206, 2005.

MACHADO, C. D. B. et al. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). **Systematics and Biodiversity**, v. 15, n. 4, p. 372–382, 2017.

MATTHEWS, N. People and fresh water ecosystems: pressures, responses and resilience. **Aquatic Procedia**, v. 6, p. 99 – 105, 2016.

MELO, B. F. et al. Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 102, p. 189–201, 2016.

MELO, B. F. et al. Little Divergence Among Mitochondrial Lineages of *Prochilodus* (Teleostei, Characiformes). v. 9, n. April, p. 1–9, 2018.

MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE - MMA. **Brasil tem mais de 116 mil espécies da fauna**. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/index.php/comunicacao/agencia-informma?view=blog&id=1386>>. Acesso em: 21 maio. 2018.

- MINISTÉRIO DOS TRANSPORTES. **PHE: Plano Hidroviário Estratégico**, 2013.
- MONDIN, L. A. DE C. et al. Genetic Pattern and Demographic History of *Salminus brasiliensis*: Population Expansion in the Pantanal Region during the Pleistocene. **Frontiers in Genetics**, v. 9, p. 1, 2018.
- MONTREUIL, V.; GARCÍA, Á.; RODRÍGUEZ, R. Biología reproductiva de “Boquichico” *Prochilodus nigricans*, en la amazonía peruana. **Folia Amazónica**, v. 12, p. 5–14, 2001.
- MOTA, S. Q.; RUFFINO, M. L. Biología e pesca do curimatá (*Prochilodus nigricans* Agassiz, 1829) (Prochilodontidae) no médio Amazonas. **Revista UNIMAR**, v. 19, n. 2, p. 493–508, 1997.
- MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.
- OHARA, W. M. et al. **Peixes do rio Teles Pires: diversidade e guia de Identificação**. Goiânia: Gráfica e Editora Amazonas, 2017.
- OHARA, W. M.; LOEB, M. V. Ichthyofauna of the upper Juruena river on Chapada dos Parecis, Mato Grosso, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 16, n. 4, p. 1–10, 2016.
- PIORSKI, N. M. et al. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, S, p. 1039–1050, 2008.
- PIRES, A. A. et al. Molecular analysis reveals hidden diversity in *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae): a genus of giant South American catfish. **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 335–340, 2017.
- RODRÍGUEZ-CASTRO, K. G. et al. Using DNA barcode to relate landscape attributes to small vertebrate roadkill. **Biodiversity and Conservation**, v. 26, n. 5, p. 1161–1178, 2017.
- SALA, O. E. et al. Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100 Global Biodiversity Scenarios for the Year 2100. **Science**, v. 287, n. March, p. 1770–1774, 2000.
- SARANHOLI, B. H.; CHÁVEZ-CONGRAINS, K.; GALETTI, P. M. Evidence of recent fine-scale population structuring in South American *Puma concolor*. **Diversity**, v. 9, n. 4, 2017.
- SCOLES, R. Caracterização ambiental da bacia do Tapajós. In: ALARCON, D. F.; MILLIKAN, B.; TORRES, M. (Eds.). **Ocekadí: hidrelétricas, conflitos socioambientais e resistência na Bacia do Tapajós**. Brasília: International Rivers Brasil, 2016. p. 29–42.
- SILVA, W. C. DA et al. Early Pleistocene lineages of *Bagre bagre* (Linnaeus, 1766) (Siluriformes: Ariidae), from the Atlantic coast of South America, with insights into the



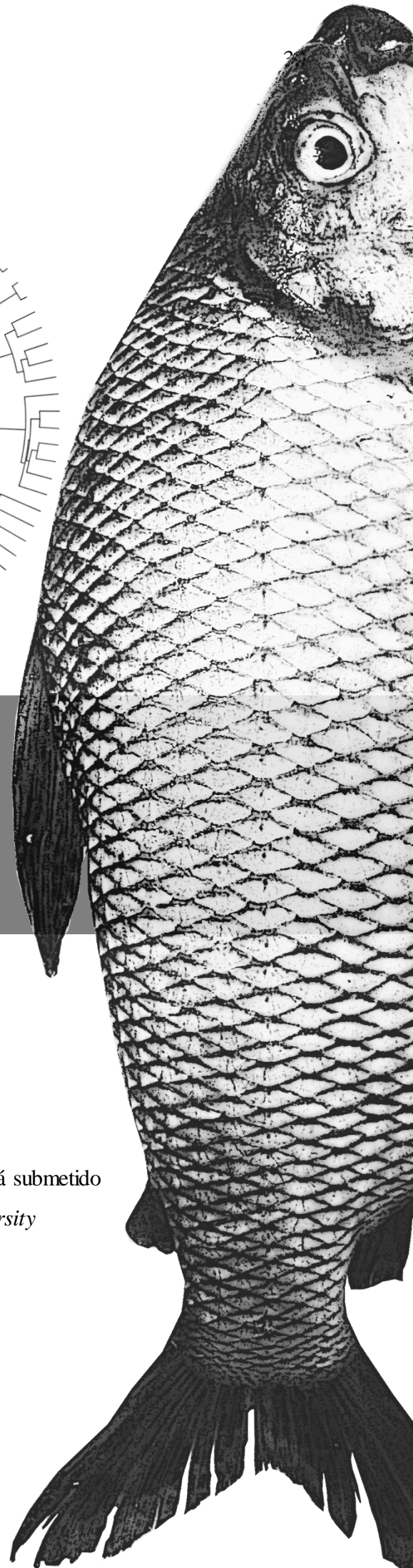
- demography and biogeography of the species. **Neotropical Ichthyology**, v. 14, 2016.
- SILVA, E. A.; STEWART, D. J. Age structure, growth and survival rates of the commercial fish *Prochilodus nigricans* (bocachico) in North-eastern Ecuador. **Environmental Biology of Fishes**, v. 77, n. 1, p. 63–77, 2006.
- SILVA, E. A.; STEWART, D. J. Reproduction, feeding and migration patterns of *Prochilodus nigricans* (Characiformes: Prochilodontidae) in northeastern Ecuador. **Neotropical Ichthyology**, v. 15, n. 3, p. 1–13, 2017.
- SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407–417, 2001.
- TANIWAKI, R. H. et al. Climate change and multiple stressors in small tropical streams. **Hydrobiologia**, v. 793, n. 1, p. 41–53, 2017.
- TAUTZ, D. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. **Nucleic Acids Research**, v. 17, n. 16, p. 6463–6471, 1989.
- TAYLOR, B. W.; FLECKER, A. S.; HALL, R. O. Loss of a harvested fish species disrupts carbon flow in a diverse tropical river. **Science**, v. 313, n. 5788, p. 833–836, 2006.
- WAN, Q. H. et al. Which genetic marker for which conservation genetics issue? **Electrophoresis**, v. 25, n. 14, p. 2165–2176, 2004.
- WINEMILLER, K. O. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. **Oecologia**, p. 225–241, 1989.
- WINEMILLER, K. O. et al. Balancing hydropower and biodiversity in the Amazon, Congo, and Mekong. **Science**, v. 351, n. 6269, p. 128–129, 2016.
- ZACARKIM, C. E. et al. The panorama of artisanal fisheries of the Araguaia River , Brazil. **Fisheries Science**, v. 81, p. 409–416, 2015.



# Capítulo I

Diversidade oculta em  
*Prochilodus nigricans*: detecção de  
uma nova linhagem na sub-bacia  
do rio Tapajós

Versão em português do artigo que será submetido  
à publicação no periódico *Diversity*



## CAPÍTULO I

*Short communication*

### **Diversidade oculta em *Prochilodus nigricans*: detecção de uma nova linhagem na sub-bacia do rio Tapajós**

Ueslei Lopes<sup>1\*</sup>, Pedro M. Galetti Jr<sup>1</sup> e Patrícia Domingues de Freitas<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética e Evolução, Universidade Federal de São Carlos, Rodovia Washington Luís, Km 235 - SP-310, São Carlos, SP, 13565-905, Brasil.

Phone: +55 163351-8309

E-mail: uesleilopes@gmail.com (U.L.); pmgaletti@ufscar.br (P.M.G.Jr); patdf@ufscar.br (P.D.F.)

## Resumo

*Prochilodus nigricans* é um peixe de água doce muito abundante e amplamente distribuído pela bacia amazônica. Sua validade taxonômica foi recentemente questionada quando diferenças genéticas entre populações da porção ocidental e oriental da bacia foram detectadas. Sabendo que o escudo brasileiro, onde a população oriental está distribuída, consiste em uma região de alta diversidade e endemismo da ictiofauna, este trabalho teve como objetivo testar a hipótese de que *P. nigricans* dessa região apresenta diversidade oculta. Para tanto, redes de haplótipos foram reconstruídas usando os marcadores mitocondriais COI e ATP6/8, os quais também foram utilizados para calcular as distâncias genéticas. Além disso, nós conduzimos uma abordagem de delimitação de espécies empregando o modelo GMYC (*Generalized Mixed Yule-coalescent*) com sequências de COI produzidas neste estudo, e outras previamente publicadas, incluindo indivíduos amostrados em toda a bacia Amazônica. A partir dos nossos resultados constatamos a existência de diferenciação genética significativa em *P. nigricans* oriental. Também reforçamos a importância de estudos que visem detectar a diversidade oculta, os quais podem abordar questões taxonômicas e certamente favorecer melhores ações de conservação.

## I.1 Introdução

Os ecossistemas de água doce têm sofrido grandes impactos e transformações [1], tornando estudos com foco na descoberta e compreensão da extensão da biodiversidade vitais para sua conservação. Com mais de 5160 espécies de peixes de água doce descritas, os rios da América do Sul abrigam um terço das espécies de peixes de todo o planeta, mas a expectativa é que esse número seja 42% maior [2].

Ao longo dos anos, o emprego de ferramentas moleculares para inventariar a biodiversidade tem aumentado e revelado uma biodiversidade oculta. Esta abordagem tem ajudado a esclarecer questões taxonômicas, delimitando linhagens genéticas e auxiliado na caracterização de Unidades Taxonômicas Operacionais Moleculares (MOTUs) [3], que são conjuntos de sequências ortólogas. Sob essa perspectiva, a bacia Amazônica ocupa uma posição notável, uma vez que sua grande extensão abriga uma enorme diversidade de espécies de peixes [3], muitas das quais permanecem desconhecidas.

*Prochilodus nigricans* é um peixe caracídeo amazônico muito abundante, o qual começa a migração para fins reprodutivos assim que o período de cheia dos rios se inicia [4,5]. Com uma dieta detritívora, esse peixe desempenha um papel funcional essencial nos ecossistemas, modulando os fluxos de energia e nutrientes [6]. Esta espécie também assume um importante status econômico e social no Brasil, uma vez que é uma das que dominam a produção pesqueira regional, sendo altamente utilizada para a subsistência de comunidades ribeirinhas [7,8]. Conhecido como curimatá, este peixe é uma das três espécies do gênero encontradas na bacia do rio Amazonas e aquela que apresenta a maior distribuição geográfica nessa drenagem em comparação com espécies congêneras [9].

Estudos recentes [10,11] questionam a validade nominal de *P. nigricans* e apontam a existência de duas linhagens dessa espécie, uma composta por amostras das sub-bacias do

Tapajós e Tocantins-Araguaia (aqui denominada “Clado oriental”), e outra, que inclui espécimes das terras baixas da Amazônia Ocidental e sua calha principal, além de incluir outra espécie taxonomicamente reconhecida como *Prochilodus rubrotaeniatus*. Considerando que o grupo oriental está distribuído no escudo brasileiro, uma área de alta diversidade ictiofaunística e endemismo, ainda subestimados [12], estudos que visem amostragens representativas nesta região ainda se fazem necessários para avaliar a existência de diversidade oculta dentro de *P. nigricans*.

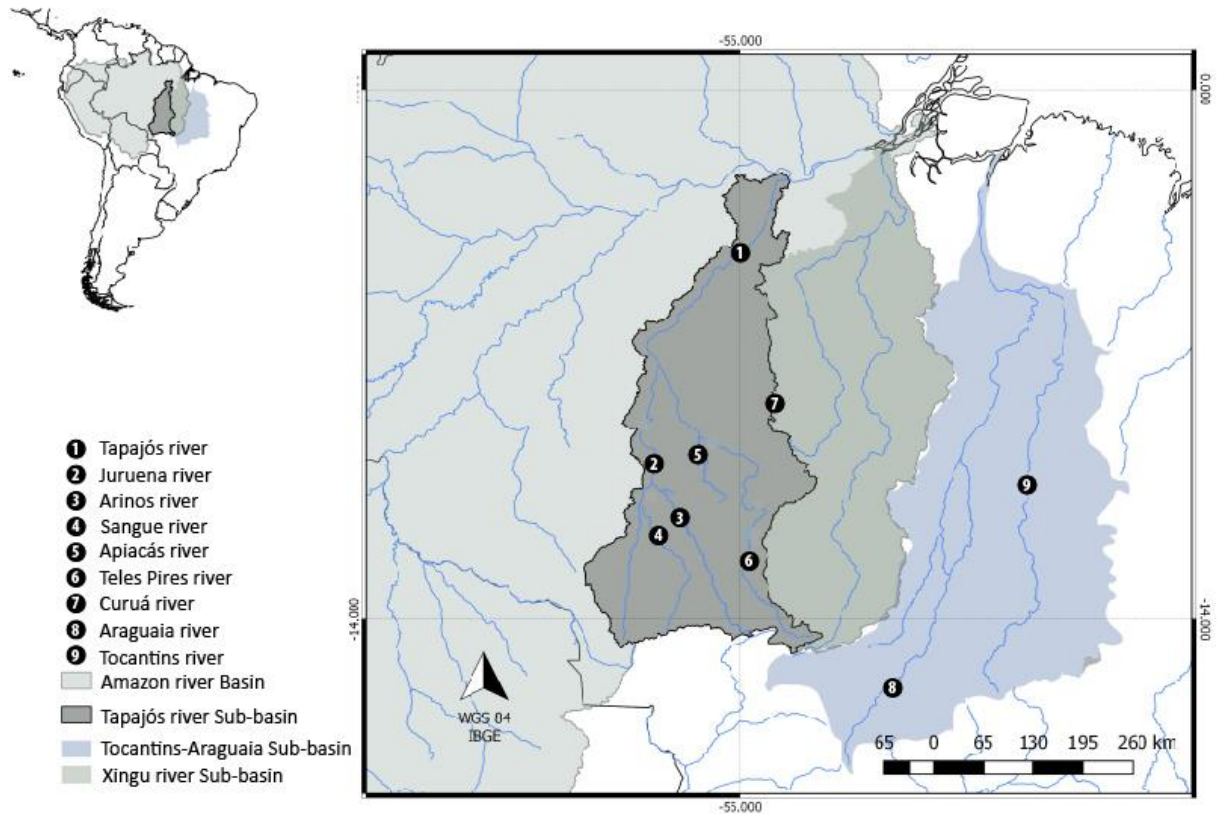
Diante desse contexto, e considerando a importância da delimitação de espécies para uma melhor estimativa da biodiversidade, o nosso objetivo consistiu em testar a hipótese de que *P. nigricans* oriundos do escudo brasileiro, aqui representado exclusivamente por indivíduos das sub-bacias dos rios Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia, ainda esconde diversidade oculta. Para isso, nós utilizamos dois marcadores mitocondriais distintos para a reconstruir redes haplotípicas e calcular distâncias genéticas, e empregamos uma abordagem de delimitação de espécies de um único gene baseado em sequências da subunidade 1 da citocromo c oxidase (COI) para determinar o número de unidades moleculares dentro das drenagens previamente mencionadas.

## **I.2 Material e métodos**

### **I.2.1 Amostragem e requerimentos éticos**

Nosso estudo foi realizado de acordo com a legislação brasileira de proteção ambiental sob a licença SISBIO Número 41778-7 fornecida pelo Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio/Ministério do Meio Ambiente) e aprovada pelo Comitê de Ética em Uso Animal da UFSCar (CEUA 3752060715). Nós amostramos pequenos fragmentos de

tecido de nadadeira de espécimes adultos de *P. nigricans* coletados nas drenagens de Teles Pires e Juruena e Tapajós (Figura I.1).



**Figura I.1.** Mapa com os pontos de amostragem de *Prochilodus nigricans* nas sub-bacias dos rios Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia.

Parte das amostras de tecidos de barbatanas da sub-bacia do rio Tapajós e outras drenagens foi fornecida por coleções científicas, pesquisadores colaboradores e pescadores ribeirinhos locais, os quais, após orientação sobre procedimentos de amostragem, forneceram os tecidos (ver Tabela Suplementar I.S1). Todas as amostras biológicas foram fixadas em etanol 96% e depositadas no Banco de Tecidos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar). Sequências adicionais de COI de *P. nigricans* amostrados em outras localidades, principalmente da porção ocidental da bacia Amazônica [10,11,13,14], foram obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>). A relação de sequências utilizadas é encontrada na Tabela Suplementar I.S2.

### I.2.2 Extração, amplificação e sequenciamento de DNA

O DNA genômico total foi extraído utilizando o protocolo de precipitação salina descrito por Aljanabi & Martinez [15], e então submetido a eletroforese em gel de agarose 1% para aferir sua qualidade. As amostras de DNA foram quantificadas utilizando biofotômetro Eppendorf (Eppendorf, Hamburg, Alemanha), e, posteriormente, foram preparadas alíquotas padronizadas a 50 ng/μL. A Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) foi realizada para amplificar os genes COI (parcialmente) e as subunidade seis e oito da ATPsintase (ATPase6/8) do DNA mitocondrial (mtDNA). Os *primers* Fish F1 e Fish R1 e ATP 8.2\_L8331 e CO3.2\_H9236 foram utilizados para amplificar as regiões COI e ATP6/8, respectivamente [16,17]. As PCRs ocorreram em um volume final de 12,5 μL contendo 50 ng de DNA *template*, 1,25 μL de buffer (10x), 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 μM de cada *primer*, 0,5 U *Taq* Platinum (Invitrogen) e água destilada ultrapura. As condições de amplificação seguiram os seguintes parâmetros para o COI: 1 ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 2 min, sendo seguido por 35 ciclos de 94 °C a 30 seg., 59 °C a 30 seg. e 72 °C por 1 min., finalizando com 1 ciclo de extensão final a 72°C por 10 min. Para os genes ATP6/8, empregamos 1 ciclo a 94°C por 3 min, 30 ciclos de 94 °C a 45 seg., 58°C por 1 min. e 72 °C por 1 min, e um ciclo de 72 °C por 2 min. Os produtos de PCR foram purificados com polietilenoglicol 20% (PEG) [18] com a finalidade de remover dNTPs não incorporados, o excesso de *primers* e eventuais bandas inespecíficas, para então serem posteriormente sequenciados em um sequenciador automatizado ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA).

### I.2.3 Análises moleculares

As sequências foram alinhadas com o auxílio do programa ClustalW [19] e editadas usando Geneious v.7.1.7 (Biomatters, Auckland, Nova Zelândia) [20]. As redes haplotípicas para ambos os marcadores foram reconstruídas usando PopART (*Population Analysis with*



*Reticulate Trees*) [21], enquanto as distâncias genéticas intra e intergrupos baseadas em K2P (Kimura 2-Parâmetros) foram estimadas com amostras das sub-bacias dos rios Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia no programa MEGA v.7 [22].

Nós empregamos o modelo *Generalized Mixed Yule Coalescent* (GMYC) [23] para delimitar MOTUs dentro de *P. nigricans* a partir de sequências de COI, incluindo as sequências do GenBank. Este modelo foi executado com o pacote SPLITS (*Species' Limits by Threshold Statistics*) [24] no R, utilizando o método *single threshold* e parâmetro de intervalo padrão (intervalo = c (1,10)). O GMYC combina o modelo Yule de eventos de especiação intraespecíficos com modelos de coalescência, sendo comumente aplicado em estudos relacionados a questões taxonômicas [25–28]. Para esta análise, foi produzida uma topologia ultramétrica usando o método de Inferência Bayesiana (IB) implementado no *software* BEAST v.2.0 [29] através do CIPRES Science Gateway [30] ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)). Também utilizamos o modelo de substituição nucleotídica baseado no critério de informação Bayesiana (BIC), determinado pelo programa JModeltest [22] (COI = K80), e relógio molecular relaxado com uma distribuição lognormal e o modelo de especiação *birth-death*, de acordo com Costa-Silva et al. [31]. Três corridas independentes das cadeias de Markov com 30 milhões de gerações foram realizadas, sendo as árvores e parâmetros salvos a cada 10000 gerações, e com 10% das primeiras topologias descartadas como *burn-in*. A combinação dos arquivos tree e log foi realizada com o *software* LogCombiner v.1.8 [32] e a mixagem apropriada dos dados foi verificada com o Tracer v1.5 [33], considerando valores do tamanho efetivo da amostragem (ESS) de todos os parâmetros iguais ou superiores a 200. A árvore foi sumarizada com o programa TreeAnnotator v.1.8 [34] e posteriormente visualizada no *software* FigTree v.1.4, disponível em [http://tree.bio.ed.ac.uk/software /Figueira/](http://tree.bio.ed.ac.uk/software/Figueira/).

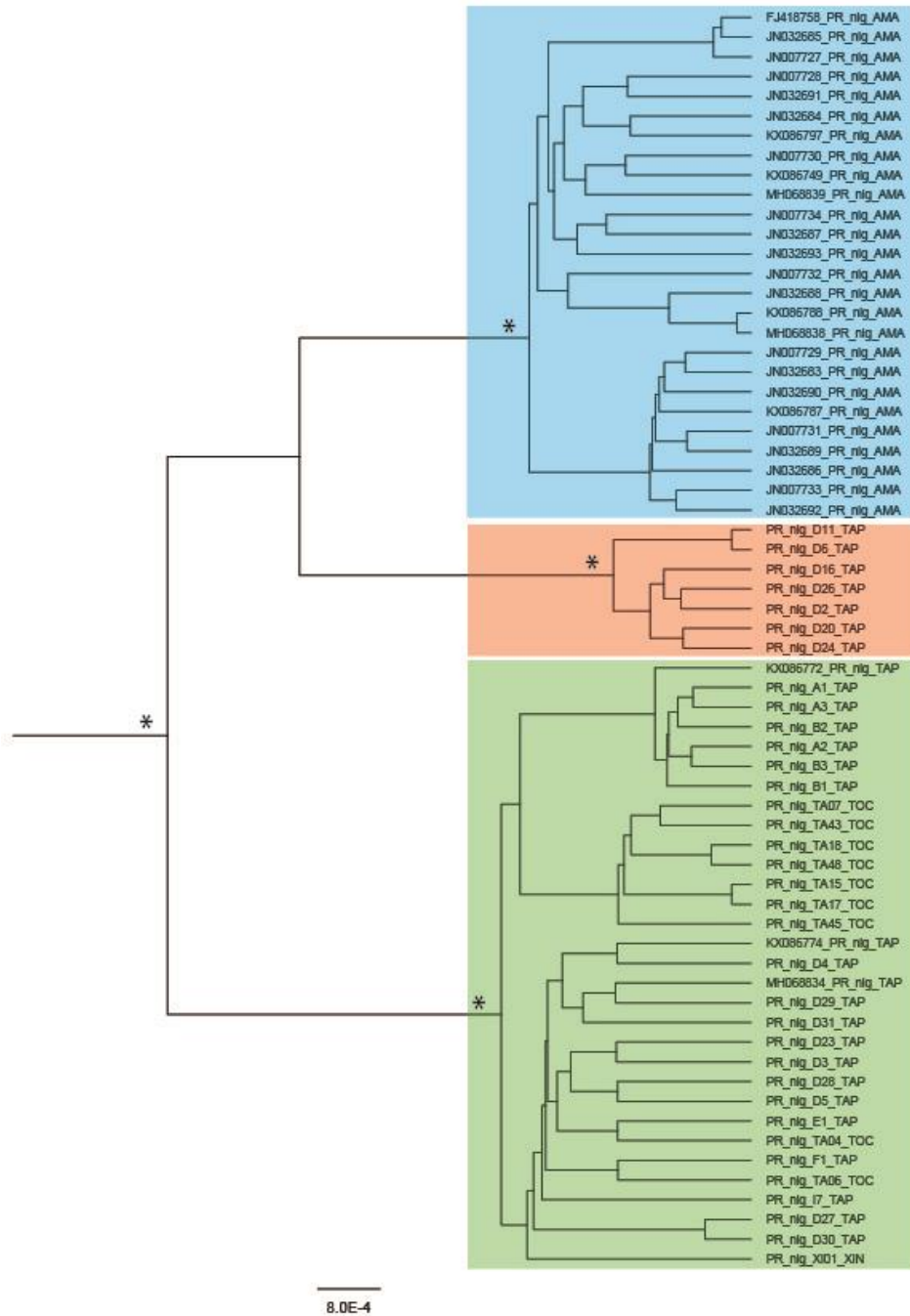
### I.3 Resultados e discussão

O conjunto de dados total gerado neste estudo consistiu de 35 sequências COI e 29 ATP6/8 após o alinhamento e edição. Os fragmentos de COI variaram de 561 a 564 pb e apresentaram 26 sítios polimórficos e 16 sítios parcimoniosamente informativos. O comprimento médio da sequência ATP6/8 foi de 985 pb e incluiu 18 sítios polimórficos, 11 dos quais foram parcimoniosamente informativos. As redes haplotípicas do COI e ATP6/8 incluíram, respectivamente, 15 e 12 haplótipos (Ver Figura Suplementar I.S1). Onze dos 28 indivíduos amostrados no rio Tapajós foram atribuídos ao haplogrupo recém-descoberto, aqui denominado como "Cluster 2".

O resultado de máxima verossimilhança obtido para o COI com o modelo GMYC foi significativamente maior ( $L = 552,1538$ ) que com o modelo nulo ( $L_0 = 504,4662$ ), o que nos permitiu rejeitar a hipótese de que todos os indivíduos pertencem à mesma unidade molecular. A análise *single threshold* do GMYC (intervalo de confiança: 3-4) revelou a ocorrência de três MOTUs na bacia Amazônica (Figura I.2), evidenciando uma a mais do que as relatadas em estudos anteriores [10,11]. Apesar das questões taxonômicas envolvendo a validade da espécie, a divisão leste-oeste de *P. nigricans* também foi recuperada no presente estudo usando novos dados, reforçando a existência de ambas as MOTUs e apresentando uma adicional (apresentada aqui em laranja na Figura I.2). O clado destacado em azul compreendeu indivíduos amostrados no rio Amazonas e calha principal, enquanto a maioria de nossa amostragem foi restrita às drenagens do Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia.

As distâncias par-a-par baseadas em K2P entre esta linhagem e o resto do grupo oriental foram  $0,019 \pm 0,005$  e  $0,01 \pm 0,003$  para COI e ATP6/8, respectivamente. Embora ambos os valores fossem mais baixos do que o comumente utilizado como limiar inicial para a abordagem de identificação molecular [25], nossos valores de distância foram semelhantes aos

encontrados para outras espécies de *Prochilodus*, que variaram de 1,2% a 10,3% [11]. As distâncias dentro dos grupos foram  $0,003 \pm 0,001$  para o clado oriental e  $0,002 \pm 0,001$  para a linhagem com COI, enquanto com ATP6 variou de  $0,001 \pm 0,000$  e  $0,002 \pm 0,001$  para o grupo oriental e o Cluster 2, respectivamente.



**Figura I2.** Árvore de inferência Bayesiana usada para delimitar linhagens de *Prochilodus nigricans* na bacia Amazônica usando a análise GMYC. Os cladros azul e verde representam, respectivamente, os cladros do oeste e do leste da Amazônia. Clado laranja representa a linhagem recém-detectada (Cluster 2). Valores de probabilidade posteriores ( $> 0,99$ ) são representados por asteriscos acima dos nós.

Nossas descobertas revelam que a diversidade dentro de *P. nigricans* pode estar incompleta e, portanto, precisa ser melhor investigada. A detecção de uma nova linhagem dentro da sub-bacia do rio Tapajós (grupo Amazonas Oriental) também incita questões sobre os processos evolutivos que podem ter levado à diversificação dentro desse táxon. A biogeografia Amazônica é complexa [35] e diversas hipóteses filogeográficas [36,37] foram postuladas até agora para explicá-la. Neste contexto, e considerando nossos resultados, *P. nigricans* pode ser um modelo interessante para testar possíveis eventos responsáveis pela diversificação observada na ictiofauna desta região.

A quantidade de registros descrevendo recentemente a delimitação de espécies moleculares e/ou detectando a diversidade oculta, especialmente em sistemas de água doce [26,38–41], ilustra quão incipiente é nosso conhecimento sobre a extensão da biodiversidade continental. Nossos resultados destacam a quantidade de trabalho descritivo que resta a ser feito na ictiofauna amazônica. Uma vez que a bacia Amazônica se encontra em evidência como área candidata à construção de diversas usinas hidrelétricas [34,35] e ameaçada por outros fatores [7,42,43], o desenvolvimento de estudos focados na descrição da biodiversidade é de suma importância para planos de manejo efetivos.

**Materiais Suplementares:** Tabela I.S1: Lista de amostras obtidas na Amazônia Oriental. Figura I.S1: Redes de haplótipos para ATP6/8 e COI de indivíduos amostrados nas sub-bacias do Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia.

### **Agradecimentos**

Os autores agradecem a Solange Arrolho, Miliany Campos, Paulo Venere, Marcelo Brito, Ademir e Erzidio, Michel Gianeti e Mario dePinna (MZUSP) pela coleta e/ou doação de parte das amostras biológicas utilizadas neste estudo. Agradecemos também a Pedro Gallo e Bruno Saranholi pela assistência de campo para coleta de material biológico e a IDEA WILD pelo

equipamento e pela doação de licença de *software* Geneious. Somos gratos à Carmen Barragan por nos auxiliar com o *software* de GIS, à Carla Gestich e Jorge Ramirez pelas contribuições no manuscrito, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (473474/2011-5), Programa SISBIOTA-Brasil (CNPq, 563299/2010-0; FAPESP, 10/52315-7) pelo apoio financeiro. UL agradece a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES, Brasil) pela bolsa.

### **Contribuições do autor**

Ueslei Lopes, Pedro M. Galetti Jr. e Patricia Domingues de Freitas conceberam e projetaram o estudo; Ueslei Lopes coletou as amostras e realizou as análises dos dados; todos os autores discutiram os resultados e escreveram o artigo.

### **Conflitos de interesse**

Os autores declaram não haver conflito de interesses.

## Referências

1. Dudgeon, D.; Arthington, A. H.; Gessner, M. O.; Kawabata, Z.; Naiman, R. J.; Knowler, D. J.; Le, C. Freshwater biodiversity: importance, threats, status and conservation challenges. **2006**, *81*, 163–182, doi:10.1017/S1464793105006950.
2. Reis, R. E.; Albert, J. S.; Di Dario, F.; Mincarone, M. M.; Petry, P.; Rocha, L. A. Fish biodiversity and conservation in South America. *J. Fish Biol.* **2016**, *89*, 12–47, doi:10.1111/jfb.13016.
3. Silva-Santos, R.; Ramirez, J. L.; Galetti, P. M.; Freitas, P. D. Molecular Evidences of a Hidden Complex Scenario in *Leporinus* cf. *friderici*. *Front. Genet.* **2018**, *9*, 47, doi:10.3389/fgene.2018.00047.
4. Loubens, G.; Panfili, J. Biologie de *Prochilodus nigricans* (Teleostei: Prochilodontidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). *Ichthyol. Explor. Freshwaters* **1995**, *6*, 17–32.
5. Montreuil, V.; García, Á.; Rodríguez, R. Biología reproductiva de “Boquichico” *Prochilodus nigricans*, en la amazonía peruana. *Folia Amaz.* **2001**, *12*, 5–14.
6. Stassen, M. J. M.; van de Ven, M. W. P. M.; van der Heide, T.; Hiza, M. A. G.; van der Velde, G.; Smolders, A. J. P. Population dynamics of the migratory fish *Prochilodus lineatus* in a neotropical river: the relationships with river discharge, flood pulse, El Niño and fluvial megafan behaviour. *Neotrop. Ichthyol.* **2010**, *8*, 113–122.
7. Castello, L.; McGrath, D. G.; Hess, L. L.; Coe, M. T.; Lefebvre, P. A.; Petry, P.; Macedo, M. N.; Renó, V. F.; Arantes, C. C. The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. *Conserv. Lett.* **2013**, *6*, 217–229, doi:10.1111/conl.12008.

8. Fernandes, C. C. Lateral migration of fishes in Amazon floodplains. *Ecol. Freshw. Fish* **1997**, *6*, 36–44, doi:10.1111/j.1600-0633.1997.tb00140.x.
9. Castro, R. M. C.; Vari, R. P. Detritivores of the South American fish family Prochilodontidae (Teleostei:Ostariophysi:Characiformes): a phylogenetic and revisionary study. *Smithson. Contrib. to Zool.* **2004**, 1–189, doi:10.5479/si.00810282.622.
10. Melo, B. F.; Sidlauskas, B. L.; Hoekzema, K.; Frable, B. W.; Vari, R. P.; Oliveira, C. Molecular phylogenetics of the Neotropical fish family Prochilodontidae (Teleostei: Characiformes). *Mol. Phylogenet. Evol.* **2016**, *102*, 189–201.
11. Melo, B. F.; Dorini, B. F.; Foresti, F.; Oliveira, C. Little Divergence Among Mitochondrial Lineages of *Prochilodus* (Teleostei, Characiformes). **2018**, *9*, 1–9, doi:10.3389/fgene.2018.00107.
12. Machado, V. N.; Collins, R. A.; Ota, R. P.; Andrade, M. C.; Farias, I. P.; Hrbek, T. One thousand DNA barcodes of piranhas and pacus reveal geographic structure and unrecognised diversity in the Amazon. *Sci. Rep.* **2018**, 1–12, doi:10.1038/s41598-018-26550-x.
13. Ardura, A.; Gomes, V.; Linde, A. R.; Moreira, J. C.; Horreo, J. L.; Garcia-Vazquez, E. The Meeting of Waters, a possible shelter of evolutionary significant units for Amazonian fish. *Conserv. Genet.* **2013**, *14*, 1185–1192, doi:10.1007/s10592-013-0505-8.
14. Ardura, A.; Linde, A. R.; Moreira, J. C.; Garcia-Vazquez, E. DNA barcoding for conservation and management of Amazonian commercial fish. *Biol. Conserv.* **2010**, *143*, 1438–1443, doi:10.1016/j.biocon.2010.03.019.

15. Aljanabi, S. M.; Martinez, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic Acids Res.* **1997**, *25*, 4692–4693, doi:10.1093/nar/25.22.4692.
16. Ward, R. D.; Zemlak, T. S.; Innes, B. H.; Last, P. R.; Hebert, P. D. N. DNA barcoding Australia's fish species. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **2005**, *360*, 1847–1857, doi:10.1098/rstb.2005.1716.
17. Sivasundar, A.; Bermingham, E.; Orti, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. *Mol. Ecol.* **2001**, *10*, 407–417.
18. Lis, J. T.; Schleif, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. *Nucleic Acids Res.* **1975**, *2*, 383–390, doi:10.1093/nar/2.3.383.
19. Larkin, M. A.; Blackshields, G.; Brown, N. P.; Chenna, R.; Mcgettigan, P. A.; McWilliam, H.; Valentin, F.; Wallace, I. M.; Wilm, A.; Lopez, R.; Thompson, J. D.; Gibson, T. J.; Higgins, D. G. Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* **2007**, *23*, 2947–2948, doi:10.1093/bioinformatics/btm404.
20. Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Meintjes, P.; Drummond, A. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics* **2012**, *28*, 1647–1649, doi:10.1093/bioinformatics/bts199.
21. Leigh, J. W.; Bryant, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. *Methods Ecol. Evol.* **2015**, *6*, 1110–1116, doi:10.1111/2041-210X.12410.
22. Kumar, S.; Stecher, G.; Tamura, K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis



- version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.* **2016**, *33*, 1870–1874.
23. Pons, J.; Barraclough, T. G.; Gomez-Zurita, J.; Cardoso, A.; Duran, D. P.; Hazell, S.; Kamoun, S.; Sumlin, W. D.; Vogler, A. P. Sequence-Based Species Delimitation for the DNA Taxonomy of Undescribed Insects. *Syst. Biol.* **2006**, *55*, 595–609, doi:10.1080/10635150600852011.
  24. Monaghan, M. T.; Wild, R.; Elliot, M.; Fujisawa, T.; Balke, M.; Inward, D. J. G.; Lees, D. C.; Ranaivosolo, R.; Eggleton, P.; Barraclough, T. G.; Vogler, A. P. Accelerated species Inventory on Madagascar using coalescent-based models of species Delineation. *Syst. Biol.* **2009**, *58*, 298–311, doi:10.1093/sysbio/syp027.
  25. Low, V. L.; Takaoka, H.; Pramual, P.; Adler, P. H.; Ya'cob, Z.; Huang, Y.-T.; Da Pham, X.; Ramli, R.; Chen, C. D.; Wannaket, A.; Sofian-Azirun, M. Delineating taxonomic boundaries in the largest species complex of black flies (Simuliidae) in the Oriental Region. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 20346, doi:10.1038/srep20346.
  26. Machado, C. D. B.; Ishizuka, T. K.; Freitas, P. D. De; Valiati, V. H.; Galetti, P. M. DNA barcoding reveals taxonomic uncertainty in *Salminus* (Characiformes). *Syst. Biodivers.* **2017**, *15*, 372–382, doi:10.1080/14772000.2016.1254390.
  27. Mills, S.; Alcántara-Rodríguez, J. A.; Ciroso-Pérez, J.; Gómez, A.; Hagiwara, A.; Galindo, K. H.; Jersabek, C. D.; Malekzadeh-Viayeh, R.; Leasi, F.; Lee, J. S.; Mark Welch, D. B.; Papakostas, S.; Riss, S.; Segers, H.; Serra, M.; Shiel, R.; Smolak, R.; Snell, T. W.; Stelzer, C. P.; Tang, C. Q.; Wallace, R. L.; Fontaneto, D.; Walsh, E. J. Fifteen species in one: deciphering the *Brachionus plicatilis* species complex (Rotifera, Monogononta) through DNA taxonomy. *Hydrobiologia* **2017**, *796*, 39–58, doi:10.1007/s10750-016-2725-7.

28. Vacher, J. P.; Kok, P. J. R.; Rodrigues, M. T.; Lima, J. D.; Lorenzini, A.; Martinez, Q.; Fallet, M.; Courtois, E. A.; Blanc, M.; Gaucher, P.; Dewynter, M.; Jairam, R.; Ouboter, P.; Thébaud, C.; Fouquet, A. Cryptic diversity in Amazonian frogs: Integrative taxonomy of the genus *Anomaloglossus* (Amphibia: Anura: Aromobatidae) reveals a unique case of diversification within the Guiana Shield. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2017**, *112*, 158–173, doi:10.1016/j.ympev.2017.04.017.
29. Bouckaert, R.; Heled, J.; Kühnert, D.; Vaughan, T.; Wu, C. H.; Xie, D.; Suchard, M. A.; Rambaut, A.; Drummond, A. J. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. *PLoS Comput. Biol.* **2014**, *10*, 1–6, doi:10.1371/journal.pcbi.1003537.
30. Miller, M. A.; Pfeiffer, W.; Schwartz, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. *2010 Gatew. Comput. Environ. Work. GCE 2010* **2010**, doi:10.1109/GCE.2010.5676129.
31. Costa-Silva, G. J.; Rodriguez, M. S.; Roxo, F. F.; Foresti, F.; Oliveira, C. Using Different Methods to Access the Difficult Task of Delimiting Species in a Complex Neotropical Hyperdiverse Group. *PLoS One* **2015**, *10*, 1–12, doi:10.1371/journal.pone.0135075.
32. Drummond, A. J.; Suchard, M. A.; Xie, D.; Rambaut, A. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* **2012**, *29*, 1969–1973, doi:10.1093/molbev/mss075.
33. Rambaut, A.; Drummond, A. Tracer v1.5 2007.
34. Rambaut, A.; Drummond, A. TreeAnnotator 1.8 2012.
35. Dagosta, F. C. P.; de Pinna, M. C. C. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographical units. *Neotrop. Ichthyol.* **2017**, *15*, 1–24,

- doi:10.1590/1982-0224-20170034.
36. Leite, R. N.; Rogers, D. S. Revisiting Amazonian phylogeography: Insights into diversification hypotheses and novel perspectives. *Org. Divers. Evol.* **2013**, *13*, 639–664, doi:10.1007/s13127-013-0140-8.
  37. Hubert, N.; Renno, J. F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *J. Biogeogr.* **2006**, *33*, 1414–1436, doi:10.1111/j.1365-2699.2006.01518.x.
  38. Pires, A. A.; Ramirez, J. L.; Galetti, P. M.; Troy, W. P.; Freitas, P. D. Molecular analysis reveals hidden diversity in *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae): a genus of giant South American catfish. *Genetica* **2017**, *145*, 335–340, doi:10.1007/s10709-017-9968-8.
  39. Ramirez, J. L.; Birindelli, J. L. O.; Galetti, P. M. A new genus of Anostomidae (Ostariophysi: Characiformes): Diversity, phylogeny and biogeography based on cytogenetic, molecular and morphological data. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2017**, *107*, 308–323, doi:10.1016/j.ympev.2016.11.012.
  40. Pereira, L. H. G.; Pazian, M. F.; Hanner, R.; Foresti, F.; Oliveira, C. DNA barcoding reveals hidden diversity in the Neotropical freshwater fish *Piabina argentea* (Characiformes: Characidae) from the Upper Basin of Brazil Parana. *Mitochondrial DNA* **2011**, *22*, 87–96, doi:10.3109/19401736.2011.588213.
  41. Ramirez, J. L.; Jr, P. M. G. DNA barcode and evolutionary relationship within *Laemolyta* Cope 1872 (Characiformes: Anostomidae) through molecular analyses. *Mol. Phylogenet. Evol.* **2015**, *93*, 77–82, doi:10.1016/j.ympev.2015.07.021.
  42. Guimberteau, M.; Ciais, P.; Pablo Boisier, J.; Paula Dutra Aguiar, A.; Biemans, H.; De Deurwaerder, H.; Galbraith, D.; Kruijt, B.; Langerwisch, F.; Poveda, G.; Rammig, A.; Andres Rodriguez, D.; Tejada, G.; Thonicke, K.; Von Randow, C.; Randow, R.; Zhang,

- K.; Verbeeck, H. Impacts of future deforestation and climate change on the hydrology of the Amazon Basin: A multi-model analysis with a new set of land-cover change scenarios. *Hydrol. Earth Syst. Sci.* **2017**, *21*, 1455–1475, doi:10.5194/hess-21-1455-2017.
43. Val, A. L.; Fearnside, P. M.; Almeida-Val, V. M. F. Environmental disturbances and fishes in the Amazon. *J. Fish Biol.* **2016**, *89*, 192–193, doi:10.1111/jfb.12896.

**Tabela Suplementar LS1.** Dados de coleta das amostras utilizadas no presente estudo. <sup>a</sup>Amostra amplificada com o COI. <sup>b</sup>Amostra amplificada com o ATP6/8.

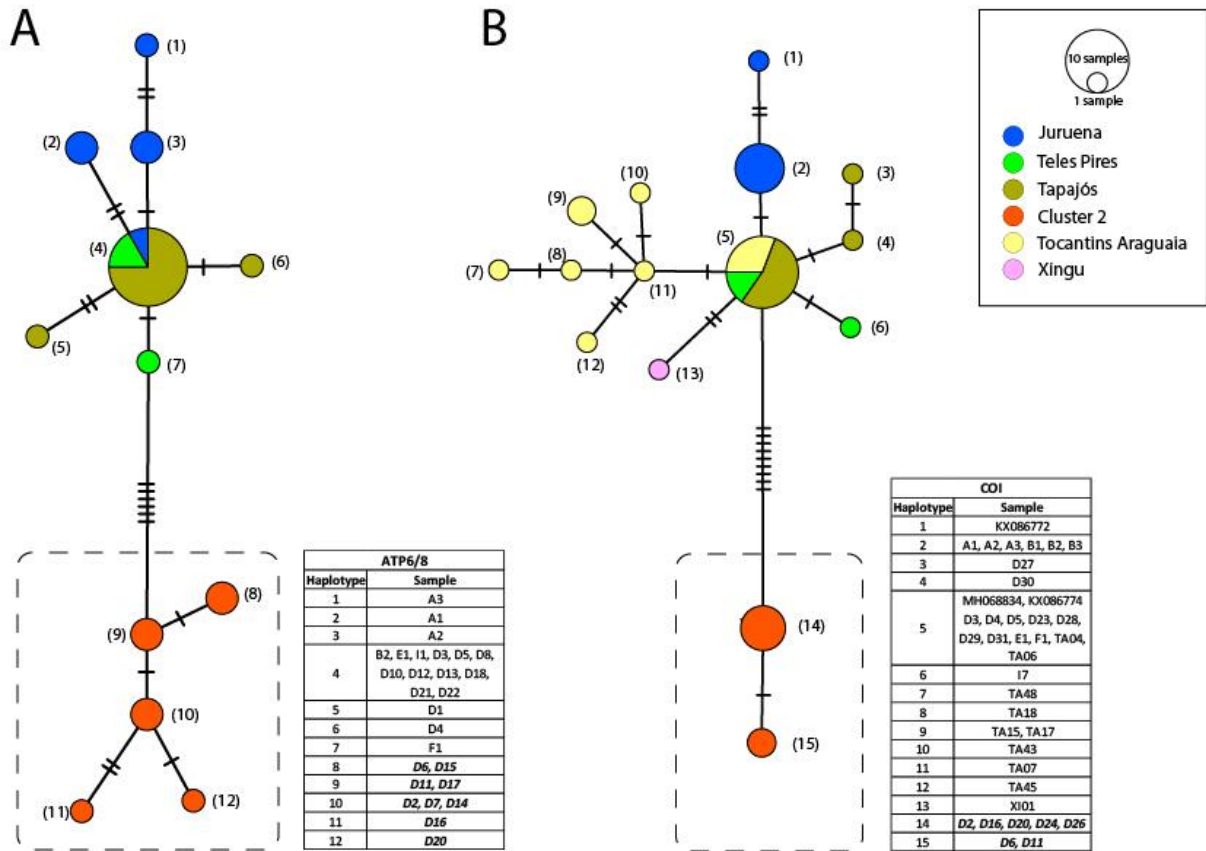
Sample code	River	Basin	Locality	Lat	Long
<sup>b</sup> A1	Arinos	Juruena	Juara	-11.280950	-57.560940
<sup>b</sup> A2	Arinos	Juruena	Juara	-11.280950	-57.560940
<sup>b</sup> A3	Arinos	Juruena	Juara	-11.280950	-57.560940
<sup>b</sup> B1	Sangue	Juruena	Juara	-11.706320	-58.050030
<sup>b</sup> B2	Sangue	Juruena	Juara	-11.706320	-58.050030
<sup>b</sup> B3	Sangue	Juruena	Juara	-11.706320	-58.050030
<sup>b</sup> D1	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D2	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D3	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D4	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D5	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D6	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D7	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D8	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D10	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D11	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D12	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D13	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D14	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D15	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D16	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D17	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D18	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> D20	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D21	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>b</sup> D22	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D23	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D24	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D26	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D27	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D28	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D29	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D30	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a</sup> D31	Tapajós	Tapajós	Itaiatuba	-4.277616	-55.984121
<sup>a,b</sup> E1	Teles Pires	Teles Pires	Sorriso	-12.385474	-55.7357515
<sup>b</sup> I1	Apiacás	Teles Pires	Apiacás	-9.504227	-57.054854
<sup>a</sup> I7	Apiacás	Teles Pires	Apiacás	-9.504227	-57.054854
<sup>a,b</sup> F1	Teles Pires	Teles Pires	Cotriguaçu	-9.879286	-58.235445
<sup>a</sup> XI01	Rio Curuá	Xingu	Altamira	-8.318597	-55.089698
<sup>a</sup> TA04	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Barra do Garça	-15833241	-51.949934
<sup>a</sup> TA06	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Barra do Garça	-15833241	-51.949934
<sup>a</sup> TA07	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Barra do Garça	-15833241	-51.949934
<sup>a</sup> TA15	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Barra do Garça	-15833241	-51.949934

<sup>a</sup> TA17	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Barra do Garça	-15833241	-51.949934
<sup>a</sup> TA18	Araguaia	Tocantins-Araguaia	Barra do Garça	-15833241	-51.949934
<sup>a</sup> TA43	Tocantins	Tocantins-Araguaia	Palmas	-10.472790	-48.428927
<sup>a</sup> TA45	Tocantins	Tocantins-Araguaia	Palmas	-10.472790	-48.428927
<sup>a</sup> TA48	Tocantins	Tocantins-Araguaia	Palmas	-10.472790	-48.428927
<sup>a</sup> TA49	Tocantins	Tocantins-Araguaia	Palmas	-10.472790	-48.428927

**Tabela Suplementar IS2.** Números de acesso das sequências de COI de *Prochilodus nigricans* obtidas no GenBank.

Espécie	Código	Rio	Localidade	Número de Acesso
<i>P. nigricans</i>	M3-7	Rio Amazonas	Manaus, AM	FJ418758
<i>P. nigricans</i>	Curimata1	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007727
<i>P. nigricans</i>	Curimata4	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007728
<i>P. nigricans</i>	Curimata5	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007729
<i>P. nigricans</i>	Curimata6	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007730
<i>P. nigricans</i>	Curimata7	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007731
<i>P. nigricans</i>	Curimata8	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007732
<i>P. nigricans</i>	Curimata9	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007733
<i>P. nigricans</i>	Curimata10	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN007734
<i>P. nigricans</i>	H1	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032683
<i>P. nigricans</i>	H2	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032684
<i>P. nigricans</i>	H3	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032685
<i>P. nigricans</i>	H4	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032686
<i>P. nigricans</i>	H5	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032687
<i>P. nigricans</i>	H6	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032688
<i>P. nigricans</i>	H7	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032689
<i>P. nigricans</i>	H8	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032690
<i>P. nigricans</i>	H9	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032691
<i>P. nigricans</i>	H10	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032692
<i>P. nigricans</i>	H11	Rio Amazonas	Manaus, AM	JN032693
<i>P. nigricans</i>	LBP 1690	Rio Amazonas	Manaus, AM	KX086749
<i>P. nigricans</i>	LBP 8589	Rio Arinos/Tapajós	Diamantino, MT	KX086772
<i>P. nigricans</i>	LBP 12865	Rio Tapajós	Itaituba, PA	KX086774
<i>P. nigricans</i>	OS 18792	Río Itaya/Amazonas	Maynas, Loreto	KX086787
<i>P. nigricans</i>	OS 18792	Río Itaya/Amazonas	Maynas, Loreto	KX086788
<i>P. nigricans</i>	FMNH 113534	Rio Itaya/Amazonas	Iquitos, Loreto	KX086797
<i>P. nigricans</i>	LBP 12865	Rio Tapajós	Itaituba, PA	MH068834
<i>P. nigricans</i>	LBP 174	Rio Acre/Purus	Rio Branco, AC	MH068838
<i>P. nigricans</i>	LBP 10919	Rio Madeira	Porto Velho, RO	MH068839

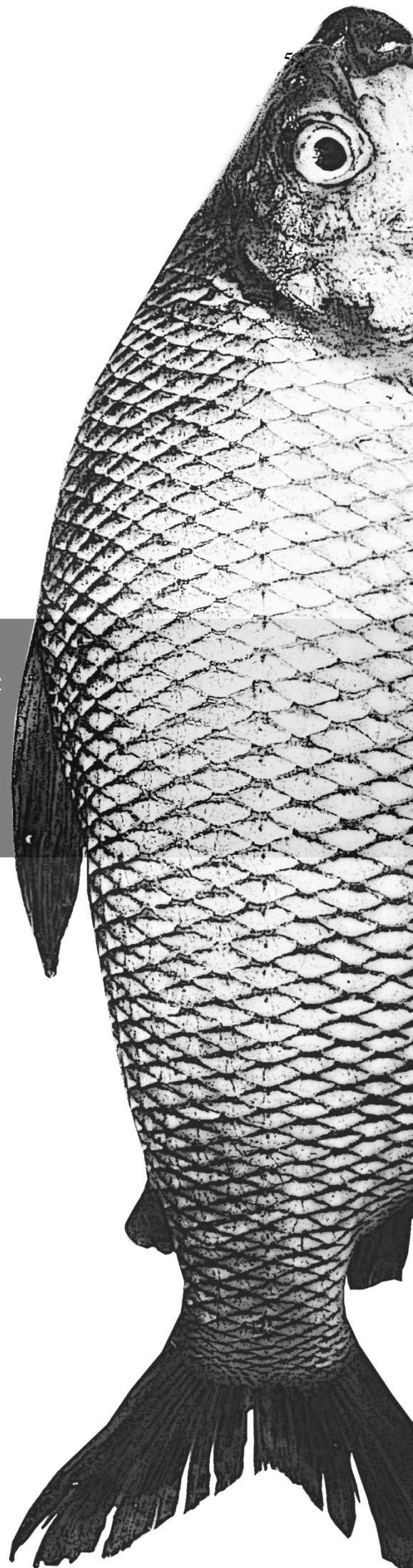
**Figura Suplementar LS1.** Redes haplotípicas de *Prochilodus nigricans* amostrados dentro das sub-bacias dos rios Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia, mostrando a relação de amostras por haplótipo. (A) ATP6/8. (B) COI.





# Capítulo II

Estrutura genético-populacional de  
*Prochilodus nigricans* na sub-bacia do  
rio Tapajós





## CAPÍTULO II

As amostras utilizadas no presente estudo correspondem exclusivamente a uma única linhagem taxonômica de *P. nigricans* de ocorrência na sub-bacia do rio Tapajós, sendo excluída aquela descrita no Capítulo I dessa tese. Apesar das questões relacionadas à validade dessa espécie levantadas em estudos anteriores, para uma melhor compreensão e fluidez da leitura estamos adotando ao longo do texto o nome científico da espécie quando nos referimos à linhagem estudada nesse capítulo.

### II.1 Introdução

Segundo o Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio), o Brasil possui mais de 4400 espécies de peixes, das quais aproximadamente 70% são registradas para as águas continentais. Dentre essas, 311 foram classificadas como vulneráveis, em perigo ou criticamente em perigo de acordo com a Portaria nº 445 de 17 de dezembro de 2014, publicada pelo Ministério do Meio Ambiente (ICMBio, 2018).

O rápido crescimento populacional aliado ao aumento da demanda por energia elétrica tem propiciado a proliferação de usinas hidrelétricas e pequenas centrais hidrelétricas (PCHs) em escala global, com diversos empreendimentos sendo construídos ou projetados, especialmente em países emergentes como o Brasil (REIS et al., 2016; TUNDISI et al., 2014; ZARFL et al., 2015). De acordo com Ohara e Loeb (2016), a sub-bacia do rio Tapajós tem registros de 300 espécies de peixes, e atualmente configura como uma das mais ameaçadas drenagens brasileiras, sendo considerada uma área prioritária para a realização de estudos em decorrência do rápido avanço das ações antrópicas na região (LATRUBESSE et al., 2017).

Para além dos efeitos sociais (*e.g.* translocação de pessoas, desapropriação de terras), a construção de tais barragens ao longo dos rios pode promover a interrupção da rota migratória de espécies de peixes e alterar a dinâmica de detritos, nutrientes e recursos através dos ecossistemas (BARTHEM; DE BRITO RIBEIRO; PETRERE, 1991; MARMULLA, 2001). Essas modificações podem ainda representar um viés adicional àqueles organismos que são extremamente dependentes desses elementos, como é o caso de alguns peixes frugívoros e

detritívoros (HORN et al., 2011). Um exemplo disso pode ser encontrado no estudo desenvolvido por Albrecht e colaboradores (2009), no qual foi detectado decréscimo populacional das espécies *Brycon gouldingi* e *Brycon falcatus* após a inundação das florestas ripárias na represa Serra da Mesa, no rio Tocantins. Dada a magnitude dos efeitos causados, é possível destacar as contínuas interrupções ocasionadas pelo represamento de rios como um dos mais danosos à biodiversidade (ZARFL et al., 2015). Estes afetam, sobretudo, as espécies migradoras, que devido à sua mobilidade, são consideradas indicadoras de conectividade em ecossistemas (YAMANAKA; MINAMOTO, 2016).

Dessa forma, inúmeros estudos que visam avaliar a estrutura genética de populações, em um cenário de fragmentação ambiental, têm sido realizados com espécies de peixes migradoras durante a piracema (período reprodutivo). Contudo, observa-se escassez de trabalhos dedicados a investigar a organização genética das populações durante o período não reprodutivo, o qual caracterizado como uma época principalmente voltada à alimentação e, portanto, de menor deslocamento.

## II.2 Hipóteses e objetivos

### II.2.1 Hipóteses

Levando-se em consideração o atual cenário de expansão da indústria energética do país, constatado pela construção de barragens e de UHEs, é notória a extrema relevância em caracterizar geneticamente populações de áreas onde tais edificações estão sendo ou virão a ser implantadas. O desenvolvimento de estudos dessa natureza em regiões que ainda não foram impactadas, como é o caso da sub-bacia do rio Tapajós, pode possibilitar um diagnóstico prévio da estrutura genética de populações de peixes e favorecer o estabelecimento de medidas conservacionistas. Assim sendo, propomos as seguintes hipóteses a serem testadas:

**Hipótese nula:** As populações de *P. nigricans* dos rios Juruena, Tapajós e Teles Pires apresentam ausência de estruturação ao longo da sub-bacia do rio Tapajós, uma vez que neste sistema hidrográfico a ausência de barragens favorece o fluxo gênico entre as diferentes populações existentes nesta área.

**Hipótese alternativa:** Apesar da inexistência de barragens na sub-bacia do rio Tapajós, as populações dos afluentes do rio Juruena, Teles Pires e Tapajós apresentam-se geneticamente diferenciadas, sugerido a existência de outros mecanismos que favorecem a diminuição de fluxo

gênico acarretando em diferenciação e consequente subestruturação das populações ao longo da sub-bacia do rio Tapajós.

### II.2.2 Objetivo geral

Visto que algumas barragens foram recentemente construídas ou encontram-se em processo de construção na sub-bacia do rio Tapajós, o presente estudo teve por finalidade avaliar a estrutura genética de *P. nigricans* com o intuito de verificar ou não a existência de subestruturação populacional ao longo do rio Tapajós e de seus principais elementos formadores durante o período não reprodutivo.

### II.2.3 Objetivos específicos

- Realizar amplificação heteróloga em *P. nigricans* de oito locos microssatélites descritos para as espécies *Prochilodus lineatus* e *Prochilodus costatus*.
- Amplificar as regiões ATP6-ATP8 e d-loop do DNA mitocondrial em *P. nigricans*;
- Estimar os parâmetros genéticos populacionais para *P. nigricans* dentro e entre os diferentes pontos de coleta;
- Avaliar a ocorrência de estruturação populacional para *P. nigricans* entre os pontos amostrados.

## II.3 Material e métodos

### II.3.1 Amostragem

Visando avaliar a ocorrência de estruturação populacional em *P. nigricans* durante período não reprodutivo, nós utilizamos um total de 239 amostras de tecido coletadas em nove pontos amostrais ao longo da sub-bacia do rio Tapajós (Figura II.1). Os pontos amostrais estão nomeados de acordo com o nome do município ou dos tributários dos rios Tapajós, Juruena e Teles Pires. As coletas das amostras ocorreram entre os meses de abril e setembro de 2015. Parte dos tecidos foi coletada integralmente por nossa equipe em dois momentos de coleta (meses de abril e setembro) e, para o restante da amostragem, nós contamos com a colaboração de pescadores ribeirinhos locais e pesquisadores, os quais, após orientações quanto aos procedimentos de coleta e fixação, nos enviaram o material no decorrer daquele ano. Para as amostras provenientes do rio Apiacás, nos foi informado que já era possível detectar peixes realizando migração e que possivelmente poderíamos obter amostras de indivíduos migrantes e de não migrantes. Os dados de campo e tamanho amostral por ponto de coleta estão descritos na Tabela II.1.

Figura II.1. Mapa da área de estudo com destaque para os pontos de coleta de *Prochilodus nigricans*.

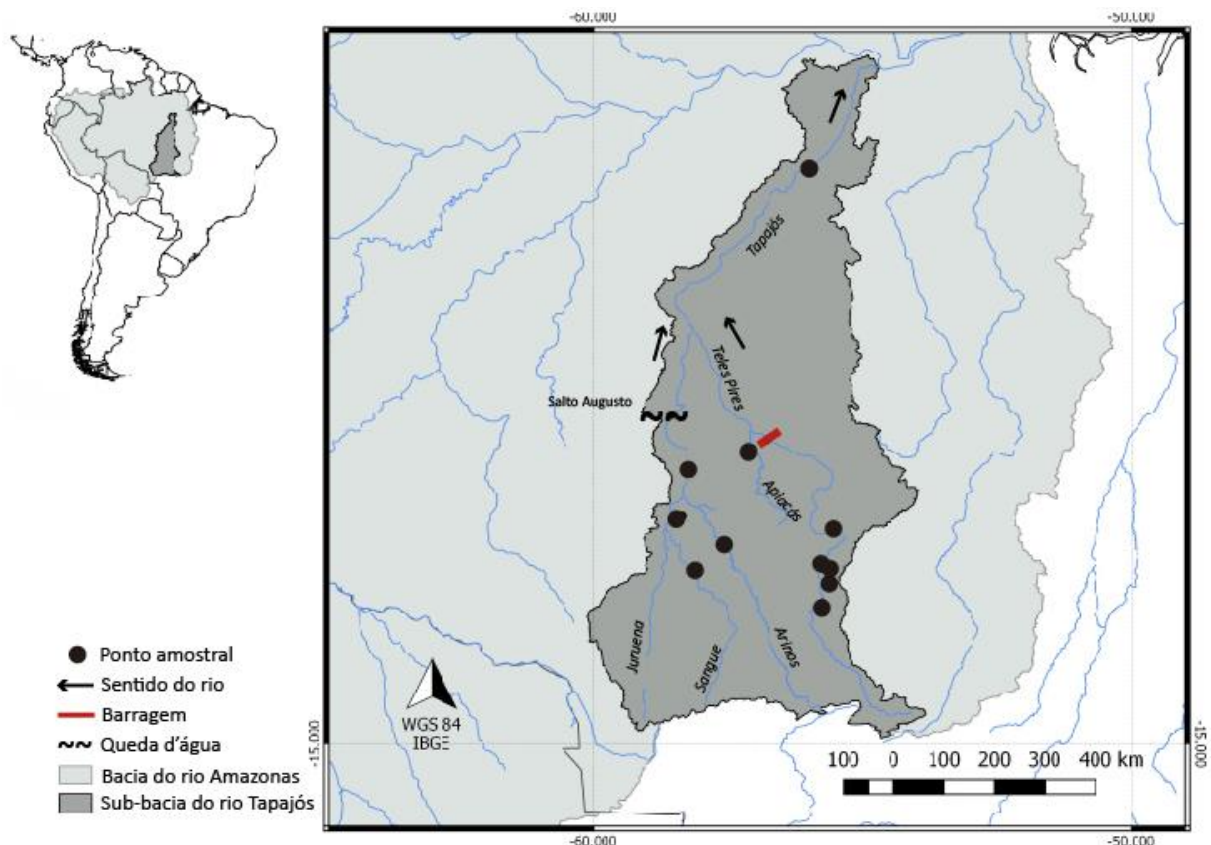


Tabela II.1. Informações sobre os pontos de coleta de *Prochilodus nigricans* ao longo da sub-bacia do rio Tapajós. As coordenadas geográficas são dadas em graus decimais. N= número de indivíduos utilizados no presente estudo.

Rio	Cidade/UF	Coordenadas Geográficas		Período de amostragem	N
		Latitude	Longitude		
<i>Drenagem Juruena</i>					
Sague	Juara/MT	-11.706320	-58.050030	Abr/2015 – Set/2015	30
Arinos	Juara/MT	-11.280950	-57.560940	Abr/2015 – Jul/2015	25
Vermelho	Castanheiras/MT	-10.760798	-58.359625	Set/2015	23
Juruena	Cotriguaçu/MT	-9.879286	-58.235445	Set/2015	30
<i>Drenagem Teles Pires</i>					
Teles Pires	Sorriso/MT	-12.385474	-55.7357515	Abr/2015 – Set/2015	30
		-11.693233 <sup>▲</sup>	-55.725453 <sup>▲</sup>		
Teles Pires	Sinop/MT	-11.986833 <sup>■</sup>	-55.621412 <sup>■</sup>	Abr/2015 – Jul/2015	30
		-11.751211 <sup>◆</sup>	-55.707208 <sup>◆</sup>		
Teles Pires	Colíder/MT	-11.020992	-55.555007	Set/2015	24
Apiacás*	Apiacás/MT	-9.504227	-57.054854	Set/2015	30
<i>Drenagem Tapajós</i>					
Tapajós**	Itaituba/PA	-4.277616	-55.984121	Ago/2015 – Set/2015	17

Coletas no ponto amostral de Sinop: <sup>▲</sup>Condomínio Piraíba, <sup>■</sup>Estrada Pato Bravo, <sup>◆</sup>Praia do Cortado. \*População amostral possivelmente com indivíduos migrantes. \*\* Onze dos 31 indivíduos da população amostral de Tapajós foram removidos das análises por pertencerem à outra linhagem, conforme discutido no Capítulo I.

Considerando a proposta dessa pesquisa, do modelo biológico escolhido e das implicações logísticas impostas pela área de estudo, optamos por empregar o uso da rede de espera como técnica principal de coleta. As redes de emalhar foram fixadas às margens dos rios ou dentro de lagoas marginais no final do dia e recolhidas na manhã seguinte, após um período não superior a 12 horas. Um fragmento da nadadeira adiposa de cada espécime capturado foi coletado e fixado em etanol 96%, sendo os indivíduos, em seguida, devolvidos vivos ao ambiente (Figura II.2). Esses tecidos receberam uma numeração de campo e posteriormente foram incorporados ao acervo do Banco de Tecidos do Laboratório de Biodiversidade Molecular e Conservação (LabBMC) da Universidade Federal de São Carlos e armazenados a -20 °C.

Figura II.2. Prancha com imagens das atividades de coleta. A= Rio Teles Pires, município de Sorriso. B= Ponte sobre o rio do Sangue, afluente do rio Juruena. C e D= Fixação da rede de emalhar. E= Captura e soltura de exemplar de *Prochilodus nigricans*. F=Entrada de uma lagoa marginal no rio do Sangue, afluente do rio Juruena. G e H= Marcas de ranhuras nas rochas resultantes do hábito detritívoro de *Prochilodus nigricans*.



### II.3.2 Conduta ética e legal

A coleta de material biológico do presente projeto de pesquisa foi conduzida em consonância com a legislação vigente no Brasil, mediante autorização (SISBIO 41778) e aprovação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de São Carlos (CEUA 3752060715).

### II.3.3 Extração de DNA e ampliações

A extração do DNA genômico total seguiu o protocolo de tampão salino descrito por Aljanabi & Martinez (1997). Géis de agarose 1% juntamente com o Gel Red™ foram utilizados a fim de verificar a integridade do DNA. A quantificação do DNA estoque foi aferida com o auxílio de biofotômetro (Eppendorf, Hamburgo, Alemanha), o que possibilitou a posterior confecção de alíquotas de DNA com concentração padronizada a 50 ng/μL.

#### II.3.3.1 Marcadores mitocondriais

Amplificamos via PCR (reação em cadeia da polimerase) os genes das subunidades 6 e 8 da ATP sintase (ATP6/8) e a região controle (d-loop) do DNA mitocondrial utilizando os *primers* descritos por Sivasundar e colaboradores (2001). As sequências dos *primers* são mostradas na tabela A na seção Anexo. A reação para ambos os marcadores teve um volume final de 12,5 μL, consistindo de 50 ng de DNA, 1,25 μL de *buffer* (10x), 0,2 mM de dNTPs, 1 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,4 μM de cada *primer* e 0,5 U de *Taq* Platinum (Invitrogen™). O programa-padrão de amplificação para o ATP6/8 era composto por um ciclo inicial de desnaturação a 94 °C por 3 minutos, seguidos por 30 ciclos de 1 minuto a 94 °C, 45 segundos a 58 °C na temperatura de anelamento, 1 minuto a 72 °C, além 2 minutos de extensão final com 72 °C. Já para o d-loop, a reação consistiu de um ciclo a 94 °C por 3 minutos, 30 ciclos de 15 segundos a 94 °C, 15 segundos a 59 °C na temperatura de anelamento, 30 segundos a 72 °C e, por fim, 5 minutos a 72 °C para a extensão final. Uma vez amplificadas as regiões de interesse do mtDNA, os produtos de PCR foram submetidos à purificação com polietilenoglicol a 20% (PEG) (LIS; SCHLEIF, 1975) para remoção do excesso de *primers*, dNTPs não incorporados e eventuais bandas inespecíficas. As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático modelo ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O número de indivíduos analisados por ponto amostral é mostrado na Tabela II.2.

Tabela II.2. Quantidade de indivíduos de *Prochilodus nigricans* empregados nas análises com mtDNA, por ponto de coleta ao longo da sub-bacia do rio Tapajós.

Rio	Cidade/UF	Marcador mitocondrial	
		ATP6/8	D-loop
Sague	Juara/MT	9	10
Arinos	Juara/MT	9	8
Vermelho	Castanheiras/MT	9	8
Juruena	Cotriguaçu/MT	10	9
Teles Pires	Sorriso/MT	10	9
Teles Pires	Sinop/MT	12	10
Teles Pires	Colíder/MT	10	9
Apiacás	Apiacás/MT	8	9
Tapajós	Itaituba/PA	11	11

### II.3.3.2 Marcadores microssatélites

Para realizar a amplificação dos locos microssatélite, utilizamos os *primers* PCOS3, PCOS14 e PCOS18 (CARVALHO-COSTA; HATANAKA; GALETTI, 2006), os quais foram originalmente desenvolvidos para *Prochilodus costatus* e PL3, PL14, PL25, PL64, PL119 e PL190 (RUEDA et al., 2011), que foram descritos para *Prochilodus lineatus* (ver tabela B, na seção Anexo). Os marcadores foram amplificados via PCR considerando o protocolo proposto por Schuelke (2000). A reação teve um volume final de 10  $\mu$ L, contendo 50 ng de DNA molde, 5  $\mu$ L de *GoTaq*®, 0,12  $\mu$ M do *primer* acrescido da cauda M13 e 0,48  $\mu$ M tanto da cauda M13 quanto do *primer* sem a cauda. As amplificações para todos oligonucleotídeos foram conduzidas de acordo com o seguinte programa: um ciclo inicial de desnaturação a 95 °C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 60 °C na temperatura de anelamento dos *primers* específicos, 30 segundos a 72 °C; seguidos de 10 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 45 segundos a 53 °C na temperatura de anelamento da cauda M13, 45 segundos a 72 °C e a etapa final de extensão com 72 °C por 10 minutos. Após a amplificação, os produtos de PCR foram genotipados em sequenciador automático ABI 3730XL (Applied Biosystems, Foster City, Califórnia, EUA). O tamanho dos alelos foi estimado com o auxílio do *Microsatellite plugin* implementado no *software* Geneious v. 7.1.7 (KEARSE et al., 2012).

### II.3.4 Análises estatísticas

#### II.3.4.1 Análise com DNA mitocondrial

As sequências de ATP6/8 e d-loop foram alinhadas com o auxílio do ClustalW implementado no programa Geneious v. 7.1.7 e em seguida editadas. As redes haplotípicas



foram construídas com o auxílio do programa PopART (*Population Analysis with Reticulate Trees*) (LEIGH; BRYANT, 2015), utilizando o algoritmo *Median Joining*. Os índices de diversidade foram estimados no programa DNAsp v. 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009), sendo determinados o número de sítios polimórficos (S) e de haplótipos (h), e as diversidades haplotípica (Hd) e nucleotídica ( $\pi$ ).

Posteriormente o *software* BAPS v. 6.0 (*Bayesian Analysis of Population Structure*) (CORANDER et al., 2008) foi utilizado com o intuito de investigar agrupamentos para as amostragens estudadas com os marcadores mitocondriais. Esse programa considera tanto as frequências nucleotídicas quanto o número de grupos geneticamente divergentes, como variáveis randômicas. Para cada um dos marcadores utilizados, realizamos a análise de “*population mixture analysis*” considerando o *K* entre 1 e 9, com 10 réplicas para cada um deles, sendo o *K* selecionado aquele que apresenta o maior valor de probabilidade posterior.

Para verificar se as populações são geneticamente diferenciadas, calculamos os valores do índice de fixação ( $\Phi_{ST}$ ) par-a-par entre os grupos estudados e realizamos a análise de variância molecular (AMOVA) considerando o nível de significância de  $p < 0,05$ , testada através de 10000 permutações. Ambas as análises foram realizadas no programa Arlequin v. 3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010).

Uma vez determinada a estrutura populacional no programa BAPS usando os dados obtidos para a região d-loop, utilizamos o método de coalescência, baseado no modelo *Bayesian Skyline Plot* (BSP) (DRUMMOND et al., 2005), visando estimar a dinâmica demográfica de cada uma das populações. Este método estima variações populacionais ao longo do tempo sem haver a dependência de um modelo paramétrico específico de demografia histórica (DRUMMOND et al., 2005). Para esta análise foram realizadas três corridas independentes das cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC), com 30 milhões de gerações cada, amostradas a cada 10.000 no programa BEAST v. 2.0 (BOUCKAERT et al., 2014), via plataforma CIPRES (MILLER; PFEIFFER; SCHWARTZ, 2010) ([www.phylo.org](http://www.phylo.org)). Os arquivos *log* e *tree* foram combinados com o auxílio do programa LogCombiner v.1.8 (DRUMMOND et al., 2012) e posteriormente analisados no *software* Tracer v1.5 (RAMBAUT; DRUMMOND, 2007) para acessar a convergência e estabilização, considerando apenas valores de ESS (*effective sample size*) iguais ou superiores a 200. Utilizamos os modelos de substituição baseados no *Bayesian Information Criteria* (BIC) sugeridos pelo programa jModeltest v. 2.1.4 (POSADA, 2008) e relógio molecular estrito, o qual é o mais indicado para dados intraespecíficos (DRUMMOND; BOUCKAERT, 2015). A taxa de substituição empregada para os nossos dados foi de 0,0167

substituições por sítio por milhão de anos, conforme sugerido por Sivasundar e colaboradores (2001).

#### II.3.4.2 Análises dos locos microssatélites

A fim de melhor embasar as discussões dos nossos resultados e inferir sobre a estrutura populacional de *P. nigricans* de forma mais acurada e precisa, nós optamos por utilizar uma abordagem consensual a partir da comparação de métodos que, apesar de possuírem premissas distintas e diferentes abordagens estatísticas (*e.g.* clusterização bayesiana e análise multivariada), podem se complementar.

Primeiramente utilizamos o *software* STRUCTURE v. 2.3.4. (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000), o qual faz uso de uma análise de atribuição bayesiana para estimar o número de populações ( $K$ ) tendo como pressupostos o equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e a ausência de desequilíbrio de ligação dentro das populações. A análise foi realizada sem informação *a priori* quanto à origem dos indivíduos, considerando o modelo de mistura e frequências alélicas correlacionadas. Esses parâmetros são apropriados para grupos cujos indivíduos possam apresentar ancestrais em mais de uma população e cujas populações são fracamente diferenciadas (FALUSH; STEPHENS; PRITCHARD, 2003; EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Foram realizadas 10 corridas independentes para cada valor de  $K$  testado (1 a 10), com 1 milhão de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) e 100 mil gerações descartadas como *burn-in*. O programa STRUCTURE Harvester v. 0.6.94 (EARL; VONHOLDT, 2012) foi utilizado para se obter o valor de  $K$  mais provável. Os resultados foram obtidos tanto pelo método de Pritchard e colaboradores (2000), em que se escolhe o  $K$  que maximize o valor de  $\text{LnP}(K)$  e que apresente a menor variância, quanto pelo método proposto por Evanno e colaboradores (2005), que se baseia na taxa de mudança de probabilidades para sucessivos valores de  $K$ .

Adicionalmente realizamos uma análise hierarquizada mantendo os mesmos parâmetros, exceto para  $K$ , cujo número máximo esteve condicionado ao número de pontos amostrais ( $n$ ) dentro de cada *cluster* previamente detectado pelo STRUCTURE mais um ( $1 < K < n + 1$ ).

Utilizamos o método bayesiano de agrupamento para inferir acerca da distribuição espacial dos *clusters* através do pacote computacional Geneland v. 4.0.6. (GUILLOT; MORTIER; ESTOUP, 2005) na plataforma R v. 3.1.2 (R CORE TEAM, 2018). Esse pacote permite fazer uso de informações georreferenciadas de genótipos individuais para inferir, além

do número de populações, também a localização espacial das descontinuidades genéticas entre elas. Para cada  $K$  testado (um a oito) realizamos uma análise com 1 milhão de interações de MCMC e 100 interações de *thinning*.

Realizamos também uma análise discriminante de componentes principais DAPC (*Discriminant Analysis of Principal Components*) usando o pacote computacional *Adegenet* (JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010), disponível na plataforma do R v. 3.1.2 (R CORE TEAM, 2018). Esse programa faz uso do algoritmo *k-means* de modo sequencial a fim de encontrar um dado número de agrupamentos por meio da maximização da variação existente entre eles, sendo os melhores *clusters* escolhidos de acordo com o critério de informação bayesiana (BIC) (JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010). De modo geral, as análises multivariadas se apresentam como uma excelente alternativa àquelas que empregam algoritmos bayesianos de agrupamento (VERGARA et al., 2015). Especialmente no caso da DAPC, uma de suas principais vantagens reside no fato de tanto o EHW quanto o equilíbrio de ligação entre os locos não serem premissas para analisar as populações. Isso garante flexibilidade quanto ao seu uso independente da taxa de recombinação genética ou mesmo ploidia nos organismos (JOMBART; DEVILLARD; BALLOUX, 2010).

Uma vez que os *clusters* foram definidos, utilizamos o programa MICRO-CHECKER v. 2.2.3. (VAN OOSTERHOUT et al., 2004) para verificar a presença de alelos nulos. Por meio do *software* GenAIEx v. 6.5 (PEAKALL; SMOUSE, 2012) estimamos o número de alelos ( $N_a$ ), os valores das heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ). O conteúdo de informação polimórfica (PIC) foi calculado no CERVUS v. 3.0.7 (MARSHALL et al., 1997) e os desvios do EHW e desequilíbrio de ligação nos locos foram aferidos no programa Genepop v. 4.0.10 (ROUSSET, 2008). Os intervalos de significância foram submetidos à correção de Bonferroni (RICE, 1989). Com o FSTAT v. 2.9.3.2 (GOUDET, 1995) obtivemos os valores de riqueza alélica e do coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ). Apesar do  $N_a$  e da  $H_o$  serem usualmente utilizados para estimar a diversidade genética (SINGH, 2017), estes estimadores podem enviesar os dados, caso o tamanho amostral seja diferente, e alelos raros possam não ser amostrados em populações pequenas (PETIT; MOUSADIK; PONS, 1998). A riqueza alélica, por sua vez, contorna esse eventual viés por meio do método de rarefação ao utilizar um tamanho amostral fixo para estimar a riqueza em cada loco (SINGH, 2017).

O índice de fixação de Wright ( $F_{ST}$ ) par-a-par foi calculado no programa Arlequin v.3.5.2.2 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010), sendo realizadas as correções de Bonferroni para análises múltiplas. Para explicar a possível presença de alelos nulos, calculamos a diferenciação

entre as populações no *software* FreeNA (CHAPUIS; ESTOUP, 2007) usando 5000 randomizações e aplicando o método de correção ENA (*excluding null alleles*). Adicionalmente utilizamos o pacote em R (R CORE TEAM, 2018) DEMETics (GERLACH et al., 2010) a fim de verificar uma possível estruturação populacional por meio do índice D ( $D_{EST}$ ) proposto por Jost (2008), o qual baseia-se no número de alelos efetivos.

## II.4 Resultados

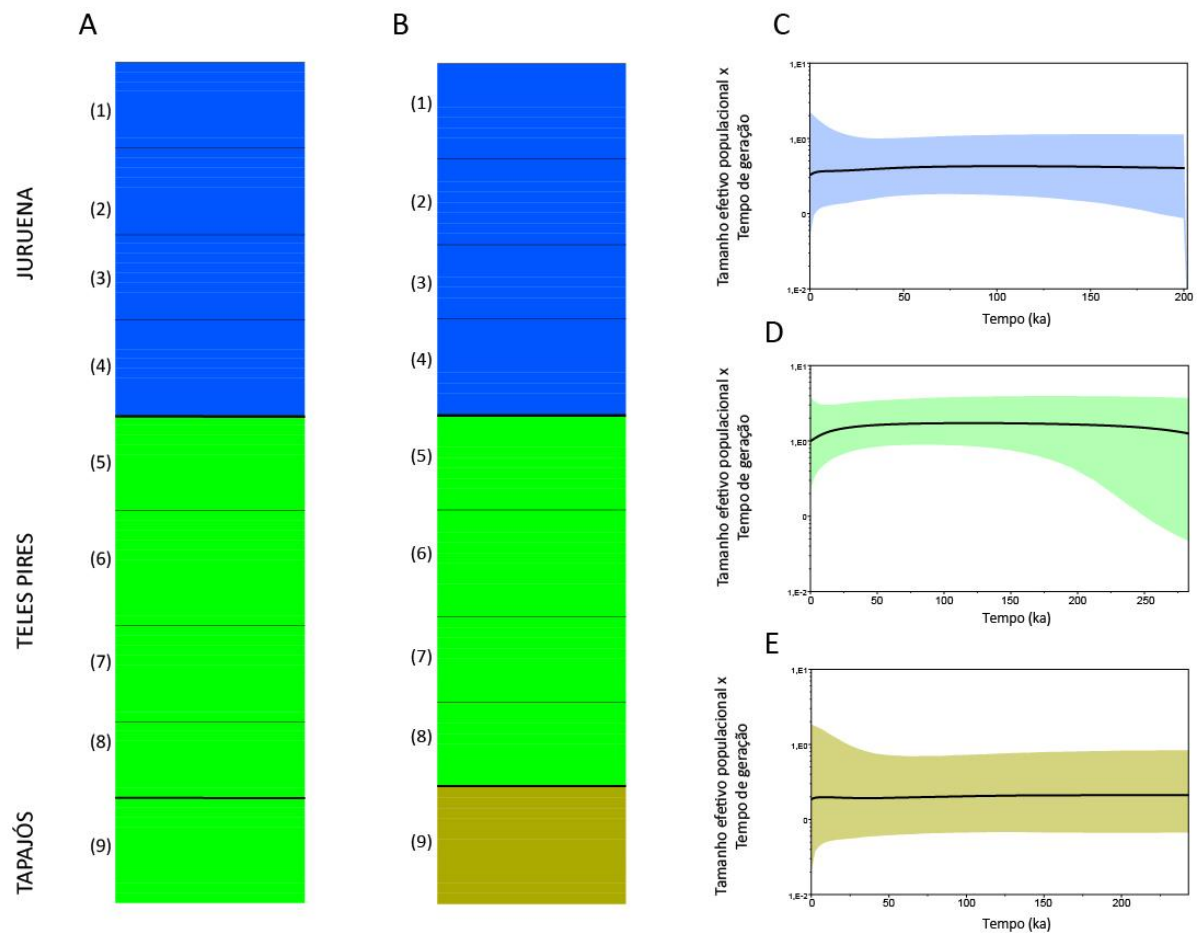
### II.4.1 DNA mitocondrial

#### II.4.1.1 Edição de sequências, estruturação populacional e demografia histórica

Após o alinhamento e a edição das sequências, o conjunto de dados utilizado nas análises populacionais foi de 88 sequências de *P. nigricans* para os genes ATP6/8 e de 83 para a região d-loop. As sequências editadas para o ATP6/8 resultaram em 826 pb, dos quais cinco sítios foram polimórficos para Juruena, 10 para Teles Pires e três para Tapajós. As sequências de d-loop editadas tiveram um tamanho final de 965 pb, sendo observados 48 sítios polimórficos na população Teles Pires, 24 para Juruena e apenas três para a população Tapajós.

A análise de agrupamentos realizada com BAPS detectou dois grupos com o ATP6/8 [ $\log(\text{ml}) -256.0999$ ], sendo um *cluster* formado por indivíduos amostrados no rio Juruena e afluentes e o outro formando um grupo com amostras das demais localidades (Figura II.3 A). Já com o d-loop, que corresponde a um marcador de taxa mutacional mais rápida em comparação com o ATP6/8, encontramos três grupos [ $\log(\text{ml}) -1318.0931$ ], os quais são formados por amostras coletadas nas drenagens dos rios Juruena, Teles Pires e Tapajós (Figura II.3 B). As análises de BSP realizadas com o marcador d-loop, por sua vez, sugerem que o tamanho efetivo populacional para cada um dos *clusters* detectados encontram-se estáveis, não havendo variações demográficas há pelo menos 200 mil anos (Figura II.3 C, D e E).

Figura II.3. Gráficos de estruturação genética realizados no programa BAPS com os marcadores ATP6/8 e d-loop e de dinâmica populacional realizado no BEAST somente com os dados de d-loop. A= Estrutura populacional de *Prochilodus nigricans* utilizando o marcador ATP6/8. B= Estrutura populacional de *Prochilodus nigricans* utilizando o marcador d-loop. C= Gráfico do BSP da população Juruena. D= Gráfico do BSP da população Teles Pires. E= Gráfico do BSP da população Tapajós. As barras de mesma cor nos gráficos de estruturação representam o mesmo grupo populacional e os números de cada grupo representam os locais de coleta (1-rio Sangue, 2-rio Arinos, 3-rio Vermelho, 4-Cotriguaçu, 5-Sorriso, 6-Sinop, 7-Colíder, 8-rio Apiacás e 9-rio Tapajós). Nos gráficos de dinâmica populacional, o eixo y representa tamanho populacional x tempo de geração (medido em milhões de anos) e o eixo x representa o tempo (indicado em mil anos atrás).



Quando analisamos os valores de  $\Phi_{ST}$  par-a-par considerando as três populações detectadas com o d-loop (inclusive para o gene ATP6/8), observamos uma diferenciação significativa para todos os pares de combinações e em ambos os marcadores, exceto entre Juruena e Tapajós com o ATP6/8, cujo valor foi baixo ( $\Phi_{ST} = 0,01297$ ) e não significativo (Tabela II.3).

Tabela II.3. Diferenciação genética par-a-par entre indivíduos de *Prochilodus nigricans* na sub-bacia do rio Tapajós, estimada através de marcadores mitocondriais. Para cada combinação são fornecidos os valores de  $\Phi_{ST}$  (com o  $p$  e o desvio-padrão). JUR = Juruena, TEL= Teles Pires, TAP = Tapajós. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) encontram-se com asterisco.

Combinação	ATP6/8	d-loop
	$\Phi_{ST}$ ( $p \pm SD$ )	$\Phi_{ST}$ ( $p \pm SD$ )
JUR x TEL	0,23899 (0,00000 $\pm$ 0,0000)*	0,34300 (0,00000 $\pm$ 0,0000)*
JUR x TAP	0,01297 (0,27051 $\pm$ 0,0155)	0,21780 (0,00000 $\pm$ 0,0000)*
TEL x TAP	0,20514 (0,00684 $\pm$ 0,0027)*	0,47299 (0,00000 $\pm$ 0,0000)*

Na tabela II.4 estão os resultados da análise de variância molecular, os quais mostraram variações significativas entre e dentro dos grupos para ambos os marcadores mitocondriais. Esses dados são congruentes e revelam-se concordantes com os demais testes estatísticos previamente estimados no presente trabalho. Os valores de variância entre as populações situaram-se entre 20 e 34% e foram relativamente menores quando comparados com a variância calculada dentro dos grupos.

Tabela II.4. Análise de Variância Molecular (AMOVA) das populações estudadas de *Prochilodus nigricans* da sub-bacia do rio Tapajós utilizando os marcadores mitocondriais ATP6/8 e d-loop, com os valores de porcentagem da variação dentro e entre as populações.

Fonte da variação	Porcentagem da variação	
	ATP6/8	d-loop
Entre Populações	20,98	34,34
Dentro das populações	79,02	65,66
	$\Phi_{ST}$ 0,20979*	$\Phi_{ST}$ 0,34338*

\*Valores significativos ( $p < 0,01$ ). Teste de significância realizado a partir de 10100 randomizações.

#### II.4.1.2 Diversidade genética e redes haplotípicas

Os resultados obtidos com o ATP6/8 mostram que os maiores valores de Hd e  $\pi$  foram observados para a população Juruena, seguidos por Teles Pires e Tapajós. Já para o d-loop, os valores de diversidade haplotípica e nucleotídica variaram, respectivamente, de 0,855 a 0,976 e de 0,004 a 0,009, sendo a população Teles Pires aquela que apresentou valores superiores para ambos os índices. Os baixos valores encontrados para Tapajós, no entanto, podem ser

reflexo da baixa amostragem realizada para esta região. Todos os dados de diversidade encontram-se mostrados na Tabela II.5.

Tabela II.5. Parâmetros de variação genética nas populações amostrais de *Prochilodus nigricans* baseados no mtDNA. Para cada marcador são fornecidos o número de sequências analisadas (N), número de sítios polimórficos (S), número de haplótipos (h), diversidade haplotípica (Hd) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ).

	ATP6/8					d-loop				
	N	S	H	Hd	$\pi$	N	S	h	Hd	$\pi$
Juruena	37	5	5	0,709	0,00172	35	24	15	0,921	0,00598
Teles Pires	40	10	10	0,629	0,00115	37	48	25	0,976	0,00908
Tapajós	11	3	3	0,345	0,00066	11	20	6	0,855	0,00476

A rede haplotípica construída a partir do ATP6/8 (Figura II.4) apresentou um padrão em forma de estrela, padrão este esperado para populações que passaram por um processo de expansão. Analisando os resultados, constatamos que o haplótipo mais comum é compartilhado por 43 indivíduos oriundos de todos os pontos amostrais, exceto do rio Arinos, afluente do Juruena. O segundo e terceiro haplótipos mais frequentes são encontrados em Juruena, os quais são compartilhados, respectivamente, por 16 e por oito indivíduos.

Com relação à região controle, observamos uma rede com padrão reticulado, constituída por 43 haplótipos. Observamos ainda que nas populações Juruena e Tapajós são encontrados os haplótipos mais comuns, além de uma leve diferenciação de Juruena em comparação com os indivíduos das demais drenagens. O compartilhamento foi evidenciado apenas em um único haplótipo e entre indivíduos dos rios Tapajós e Teles Pires (Figura II.5).

Figura II.4. Rede de haplótipos baseada na variação dos genes ATP6/8 do DNA mitocondrial nas populações amostrais de *Prochilodus nigricans* da sub-bacia do rio Tapajós. As cores referem-se aos pontos amostrais ao longo da sub-bacia e os traços transversais correspondem à quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos.

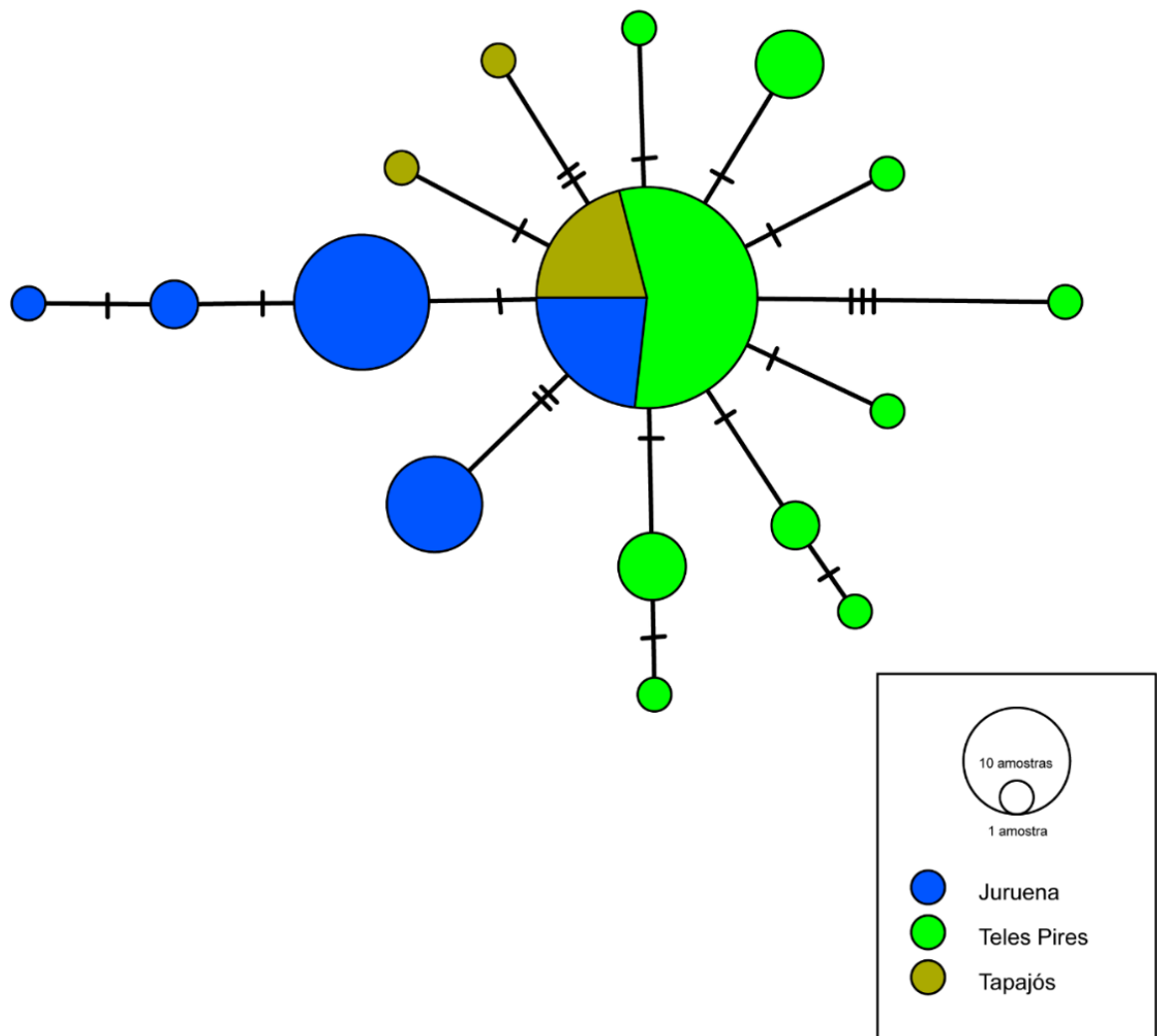
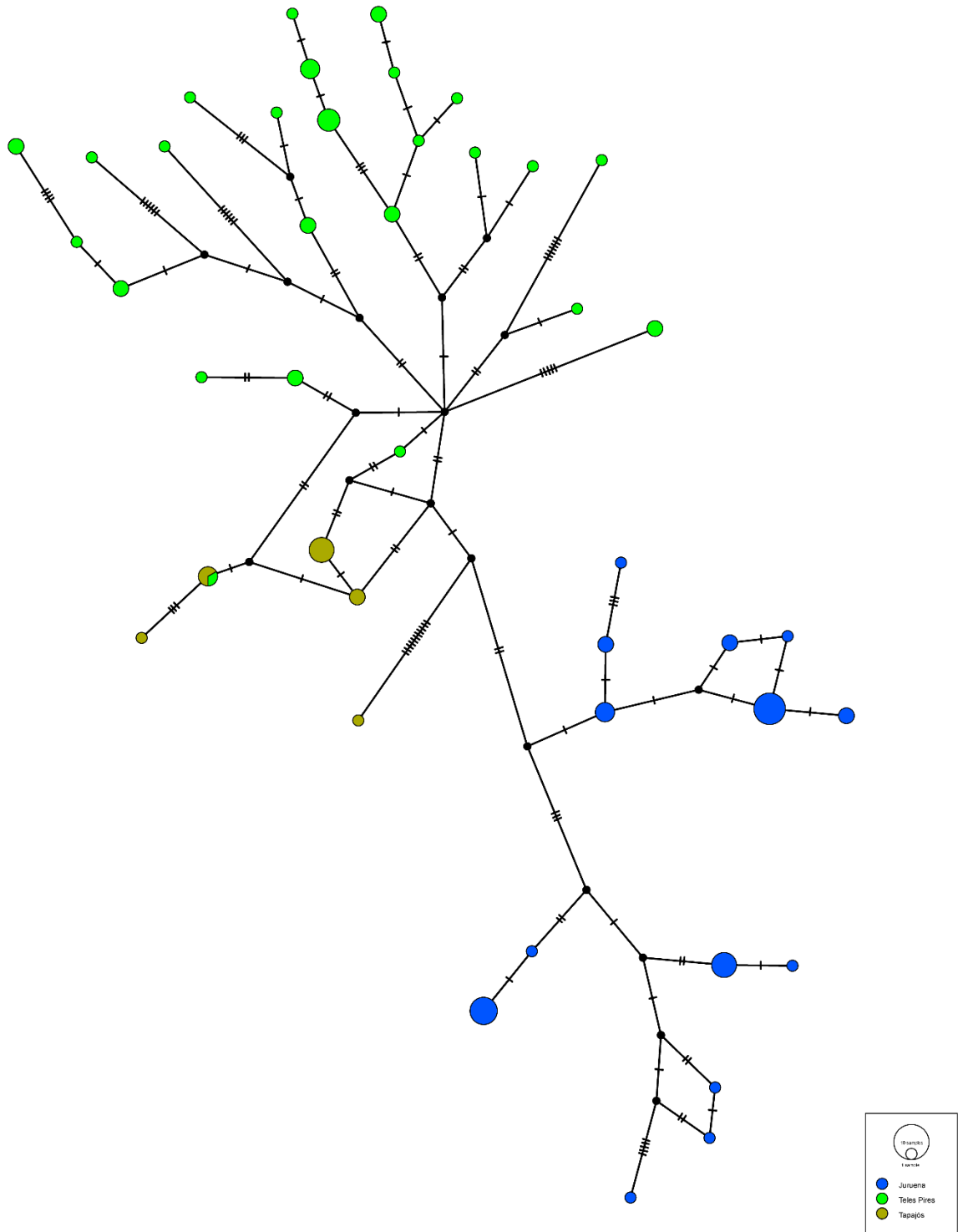




Figura II.5. Rede de haplótipos baseada na variação do marcador d-loop do DNA mitocondrial nas populações amostrais de *Prochilodus nigricans* da sub-bacia do rio Tapajós. As cores referem-se aos pontos amostrais ao longo da sub-bacia e os traços transversais correspondem à quantidade de passos mutacionais entre os haplótipos.



## II.4.2 Microssatélites

### II.4.2.1 Estruturação genética

A partir da análise de atribuição bayesiana realizada no programa STRUCTURE, sem informação *a priori* quanto à origem das amostras, observou-se que o valor mais provável de agrupamento foi  $K=2$  (Figuras II.6 A, B e II.7 A), indicando que os indivíduos coletados no rio Juruena (e afluentes) compõem um grupo genético e que aqueles amostrados no Teles Pires e Tapajós constituem outro.

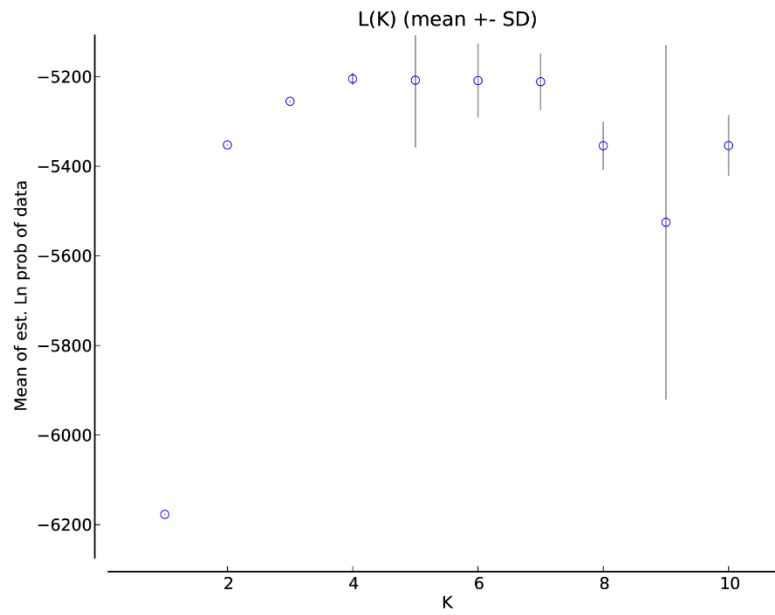
Ao verificar outros valores de  $K$  fornecidos pelo método de Evanno (DeltaK), observamos que o segundo valor mais provável foi igual a três. O gráfico de atribuição indica que os indivíduos do rio Juruena se mantêm como um único *cluster*, seguido por um grupo formado por indivíduos do rio Teles Pires e por outro com indivíduos oriundos do rio Tapajós (Figura II.7 B).

A partir da análise do gráfico de probabilidade é possível observar mistura entre as populações de Teles Pires e Tapajós, confirmando a suspeita de captura de indivíduos migrantes no rio Apiacás (ver Figura A na seção Anexo). Uma vez que o objetivo do presente estudo consistiu em avaliar a estruturação genética de *P. nigricans* dentro do sistema Tapajós durante período não reprodutivo, optamos, portanto, por retirar essa população das análises subsequentes com os microssatélites e submeter nossos dados a outras ferramentas sem considerá-la.

Considerando  $K=3$ , constatamos em seguida a ausência de subestruturação dentro dos *clusters* por meio de uma avaliação hierarquizada, onde utilizamos o programa STRUCTURE analisando cada um dos grupos individualmente. A observação dos gráficos de atribuição bayesiana gerados a partir do pacote Geneland (Figuras II.8 e II.9) e os resultados obtidos por meio da análise discriminante de componentes principais (Figura II.10) suportam três populações espacialmente distribuídas e bem definidas ao longo da sub-bacia, as quais são formadas por cada um dos dois tributários formadores e da calha principal do rio Tapajós.

Figura II.6. Resultado da análise bayesiana para determinação do número de grupos de *Prochilodus nigricans*, por meio do logaritmo de probabilidade médio e valores de DeltaK, segundo Evanno (2005).

A



B

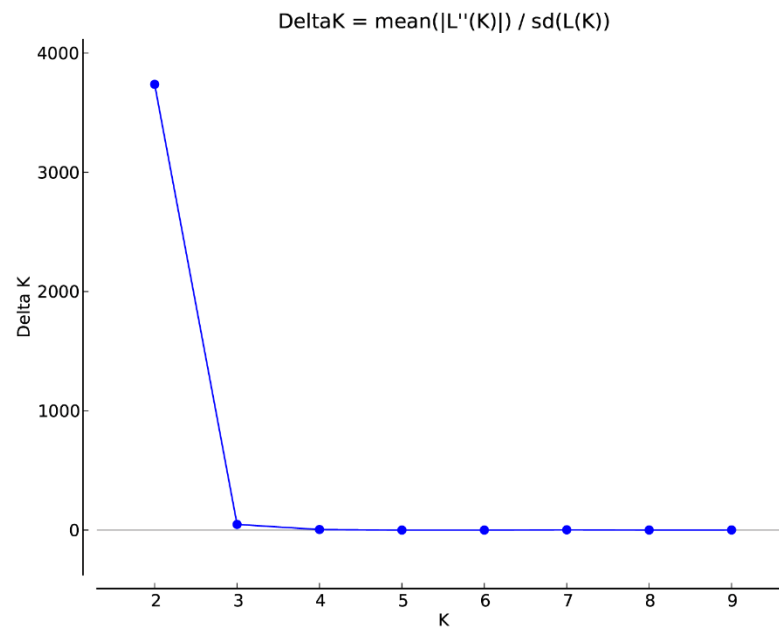
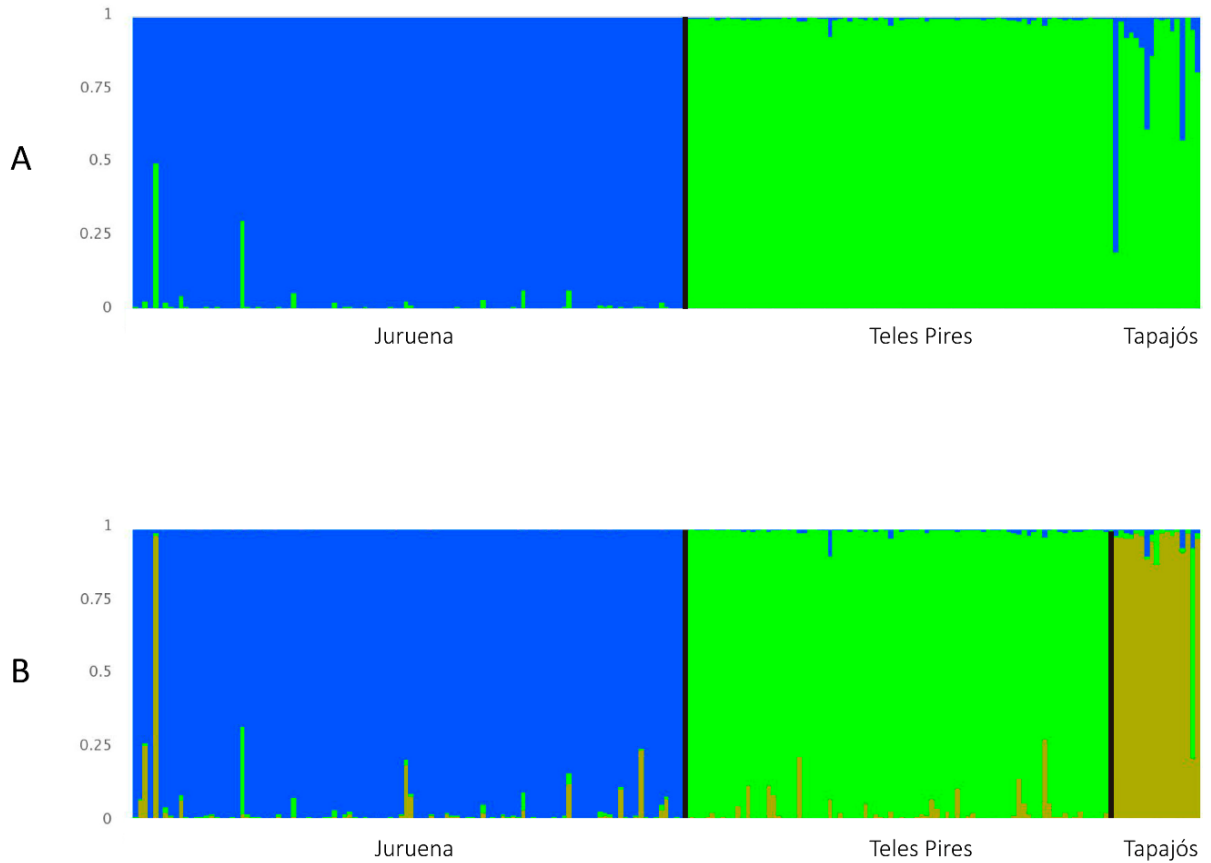


Figura II.7. Gráficos da probabilidade de atribuição de indivíduos de *Prochilodus nigricans*. As linhas verticais representam a probabilidade de os indivíduos pertencerem aos grupos inferidos, sendo estes indicados pelas diferentes cores. A)  $K=2$ . B)  $K=3$ .



Após assumir três populações e submeter os dados genéticos ao *software* MICRO-CHECKER, obtivemos a evidência da presença de alelos nulos em cinco dos nove locos utilizados no presente trabalho. A população Juruena apresentou quatro locos nessa condição (PCOS14, PL119, PL3 e PL25), sendo seguida por Tapajós com dois (PL190 e PL25) e Teles Pires com um loco com alelos nulos (PL25). PL25 foi o único com alelos nulos registrado para as três populações e, portanto, foi retirado das análises. Este apresentou frequências variando de 17% a 24% de acordo com o método de Chakraborty e colaboradores (1992), o qual atrela a incidência de alelos nulos à não amplificação das amostras em decorrência da degradação do DNA.

Os resultados de diferenciação  $F_{ST}$  par-a-par foram significativos e apresentaram valores similares àqueles obtidos com o programa FreeNA, o qual emprega a correção ENA para alelos nulos (as frequências de alelos nulos calculada no FreeNA podem ser visualizadas na Tabela C do Anexo).

Os valores de  $D_{EST}$  foram condizentes com os valores de  $F_{ST}$  e com os resultados de estruturação mostrados pelos gráficos do STRUCTURE ( $K=3$ ), Geneland e DAPC indicando a existência de três populações geneticamente estruturadas. Em todas as comparações par-a-par com os dados de microssatélites, observa-se que Juruena apresenta uma diferenciação maior que os demais *clusters* (Tabela II.6).

A diferenciação das populações também foi inferida por meio da análise de variância molecular, considerando os grupos estabelecidos pela análise multivariada e as de atribuição bayesiana. Na tabela II.7, observamos que mais de 80% da variação foi atribuída à diversidade dentro dos grupos, enquanto 16,17% são encontradas entre os mesmos.

Figura II.8. Gráfico com o número de *clusters* ( $K=3$ ) mais provável fornecido pelo pacote Geneland.

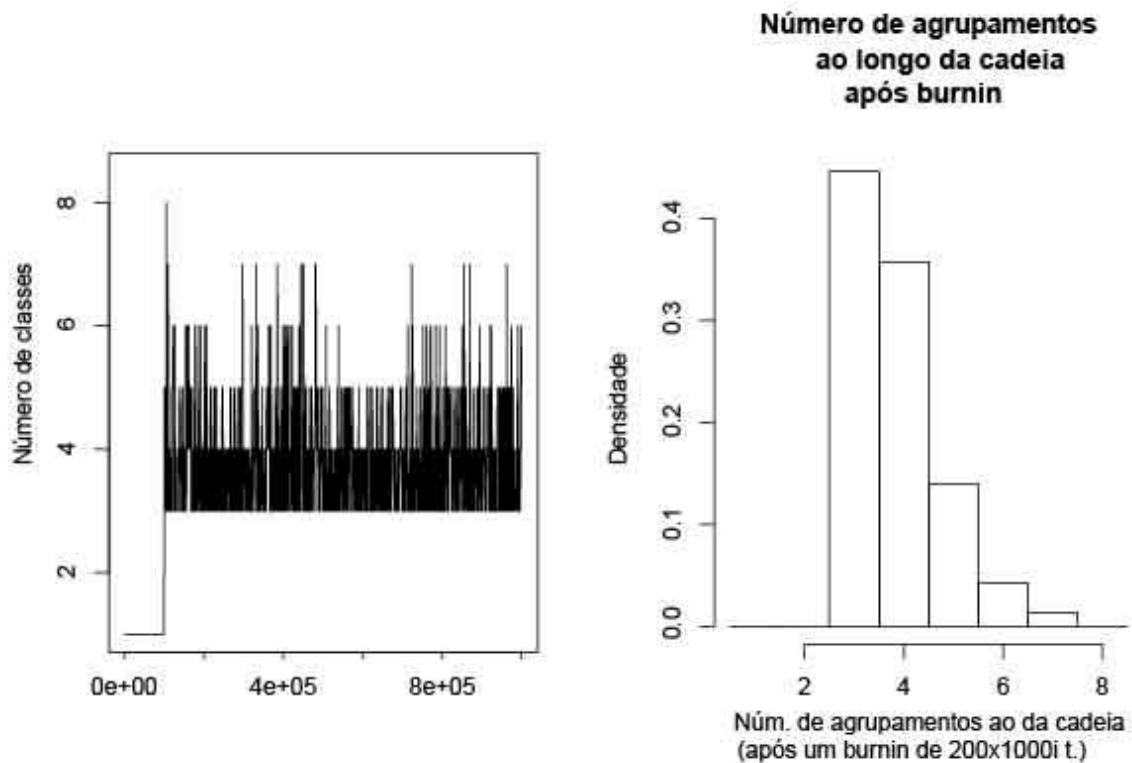


Figura II.9. Mapas de probabilidade posterior de atribuição espacial das populações amostrais de *Prochilodus nigricans* na sub-bacia do rio Tapajós. Agrupamento espacial sugere três *clusters* distintos ao longo da área geográfica estudada (*Membership*).

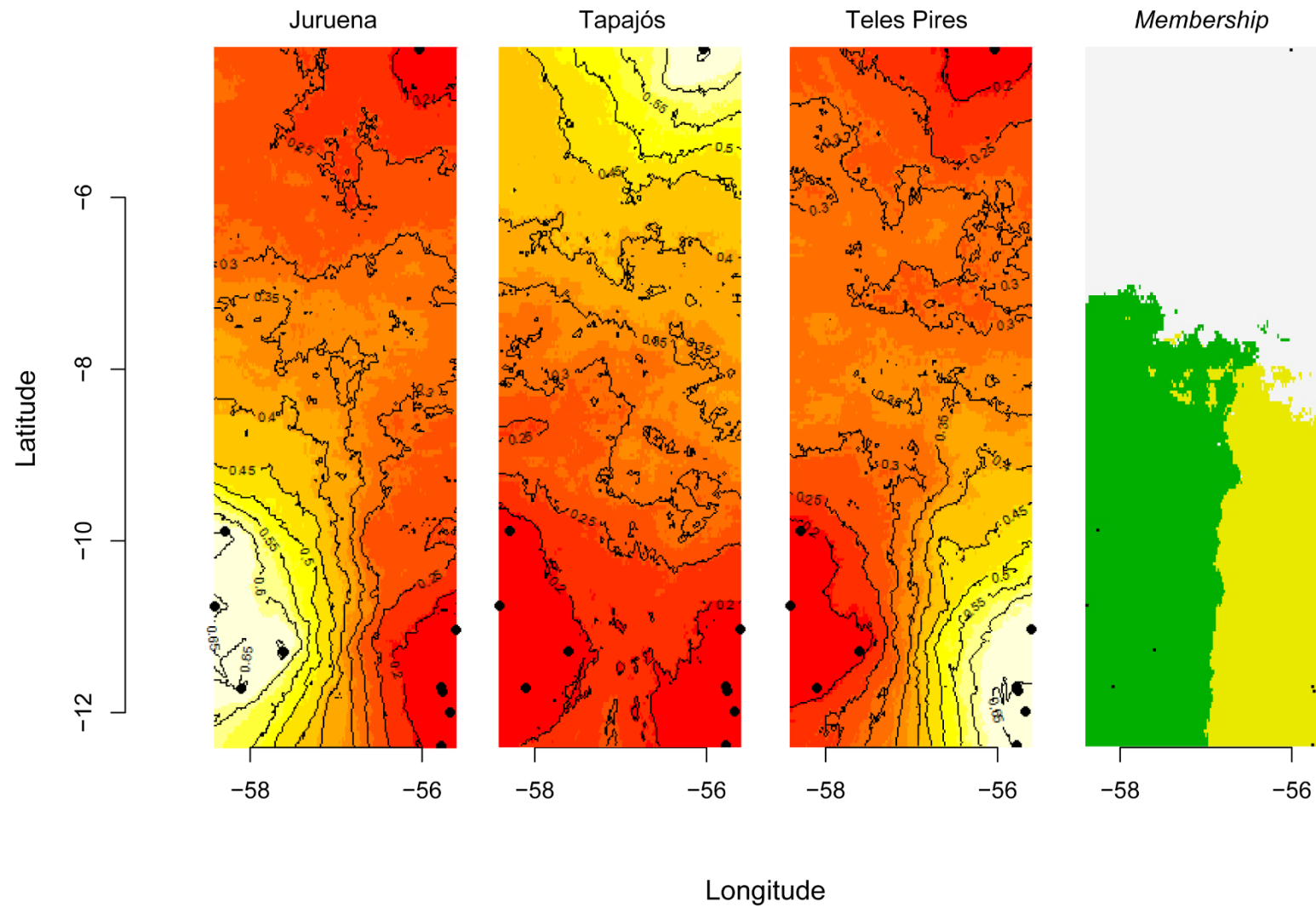


Figura II.10. Gráfico da análise discriminante de componentes principais evidenciando a existência de três populações distintas de *Prochilodus nigricans* dentro da sub-bacia do rio Tapajós. JUR= Juruena. TEL= Teles Pires. TAP= Tapajós.

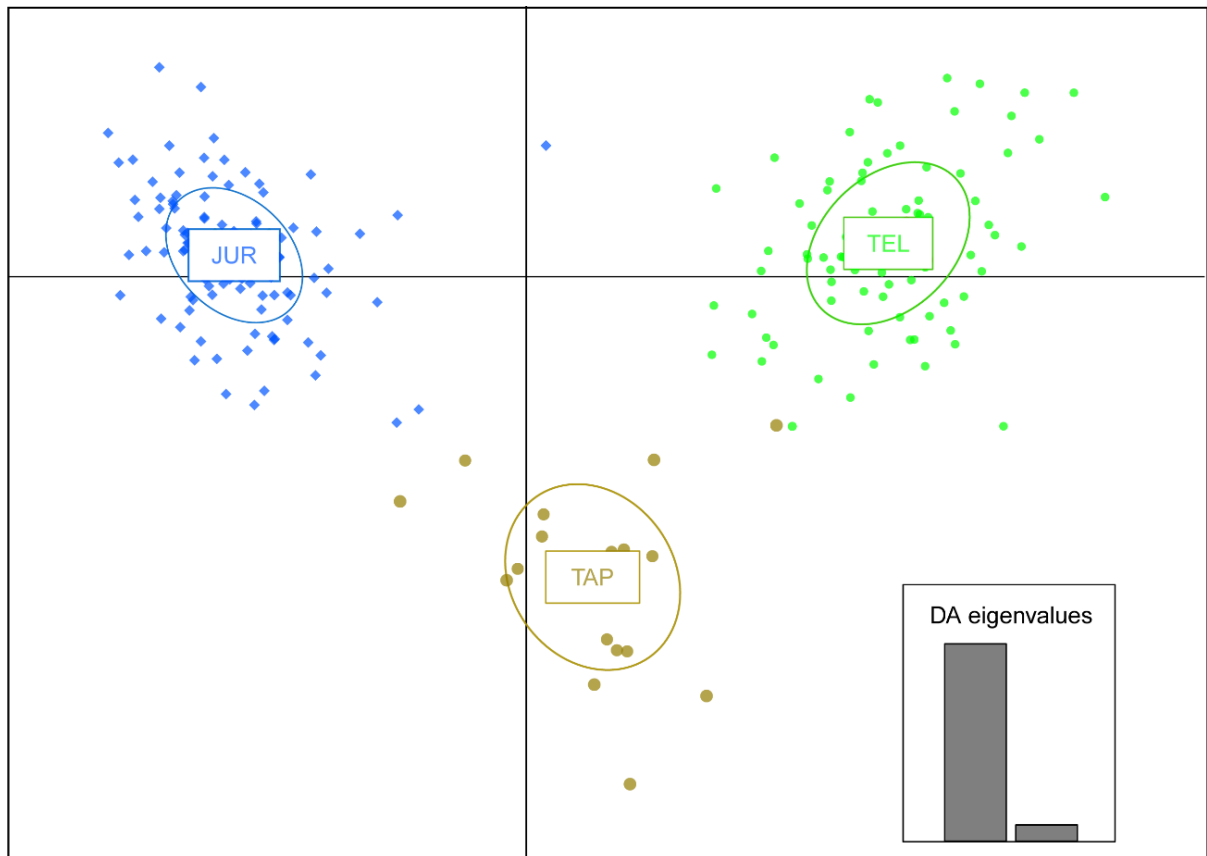


Tabela II.6. Diferenciação genética par-a-par entre indivíduos de *Prochilodus nigricans* na sub-bacia do rio Tapajós, estimada através de marcadores microssatélites. Para cada combinação são fornecidos os valores de  $F_{ST}$  (com o  $p$  e o desvio-padrão),  $F_{ST}$  calculado com a correção ENA (IC 95%) no software FreeNA e  $D_{EST}$  (com o  $p$ ). JUR = Juruena, TEL= Teles Pires, TAP = Tapajós. Valores significativos ( $p < 0,05$ ) encontram-se com asterisco.

Combinação	Microssatélite		
	$F_{ST}$ ( $p \pm SD$ )	$F_{ST}^{ENA}$ (IC)	$D_{EST}$ ( $p$ )
JUR x TEL	0,17757 (0,000 $\pm$ 0,000)*	0,176673 (0,080:0,257)*	0,51499 (0,001)*
JUR x TAP	0,12274 (0,000 $\pm$ 0,000)*	0,120127 (0,064:0,178)*	0,41019 (0,001)*
TEL x TAP	0,11065 (0,000 $\pm$ 0,000)*	0,109698 (0,044:0,207)*	0,31306 (0,001)*

Tabela II.7. Análise de Variância Molecular (AMOVA) das populações estudadas de *Prochilodus nigricans* da sub-bacia do rio Tapajós com oito locos microssatélites, com os valores de porcentagem da variação dentro e entre as populações.

Fonte da variação	Porcentagem da variação
Entre Populações	16,17
Dentro das populações	83,83
	$F_{ST}$ 0,16169*

\*Valores significativos ( $p < 0,01$ ). Teste de significância realizado a partir de 10100 randomizações.

#### II.4.2.2 Estimativa de diversidade genética

A estimativa de diversidade genética foi realizada considerando o número de alelos ( $N_a$ ), número efetivo de alelos ( $N_e$ ), a riqueza alélica ( $R_a$ ) e as heterozigosidades esperada ( $H_e$ ) e observada ( $H_o$ ). Entre os oito locos analisados, o loco PL119 revelou-se o mais polimórfico, com um número de alelos por população variando entre 13 e 22. O número de alelos por loco variou entre dois (PCOS18; Juruena e Teles Pires) e 22 (PL119; Teles Pires), com uma média total de nove alelos por loco para as populações amostrais. O maior valor para o número de alelos médio observado foi encontrado para a população Teles Pires (9,5), com 84 indivíduos, ao passo que o menor foi obtido para população Tapajós (8,375), com 17 indivíduos. Considerando o número de alelos efetivos, observamos que o loco PCOS18 na população Tapajós foi o que apresentou o menor número de alelos (1,125) e o loco PL119, em Juruena, o maior valor (10,882). Em termos de riqueza alélica, a relação foi mantida, com os locos PCOS18 e PL119 apresentando o menor (2) e o maior (13,339) valor, respectivamente.

Os valores médios de  $H_o$  e  $H_e$  foram 0,590 e 0,660 para Juruena, de 0,571 e 0,603 para Teles Pires e de 0,647 e 0,688 para Tapajós. Apesar dos dados para excesso de homozigotos não terem sido significativos após correção de Bonferroni ( $p=0,00208$ ), observou-se um valor de  $p$  limítrofe para o loco PL3 na população Juruena. Somente três locos apresentaram desvios no Equilíbrio de Hardy-Weinberg (PL3 na população Juruena e PL190 nas populações Teles Pires e Tapajós). Não foi observado desequilíbrio de ligação entre as 84 combinações dos loci par a par, após correção de Bonferroni ( $p=0,0006$ ). O número de alelos privados variou de um a 19, com os maiores valores sendo apresentados, respectivamente, para as populações Teles Pires, Juruena e Tapajós. Apenas dois alelos apresentaram frequências superiores a 25% (PCOS14 em Tapajós e PL64 em Teles Pires), sendo que para a grande maioria dos alelos privados (70%), as frequências foram inferiores a 5%. Todas as informações de diversidade genética podem ser encontradas na Tabela II.8.



Tabela II.8. Parâmetros de variação genética nas populações amostrais de *Prochilodus nigricans* baseados em oito locos microssatélites. Para cada loco são apresentados o número de indivíduos (N), número de alelos (Na), número de alelos efetivos (Ne), número de alelos privados (Ap), riqueza alélica (Ra), heterozigosidade observada (Ho), heterozigosidade esperada (He), conteúdo de informação polimórfica (PIC), coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ), valores de  $p$  para déficit de heterozigotos ( $pL$ ), valores de  $p$  para excesso de heterozigoto ( $pS$ ), desvios no equilíbrio de Hardy-Weinberg ( $pHWE$ ). Valores significativos para  $F_{IS}$  encontram-se em itálico ( $p= 0.00208$ ); valores significativos de  $p$  para EHW ( $0,006 < \alpha < 0,05$ ) após correção sequencial de Bonferroni encontram-se com asteriscos.

	Locos microssatélites								Média
	PCOS14	PCOS18	PCOS3	PL119	PL14	PL190	PL64	PL3	
<i>Juruena</i>									
N	108	108	108	106	106	108	107	108	---
Na	9	5	3	14	15	6	13	8	9,125
Ne	4,070	1,645	1,402	10,882	6,275	2,161	4,272	4,952	4,457
Ap	3	3	0	2	5	0	4	1	---
Ra	6,909	4,129	2,289	11,832	10,269	4,252	8,520	6,875	6,844
Ho	0,648	0,333	0,306	0,830	0,849	0,611	0,757	0,389	0,590
He	0,754	0,392	0,287	0,908	0,841	0,537	0,766	0,798	0,660
PIC	0,721	0,371	0,251	0,901	0,825	0,488	0,746	0,770	0,634
$F_{IS}$	0,145	0,154	-0,060	0,091	-0,005	-0,133	0,016	0,516	0,112
$pL$	0,004	0,015	0,823	0,008	0,583	0,988	0,358	0,002	---
$pS$	1,000	0,996	0,373	0,996	0,527	0,038	0,740	1,000	---
$pHWE$	0,104	0,037	0,813	0,292	0,832	0,255	0,069	0,000*	---
<i>Teles Pires</i>									
N	84	84	84	84	84	84	84	84	---
Na	12	2	3	22	11	9	11	6	9,5
Ne	8,115	1,194	1,196	10,756	3,943	4,720	5,093	1,595	4,576
Ap	3	0	0	8	3	2	2	1	---
Ra	9,887	1,972	2,166	13,339	7,329	7,264	7,933	4,095	6,748
Ho	0,821	0,131	0,155	0,929	0,667	0,738	0,774	0,357	0,571
He	0,877	0,163	0,164	0,907	0,746	0,788	0,804	0,373	0,603
PIC	0,865	0,149	0,152	0,900	0,712	0,761	0,778	0,350	0,583
$F_{IS}$	0,069	0,201	0,060	-0,018	0,113	0,069	0,043	0,048	0,075
$pL$	0,073	0,123	0,460	0,758	0,035	0,121	0,271	0,283	---
$pS$	0,965	0,992	0,921	0,415	0,981	0,944	0,833	0,833	---
$pHWE$	0,054	0,118	0,496	0,674	0,117	0,002*	0,121	0,185	---

Tabela II.8 (Continuação).

	Locos microsatélites								Média
	PCOS14	PCOS18	PCOS3	PL119	PL14	PL190	PL64	PL3	
	<i>Tapajós</i>								
N	17	17	17	17	17	17	17	17	---
Na	9	2	4	13	11	12	9	7	8,375
Ne	6,149	1,125	2,050	8,377	4,857	7,410	4,516	3,590	4,759
Ap	2	0	2	0	2	4	1	2	---
Ra	9,000	2,000	4,000	13,000	11,000	12,000	9,000	7,000	8,375
Ho	0,824	0,118	0,529	0,941	0,765	0,647	0,706	0,647	0,647
He	0,837	0,111	0,512	0,881	0,794	0,865	0,779	0,721	0,688
PIC	0,820	0,105	0,431	0,869	0,771	0,852	0,759	0,680	0,660
$F_{IS}$	0,047	-0,032	-0,003	-0,039	0,067	0,280	0,123	0,133	0,042
$pL$	0,406	1,000	0,596	0,775	0,388	0,010	0,171	0,240	---
$pS$	0,810	0,981	0,627	0,529	0,835	0,998	0,954	0,894	---
$pHWE$	0,361	1,000	1,000	0,044	0,951	0,005*	0,007	0,028	---

## II.5 Discussão

Os nossos resultados de estruturação suportam a existência de, pelo menos, três populações de *P. nigricans* geneticamente distintas dentro da sub-bacia do rio Tapajós e nos permitem refutar a hipótese nula de panmixia da espécie nesse sistema hidrográfico. As análises realizadas com o *software* STRUCTURE evidenciaram um  $K=2$ , com uma sub-estrutura entre o Teles Pires e Tapajós. Este resultado foi corroborado pelo elevado número de alelos privados observado para as populações, além das análises discriminantes de componentes principais do DAPC e da atribuição bayesiana gerada no Geneland, as quais foram conduzidas com informação *a priori* quanto à origem dos indivíduos. Os altos valores de  $F_{ST}$  foram significativos e relativamente superiores aos apresentados em estudos com espécies congêneras (BARROCA et al., 2012; BRAGA-SILVA; GALETTI, 2016; HATANAKA; HENRIQUE-SILVA; GALETTI, 2006), e também em outras espécies neotropicais migradoras estudadas em período não reprodutivo, nos rios Uruguai e Mogi-Guaçu (RIBOLLI, 2014; ROSSINI, 2010).

Quanto às estimativas de diversidade genética (Ho, He e Ra), os valores observados no presente estudo foram similares aos encontrados para a espécie *Prochilodus argenteus* (SANCHES et al., 2012), e superiores àqueles detectados para *Prochilodus magdalenae* na

bacia do rio Magdalena, cujo estudo utilizou alguns dos locos empregados neste trabalho (BERDUGO; BARANDICA, 2014).

Dentre as três populações aqui estudadas, a que apresentou maior diversidade genética foi a Tapajós, cujo número amostral foi de apenas 17 indivíduos. Para esta população, o valor médio de riqueza alélica foi igual 8,375, sendo observado o maior número de alelos efetivos ( $N_e = 4,759$ ) e valores superiores de heterozigidade observada e esperada em relação as demais populações. Esses resultados se mostram plausíveis se constatarmos que o rio Tapajós possui outros tributários (e.g. rio Jamaxim), além do Teles Pires e Juruena, os quais podem provavelmente estar contribuindo para o aumento dessa diversidade.

A população Juruena apresentou uma diferenciação genética maior quando comparada com as demais populações identificadas no presente estudo. Esses resultados estão em consonância com aqueles obtidos a partir da região controle do DNA mitocondrial, em que não há haplótipos compartilhados desse tributário com os demais (Figura II.5). Tal estruturação é, inclusive, detectada a partir da análise de atribuição bayesiana do BAPS com o marcador ATP6/8 (Figura II.3 A), o qual apresenta divergência mais lenta que o d-loop. Visto que esses marcadores nos dão uma resposta histórica, a estruturação revelada pelos locos microssatélites pode ser um reflexo de eventos antigos, como a presença de barreiras previamente existentes.

A identificação de padrões de distribuição genética, assim como a detecção de possíveis fatores responsáveis pela diferenciação de populações, consistem em informações extremamente importantes para o estabelecimento de planos de manejo mais apropriados e eficientes (PIORSKI et al., 2008). Aspectos comportamentais, tais como *homing* (PEREIRA; FORESTI F; OLIVEIRA, 2009), ondas reprodutivas e isolamentos por tempo e distância (RIBOLLI et al., 2017; SANCHES; GALETTI JR, 2007), além de barreiras geográficas, como cachoeiras e corredeiras (TORRENTE-VILARA et al., 2011) e as ações antropogênicas (e.g. construção de barramentos) (COLEMAN et al., 2018; DO PRADO et al., 2018; ESGUÍCERO; ARCIFA, 2010), podem atuar sobre as populações de modo a reduzir o fluxo gênico e promover estruturações. Pires e colaboradores (2017) também encontraram diferenciação genética analisando marcadores mitocondriais em amostras de *Zungaro* coletadas no rio Juruena e outros pontos amostrais de ocorrência do gênero. Neste estudo, os autores sugeriram a ocorrência de uma terceira MOTU (sigla para “unidade taxonômica operacional molecular”, do inglês em tradução livre), não correspondente às duas espécies atualmente válidas (*Zungaro zungaro* e *Zungaro jahu*).

Para Britski e Garavello (2005), a presença de corredeiras e cachoeiras ao longo da sub-bacia do rio Tapajós pode ter um papel importante na diferenciação faunística. De acordo com informações oficiais do Parque Nacional do Juruena (ICMBIO, 2011), o rio que dá nome a essa reserva ecológica possui 15 corredeiras, das quais o Salto Augusto e o Salto São Simão são as que apresentam maiores riscos à navegação. O Salto Augusto é caracterizado por apresentar aproximadamente 600 metros de extensão e 19 metros de altura durante o período de seca (PETINI-BENELLI, 2014) e, segundo relatos de pescadores ribeirinhos locais (comunicação pessoal), se comporta como uma barreira à migração daqueles peixes que encontram-se à jusante da queda d'água, o que poderia justificar a forte estruturação encontrada no presente estudo. Já para Dagosta e dePinna (2017), os rios Teles Pires, Juruena e Jamanxim não apresentam relação com o rio Tapajós, e eventos de captura de cabeceira possivelmente seriam a explicação para o elevado grau de hibridismo histórico nessa sub-bacia evidenciado a partir de suas análises.

O resultado encontrado no cálculo do índice  $D$  de Jost, assim como os valores de  $\Phi_{ST}$  em ambos os marcadores mitocondriais, também evidenciaram estruturação significativa das populações do tributário Teles Pires e do rio Tapajós, sugerindo que a restrição ao fluxo gênico é menor entre esses sistemas do que entre cada um deles e a população amostrada no tributário Juruena. Os nossos valores de  $\Phi_{ST}$  com o d-loop foram relativamente similares aos encontrados por Machado e colaboradores (2017), que detectaram moderada estruturação de *P. nigricans* na sub-bacia do rio Madeira possivelmente devido à presença de corredeiras no alto curso daquele rio. Além disso, a AMOVA indicou variação significativa entre as populações, apesar da variação maior ter sido detectada entre indivíduos dentro de uma mesma população do que entre elas. A partir da análise desses resultados, os fatores que podem explicar a estruturação encontrada entre as populações Teles Pires e Tapajós se tornam uma outra questão a ser investigada.

Uma vez que a UHE Teles Pires entrou em operação recentemente (ano de 2015), não podemos afirmar que a barragem seria o agente que estaria promovendo a diferenciação genética entre as populações Teles Pires e Tapajós. Porém, no local onde essa usina foi implantada havia um conjunto de corredeiras conhecido genericamente como “Sete Quedas” e que, eventualmente, poderia ter exercido algum tipo de influência na definição do padrão de distribuição da diversidade genética detectado com este estudo. De acordo com a Empresa de Pesquisas Energéticas (EPE, 2010a), as principais cachoeiras dessa região seriam a do Purgatório, a Sete Quedas (cuja primeira queda tinha 10 m), a Oscar Miranda e a Vileroy, mas,

em geral, informações mais precisas na literatura sobre esse complexo (*e.g.* altura das cachoeiras, extensão) são escassas, assim como informações quanto à subida de peixes à montante das quedas d'água (comunicação pessoal) se mostraram conflitantes, impedindo-nos de fazer maiores inferências.

Apesar de existirem outras corredeiras ao longo do rio Tapajós (*e.g.* Cachoeira Chacorão, Cachoeira de Mangabalzinho), entre o nosso último ponto de coleta no rio Teles Pires e Itaituba, indivíduos migrantes no rio Apiacás foram coletados, sugerindo que talvez não haja impedimentos ao curimbatá, pelo menos, entre Itaituba e à jusante da agora inundada “Sete Quedas”.

Outro fator a ser observado refere-se aos locais de amostragem. Considerando que o último ponto de coleta dentro do sistema Teles Pires está aproximadamente a 1300 km da área amostrada no rio Tapajós, uma hipótese que precisará ser testada é se a estruturação aqui detectada se deve às distâncias entre eles. O isolamento por distância (ou IBD, de *isolation by distance*), modelo que tem sido usualmente empregado em estudos com os mais diferentes organismos, configura o processo no qual o fluxo gênico entre populações é atenuado em decorrência do distanciamento geográfico, gerando estruturação genética no espaço (WRIGHT, 1943). Sabidamente, espécies do gênero *Prochilodus* são reconhecidas por realizarem longas jornadas durante a cheia dos rios, podendo atingir desde algumas centenas (BAIGUN, 1985; LOUBENS; PANFILI, 1995; SPERANZA et al., 2012) até 1000 quilômetros de distância, conforme dados compilados por Melo e colaboradores (2013). Contudo para que esta hipótese possa ser efetivamente testada no problema aqui abordado, novas coletas entre esses dois pontos amostrais se fazem necessárias.

Considerando o cenário apresentado, provavelmente as populações Teles Pires e Juruena estão fechando seu ciclo reprodutivo localmente, cada uma em seu próprio habitat, sem a necessidade de realizar grandes migrações. Para peixes migradores neotropicais já foi reportado que a presença de apenas um único tributário pode garantir a continuidade da reprodução de peixes (DA SILVA; REYNALTE-TATAJE; ZANIBONI-FILHO, 2012; NUNES et al., 2015; SATO et al., 2005). Além disso, as áreas alagáveis e lagoas marginais presentes nesses tributários (ANDRADE GUTIERREZ/ELETRONORTE/FURNAS, 2009; EPE, 2010b; FUNAI, 2008) fornecem as condições necessárias para o desenvolvimento de ovos e de indivíduos juvenis, servindo como verdadeiros berçários (MELO et al., 2013; ZACARDI et al., 2017). Desta forma, apesar destes rios constituírem dois tributários formadores de um rio

principal, a existência de habitats que permitem fechar o ciclo de vida nestes locais pode explicar a existência de populações tão bem estruturadas nesse sistema hidrográfico.

### II.5.1 Implicações para a conservação

Este estudo se apresenta como um primeiro trabalho acerca da variabilidade e estruturação genética de *P. nigricans* dentro da sub-bacia do rio Tapajós, e contribui para aumentar o conhecimento sobre populações de peixes migradores que fogem ao modelo clássico de população panmítica. Apesar de estruturações genéticas em peixes migradores durante o período não reprodutivo já terem sido outrora reportadas, e pouco se saber sobre os fatores que poderiam promover essas estruturações (SANCHES; GALETTI JR, 2007), os nossos dados sugerem que barreiras físicas devam ser as principais responsáveis pelo padrão de distribuição da diversidade genética encontrado em populações de peixes destes ambientes. Contudo, acreditamos também que a qualidade do habitat, incluindo a disponibilidade de alimento e de áreas para desova e criação de juvenis, podem estar fortemente relacionados com a estruturação dessas populações.

As análises de demografia histórica realizadas para as populações Juruena, Teles Pires e Tapajós aqui amostradas, evidenciam que estas estão estáveis, sem indícios de expansão ou declínio populacional nos últimos 200 mil anos (Figuras II.3 C, D e E). Com a construção de empreendimentos hidrelétricos, no entanto, esse panorama pode ser alterado, uma vez que a fragmentação e alterações de habitat promovidas pela implementação de barragens podem levar à redução e isolamento populacionais, tornando-as mais suscetíveis às variações do ambiente e à perda de diversidade genética (FRANKHAM, 2005). Em virtude da redução do fluxo gênico e do isolamento, populações pequenas tendem a se tornar mais endogâmicas e, sob efeito da deriva genética, apresentar aumento das frequências de alelos deletérios, os quais podem reduzir o *fitness* reprodutivo dos indivíduos, ou mesmo a viabilidade populacional (ALLENDORF; LUIKART; AITKEN, 2013; FRANKHAM, 2008; WRIGHT; TREGENZA; HOSKEN, 2008). Os efeitos da fragmentação em populações têm sido amplamente abordados na literatura (GOUSKOV et al., 2016; HANSEN et al., 2014; NERAAS; SPRUELL, 2001; PAVLOVA et al., 2017), e tornam-se motivo de grandes preocupações quando constatamos a imensa quantidade de empreendimentos projetados para a bacia Amazônica, e em especial para a sub-bacia do rio Tapajós (LATRUBESSE et al., 2017; LEES et al., 2016). Segundo o levantamento realizado por Fearnside (2015) já estão prontas, em fase de construção ou planejadas cerca de

sete usinas para Tapajós (incluindo o tributário de Jamanxim), sendo seis para a bacia do rio Teles Pires e 32 para a bacia do rio Juruena.

Frente a esse cenário, o caráter diagnóstico de nosso estudo representa uma valiosa contribuição, visto que conseguimos avaliar o status de populações durante uma estação não reprodutiva, antes mesmo que os reconhecidos impactos exercidos pelas UHEs em populações naturais fossem percebidos. Estudos que futuramente tenham por finalidade avaliar os efeitos dessas construções sobre a diversidade genética das populações de *P. nigricans*, provavelmente poderão usar o nosso trabalho como referência, e estimar possíveis impactos de modo mais preciso, permitindo que medidas de manejo mais adequadas sejam implementadas.

Vale salientar ainda que, apesar da solidez dos nossos dados, o desenho experimental deste trabalho restringiu-se apenas a um único período não reprodutivo e, dessa forma, a possibilidade de haver distintas populações coexistindo dentro de cada um desses três sistemas hidrográficos não pode ser negligenciada. Ribolli e colaboradores (2018) detectaram sinal temporal de estruturação genética em *Salminus brasiliensis*, em indivíduos coletados consecutivamente na mesma área amostral durante dois períodos não reprodutivos. Esses pesquisadores atribuíram seus achados ao fenômeno conhecido como *shoaling*, comportamento gregário não associado à reprodução, mas relacionado a interações entre os indivíduos como um mecanismo de defesa e forrageamento (HERBERT-READ et al., 2011, 2017; PITCHER, 1986), e com aparente base genética (HUIZINGA; GHALAMBOR; REZNICK, 2009). Além disso, diferenças temporais durante o período reprodutivo, embora amplamente reportadas em salmonídeos e plantas com flores (HENDRY; DAY, 2005), têm sido recentemente documentadas em espécies de peixes neotropicais (BRAGA-SILVA; GALETTI, 2016; RIBOLLI et al., 2017; RUEDA et al., 2013). O isolamento por tempo, ou IBT (*isolation by time*), consiste em um fenômeno ocasionado pela diferença temporal entre os períodos reprodutivos de grupos de indivíduos de uma dada espécie, podendo acarretar em restrição do fluxo gênico e consequente estruturação populacional (HENDRY; DAY, 2005). Diante do exposto, sugerimos que coletas adicionais, considerando amostragens intercaladas entre períodos não reprodutivo e reprodutivo, conduzidas, além da calha principal, em afluentes dos principais tributários do rio Tapajós, sejam realizadas em estudos futuros a fim de testar se cada um desses sistemas abriga mais de uma população de *P. nigricans*.

Por fim, a coleta de indivíduos realizando migração no rio Apiacás evidencia que peixes da população Tapajós fazem uso desse tributário para fechar seu ciclo de vida e, dessa

forma, ressalta a importância dessa drenagem para manutenção da população. Se eventualmente a região de “Sete Quedas” não tiver representado uma barreira efetiva à migração ascendente dos curimatás, o barramento de Teles Pires exercerá esse papel e o rio Apicás poderá se constituir em uma rota alternativa. No entanto, este rio que já conta com a PCH Salto do Apicás (localizada a aproximadamente 160 km a montante do nosso ponto de coleta) também abrigará a UHE de Foz do Apicás, a qual terá um reservatório de 89,6 km<sup>2</sup> e capacidade de 230 MW (FEARNSIDE, 2014), impondo maiores limitações às rotas migratórias não apenas dessa, como possivelmente de outras espécies de peixes que realizam piracema.

## II.6 Considerações finais

Os resultados do nosso estudo sugerem que a estruturação detectada nas populações de *P. nigricans* se deve a fatores históricos, uma vez que esse padrão foi também obtido a partir dos marcadores mitocondriais. Nós postulamos que a estrutura encontrada se deva à existência de barreiras físicas, se fazendo necessário que a hipótese de isolamento por distância, entre as populações Teles Pires e Tapajós, seja testada em estudos futuros. Salientamos ainda a importância da realização de mais coletas, cuja execução deve considerar os períodos reprodutivo e não reprodutivo e de modo consecutivo, a fim de verificar ou não a ocorrência de outras populações geneticamente distintas dentro de cada um desses três sistemas.

Por fim, reforçamos que, em meio as grandes pressões impostas aos ambientes dulcícolas (CASTELLO et al., 2013; CRAIG et al., 2017; VÖRÖSMARTY et al., 2010), onde constantemente observa-se a conservação ambiental sucumbir aos interesses econômicos e às demandas da sociedade, a realização de estudos genéticos que busquem avaliar/diagnosticar o status das populações de diferentes grupos taxonômicos, antes que os efeitos das ações antrópicas sejam percebidos, não pode ser dispensada. O emprego de marcadores de divergência recente e antiga, nesse contexto, constituem abordagens que podem se complementar e, portanto, melhor direcionar a tomada de decisões no que tange o manejo das espécies que serão impactadas.



## Referências

- ALBRECHT, M. P.; CARAMASCHI, É. P.; HORN, M. H. Population responses of two omnivorous fish species to impoundment of a Brazilian tropical river. **Hydrobiologia**, v. 627, n. 1, p. 181–193, 2009.
- ALJANABI, S. M.; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic acids research**, v. 25, n. 22, p. 4692–4693, 1997.
- ALLENDORF, F.; LUIKART, G.; AITKEN, S. **Conservation and the genetics of populations, 2nd edition**. [s.l.] John Wiley & Sons, 2013.
- ANDRADE GUTIERREZ/ELETRONORTE/FURNAS. **RIMA: Relatório de Impacto Ambiental do Aproveitamento Hidrelétrico Colíder**, 2009. Disponível em: <[http://www.copel.com/uhecolider/sitearquivos2.nsf/arquivos/rima/\\$FILE/RIMA.pdf](http://www.copel.com/uhecolider/sitearquivos2.nsf/arquivos/rima/$FILE/RIMA.pdf)>
- BAIGUN, C. Marcaciones de peces en el embalse de Salto Grande, Río Uruguay (Argentina Uruguay). **Revista de Ciencias Naturales del Litoral**, v. 16, n. 1, p. 85–93, 1985.
- BARROCA, T. M. et al. Genetic diversity and population structure of *Prochilodus costatus* and *Prochilodus argenteus* preceding dam construction in the Paraopeba River, São Francisco River Basin, Minas Gerais, Brazil. **Open Journal of Genetics**, v. 02, n. 02, p. 121–130, 2012.
- BARTHEM, R. B.; DE BRITO RIBEIRO, M. C. L.; PETRERE, M. Life strategies of some long-distance migratory catfish in relation to hydroelectric dams in the Amazon Basin. **Biological Conservation**, v. 55, n. 3, p. 339–345, 1991.
- BERDUGO, G. O.; BARANDICA, J. C. N. Genetic diversity and population structure of bocachico *Prochilodus magdalenae* (Pisces, Prochilodontidae) in the Magdalena river basin and its tributaries, Colombia. **Genetics and Molecular Biology**, v. 37, n. 1, p. 37–45, 2014.
- BOUCKAERT, R. et al. BEAST 2: A Software Platform for Bayesian Evolutionary Analysis. **PLoS Computational Biology**, v. 10, n. 4, p. 1–6, 2014.
- BRAGA-SILVA, A.; GALETTI, P. M. Evidence of isolation by time in freshwater migratory fish *Prochilodus costatus* (Characiformes, Prochilodontidae). **Hydrobiologia**, v. 765, n. 1, p.

159–167, 2016.

BRITSKI, H. A.; GARAVELLO, J. C. P. Uma nova espécie de *Leporinus* Agassiz, 1829, da bacia Amazônica (Ostariophysi: Characiformes: Anostomidae). **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS Série Zoologia**, v. 18, p. 75–83, 2005.

CARVALHO-COSTA, L. F.; HATANAKA, T.; GALETTI, P. M. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite markers in the migratory freshwater fish *Prochilodus costatus*. **Molecular Ecology Notes**, v. 6, n. 3, p. 818–819, 2006.

CASTELLO, L. et al. The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. **Conservation Letters**, v. 6, n. 4, p. 217–229, 1 jul. 2013.

CHAKRABORTY, R. et al. Apparent Heterozygote Deficiencies Observed in DNA Typing and Their Implications in Forensic Applications. **Annals of Human Genetics**, v. 56, p. 455–457, 1992.

CHAPUIS, M. P.; ESTOUP, A. Microsatellite null alleles and estimation of population differentiation. **Molecular Biology and Evolution**, v. 24, n. 3, p. 621–631, 2007.

COLEMAN, R. A. et al. Artificial barriers prevent genetic recovery of small isolated populations of a low-mobility freshwater fish. **Heredity**, p. 1, 12 jan. 2018.

CORANDER, J. et al. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 539, 2008.

CRAIG, L. S. et al. Meeting the challenge of interacting threats in freshwater ecosystems: A call to scientists and managers. **Elem Sci Anth**, v. 5, n. 0, p. 72, 2017.

DA SILVA, P. A.; REYNALTE-TATAJE, D. A.; ZANIBONI-FILHO, E. Identification of fish nursery areas in a free tributary of an impoundment region, upper Uruguay River, Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 10, n. 2, p. 425–438, 2012.

DAGOSTA, F. C. P.; DE PINNA, M. C. C. Biogeography of Amazonian fishes: deconstructing river basins as biogeographical units. **Neotropical Ichthyology (accepted)**, v. 15, n. September, p. 1–24, 2017.

DO PRADO, F. D. et al. Genetic structure and evidence of anthropogenic effects on wild

populations of two Neotropical catfishes: baselines for conservation. **Journal of Fish Biology**, v. 92, n. 1, p. 55–72, 1 jan. 2018.

DRUMMON, A. J.; BOUCKAERT, R. R. **Bayesian Evolutionary Analysis with BEAST**. Cambridge: Cambridge University Press, 2015.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian coalescent inference of past population dynamics from molecular sequences. **Molecular Biology and Evolution**, v. 22, n. 5, p. 1185–1192, 2005.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular Biology and Evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969–1973, 2012.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359–361, 2012.

EPE. **RIMA: Relatório de impacto ambiental UHE Teles Pires**, 2010a. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-247/Rima - UHE Teles Pires.pdf>>

EPE. **RIMA: Relatório de Impacto Ambiental da Usina Hidrelétrica de Sinop**, 2010b. Disponível em: <<http://www.epe.gov.br/sites-pt/publicacoes-dados-abertos/publicacoes/PublicacoesArquivos/publicacao-247/Rima - UHE Sinop.pdf>>

ESGUÍCERO, A. L. H.; ARCIFA, M. S. Fragmentation of a Neotropical migratory fish population by a century-old dam. **Hydrobiologia**, v. 638, p. 41–53, 2010.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611–2620, 2005.

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

FALUSH, D.; STEPHENS, M.; PRITCHARD, J. K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. **Genetics**, v. 164, n. 4, p. 1567–1587, 2003.

- FEARNSIDE, P. M. **Análisis de los Principales Proyectos HidroEnergéticos en la Región Amazónica**, 2014.
- FEARNSIDE, P. M. Amazon dams and waterways: Brazil's Tapajós Basin plans. **Ambio**, v. 44, n. 5, p. 426–439, 2015.
- FRANKHAM, R. Genetics and extinction. **Biological Conservation**, v. 126, n. 2, p. 131–140, 2005.
- FRANKHAM, R. Inbreeding and Extinction: Island Populations. **Conservation Biology**, v. 12, n. 3, p. 665–675, 2008.
- FUNAI. **PARECER TÉCNICO 020/2008 – CMAM/CGPIMA/DAS/FUNAI. Análise da Avaliação Ambiental Integrada da Bacia do Alto Juruena** Brasília, 2008.
- GERLACH, G. et al. Calculations of population differentiation based on GST and D: Forget GST but not all of statistics. **Molecular Ecology**, v. 19, n. 18, p. 3845–3852, 2010.
- GOUDET, J. FSTAT (Version 1.2): A Computer Program to Calculate F-Statistics. **Journal of Heredity**, v. 86, p. 485–486, 1995.
- GOUSKOV, A. et al. Fish population genetic structure shaped by hydroelectric power plants in the upper Rhine catchment. **Evolutionary Applications**, v. 9, n. 2, p. 394–408, 2016.
- GUILLOT, G.; MORTIER, F.; ESTOUP, A. GENELAND: A computer package for landscape genetics. **Molecular Ecology Notes**, v. 5, n. 3, p. 712–715, 2005.
- HANSEN, M. M. et al. The effects of medieval dams on genetic divergence and demographic history in brown trout populations. **BMC Evolutionary Biology**, v. 14, n. 1, p. 1–14, 2014.
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, n. 1–2, p. 153–159, 2006.
- HENDRY, A. P.; DAY, T. Population structure attributable to reproductive time: Isolation by time and adaptation by time. **Molecular Ecology**, v. 14, n. 4, p. 901–916, 2005.
- HERBERT-READ, J. E. et al. Inferring the rules of interaction of shoaling fish. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 108, n. 46, p. 18726–18731, 2011.

HERBERT-READ, J. E. et al. How predation shapes the social interaction rules of shoaling fish. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 284, n. 1861, p. 20171126, 2017.

HORN, M. H. et al. Seed dispersal by fishes in tropical and temperate fresh waters: The growing evidence. **Acta Oecologica**, v. 37, n. 6, p. 561–577, 2011.

HUIZINGA, M.; GHALAMBOR, C. K.; REZNICK, D. N. The genetic and environmental basis of adaptive differences in shoaling behaviour among populations of Trinidadian guppies, *Poecilia reticulata*. **Journal of Evolutionary Biology**, v. 22, n. 9, p. 1860–1866, 2009.

ICMBIO. **Plano de Manejo do Parque Nacional do Juruena. Encarte 2**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/imgs-unidades-coservacao/Encarte2.pdf>>. Acesso em: 18 jan. 2018.

ICMBIO. **Lista de Espécies Ameaçadas**. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/portal/especies-ameacadas-destaque>>. Acesso em: 20 maio. 2018.

JOMBART, T.; DEVILLARD, S.; BALLOUX, F. Discriminant analysis of principal components: A new method for the analysis of genetically structured populations. **BMC Genetics**, v. 11, n. 1, p. 94, 2010.

JOST, L. GST and its relatives do not measure differentiation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 18, p. 4015–4026, 2008.

KEARSE, M. et al. Geneious Basic: An integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics**, v. 28, n. 12, p. 1647–1649, 2012.

LATRUBESSE, E. M. et al. Damming the rivers of the Amazon basin. **Nature**, v. 546, n. 7658, p. 363–369, 2017.

LEES, A. C. et al. Hydropower and the future of Amazonian biodiversity. **Biodiversity and Conservation**, v. 25, n. 3, p. 451–466, 9 mar. 2016.

LEIGH, J. W.; BRYANT, D. POPART: Full-feature software for haplotype network construction. **Methods in Ecology and Evolution**, v. 6, n. 9, p. 1110–1116, 2015.

- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, n. 11, p. 1451–1452, 2009.
- LIS, J. T.; SCHLEIF, R. Size fractionation of double-stranded DNA by precipitation with polyethylene glycol. **Nucleic Acids Research**, v. 2, n. 3, p. 383–390, 1975.
- LOUBENS, G.; PANFILI, J. Biologie de *Prochilodus nigricans* (Teleostei : Prochilodontidae) dans le bassin du Mamoré (Amazonie bolivienne). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 6, n. 4, p. 17–32, 1995.
- MACHADO, V. N. et al. Population genetic structure of the Amazonian black flannelmouth characin (Characiformes, Prochilodontidae: *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829): contemporary and historical gene flow of a migratory and abundant fishery species. **Environmental Biology of Fishes**, v. 100, n. 1, p. 1–16, 2017.
- MARMULLA, G. **Dams, fish and fisheries. Opportunities, challenges and conflict resolution**. FAO Fisher ed. Roma: FAO, 2001.
- MARSHALL, T. C. et al. Statistical confidence for likelihood-based paternity. **Mol. Ecol**, n. 1998, p. 639–655, 1997.
- MELO, B. F. et al. The roles of marginal lagoons in the maintenance of genetic diversity in the Brazilian migratory fishes *Prochilodus argenteus* and *Prochilodus costatus*. **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 3, p. 625–636, 2013.
- MILLER, M. A.; PFEIFFER, W.; SCHWARTZ, T. Creating the CIPRES Science Gateway for inference of large phylogenetic trees. **2010 Gateway Computing Environments Workshop, GCE 2010**, 2010.
- NERAAS, L. P.; SPRUELL, P. Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 5, p. 1153–1164, 1 maio 2001.
- NUNES, D. M. F. et al. Influence of a large dam and importance of an undammed tributary on the reproductive ecology of the threatened fish matrinxã *Brycon orthotaenia* Günther, 1864 (Characiformes: Bryconidae) in southeastern Brazil. **Neotropical Ichthyology**, v. 13, n. 2, p. 317–324, 2015.

- OHARA, W. M.; LOEB, M. V. Ichthyofauna of the upper Juruena river on Chapada dos Parecis, Mato Grosso, Brazil. **Biota Neotropica**, v. 16, n. 4, p. 1–10, 2016.
- PAVLOVA, A. et al. Severe consequences of habitat fragmentation on genetic diversity of an endangered Australian freshwater fish: A call for assisted gene flow. **Evolutionary Applications**, v. 10, n. 6, p. 531–550, 2017.
- PEAKALL, R.; SMOUSE, P. E. GenALEx 6.5: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update. **Bioinformatics**, v. 28, n. 19, p. 2537–2539, 2012.
- PEREIRA, L. H. G.; FORESTI F; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 215–225, 2009.
- PETINI-BENELLI, A. Orchidaceae da região do Rio Juruena, Mato Grosso, Brasil. **Orquidário**, v. 28, n. 1, p. 23–31, 2014.
- PETIT, R. J.; MOUSADIK, A. E. L.; PONS, O. Identifying Populations for Conservation on the Basis of Genetic Markers. v. 12, n. 4, p. 844–855, 1998.
- PIORSKI, N. M. et al. Contribution of conservation genetics in assessing neotropical freshwater fish biodiversity. **Brazilian Journal of Biology**, v. 68, n. 4, S, p. 1039–1050, 2008.
- PIRES, A. A. et al. Molecular analysis reveals hidden diversity in *Zungaro* (Siluriformes: Pimelodidae): a genus of giant South American catfish. **Genetica**, v. 145, n. 3, p. 335–340, 2017.
- PITCHER, T. J. Functions of shoaling behaviour in teleosts. In: **The Behaviour of Teleost Fishes**. [s.l: s.n.]. p. 553.
- POSADA, D. jModelTest: Phylogenetic model averaging. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253–1256, 2008.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, v. 155, n. 2, p. 945–959, 2000.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical** Vienna, Austria R Foundation for Statistical Computing, , 2018. Disponível em: <<https://www.r-project.org>>

- RAMBAUT, A.; DRUMMOND, A. **Tracer v1.5**, 2007. Disponível em: <<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/tracer/>>. Acesso em: 20 jul. 2017
- REIS, R. E. et al. Fish biodiversity and conservation in South America. **Journal of Fish Biology**, v. 89, n. 1, p. 12–47, 2016.
- RIBOLLI, J. **Caracterização genética populacional do dourado, *Salminus brasiliensis* (Pisces, Characidae, Salmininae) na Bacia do alto e médio rio Uruguai**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2014.
- RIBOLLI, J. et al. Isolation-by-time population structure in potamodromous Dourado *Salminus brasiliensis* in southern Brazil. **Conservation Genetics**, v. 18, n. 1, p. 67–76, 2017.
- RIBOLLI, J. et al. Genetic evidences of non-reproductive shoaling in the freshwater fish *Salminus brasiliensis*. **Hydrobiologia**, 2018.
- RICE, W. R. Analyzing Tables of Statistical Tests. **Evolution**, v. 43, n. 1, p. 223–225, 1989.
- ROSSINI, B. C. **Caracterização da estrutura genética de populações residentes e migradoras da espécie *Salminus brasiliensis* da Bacia do rio Mogi-Guaçu**. [s.l.] Universidade Federal de São Carlos, 2010.
- ROUSSET, F. GENEPOP'007: A complete re-implementation of the GENEPOP software for Windows and Linux. **Molecular Ecology Resources**, v. 8, n. 1, p. 103–106, 2008.
- RUEDA, E. C. et al. Isolation and characterization of polymorphic microsatellite loci in the migratory freshwater fish *Prochilodus lineatus* (Characiformes: Prochilodontidae). **Conservation Genetics Resources**, v. 3, n. 4, p. 681–684, 2011.
- RUEDA, E. C. et al. Seasonal variation in genetic population structure of sábalo (*Prochilodus lineatus*) in the Lower Uruguay River. **Genetica**, v. 141, n. 7–9, p. 401–407, 2013.
- SANCHES, A.; GALETTI JR, P. M. Genetic evidence of population structuring in the neotropical freshwater fish *Brycon hilarii* (Valenciennes, 1850). **Brazilian journal of biology = Revista brasleira de biologia**, v. 67, n. 4 Suppl, p. 889–895, 2007.
- SANCHES, A. et al. Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the Sao Francisco River in Brazil and its



significance for conservation. **Latin American Journal of Aquatic Research**, v. 40, n. 1, p. 177–186, 2012.

SATO, Y. et al. Influence of the Abaeté River on the reproductive success of the neotropical migratory teleost *Prochilodus argenteus* in the São Francisco River, downstream from the Três Marias Dam, southeastern Brazil. **River Research and Applications**, v. 21, n. 8, p. 939–950, 2005.

SCHUELKE, M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments A poor man's approach to genotyping for research and high-throughput diagnostics. **PRISM**, v. 18, p. 1–2, 2000.

SINGH, S. K. **Conservation genetics of the Bengal tiger (*Panthera tigris tigris*) in India**. [s.l.] University of Oulu, Faculty of Science, 2017.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 407–417, 2001.

SPERANZA, E. D. et al. Migratory behaviour of a dominant detritivorous fish *Prochilodus lineatus* evaluated by multivariate biochemical. **Journal of Fish Biology**, v. 81, p. 848–865, 2012.

TORRENTE-VILARA, G. et al. Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). **Ecology of Freshwater Fish**, v. 20, n. 4, p. 588–597, 2011.

TUNDISI, J. G. et al. How many more dams in the Amazon? **Energy Policy**, v. 74, p. 703–708, 1 nov. 2014.

VAN OOSTERHOUT, C. et al. MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 3, p. 535–538, 2004.

VERGARA, M. et al. Inferring population genetic structure in widely and continuously distributed carnivores: The stone marten (*Martes foina*) as a case study. **PLoS ONE**, v. 10, n. 7, p. 1–20, 2015.

VÖRÖSMARTY, C. J. et al. Global threats to human water security and river biodiversity.

**Nature**, v. 467, n. 7315, p. 555–561, 2010.

WRIGHT, L. I.; TREGENZA, T.; HOSKEN, D. J. Inbreeding, inbreeding depression and extinction. **Conservation Genetics**, v. 9, n. 4, p. 833–843, 21 ago. 2008.

WRIGHT, S. Isolation by Distance. **Genetics**, v. 28, n. 2, p. 114–138, 1943.

YAMANAKA, H.; MINAMOTO, T. The use of environmental DNA of fishes as an efficient method of determining habitat connectivity. **Ecological Indicators**, v. 62, p. 147–153, 2016.

ZACARDI, D. M. et al. Distribution of economically important fish larvae (Characiformes, Prochilodontidae) in the Central Amazonia, Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, p. 1–9, 2017.

ZARFL, C. et al. A global boom in hydropower dam construction. **Aquatic Sciences**, v. 77, n. 1, p. 161–170, 25 jan. 2015.

## Anexo

Tabela A. Sequências dos *primers* de marcadores do DNA mitocondrial utilizados no presente estudo e suas respectivas temperaturas de anelamento.

Região	Nome	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	T (°C)	Referência
ATP6/8	L8331	F: AAAGCRTYRGCCTTTTAAGC	58	Sivasundar et al., 2001
	H9236	R: GTTAGTGGTCAKGGGCTTGRTC		
d-loop	F-TTF	F: GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA	59	
	F-12R	R: GTCAGGACCATGCCTTTGTG		

Tabela B. Painel de loci microssatélites polimórficos para espécies de *Prochilodus* utilizados no presente trabalho. N= número de alelos.

Loco	Sequência do <i>primer</i> (5'-3')	Motif	Tamanho	N*	Referências
PL3	F: TCTGAGCTGTGA GGAATGGA R: AGAGCGCTCAAGCACAA GAT	(CA) <sub>n</sub>	185 – 203	06	Rueda et al., 2011
PL14	F: TGCCCAACA CTGAAACTGAG R: CTCATCAACCTGCCTGGAAT	(CA) <sub>n</sub>	104 – 134	11	
PL25	F: GAAGCTTGGGCTCTTGACAT R: CGTTTGCCTCTA GCCTTTTG	(CA) <sub>n</sub>	104 – 132	5	
PL64	F: AGAGCAACACA GGGAGGA GT R: ACGCTCTGCTCA GCCATACT	(CA) <sub>n</sub>	158 – 180	13	
PL119	F: GAAAAAGGCTA GGGGACTGG R: GAGGAAAAT TGCCTT TTGTAGG	(CA) <sub>n</sub>	161 – 207	12	
PL190	F: GCTTGGGAGCCTATTCATCC R: GGGTTTCTGCACCATA CAGG	(CA) <sub>n</sub>	197 – 227	22	
PCOS03	F: CTGGA GTA GCATGA GGA G R: GTTAAACAGCATAGTGATGG	(CTGT) <sub>5</sub>	212 – 228	06	Carvalho-Costa et al., 2006
PCOS14	F: CGTGAATGTGCTTTATATGC R: AATGCCATTTCTGATTAAGG	(TC) <sub>49</sub>	204 – 262	21	
PCOS18	F: TCTCTTCTCACACACCTTCC R: TGATTACCAGCAACA GTTTG	(GT) <sub>20</sub>	208 – 250	10	

\*Valores encontrados para *Prochilodus lineatus* (RUEDA et al., 2011) e *Prochilodus costatus* (CARVALHO-COSTA; HATANAKA; GALETTI, 2006).

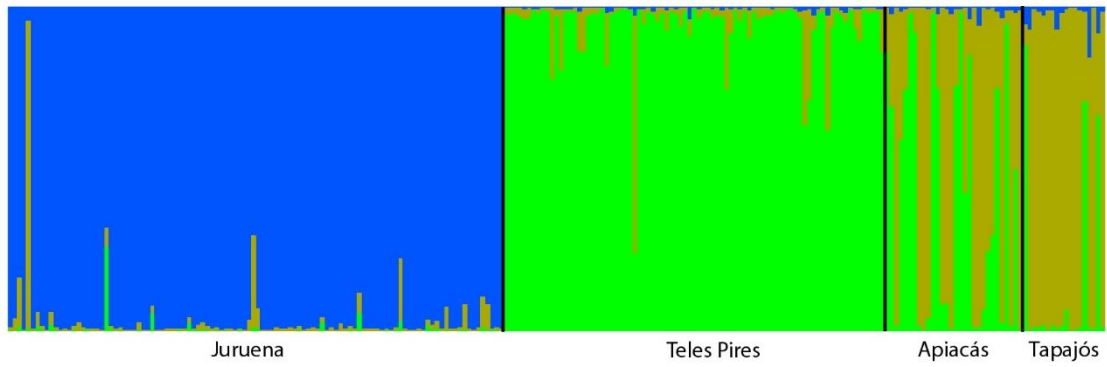
Tabela C. Frequência estimada dos alelos nulos através do *software* FreeNA.

Loci	Populações		
	Juruena	Teles Pires	Tapajós
PCOS14	0.06275	0.03074	0.00001
PCOS18	0.07132	0.05180	0.00001
PCOS3	0.00001	0.01686	0.00001
PL119	0.03991	0.00265	0.00000
PL14	0.00000	0.04404	0.00910
PL190	0.00000	0.03523	0.10174
PL64	0.00002	0.00808	0.00000
PL3	0.23155	0.03784	0.07762

Legenda

	0,05 < x < 0,10
	0,10 < x < 0,20
	0,20 < x

Figura A. Gráfico da probabilidade de atribuição de indivíduos de *Prochilodus nigricans*, considerando indivíduos coletados no rio Apicás. As linhas verticais representam a probabilidade de os indivíduos pertencerem aos grupos inferidos, sendo estes indicados pelas diferentes cores.



#### 4. CONCLUSÕES

- ✓ As análises de distância genética e delimitação de espécies baseada em um único gene foram eficientes para caracterizar a existência de MOTUs em *P. nigricans* e detectar uma nova linhagem no escudo brasileiro, revelando uma diversidade antes desconhecida pela ciência. Nossos achados, aliados àqueles previamente reportados para espécie, fazem de *P. nigricans* um modelo interessante a ser empregado em estudos que visem testar hipóteses filogeográficas para explicar processos de diversificação dentro da bacia Amazônica.
- ✓ Os locos de microssatélites empregados no presente estudo foram eficazes na amplificação e na detecção da variabilidade genética em uma linhagem de *P. nigricans* na sub-bacia do rio Tapajós.
- ✓ Os nossos dados indicam a presença de pelo menos três populações de *P. nigricans* geneticamente distintas dentro da sub-bacia do rio Tapajós, as quais encontram-se estruturadas possivelmente devido à influência de barreiras físicas. Amostragens realizadas entre as regiões de Colíder e Itaiatuba, no entanto, precisam ser consideradas em futuros estudos a fim de avaliar se essa diferenciação se deve a isolamento por distância.
- ✓ A população Juruena foi a que apresentou a maior diferenciação genética em comparação com as populações Teles Pires e Tapajós.
- ✓ As populações Juruena, Teles Pires e Tapajós apresentaram níveis de diversidade genética elevados ou similares aos de outras espécies de *Prochilodus* e não apresentaram sinais históricos de declínio ou expansão populacional.
- ✓ A avaliação diagnóstica prévia do status genético das populações de *P. nigricans* dentro da sub-bacia do rio Tapajós é um resultado extremamente valioso de nossa pesquisa, visto que tornará possível a futuros estudos estimar os efeitos dos barramentos (construídos ou em vias de construção) sobre o padrão de distribuição da diversidade genética desse importante recurso ecológico, econômico e social.
- ✓ Os dados levantados no presente estudo nos permitem apontar para necessidade de pesquisas que investiguem aspectos relacionados a mecanismos reprodutivos eventualmente responsáveis pela diferenciação genética de populações de *P. nigricans* nesta região. Assim, recomendamos que estudos futuros, considerando também o período reprodutivo, sejam realizados nos sistemas hidrográficos de ocorrência da espécie.