



DIVERSIDADE  
BIOLÓGICA  
PPG-UFAM



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DIVERSIDADE BIOLÓGICA

**FILOGEOGRAFIA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *INIA GEOFFRENSIS*  
(CETARTIODACTYLA: INIIDAE) NOS RIOS NEGRO E BRANCO E EVIDÊNCIA DE LINHAGEM  
EVOLUTIVA INDEPENDENTE NA BACIA DO ORINOCO**

JOICIANE GONÇALVES FARIAS

MANAUS-AM  
MAIO/2015

JOICIANE GONÇALVES FARIAS

**FILOGEOGRAFIA E GENÉTICA DE POPULAÇÕES DE *INIA GEOFFRENSIS*  
(CETARTIODACTYLA: INIIDAE) NOS RIOS NEGRO E BRANCO E EVIDÊNCIA DE LINHAGEM  
EVOLUTIVA INDEPENDENTE NA BACIA DO ORINOCO**

Orientadora: Profa. Dra. Izeni Pires Farias

Co-orientadora: Ph.D. Susana Josefina Caballero

Co-orientador: Prof. Dr. Tomas Hrbek

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre em Diversidade Biológica.

**Fonte financiadora:**

CNPq Universal/482253/2012-6

**Apoio:**

Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL

Laboratorio de Ecología Molecular de Vertebrados Acuáticos – LEMVA

MANAUS-AM  
MAIO/2015

## FICHA CATALOGRÁFICA

F224f Farias, Joiciane Gonçalves  
Filogeografia e genética de populações de *Inia geoffrensis* (Cetartiodactyla: Iniidae) nos rios Negro e Branco e evidência de linhagem evolutiva independente na bacia do Orinoco / Joiciane Gonçalves Farias. 2015  
123 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Izeni Pires Farias  
Coorientadora: Susana Josefina Caballero  
Coorientador: Tomas Hrbek  
Dissertação (Mestrado em Diversidade Biológica) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Boto-vermelho. 2. Taxonomia. 3. Filogeografia. 4. Hidrelétricas.  
I. Farias, Izeni Pires II. Universidade Federal do Amazonas III.  
Título

### SINOPSE

Foram utilizados duas classes de marcadores moleculares (nuclear e mitocondrial) para análise das relações filogenéticas e populacionais entre *Inia geoffrensis* e *Inia geoffrensis humboldtiana*. Uma diferenciação genética histórica foi observada em uma linhagem dentro de *Inia geoffrensis humboldtiana*, com isso propôs-se elevar seu nível taxonômico ao de espécie. Populações geneticamente diferenciadas de *Inia geoffrensis geoffrensis* foram observadas para as demais áreas analisadas (rios Negro e Branco).

**Palavras-chave:** boto-vermelho, taxonomia, filogeografia, hidrelétricas.

♪♪♪ "Many rivers to cross  
But I can't seem to find my way over  
Wandering I am lost as I travel along  
The white cliffs of Dover  
Many rivers to cross and it's only my will  
That keeps me alive  
I've been licked, washed up for years and  
I merely survive because of my pride  
..." ♪♪♪

(Many rivers to cross, Jimmy Cliff)

À Bióloga e amiga, que nessa nossa bela profissão me ensinou a  
sonhar:

GREICE APARECIDA DO NASCIMENTO  
*in memoriam*

## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Izeni Pires Farias, por gentilmente aceitar orientar esta pessoa que não fazia a menor ideia do que faria no mestrado! Por me colocar no caminho e deixar que eu o seguisse... Pelo auxílio financeiro e pela muita paciência! Obrigada pela oportunidade! Obrigada por me ensinar tanto! Serei eternamente grata!

À minha co-orientadora Susana Josefina Caballero Gaitan; por não medir esforços em apoiar este trabalho e especialmente por ter se vinculado a ele no momento em que eu mais precisei! Também por contribuir com as amostras da bacia do Orinoco (junto com Fernando Trujillo), sem as quais este trabalho não teria tamanha magnitude! Obrigada por ser mui amable!

Ao meu co-orientador Tomas Hrbek, por orientar em todos os momentos que meu trabalho precisou... Por me incentivar (e às vezes até pressionar!) a seguir em frente com este trabalho e com minha carreira. Obrigada por pacientemente me ouvir e por pacientemente me instruir! Serei eternamente grata!

Ao Programa de Pós-Graduação em Diversidade Biológica. Aos professores deste programa que contribuíram para minha formação, em especial a Maria Gracimar, pelos sábios conselhos e pelo excelente caráter; Carlos Schneider e Cláudia Gross, por cederem o uso da “salinha de estudos”!

À CAPES, pela bolsa de estudo. Ao CNPq pelo financiamento do projeto “Biogeografia em escala fina do boto rosa: os limites genéticos e geográficos entre *Inia geoffrensis geoffrensis* e *Inia geoffrensis humboldtiana*”, coordenado por minha orientadora, cujos recursos financeiros suportaram esta pesquisa.

Ao COMAR, à Brigada Ararigóia, ao 5º BIS (sede em São Gabriel da Cachoeira e base em Cucuí), à FOIRN e às comunidades indígenas São José de Marabitaná e Macedônia, ambas no alto Rio Negro, por viabilizarem a logística necessária para realizar as capturas dos botos naquela região tão remota. Ao Babazinho, por apoiar esta pesquisa durante as capturas de botos no rio Branco, em Boa Vista.

Aos pescadores, Ediney Lemos Lopes (Ney), Waldenilson Aparício Costa (Choca), Jaizinho de Oliveira Preste (Jai), Américo Rodrigues da Silva, Jorge Batalha Tenasol, que toparam todas as jornadas a campo com esta pessoa inexperiente; por gentilmente transmitirem seus ricos conhecimentos sobre as atividades de campo; e por tornar nossos dias de trabalho agradáveis com as valiosas histórias de pescador.

Às amigas que me ajudaram em campo: Valéria Machado, Nathali Ristau, Aline Ximenes e Priscila Azarak. Muito obrigada! Ao Pedro Senna por ter auxiliado no campo no alto rio Negro (obrigada por permanecer os 26 dias de campo!). À mãe da Priscila, dona Eliana, por nos disponibilizar um lar em Boa Vista, sempre que precisamos estar por lá.

Aos colegas do LEGAL! Em especial: Aline e Valéria, por terem me dado um lar pelo tempo que precisei, e junto com Priscila e Ana Paula, pelo companheirismo e amizade. Jose e ao Mario, porque sempre que precisei não mediram esforços em me auxiliar; Adriano e Fabinho, por me ensinarem a fazer extração de DNA; Fabrício, por me ensinar a técnica da PCR; Sandra, Roberta Canton, Gabi, Guta, Júlia, Juliana, Israela, Jéssica, Luciana, Fabinho, Zamora, Elciomar e Vinícius, pelos momentos agradáveis no trabalho. Zamora, Elciomar, Priscila, Aline: obrigada por estarem trabalhando comigo em muitas madrugadas no laboratório; obrigada por, junto com Ana Paula Melo, Valéria, Jose e Fabrício, terem me auxiliado a manejar as redes de captura!

À Waleska, por me passar os clássicos artigos sobre *Inia* e temas diversos em genética, por se disponibilizar a auxiliar em todos os momentos.

À Juliana, Guta, Fabinho, Valéria, Jéssica e Priscila por ler as introduções dos capítulos e contribuir com excelentes sugestões, e pelos momentos de estudo.

À Lu Colley por ler e contribuir com os textos de toda esta dissertação, e por me acalmar. À sua (que também é minha) família (Talita, Lucy, Hildes e Sara), por me darem um lar em Cuiabá e por estarem orando por mim!

Aos amigos presentes (Ana Arnt, Lu Colley, Jamile, Alininha, Quézia [best], Michele, Camila, Gê, Bruna Winck, Priscila, Danilo [curico], Luiz Cláudio, André e Ju) e àquel@s que desistiram de mim (...)! Cada um de vocês contribuiu para que eu seguisse em frente!

Aos grandes mestres, que são o alicerce da minha formação acadêmica: Ana Arnt (orientadora e amiga), Diogo Costa (por me ensinar que a construção de um trabalho científico depende de esforço e não de “inteligência”), e Eduardo Bessa (exemplo de dedicação, esforço e organização profissional).

Aos meus ex alunos da UNEMAT, com os quais eu mais aprendi do que ensinei!

Aos meus pais (José Farias e Lourdes Gonçalves), por sempre me apoiarem nas escolhas que faço, especialmente quando se referem aos meus estudos. Por pacientemente esperarem por dias melhores, e que eu contribua para que eles existam! Aos meus irmãos (Janderson e Jairo), por fazer pelos nossos pais o que eu não faço, e por me apoiarem também! À minha sobrinha Laurinha, florzinha da minha vida!

Ao Felipe, por sempre apoiar as minhas escolhas profissionais, mesmo sabendo que elas nos mantêm longe um do outro. Por me ensinar a amar as coisas simples da vida! Por criar e cuidar do nosso lar e dos nossos filhinhos (Gatinha e Totozão)! Por cuidar de mim e me respeitar! Por me amar! Meu coração é seu!

À tod@s que de alguma forma contribuíram para que eu cumprisse mais esta estapa de meus estudos.

Obrigada!

## APRESENTAÇÃO

Esta pesquisa fez parte dos projetos do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) da UFAM, cujos trabalhos vêm sendo realizados utilizando ferramentas moleculares mitocondriais e nucleares, sobre boto-vermelho (gênero *Inia*). Esses estudos vêm sendo desenvolvidos há cerca de uma década e foram inicialmente idealizados e executados por Izeni Farias, Tomas Hrbek, Vera da Silva e Waleska Gravena. As primeiras amostras obtidas foram cedidas por Vera da Silva e Antony Martin (coordenadores do Projeto Boto na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá), além de algumas delas terem sido obtidas pelo pai dos estudos com mamíferos aquáticos na Amazônia, Robin Best (já falecido).

As primeiras coletas em campo foram realizadas por Waleska Gravena. Seu imenso esforço, diante dos poucos recursos financeiros e logísticos, para obter amostras do Rio Madeira e baixo Rio Negro, foram essenciais para tornar possível a realização de todas as pesquisas desde então. Nicole Dutra também contribuiu para o banco de tecidos, obtendo amostras em expedições aos rios Araguaia e Negro. Ambas contribuíram de forma excepcional para a construção do banco de tecidos e banco de dados de *Inia*.

Este grupo de pesquisa já publicou os seguintes trabalhos: biologia forense em amuletos vendidos como sendo de *Inia* (Gravena et al. 2008); desenvolvimento de marcadores microssatélites (Gravena et al. 2009); descrição de nova espécie de boto para a bacia Tocantins/Araguaia (*Inia araguaiaensis*) e datação das espécies existentes (Hrbek et al. 2014); avaliação da atuação das corredeiras do alto Rio Madeira sobre populações de *Inia geoffrensis* e de *Inia boliviensis* (Gravena et al. 2014; 2015); além de diversos resumos e palestras apresentados em conferências nacionais e internacionais, e artigos que estão em preparação.

Esta pesquisa teve início em 2012, sendo desenvolvida como uma tentativa inicial de avaliar o nível de divergência genética dos botos dos rios Branco e Negro. Expandimos essa avaliação para analisar a divergência e limite geográfico entre *Inia geoffrensis humboldtiana* e *Inia geoffrensis geoffrensis*. Para tal, além das amostras obtidas nos rios Negro e Branco, nos foram cedidas amostras da bacia do Orinoco por Susana Caballero (nossa então colaboradora). Nesta dissertação, vos apresento, em dois capítulos, duas singelas histórias construídas com base nas análises da maioria das amostras acima mencionadas, como resultado do esforço de todos os membros deste grupo de pesquisa.



## RESUMO

Os golfinhos de água doce do gênero *Inia* pertencem a família Iniidae e possuem três espécies descritas para diferentes regiões hidrográficas: *Inia boliviensis* (sub-bacia Boliviana); *I. araguaiaensis* (bacia Tocantins/Araguaia); e *I. geoffrensis* (bacias Amazônica e do Orinoco). Esta última é representada por duas subespécies, cuja taxonomia é controversa: *Inia geoffrensis geoffrensis* (bacia Amazônia) e *I. g. humboldtiana* (bacia do Orinoco). As adaptações adquiridas pelas espécies deste gênero permitiram-lhes explorar ambientes de áreas alagáveis, comuns em várias regiões da Amazônia Central e nos Llanos da bacia do Orinoco. Essas duas bacias são conectadas atualmente pelo Canal Casiquiare, que liga o alto Rio Negro ao alto Rio Orinoco, e tem atuado tanto como corredor, quanto como barreira à fauna aquática compartilhada por ambas bacias. Este estudo teve como objetivos: I) testar se *Inia geoffrensis humboldtiana* representa uma unidade evolutiva independente das demais espécies e subespécie de *Inia*; II) entender os padrões geográficos da estrutura populacional de *Inia geoffrensis* na bacia do rio Negro e sub-bacia do rio Branco. Para atender ao objetivo I) foram realizadas análises Bayesianas e de Máxima Parsimônia com sequências da região controle para 108 indivíduos, do citocromo *b* para 122 e de 10 *loci* microssatélites para 129, provenientes das regiões tipo das espécies de *Inia*. Os resultados mostraram quatro linhagens, correspondendo às espécies e subespécies de *Inia*. Uma quinta linhagem, correspondendo aos indivíduos do alto/médio Orinoco, foi observada somente para os dados do mtDNA. As duas linhagens da bacia do Orinoco apresentam distintos tempos de divergência. O clado com a linhagem do alto/médio Orinoco e sua espécie irmã, *Inia* da Amazônia Central, divergiu há 354 mil anos. A linhagem do médio/baixo Orinoco divergiu deste clado a 1.66 milhões de anos. Nossas evidências sugerem que *Inia* do médio/baixo Orinoco é uma espécie distinta das demais, e a designamos *Inia humboldtiana* stat nov. (Pilleri e Gehr, 1977). Igualmente, os dados obtidos ainda são insuficientes para avaliar o real *status* taxonômico da segunda linhagem de *Inia* da bacia do Orinoco (alto/médio Orinoco). Para atender ao objetivo II) foram realizadas análises Bayesianas e de Máxima Verossimilhança com sequências da região controle para 131 indivíduos, do citocromo *b* para 127 e de 10 *loci* microssatélites para 143, provenientes dos rios Negro, Branco, Solimões, baixo Rio Madeira e da bacia do Orinoco. Para os indivíduos da bacia do Orinoco observamos um resultado semelhante ao cumprir o objetivo I. Para os indivíduos das demais localidades, diferentes padrões de diferenciação genética foram observados conforme marcador utilizado, sendo um baixo grau de subdivisão populacional ( $F_{ST} = 0.04762$ ,  $P < 0.001$ ) e altos índices de fluxo gênico para o nuDNA; e o oposto ( $\Phi_{ST} = 0.75490$ ,  $P < 0.001$ ) para o mtDNA. Foram determinadas subpopulações, cujos níveis de diversidade foram relativamente altos. Essas diferenciações genéticas em nível de subpopulação parecem corresponder a história evolutiva das áreas, apesar de ter sido constatada filopatria por fêmeas. Tanto para estas quanto para os machos, as corredeiras de São Gabriel da Cachoeira (Rio Negro) e do Bem Querer (Rio Branco) não podem ser consideradas como barreira física/geográfica. Sendo assim, a construção das hidrelétricas projetadas para essas áreas, proporcionarão, sem dúvida, fragmentação demográfica e genética nas subpopulações de botos observadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** boto-vermelho, *Inia*, linhagens, taxonomia, filogeografia, filopatria.

## ABSTRACT

The river dolphins of the genus *Inia* belong to the family Iniidae. This family has three species distributed in different hydrographic regions: *Inia boliviensis* (Bolivian sub-basin); *I. araguaiaensis* (Tocantins/Araguaia basin); and *I. geoffrensis* (Amazon and Orinoco basins). The last one is represented for two subspecies whose the taxonomy is controversy: *Inia geoffrensis geoffrensis* (Amazon basin) and *I. g. humboldtiana* (Orinoco basin). These species have adaptations that enable them to explore flooded areas, common in several regions in Central Amazon and Orinoco Llanos. The Amazon and Orinoco basin are connected by the Casiquiare Channel, that connects the upper Orinoco River to the upper Negro River. This channel has been acting as well a corridor as a barrier to aquatic fauna shared by these two basins. The aims of this study were: I) to test if *Inia geoffrensis humboldtiana* represents an independent evolutionary unit; II) to understand the geographic patterns of the population structure of the *Inia geoffrensis* from the Negro River basin and the Branco River sub-basin. To reach aim I), we performed Bayesian and Maximum Parsimony analysis on sequences of *Inia* individuals from the type localities: 108 individuals for control region, 122 for cytochrome b and 129 for 10 *loci* microsatelitis. The results showed four lineages, corresponding to the *Inia* species and subspecies. A fifth lineage was observed for the individuals from the upper Orinoco basin. The two lineages of the Orinoco basin has different estimated time of divergence. The estimated divergence of the upper Orinoco lineage from its *Inia* Central Amazon sister lineage is 0.354 million years ago. This clade is sister to *Inia* from lower/middle Orinoco with an estimated time of divergence of 1.66 mya. Our evidences suggest that *Inia* from the lower/middle Orinoco basin is a different species, and we called it *Inia humboldtiana* stat nov. (Pilleri & Gehr, 1977). Furthermore, the data analysed are not yet enough to evaluate the taxonomic status of the upper Orinoco *Inia* lineage. To reach aim II), we perform Bayesian and Maximum Likelihood analysis on 131 individuals for the control region, 127 individuals for the cytochrome b, and 143 individuals for 10 *loci* microsatelities. The individuals were sampled from the Orinoco basin, and from the Negro, Branco, Madeira and Solimões rivers. The results for the individuals from the Orinoco basin was the same as that obtained to reach the aim I. To the other individuals, different patterns of genetic differentiation were observed as marker used. For nuclear DNA was observed a low degree of population subdivision ( $F_{ST} = 0.04762$ ,  $P < 0.001$ ) and an high gene flow index; and for mitochondrial DNA was observed an opposite situation ( $\Phi_{ST} = 0.75490$ ,  $P < 0.001$ ). From these results subpopulations were determined whose the genetic diversity levels were relatively high. The genetic differentiations of the subpopulations seem to correspond to the rivers evolution. Furthermore, we observed female philopatry. The rapids of São Gabriel da Cachoeira (Negro River) and Bem Querer (Branco River) are not barrier for the dolphins, both female as male. Thus, the construction of dams designed for these areas, will fragment that subpopulations, both demographically as genetically.

**KEY-WORDS:** pink river dolphin, *Inia*, lineage, taxonomy, phylogeography, philopatry.

## SUMÁRIO

<b>Agradecimentos</b> .....	V
<b>Apresentação</b> .....	VII
<b>Resumo</b> .....	VIII
<b>Abstract</b> .....	IX
<b>Sumário</b> .....	X
<b>Lista de Figuras</b> .....	XII
<b>Lista de Tabelas</b> .....	XIII
<b>Introdução Geral</b> .....	1
Espécie, subespécie e população.....	1
Filogeografia, genética populacional e os marcadores moleculares.....	2
<i>Inia</i> : classificação, evolução e sistemática.....	3
Aspectos biológicos das espécies de <i>Inia</i> .....	7
Aspectos ecológicos das espécies de <i>Inia</i> .....	8
Ameaças.....	9
<b>Capítulo I</b> .....	12
<b>Evidência de linhagem evolutiva independente em <i>Inia geoffrensis</i> ssp. (<i>Cetartiodactyla</i>: <i>Iniiidae</i>)</b> .....	12
<b>Resumo</b> .....	12
<b>Introdução</b> .....	13
<b>Material e Métodos</b> .....	17
Amostragem.....	17
Obtenção do material genético.....	19
Microsatélites ( <i>SSR – Sample Sequence Repeats</i> ).....	19
Citocromo <i>b</i> ( <i>Cytb</i> ) e região controle ( <i>CR</i> ).....	20
Análises.....	22
<b>Resultados</b> .....	25
Tratamento Taxonômico.....	33
<b>Discussão</b> .....	36
Linhas de evidência para <i>Inia humboldtiana</i> stat. nov.....	38
<b>Capítulo II</b> .....	44
<b>Padrões geográficos de estrutura populacional em <i>Inia geoffrensis</i> (<i>Cetartiodactyla</i>: <i>Iniiidae</i>) nos rios Negro e Branco</b> .....	44
<b>Resumo</b> .....	44
<b>Introdução</b> .....	45

<b>Material e Métodos</b> .....	48
Amostragem.....	48
Coleta do material biológico.....	49
Obtenção do material genético.....	51
Análises.....	51
Estruturação genética e Padrão geográfico.....	52
Fluxo gênico e Diversidade genética.....	54
<b>Resultados</b> .....	55
Estruturação genética e Padrão geográfico.....	56
Fluxo gênico e Diversidade genética.....	62
<b>Discussão</b> .....	65
Padrão Geográfico.....	66
Estruturação genética e Fluxo gênico.....	70
Diversidade genética e Implicações para Conservação.....	73
<b>Considerações finais</b> .....	74
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	76
<b>Material Suplementar</b> .....	93

## LISTA DE FIGURAS

### INTRODUÇÃO GERAL

- Figura 1.** Topologias para os diferentes grupos de *Inia* (Amazônia Boliviana, Colombiana e Central e bacia do Orinoco), utilizando marcadores moleculares mitocondriais (região controle e citocromo *b*), segundo Banguera-Hinestroza et al. (2002)..... 5
- Figura 2.** Distribuição das espécies conhecidas para o gênero *Inia*, segundo Hrbek et al. (2014).. 6

### CAPÍTULO I

- Figura 1.** Mapa das localidades das amostras utilizadas por este estudo.....18
- Figura 2.** Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4. A análise foi realizada sob 10 *loci* de microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco, 44 de *I. geoffrensis*, 45 de *I. boliviensis* e 32 de *I. araguaiaensis*.....26
- Figura 3.** Rede de haplótipos elaborada no programa *Haploviewer*, com base em árvore de máxima verossimilhança construída a partir de sequências concatenadas de citocromo *b* (1140 pares de bases) e região controle (621 pares de base) do DNA mitocondrial.....27
- Figura 4.** Análise filogenética Bayesiana e estimativa do tempo de divergência através do *BEAST* v. 1.7.1, usando sequências do gene citocromo *b* (1140 pares de bases) do DNA mitocondrial....32
- Figura 5.** Provável distribuição geográfica de *Inia humboldtiana* stat. nov. (regiões média e baixa da bacia do Orinoco), e de *Inia* aff. *geoffrensis* (regiões alta e média da bacia do Orinoco).....35

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Mapa das localidades amostradas durante este estudo, e de localidades amostradas em outros estudos, cujos dados também foram utilizados por este trabalho.....49
- Figura 2.** Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4. Análise realizada sob 10 *loci* de microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco, 74 do Rio Negro, 24 do Rio Branco, 19 do baixo Rio Madeira e 18 do médio Solimões.....57
- Figura 3.** Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *BAPS*. A análise foi realizada sob 1862 pares de bases concatenados da região controle (621) e citocromo *b* (1241), para 7 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco, 61 do Rio Negro, 24 do Rio Branco, 19 do baixo Rio Madeira e 16 do médio Solimões.....59
- Figura 4.** Rede de haplótipos elaborada no programa *Haploviewer*, com base em árvore de máxima verossimilhança construída a partir de sequências concatenadas da região controle (621 pares de base) e do citocromo *b* (1241 pares de bases) do DNA mitocondrial.....63

### MATERIAL SUPLEMENTAR

- Figura 1-A.** Melhor probabilidade posterior para explicar os dados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4.....106
- Figura 2-A.** Melhor probabilidade posterior para explicar os dados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4.....107

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Caracteres diagnósticos (apomorfias) para os grupos biológicos observados em *Inia* das bacias do Orinoco (*Inia humboldtiana* stat. nov. e *Inia* aff. *geoffrensis*), Amazônica (*Inia geoffrensis*), Tocantins/Araguaia (*Inia araguaiaensis*) e sub-bacia Boliviana (*Inia boliviensis*), baseados em sequências do citocromo b e da região controle do DNA mitocondrial.....28

### CAPÍTULO II

**Tabela 1.** Valores de  $F_{ST}$  (diagonal abaixo) e  $N_m$  (diagonal acima) obtidos com os dados dos 10 *loci* de microssatélites para as subpopulações de *Inia geoffrensis*, consideradas de acordo com as “quebras” populacionais observadas pelo resultado da análise do *STRUCTURE*.....61

**Tabela 2.** Valores de  $\Phi_{ST}$  (diagonal abaixo) e  $N_m$  (diagonal acima) obtidos com os dados concatenados da região controle e citocromo b do mtDNA para as subpopulações de *Inia geoffrensis*, consideradas de acordo com a distribuição hidrogeográfica majoritária dos clusters observados pelo resultado da análise do *BAPS*..... 61

**Tabela 3.** Índices de diversidade genética resultantes dos 10 *loci* de microssatélites analisados para as subpopulações *Inia geoffrensis*, considerandas de acordo com as “quebras” populacionais observadas pelo resultado da análise do *STRUCTURE*.....64

**Tabela 4.** Parâmetros genéticos obtidos com os dados concatenados da região controle e citocromo b do mtDNA para as subpopulações de *Inia geoffrensis*, consideradas de acordo com a distribuição hidrogeográfica majoritária dos clusters observados pelo resultado da análise do *BAPS*..... 65

### MATERIAL SUPLEMENTAR

**Tabela 1-A.** Localidades (rios), Região geopolítica, taxon, número de tombo do tecido (CTGA), número amostral por marcador, coordenadas geográficas (em graus, minutos e segundos) e referência do material analisado, para os indivíduos cujas análises estão apresentadas no capítulo I desta dissertação..... 94

**Tabela 2-A.** Localidades/rios, região geopolítica, taxon, número de tombo do tecido (CTGA), número amostral por marcador, coordenadas geográficas (em graus, minutos e segundos) e referência do material analisado, para os indivíduos cujas análises estão apresentadas no capítulo II desta dissertação..... 100

**Tabela 1-B.** Média da probabilidade posterior de cada número *a priori* dos grupos biológicos (K) de *Inia* analisados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4. .... 106

**Tabela 2-B.** Média da probabilidade posterior de cada número estabelecido *a priori* para os grupos biológicos de *I. geoffrensis geoffrensis* e *I. g. humboldtiana* (K) analisados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4..... 108

**Tabela 2-C.** Índices de diversidade genética resultantes para cada *locus* de microssatélite analisados para as subpopulações de *Inia geoffrensis geoffrensis* dos rios Negro, Branco, baixo Madeira e Solimões..... 108

**Tabela 2-D.** Índices de diversidade genética resultantes dos 10 *loci* microssatélites analisados para as subpopulações de *Inia geoffrensis geoffrensis*, consideradas de acordo com o resultado observado pela análise do *STRUCTURE*..... 109

## INTRODUÇÃO GERAL

As relações históricas entre as bacias do Amazonas e do Orinoco e sua atual conectividade através do Canal Casiquiare, levam a questionar se há também uma conectividade entre as espécies que as habitam. Além disso, instiga buscar responder como essas espécies estão distribuídas nesses mega sistemas fluviais. O crescente uso da ferramenta molecular em estudos dessa magnitude tem fornecido respostas esclarecedoras para várias dessas questões.

Incerido nesse contexto, este trabalho questiona aspectos taxonômicos e filogeográficos de populações de boto-vermelho (gênero *Inia*) que habitam essas bacias. Abaixo segue uma breve descrição dos temas trabalhados. Posteriormente, destaco alguns aspectos importantes de *Inia*, do ponto de vista taxonômico, filogenético, biológico e ecológico, bem como algumas das ameaças que as espécies desse gênero vêm sofrendo.

### *ESPÉCIE, SUBESPÉCIE E POPULAÇÃO*

Apesar de amplamente discutido, e de existirem mais de vinte conceitos descritos (Mayden 1997; Wilkins 2002; Taylor 2009), não há um consenso geral sobre o que é uma espécie (Aleixo 2009). Com relação a isso existem basicamente duas classes de problemas: uma quanto à escolha do conceito; e outra quanto à aplicabilidade do mesmo na definição de uma espécie (Mayr 1996). Independente das discordâncias com relação ao conceito ou a aplicabilidade, espécies são entidades reais, ou seja, são um fenômeno concreto da natureza (Mayr 1996).

Neste trabalho utilizamos o conceito evolutivo de espécie, que designa uma espécie como uma linhagem de organismos que têm evoluído separadamente de outras, apresenta identidade própria em relação às outras comparadas, e possui suas próprias tendências evolutivas e destino histórico (Simpson 1951; Wiley 1978; 1981). Embora Mayr (1996) tenha feito duras críticas a este conceito, por ter critérios "errôneos" para distinguir espécies, nós cremos que o uso adequado da ferramenta molecular tenha suprido as falhas apontadas por Mayr. Além disso, o uso de múltiplas linhas de evidência (Reeves et

al. 2004) permite que a escolha de um conceito como base não exclua o uso concomitante de outros, especialmente daqueles amplamente aceitos.

Mais controverso e polêmico do que o conceito de espécie é o de subespécie (Aleixo 2009; Fitzpatrick 2010), cuja definição se refere a uma população parcialmente diferente dentro da espécie, que apresenta variação morfológica e genética, compartilha uma distribuição geográfica ou habitat únicos (Wilson & Brown 1953; Cracraft 1983; Mayr 1996), podendo cruzar e produzir descendentes férteis (Frankham et al. 2008). Quando estas apresentam uma diferenciação gradual, o uso da taxonomia trinomial torna-se desnecessário (Fitzpatrick 2010). Por isso, deve-se fazer uma avaliação rigorosa das distinções populacionais, para apenas definir uma subespécie no caso de estabelecimento de prioridades e ações conservacionistas (Fitzpatrick 2010).

Diferenças sutis entre uma unidade evolutiva e outra também podem nos levar a confundir entre o que seria uma espécie e o que seria uma diferenciação em nível populacional (Camargo & Sites 2013). Uma população, em sua clássica definição ecológica, é “um grupo de organismos da mesma espécie ocupando um determinado espaço em um determinado momento” (Krebs 2001: 116), podendo interagir uns com os outros (Waples & Gaggiotti 2006). Sob um paradigma evolutivo, esses indivíduos vivem próximos o suficiente de modo que possam acasalar entre si com a mesma probabilidade (Waples & Gaggiotti 2006). Por tais razões, definir o que é uma população é tão importante quanto definir o que é uma espécie, devido a sua aplicabilidade, que é tornar possível avaliar e caracterizar populações na natureza (Waples & Gaggiotti 2006).

Sem excluir a importância de integrar os dados obtidos com outras linhas de evidência, o uso de ferramentas moleculares tornou-se essencial para estudos apoiados em qualquer dos conceitos acima apresentados.

#### *FILOGEOGRAFIA, GENÉTICA POPULACIONAL E OS MARCADORES MOLECULARES*

Estudos filogeográficos utilizam dados genéticos e geográficos na busca da compreensão dos componentes filogenéticos e/ou históricos da estrutura populacional (Avice 2004). Quando se compara as informações obtidas sobre uma espécie com outras



que apresentam distribuição semelhante, é possível identificar padrões gerais de distribuição, e com isso delinear áreas importantes para a conservação (Yumi 2009). A maioria dos trabalhos filogeográficos são realizados com análise do DNA mitocondrial (mtDNA) (Awise 1991; 1998), por se tratarem de análises acima do nível individual que requerem o uso de marcadores mais conservados (Parker et al. 1998), mas também que permitam avaliar a relação entre populações coespecíficas (Awise et al. 1984).

No entanto, uma filogenia matrilinear apresenta apenas uma porção da informação da composição genealógica dentro de genealogia sexual (Awise 1998). Nesse sentido, Hoelzel (1992) recomenda que se realizem estudos com uso de marcadores dos DNAs mitocondrial e nuclear, para que seja possível identificar padrões de dispersão de machos e fêmeas e, assim, maximizar a resolução das análises. Para as estimativas de genética populacional, e àquelas em nível individual, que requerem marcadores com análise de variação máxima, os microssatélites (DNA nuclear) são extremamente úteis (Parker et al. 1998; Zhu et al. 2000; Caixeta et al. 2009).

Em cetáceos, são observados padrões complexos de estrutura populacional (Hoelzel 1992). Para algumas espécies há uma correspondência entre a variação genética e a presença de barreiras geográficas (como nas populações residentes de orca, *Orcinus orca* (Parsons et al. 2013), enquanto que para outras não (como no boto-de-burmeister, *Phocoena spininnis* (Rosa et al. 2005). Além disso, níveis altos de estruturação genética podem ocorrer apenas para um dos sexos (como na cachalote, *Physeter macrocephalus* (Lyrholm et al. 1999; Engelhaupt et al. 2009), no golfinho-escuro, *Lagenorhynchus obscurus* (Cassens et al. 2005) e no boto-vermelho, *Inia geoffrensis* (Hollatz et al. 2011)). Certamente, o uso da ferramenta molecular tem contribuído substancialmente para evolução desses estudos populacionais, filogeográficos e taxonômicos.

#### INIA: CLASSIFICAÇÃO, EVOLUÇÃO E SISTEMÁTICA

O gênero *Inia* pertence à ordem Cetartiodactyla, subordem Cetacea, infraordem Odontoceti e família Iniidae (Montgelard et al. 1997). São golfinhos de água doce que no

Brasil são popularmente conhecidos como boto ou boto-vermelho; na Venezuela, como tonina del Orinoco, delfin rosado e bufeo colorado; na Colômbia, no Peru e no Equador, como bufeo colorado (da Silva et al. 2008; Portocarrero-Aya et al. 2010). Aqui utilizaremos preferencialmente o nome boto, conhecido internacionalmente (da Silva et al. 2008).

Com relação a evolução de *Inia*, existem poucas evidências, especialmente devido a escassez de registro fóssil (Cozzuol 1985). Provavelmente seu ancestral adentrou o continente por uma via marinha durante o final do Mioceno (Pyenson et al. 2015) a partir do norte (mar do Caribe) que seguia em direção oeste-sul até o Atlântico (Hamilton et al. 2001). Quando esse caminho de mar se retraiu, esses golfinhos permaneceram nas águas que se tornaram continentais, onde evoluíram como *Inia* (Hamilton et al. 2001). O mais recente achado fóssil inídeo, *Isthminia panamensis*, da região do Panamá, levou os autores a proporem que deve ter havido frequentes invasões marinhas durante o Neógeno, em diferentes margens continentais, o que justifica os distintos achados fósseis no continente (Pyenson et al. 2015).

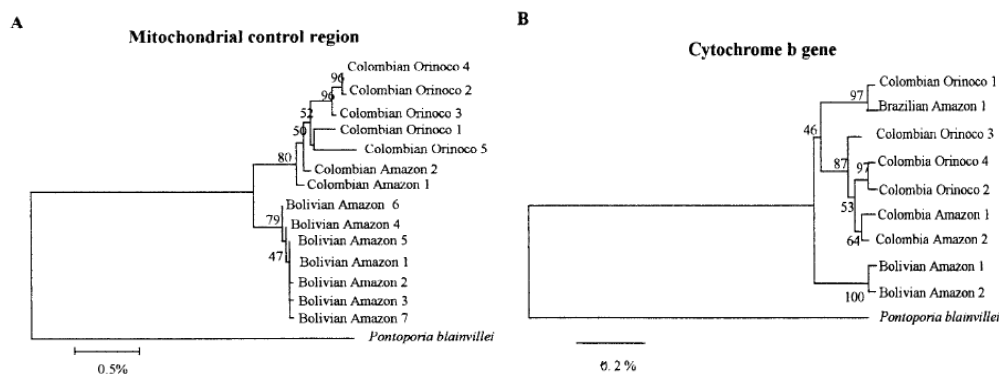
Possivelmente *Inia* originou-se na região do antigo lago Beni (datado do Pleistoceno), hoje em dia Amazônia Boliviana (Pilleri & Gihl 1977), e com o tempo dispersou-se para áreas longuíguas, onde suas atuais espécies evoluíram. Segundo a IUCN sua distribuição abrange cerca de 7 milhões de Km<sup>2</sup> da América do Sul (Reeves et al. 2013), atingindo seis países: Brasil, Venezuela, Colômbia, Equador, Peru e Bolívia (Best & da Silva 1993); e três bacias hidrográficas\*: Amazônica, do Orinoco e Tocantins/Araguaia (Best & da Silva 1989a). Botos são encontrados da foz próximo a Belém às nascentes dos rios Ucayali e Marañon, no Peru; no sistema Orinoco, exceto no rio Caroni e acima das corredeiras do Para no rio Caura, na Venezuela; na bacia dos rios Beni/Mamoré, na Bolívia (Meade & Koehnken 1991; da Silva 2009; Trujillo et al. 2010); em todo Rio Araguaia e no Rio Tocantins (onde seu limite é a hidrelétrica Serra da Mesa) (Araújo & da Silva 2014; Ristau et al. 2014).

---

\*Por bacia hidrográfica (ou sistema hidrográfico) entende-se a área onde as águas das chuvas e dos rios drenam em direção a um rio principal, o qual determina o nome da bacia. Tal sistema é formado devido aos desníveis dos terrenos que orientam os cursos da água. Aqui, nós também adotamos a denominação sub-bacia, como sendo as áreas que apresentam tais características, mas cuja drenagem total deságua em um dos grandes afluentes do Rio Amazonas (como a sub-bacia dos rios Beni/Mamoré [também chamada de sub-bacia Boliviana] e a sub-bacia do Rio Branco), como tem sido amplamente utilizado na literatura.

As espécies e subespécies descritas até o momento foram sugeridas com base em evidências morfológicas, craniométricas e moleculares (Pilleri & Gihl 1977; da Silva 1994; Banguera-Hinestroza et al. 2002; Hrbek et al. 2014). Os primeiros estudos utilizaram dados morfológicos e craniométricos, e concluíram que existem duas espécies: *Inia boliviensis* (d'Orbigny, 1834), ocorre nos sistemas de rios do Beni/Mamoré; e *Inia geoffrensis* (de Blainville 1817), no restante da distribuição do gênero (Pilleri & Gihl 1977; da Silva 1994). Esta última, teria ainda duas subespécies: *I. g. geoffrensis* (van Bree & Robineau 1973), população do restante da bacia Amazônica; e *I. g. humboldtiana*, população do sistema Orinoco.

A primeira inferência filogenética, baseada em dados moleculares do DNA mitocondrial, mostrou a topologia das árvores com um dos cladogramas agregando todos os indivíduos da sub-bacia Boliviana e o outro todos os indivíduos da Amazônia Colombiana e Central e da bacia do Orinoco (Figura 1) (Banguera-Hinestroza et al. 2002). Com isso, a sugestão de que *I. geoffrensis* e *I. boliviensis* são espécies diferentes (da Silva 1994; Pilleri & Gihl 1977) foi corroborada por Banguera-Hinestroza et al. (2002), onde concluíram que as mesmas representariam duas Unidades Evolutivamente Significantes (ESU). Enquanto que, por formarem um grupo parafilético, as subespécies foram invalidadas (Banguera-Hinestroza et al. 2002).



**Figura 1.** Topologias para os diferentes grupos de *Inia* (Amazônia Boliviana, Colombiana e Central e bacia do Orinoco), utilizando marcadores moleculares mitocondriais (região controle e citocromo *b*, respectivamente), segundo Banguera-Hinestroza et al. (2002).

Recentemente, foi descrita uma nova espécie para o gênero: *Inia araguaiaensis*, distribuída na bacia Tocantins/Araguaia (Hrbek et al. 2014). Até então pensava-se que esta espécie era a mesma que habita as águas da bacia Amazônica (*Inia geoffrensis*). No entanto, análises moleculares identificaram os botos do rio Araguaia como uma linhagem que divergiu a pouco mais de dois milhões de anos daquela que habita os rios amazônicos (Hrbek et al. 2014). Embora tenham utilizado poucos indivíduos, foi possível para os autores também apresentarem diferenças craniométricas e no número de dentes entre esta nova espécie e as demais do gênero. Sendo assim, atualmente estão descritas três espécies para o gênero: *Inia boliviensis*, *I. geoffrensis* e *I. araguaiaensis* (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuição das espécies conhecidas para o gênero *Inia*, segundo Hrbek et al. (2014). Informações atuais sobre os limites de distribuição de *Inia boliviensis* são apresentadas nos trabalhos de Gravena et al. (2014; 2015).

Uma aspecto interessante quanto a distribuição das espécies de *Inia* era o fato de, teoricamente, elas estarem separadas por barreiras geográficas. Imaginava-se que as corredeiras do alto Rio Madeira impediam o fluxo gênico entre *Inia boliviensis* e *I. geoffrensis* (Pilleri & Gihl 1977; da Silva 1994; Banguera-Hinestroza et al. 2002). No

entanto, os estudos de Gravena et al. (2014; 2015), utilizando dados moleculares do DNA mitocondrial e nuclear, mostraram que indivíduos de *Inia boliviensis* descem tais corredeiras e deslocam-se até próximo a foz do Rio Madeira, hibridizando com indivíduos de *Inia geoffrensis*. Também foram identificadas diferentes unidades de conservação de *Inia boliviensis* habitando as regiões entre corredeiras (Gravena et al. 2015). A conclusão destes estudos é que as corredeiras apenas limitam o fluxo gênico entre as populações da Amazônia Central e do sistema Beni-Mamoré (Brasil e Bolívia, respectivamente).

Na descrição de *Inia araguaiaensis*, Hrbek et al. (2014) indicaram incerteza com relação a qual espécie ocorreria a jusante da hidrelétrica de Tucuruí (construída sobre as corredeiras), no baixo Rio Tocantins. Porém, análises de amostras coletadas recentemente, por esta equipe de pesquisa, no município de Mocajuba – PA (02°34'54.6"S; 49°30'36.7"W), revelaram que nessa área ocorrem indivíduos de *Inia araguaiaensis* (Hrbek e Farias, dados não publicados). Certamente, é essencial a realização de estudos de genética populacional sobre as populações fragmentadas pelos diversos empreendimentos hidrelétricos daquele rio, a fim de verificar os impactos gerados.

Com relação as populações de *Inia geoffrensis* que habitam as bacias Amazônica e do Orinoco, por muito tempo acreditava-se que elas estariam separadas pelo Canal Casiquiare (Pilleri & Gihl 1977; Banguera-Hinestroza et al. 2002), que atualmente é a principal conexão entre ambas, ligando o alto Rio Orinoco ao alto Rio Negro (Silva-León 2005; Machado-Allison 2008; Winemiller & Willis 2011). No entanto, botos são frequentemente vistos naquele canal (Pilleri et al. 1982; da Silva 2009; Herrera Trujillo et al. 2014). Contudo, nenhum estudo genético foi realizado para identificar a quais populações (bacia do Orinoco ou Rio Negro/bacia Amazônica) esses indivíduos estariam mais relacionados.

#### ASPECTOS BIOLÓGICOS DAS ESPÉCIES DE INIA

A evolução de diversas características permitiu aos botos explorar ambientes de florestas alagadas (Best & da Silva 1993; Martin & da Silva 2004b). Eles possuem

nadadeiras especializadas, sendo a caudal larga e triangular e as peitorais flexíveis com formato de remo (Best & da Silva 1989a). As vértebras cervicais não são fusionadas, o que torna seu pescoço flexível (da Silva 1986). Já o corpo, apesar de ser moderadamente robusto, também é extremamente arqueável, permitindo aos botos curvar-se e contornar-se (Best & da Silva 1993; Sylvestre 1985) podendo virar a cabeça a 90° ou mais do eixo do corpo (Sylvestre 1985).

Dentre os cetáceos os botos representam um grupo com alto dimorfismo sexual, sendo maior entre os golfinhos de água doce (da Silva 1994; Martin & da Silva 2006). Nesta espécie os machos (2,55 m e 159 kg) são maiores do que as fêmeas (2,05 m e 96,5 kg) (da Silva 1994). A espécie apresenta segregação sexual (Hollatz et al. 2011; Martin & da Silva 2004a). Adultos formam apenas associações curtas com qualquer outro sexo, somente a fêmea exerce cuidado parental (da Silva 1996; Martin & da Silva 2004a). Tanto os rituais de acasalamento (Martin et al. 2008) quanto os nascimentos dos filhotes são altamente sazonais (Martin et al. 2008; McGuire & Aliaga-Rossel 2007; McGuire & Winemiller 1998; Santos et al. 2012).

Parte da dificuldade em se estudar botos é devido ao fato de eles possuírem hábitos discretos (Santos et al. 2012), não nadarem em sincronia (Sylvestre 1985), além de não ser possível prever como, quando e onde os indivíduos vão transpor a lâmina d'água (da Silva & Martin 2000). Os botos passam mais tempo submersos do que nadando, e quando emergem apresentam comportamentos inconspícuos (Sylvestre 1985), com o rosto e os olhos raramente sendo vistos (Pilleri & Gihl 1977). Além disso, as cicatrizes do corpo nem sempre servem para reconhecimento individual, aliado ao fato de que muitos rios amazônicos possuem águas túrbidas, tornando difícil reconhecê-los quando sobem à superfície da água (da Silva & Martin 2000; Martin & da Silva 2006).

#### *ASPECTOS ECOLÓGICOS DAS ESPÉCIES DE INIA*

Botos habitam os rios principais e seus afluentes, canais laterais, planícies alagáveis e florestas de várzea, lagos e bocas de rios (Best & da Silva 1993), porém, não estão distribuídos de modo estocástico ao longo destes habitats (Magnusson et al. 1980).

As maiores densidades de botos ocorrem na boca de rios e lagos e em confluências (Gomez-Salazar et al. 2012) bem como nas margens, tendendo a diminuir em direção ao centro dos rios (Martin et al. 2004; Vidal et al. 1997). Tais diferenças indicam preferência por habitat (Layne 1958) e podem ser explicadas pelas diferenças na complexidade do mesmo, inclusive com relação às alterações antrópicas (Aliaga-Rossel et al. 2006; Aliaga-Rossel & Quevedo 2011; McGuire & Winemiller 1998), acesso a parceiros, presença e densidade de presas, bem como facilidade em capturá-las (McGuire & Winemiller 1998).

Estudos indicam que botos são predominantemente solitários, tendo em vista que a maioria das observações realizadas em diferentes áreas são de indivíduos solitários, seguida de observações de pares (Aliaga-Rossel et al. 2006; Best & da Silva 1989a; Magnusson et al. 1980; Martin et al. 2004; Santos et al. 2012), que predominantemente são mãe e filhote (Best & da Silva 1989a;b). Grandes agregações ocorrem em áreas de reprodução e alimentação (Best & da Silva 1989a; da Silva 1996). Sendo esta última atividade realizada com maior intensidade das 6 as 9 da manhã e das 15 as 16 horas (Best & da Silva 1989a;b), geralmente na margem dos rios, em baías rasas, florestas inundadas, ou onde dois rios se encontram (Best & da Silva 1989a). Essas preferências por habitat e comportamento são a base para a escolha estratégica de locais para capturar indivíduos, com a finalidade de obter amostras biológicas (da Silva & Martin 2000).

#### AMEAÇAS

O grau de ameaça aos botos em suas áreas de vida ocorre em diversos níveis, o que tem levado diferentes países e instituições a desingar diferentes *status* para as espécies de *Inia*. No Brasil o boto consta na série de espécies ameaçadas do Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos - Pequenos Cetáceos (da Silva 2010). No Livro vermelho da fauna ameaçada da Venezuela o boto é considerado vulnerável (Bolaños-Jiménez et al. 2008). Na Colômbia a espécie também é considerada vulnerável (Trujillo et al. 2010). Está listado no Apêndice II da CITES (*Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora*) e Apêndice II da

CMS (*Convention on the Conservation of Migratory Species of Wild Animals*). Já a lista vermelha da IUCN, que antes o reconhecia como “vulnerável”, agora apresenta seu *status* como “deficiente de dados” por não haver informações atuais suficientes sobre ecologia, número de populações e ameaças à espécie (Reeves et al. 2013).

Na realidade, esses animais são notadamente vulneráveis a uma série de atividades humanas, seja de forma direta ou indireta (Vidal 1993). Como por exemplo:

Destruição de habitats (Galetti et al. 2010). Atividades de mineração, indústria de óleo e poluição por contaminantes agrícolas (Rosas & Lehti 1996; Aliaga-Rossel 2003; Lailson-Brito Jr. et al. 2008; Torres et al. 2009; Gomez-Salazar et al. 2012). Mortes acidentais em redes de pesca, que em sua maioria ocorre com filhotes e juvenis, que são menos experientes, o que os torna mais propensos a esse tipo de ameaça (Aliaga-Rossel 2002; 2003; Gomez-Salazar et al. 2012). Mortes intencionais, no intuito de evitar que os botos se alimentem dos peixes capturados ou causem danos à malhadeira (Loch et al. 2009). Caça para uso como isca para pesca da piracatinga (*Calophysus macropterus*), atividade que tem se tornado uma importante ameaça para conservação dos botos no Brasil, Colômbia e Venezuela (Loch et al. 2009; da Silva et al. 2011; Diniz 2011; Alves et al. 2012; Mintzer et al. 2013).

A construção de hidrelétricas também é considerada uma ameaça por trazer diversos impactos ao ambiente aquático, alterado-o drasticamente. Mas, seu impacto sobre os golfinhos de rio ainda tem sido pouco estudado (Best & da Silva 1989b; Vidal 1993; Gomez-Salazar et al. 2012; Braulik et al. 2014). Vários desses empreendimentos estão projetados, ou já foram construídos, em rios que fazem parte da área de distribuição do boto-vermelho (<http://dams-info.org/pt>). O plano original de expansão energética (Plano 2010), liberado pelas autoridades brasileiras em 1987, previa a construção de 79 barragens na Amazônia (Fearnside 2015). Dentre estas, constavam dois aproveitamentos para o Rio Negro (São Gabriel e Santa Isabel-Uaupés/Negro, cada um com 2.000 MW) e cinco para a sub-bacia do Rio Branco (Caracaraí-Mucajaí, com 1.000 MW; Maracá, com 500 MW; Surumu, com 100 MW; Bacarão, com 200 MW; e Santo Antônio (Contigo), com 200 MW) (Fearnside 2015).



Apesar de terem sido aprovadas quatro unidades geradoras de 658 KW, no Igarapé Miuá, em São Gabriel da Cachoeira (Portaria Nº 55 de 17 de março de 1997, Diário Oficial, 18 de março de 1997) (Brasil 1997), atualmente no local está em operação apenas um pequeno aproveitamento hidrelétrico com potência de 5 MW ([http://dams-info.org/pt/dams/view/sao\\_gabriel\\_cachoeira/](http://dams-info.org/pt/dams/view/sao_gabriel_cachoeira/)). Enquanto que, para a bacia do Rio Branco, três hidrelétricas estão inventariadas (Rio Mucajaí: Fé esperança, com 72 MW; Paredão, com 27 MW; Paredão A, com 199 MW) e três estão planejadas (Rio Mucajaí: Paredão M1, com 70 MW; Rio Branco: Bem Querer, com 708 MW; Rio Contigo: Contigo, com 136 MW) (<http://dams-info.org/pt>). Destas, está prevista para entrar em operação em julho de 2022 a barragem no Bem Querer (Brasil & EPE 2014).

De acordo com o exposto nas subseções acima, constatamos que diversos aspectos biológicos das espécies e subespécies de boto ainda têm sido pouco estudados. Dentre eles, o posicionamento filogenético de indivíduos da bacia do Orinoco e as características genético populacionais de indivíduos que habitam rios que sofrerão impactos de aproveitamentos hidrelétricos, como o Rio Negro e rios da sub-bacia do Rio Branco. Além disso, diante da eminência de diversas outras ameaças sobre esses animais, consideramos que informações sobre a variabilidade genética de *Inia* são essenciais para subsidiar ações conservacionistas necessárias para manter a integridade populacional das espécies do gênero.

Por isso, com base em análises moleculares do DNA mitocondrial e nuclear, este trabalho teve por objetivos:

Capítulo I) Testar se *Inia geoffrensis humboldtiana* representa uma unidade evolutiva independente das demais espécies e subespécie de *Inia*.

Capítulo II) Entender os padrões geográficos da estrutura populacional de *Inia geoffrensis* nos rios Negro e Branco.

## CAPÍTULO I

### EVIDÊNCIA DE LINHAGEM EVOLUTIVA INDEPENDENTE EM *INIA GEOFFRENSIS* SSP.

#### (CETARTIODACTYLA: INIIDAE)

#### RESUMO

O gênero *Inia* contém atualmente três espécies de golfinhos de água doce: *Inia boliviensis*, *Inia araguaiaensis* e *Inia geoffrensis*. *Inia geoffrensis* compreende duas subespécies: *Inia geoffrensis geoffrensis*, distribuída na bacia Amazônica; e *Inia geoffrensis humboldtiana*, distribuída na bacia do Orinoco. A validade dessas duas subespécies foi questionada devido à ausência de isolamento geográfico, por conta da conexão entre essas duas bacias através do Canal Casiquiare; além de ausência de monofilia recíproca para linhagens observadas através do DNA mitocondrial. Diante dessas incertezas, neste estudo avaliamos se *Inia geoffrensis humboldtiana* representa uma unidade evolutiva independente das demais espécies e subespécie do gênero *Inia*. Análises de Máxima Verossimilhança e Inferência Bayesiana foram realizadas sob dados moleculares do DNA mitocondrial e nuclear (microssatélites) para indivíduos das regiões tipo das espécies de *Inia*. Sendo 8 indivíduos de *I. g. humboldtiana*, 48 de *I. g. geoffrensis*, 54 de *I. boliviensis* e 33 de *I. araguaiaensis*. Os dados de microssatélites sugeriram quatro grupos biológicos, que correspondem às espécies e subespécies avaliadas, com exceção aos indivíduos dos rios Meta e Bitá (alto/médio) Orinoco, que apresentaram característica de mistura com os demais. Padrão semelhante foi observado na rede de haplótipos, com exceção ao indivíduo do Rio Bitá (alto/médio Orinoco), que aqui se comportaram como uma linhagem tão distinta quanto às demais. Todos esses grupos apresentam caracteres em estado apomórfico. Esses resultados indicam a existência de duas linhagens para a bacia do Orinoco, uma para os indivíduos do alto/médio Orinoco e outra para os do médio/baixo. Provavelmente essas linhagens estão separadas pelas corredeiras de Maiupures e Atures, localizadas a jusante da confluência dos rios Tomo e Meta, respectivamente. O tempo de divergência entre as linhagens de *Inia* do baixo Orinoco e da Amazônia Central é de 354 mil anos. Enquanto que entre este clado e a linhagem de *Inia* do médio/baixo Orinoco é de 1.66 milhões de anos. Com base em múltiplas linhas de evidência, sugerimos que *Inia* do médio/baixo Orinoco seja considerada uma espécie distinta das demais, e aqui indicamos a elevação de seu *status* ao nível de espécie, *Inia humboldtiana* stat. nov. (Pilleri & Gühr, 1977). Com relação a segunda linhagem do Orinoco, sugerimos análises com um maior número amostral para definir seu real *status* taxonômico.

**PALAVRAS-CHAVE:** taxonomia, linhagens, *Inia geoffrensis humboldtiana*, tonina del Orinoco

## INTRODUÇÃO

O gênero *Inia* (d'Orbigny, 1834) atualmente compreende três espécies de golfinhos de água doce, vernacularmente conhecidas como “boto-vermelho” ou “boto” (Best & da Silva 1989a; da Silva et al. 2008). Suas distribuições abrangem exclusivamente os sistemas de rios das bacias do Amazonas, Tocantins/Araguaia e do Orinoco, na América do Sul (Pilleri & Gihl 1977; da Silva 1994; Gravena et al. 2014; Hrbek et al. 2014). *Inia boliviensis* (d'Orbigny, 1834), está distribuída nos sistemas de rios das sub-bacias dos rios Mamoré e Iténez (Bolívia) (da Silva 1994) alcançando a região do médio Rio Madeira (Brasil) (Gravena et al. 2014), tem como localidade tipo o Rio Iténez (divisa entre Brasil e Bolívia). *Inia araguaiaensis* Hrbek, Farias, Dutra e da Silva, 2014 ocorre em toda bacia do Rio Tocantins/Araguaia, com localidade tipo o Lago Jurumirim, no Rio Araguaia, estado de Goiás (Brasil) (Hrbek et al. 2014; Hrbek dados não publicados). A espécie *I. geoffrensis* (de Blainville, 1817) é a mais amplamente distribuída dentro do gênero, ocorre tanto na bacia Amazônica quanto na bacia do Orinoco (Best & da Silva 1989a,b; da Silva 1994).

Estudos sugeriram que *Inia geoffrensis* seria representada por duas subespécies: *I. g. geoffrensis* (van Bree & Robineau, 1973) e *I. g. humboldtiana* Pilleri & Gihl, 1977. A primeira, com a localidade tipo sendo a Amazônia Central, está distribuída nos sistemas de rios da bacia Amazônica, exceto nas sub-bacias dos rios Mamoré e Iténez (Best & da Silva 1993; da Silva 1994). Enquanto *I. g. humboldtiana*, cuja localidade tipo é a região de San Fernando de Apuré (Venezuela), ocorre exclusivamente nos sistemas de rios da bacia do Orinoco (Pilleri & Gihl 1977; da Silva 1994).

Desde a descrição de *Inia g. humboldtiana*, baseada em caracteres morfológicos, têm sido levantadas uma série de controvérsias quanto a existência de alopatria em relação a *I. g. geoffrensis*, bem como quanto a validade de tal taxon (Casinos & Ocaña 1979; Banguera-Hinestroza et al. 2002). Esses taxa foram sugeridos como alopátricos inicialmente devido a crença de que o Canal Casiquiare (Venezuela) atuaria como possível barreira ao fluxo de botos entre as bacias Amazônica e do Orinoco (Pilleri & Gihl 1977). Este canal, atualmente constitui a única conexão permanente entre tais bacias, e

tem origem localizada no alto Rio Orinoco conectando-se ao alto Rio Negro (Zeidemann 2001; Silva-León 2005; Machado-Allison 2008; Winemiller & Willis 2011).

Por conta dessa conexão, Casinos e Ocaña (1979) afirmaram que não existe isolamento biogeográfico entre essas duas bacias, o que impossibilitaria diferenciações em nível de subespécie entre esses grupos. Porém, Meade e Koehnken (1991) argumentaram que o Casiquiare poderia ser uma barreira para os botos apenas na estação seca, uma vez que em épocas de cheia o nível de suas águas torna-se de 4 a 6 metros mais alto. Apesar da dúvida quanto a vicariância, outras duas evidências foram mencionadas para a inconsistência em se considerar o Canal Casiquiare como uma barreira ao fluxo dos botos de ambas bacias. A primeira, se referia ao fato de dois crânios, sendo um da localidade de Gallo, no alto Orinoco, e um de San Carlos no alto Rio Negro (Guainia), terem sido identificados como pertencentes a subespécie *Inia g. geoffrensis* (Pilleri et al. 1982). A segunda, é em razão de, frequentemente, esses animais serem vistos nesta área (Pilleri et al. 1982; da Silva 2009).

Outros autores sugeriram ainda que *Inia g. humboldtiana* ocorreria não apenas em toda bacia do Orinoco (principais rios e tributários), mas também através do Canal Casiquiare, alcançando a região do alto rio Negro (território brasileiro), e nesta área, as corredeiras de São Gabriel da Cachoeira (com cerca de 20 quilômetros de extensão) seriam a real barreira física entre essas duas subespécies (Best & da Silva 1989a;b; 1993; da Silva 2010). Esses relatos nos levam a crer que a distribuição dessas subespécies pode ser contínua, com os sistemas de rios das bacias do Amazonas e do Orinoco naturalmente interconectados (HersHKovitz 1963). Todavia essas hipóteses não foram testadas, e pouco sabemos sobre os reais limites de distribuição de *Inia g. humboldtiana*.

A existência de caracteres que pudessem diagnosticar essa subespécie também foi contestada (Casinos & Ocaña 1979; Banguera-Hinestroza et al. 2002). Casinos e Ocaña (1979) realizaram análises multivariadas sob medidas biométricas do crânio de indivíduos de *Inia* das bacias do Orinoco e do Amazonas e da sub-bacia boliviana, e identificaram um aumento gradual no comprimento e um decréscimo gradual na largura,

no sentido norte-sul da distribuição geográfica de *Inia*. Diante desses resultados, os autores invalidaram a proposta de Pilleri e Gihl (1977) sobre a existência de uma subespécie para a bacia do Orinoco. Posteriormente, novos dados apresentados por Pilleri e Gihl (1980) e as análises morfológicas e craniométricas obtidas por da Silva (1994) validaram a subespécie *I. g. humboldtiana*.

A validade do taxon foi novamente refutada quando Banguera-Hinestroza et al. (2002), ao realizarem as primeiras inferências filogenéticas sobre *I. g. humboldtiana* e *I. g. geoffrensis*, não identificaram clados monofiléticos entre tais grupos. A parafilia observada levou tais autores a discordarem da existência de duas subespécies dentro de *Inia geoffrensis*. No entanto, esses autores não consideraram o fato de que nem sempre é possível observar monofilia recíproca em grupos biológicos que divergiram recentemente; além disso, tanto o tempo de divergência quanto o número de *loci* examinados interferem na visualização dos resultados (Knowles & Carstens 2007). Neste caso, a não monofilia não poderia ser uma justificativa para a não existência de linhagens separadas (de Queiroz & Donoghue 1988; de Queiroz 2007).

Percebe-se então, que os vários dados obtidos pelos trabalhos mencionados, obviamente além de resultarem em incertezas com relação a validação taxonômica das subespécies de *Inia geoffrensis*, também pouco esclarecem sobre o real posicionamento filogenético de representantes de *Inia g. humboldtiana* em relação aos demais membros do gênero. Tais discordâncias podem ser um reflexo da tentativa de enquadrar essas populações (da bacia do Orinoco e Amazônica) em conceitos talvez pouco apropriados para as mesmas, como o de subespécie; embora este termo tenha sido amplamente utilizado para classificar subgrupos dentro do gênero *Inia* (Pilleri & Gihl 1977; da Silva 1994).

A definição de subespécie se refere a uma população parcialmente diferente dentro da espécie, que apresenta variação morfológica e genética, compartilha uma distribuição geográfica ou habitat únicos; mas, tais caracteres nem sempre são o suficiente para o reconhecimento como espécie de acordo com qualquer um dos conceitos estabelecidos; notoriamente, trata-se de uma classificação subjetiva que designa uma entidade não real

(Wilson & Brown 1953; Cracraft 1983; Mayr 1996; Frankham et al. 2008). Da mesma forma, além da complexidade da evolução desses grupos não estar refletindo o conceito de subespécie, pode também não estar sendo representada pelas subjetivas tentativas de enquadrá-los em conceitos de espécie amplamente utilizados (biológico, morfológico, filogenético) (de Queiroz 1998). Dentre os mais de vinte conceitos de espécie descritos (Mayden 1997; Wilkins 2002; Taylor 2009) sabe-se que muitos deles não levam em consideração pressupostos biológicos importantes (como a evolução das espécies), com isso tornam-se mais uma fonte de confusão do que um auxílio ao entendimento dos organismos em questão (Donoghue 1985). Por outro lado, avaliar caracteres insuficientemente informativos, denota uma imperfeição de nosso método e sistema de observação e não do conceito utilizado (Wiley 1978). Por tais razões, é possível que os grupos biológicos aqui discutidos (*Inia g. geoffrensis* e *Inia g. humboldtiana*) já tenham se diferenciado, mas nós temos examinado caracteres arbitrários e enganosos em detectar tal diferenciação ou em designar tais grupos como monofiléticos ou não (Wiley 1981; Donoghue 1985; Knowles & Carstens 2007).

É importante considerar que uma espécie pode se dividir em duas evolutivamente independentes, e mesmo assim ambas podem não apresentar uma divergência significativa (Wiley 1978), pois tal divergência pode depender dos critérios/conceitos analisados (de Queiroz 2007). Uma espécie, dentro do conceito evolutivo proposto por Simpson (1951) e Wiley (1978, 1981), é uma linhagem de organismos que têm evoluído separadamente de outras, apresenta identidade própria em relação às outras comparadas, e possui suas próprias tendências evolutivas e destino histórico. Então, para avaliar se determinados grupos biológicos formam linhagens independentes e devem ou não pertencer a mesma espécie evolutiva, deve-se buscar provas adequadas de que eles têm evoluído independentemente ou não (Wiley 1981).

Realizar uma análise criteriosa sob diferentes genes é extremamente importante na busca por evidências adequadas da evolução de um grupo, uma vez que, determinar os limites entre espécies que divergiram recentemente pode não ser simples, tanto devido a pouca diferenciação, quanto devido a disparidade entre conjuntos de caracteres ou entre árvores de diferentes genes (Harrison & Larson 2014). Por tais razões, diante da incerteza

quanto a efetividade das prováveis barreiras geográficas, bem como ao pouco esclarecimento sobre o parafiletismo entre *Inia g. geoffrensis* e *Inia g. humboldtiana*; sob a luz do conceito evolutivo de espécie (Simpson 1951; Wiley 1978; Wiley 1981), este trabalho teve por objetivo testar se *Inia geoffrensis humboldtiana* representa uma unidade evolutiva independente das demais espécies e subespécie do gênero *Inia*, com base em análises moleculares do DNA mitocondrial e nuclear.

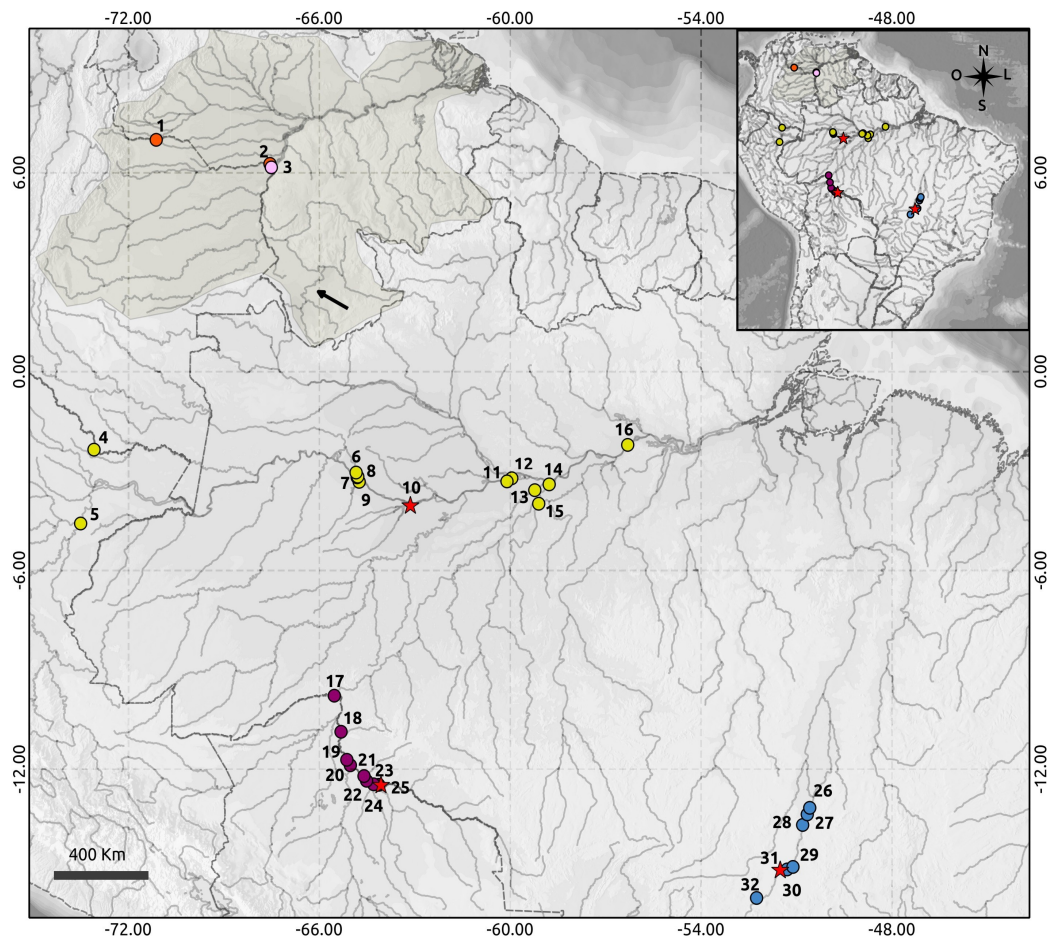
## MATERIAL E MÉTODOS

### AMOSTRAGEM

Para testar se existe unidade evolutiva independente em *Inia geoffrensis humboldtiana*, foram realizadas análises sob duas classes de marcadores moleculares, sendo um nuclear (10 *loci* microssatélites) e um mitocondrial (dois *loci*: citocromo *b* – Cytb e parte da região controle – Dloop), de amostras de todos os representantes do gênero. Para *Inia g. humboldtiana*, foram utilizadas oito amostras de tecido das seguintes localidades: rios Bitá (N=2), consideradas como representantes do alto/médio Orinoco, e Meta (N=1) e Arauca (N=5), consideradas como representantes do médio/baixo Orinoco (Figura 1; Material Suplementar: Tabela 1-A). Essas amostras foram cedidas pelo Laboratório de Ecología Molecular de Vertebrados Acuáticos (LEMVA) da Faculdade de Ciências da Universidad de Los Andes (Colômbia).

Para *Inia g. geoffrensis*, *Inia boliviensis* e *Inia araguaiaensis* foram utilizados os dados moleculares publicados por Gravena et al. (2014) e Hrbek et al. (2014), tais informações representam as localidades tipo dessas espécies (Figura 1; Material Suplementar: Tabela 1-A). O banco de dados das regiões de microssatélites de todas as espécies e os dados da região controle para *Inia araguaiaensis*, estão depositados no banco de dados moleculares do Laboratório de Evolução e Genética Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (LEGAL/ICB/UFAM). Os demais dados das sequências nucleotídicas, dos trabalhos acima mencionados, estão disponíveis na plataforma GenBank sob os seguintes números de acesso: KF657593 – KF657640 (*Inia boliviensis*), KF802316 – KF802348 (*Inia geoffrensis*), e KF802381 –

KF802412 (*Inia araguaiaensis*), regiões de citocromo *b*; KF657489 – KF657536 (*Inia boliviensis*), e KF802280 – KF802312 (*Inia geoffrensis*), regiões controle.



**Figura 1.** Mapa das localidades das amostras utilizadas por este estudo. Bacia do Orinoco: (1) Rio Arauca; (2) Puerto Carreño – Rio Meta; (3) Confluência Rio Bitá. Sistema Solimões/Amazonas: (4) Amazonas Colombiano - Rio Putumayo; (5) Rio Ucayali; (6) Mamirauá – Pagão; (7) Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; (8) Marchantaria/Alvarães; (9) Praia do Catitu/Tefé; (10) Coari/Rio Solimões; (11) Curari/Rio Solimões; (12) Marajá/Iranduba/Rio Solimões; (13) Paraná do Mamurí/Rio Mamurí; (14) Foz do Rio Madeira; (15) Foz do Rio Canumã; (16) Lago do Tracajá/Careiro/Rio Amazonas. Sub-bacia Boliviana: (17) Fortaleza do Abunã/Rio Abunã; (18) Rio Pakaás; (19) Boca do Lago Mercedes/Rio Mamoré; (20) Comunidade Surpresa/Rio Mamoré; (21) Foz do Rio Cautário; (22) Porto Acre/Rio Guaporé; (23) Porto França/Rio Guaporé; (24) Contra Fiado/Rio Guaporé; (25) Baía Grande/Rio Guaporé. Bacia Tocantins/Araguaia: (26) Lago Brito/Luiz Alves/Rio Araguaia; (27) Lago Montaria/Luiz Alves/Rio Araguaia; (28) Bandeirantes/Rio Araguaia; (29) Lago dos Cavalos/Aruanã/Rio Vermelho; (30) Fazenda São



Paulo/Itacaiu/Rio Araguaia; (31) Lago Jurumin/Rio Araguaia; (32) Barra do Garças/Rio Araguaia. A seta indica a localização do Canal Casiquiare. As estrelas indicam as localidades tipo das espécies de *Inia*. Mapa elaborado no *software* QGIS (QGIS Development Team 2014).

### **OBTENÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO**

A extração de DNA foi feita utilizando protocolo padrão para extração com fenol-clorofórmio segundo Sambrook e Russel (2001). De cada amostra foi retirado cerca de 2 a 3 mg de tecido, que foi digerido com o uso de 15 µl de Proteinase K, utilizando 500 µl de tampão STE e 75 µl de SDS a 10%. Posteriormente foram realizadas duas lavagens com 600 µl de fenol (pH > 8.0); uma lavagem com 600 µl de clorofórmio-álcool isoamílico; precipitação com 55 µl de NaCl a 5M e 1000 µl de álcool absoluto; uma última lavagem com 500 µl de álcool 70% e a ressuspensão do DNA em 50 µl de água deionizada autoclavada.

### *MICROSSATÉLITES (SSR – SAMPLE SEQUENCE REPEATS)*

Para a reação de amplificação das regiões de microssatélites foram utilizados os seguintes componentes: 4.6 µl de água deionizada autoclavada, 0.7 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25mM, 1.0 µl dNTP a 10mM, 1.0 µl *buffer* 10x (750 mM Tris-HCL-pH 8.8 a 25C°, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Tween 20), 0.7 µl do *primer reverse* a 2µM, 0.35 µl do *primer forward* a 2µM, 0.35 µl do *primer* M13 com a calda fluorescente a 2µM, e 0.3 µl de *Taq* polimerase a 1U/µl.

Foram utilizados sete (Ig2B1, Ig11B1, Ig8H1, Ig10E, Ig11D2, Ig3A1 e Ig7F2) *primers* de microssatélites desenvolvidos para o gênero *Inia* por Gravena et al. (2009), e três *primers* desenvolvidos para a espécie *Tursiops truncatus* por Caldwell et al. (2002) (TtruAAT40) e Rosel et al. (2005) (Ttr11 e Ttr48). Tais *primers* foram marcados de acordo com o método descrito por Schuelke (2000), que consiste na utilização de um *primer* universal (denominado M13) marcado com fluorescência que se anela ao *primer* específico da região microssatélite, possibilitando a leitura no sequenciador ABI3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®). O volume total de 10.0 µl de reação foi

alcançado adicionando 9.0 µl do *mix* preparado para a reação e 1.0 µl do DNA genômico de cada indivíduo, com concentração de 40 ng/µl.

O programa de amplificação teve os seguintes perfis de temperatura: 94°C por 60 segundos para aquecimento; seguido de 25 ciclos de 94°C por 30 segundos para desnaturação do DNA, anelando os *primers forward* e *reverse* de acordo com as temperaturas específicas (ver Caldwell et al. 2002; Rosel et al. 2005; e Gravena et al. 2009) por 30 segundos, com extensão a 68°C por 40 segundos; e 15 ciclos de 94°C por 20 segundos para desnaturação do DNA, anelando o *primer* M13 a 50°C por 30 segundos, com extensão a 72°C por 60 segundos; e para finalizar a extensão, 72°C por 30 minutos. Os produtos da amplificação de microssatélites foram submetidos ao gel de agarose (1%) com Gel Red e marcador de 100 pb, a fim de verificar se as regiões de interesse foram amplificadas.

Os fragmentos amplificados foram genotipados em um sequenciador ABI3130xl *Genetic Analyzer* (Applied Biosystems®) com auxílio de um marcador de peso molecular ROX pUC-19 modificado de DeWoody et al. (2004). Após a genotipagem, o tamanho dos alelos foi analisado com auxílio do programa *GeneMapper*® 4.0 (Applied Biosystems®). Posteriormente, foi montada uma matriz com os dados dos alelos de cada indivíduo, que foi utilizada para as análises estatísticas que descevo na seção “Análises” desta dissertação.

#### CITOCROMO B (CYTB) E REGIÃO CONTROLE (CR)

Para reação de amplificação dos marcadores mitocondriais foram utilizados os seguintes componentes: 5.8 µl de água deionizada autoclavada, 1.0 µl de *buffer* soro albumina a 1mg/µl (BSA), 1.8 µl de MgCl<sub>2</sub> a 25mM, 1.5 µl de *buffer* 10x (750 mM Tris-HCl-pH 8.8 a 25C°, 200 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 0.1% (v/v) Tween 20), 1.2 µl de dNTP a 10mM, 1.5 µl de cada *primer* (a 2pmol), e 0.3 µl de *Taq* polimerase a 1U/µl. Para a região controle foram aplicados os *primers* L-TRO (*forward*) e H-DH6 (*reverse*) (Banguera-Hinestroza et al. 2002). Para o sequenciamento total do Cytb foram utilizados os *primers* IniaGluF1 (*foward*) e IniaProR1 (*reverse*) (Gravena et al. 2014). Para todos os marcadores o volume

total de 15.0 µl de reação foi alcançado adicionando 14.0 µl do *mix* preparado para a reação e 1.0 µl de DNA genômico de cada indivíduo, com concentração de 40 ng/µl.

Os programas de amplificação tiveram os seguintes perfis de temperatura: 68°C por 60 segundos para aquecimento, seguido de 35 ciclos de 93°C por 10 segundos para desnaturação do DNA, 48°C por 35 segundos para anelamento dos *primers*, com extensão a 68°C por 90 segundos, e para finalizar a extensão, 68°C por 5 minutos. Os produtos da amplificação foram submetidos ao gel de agarose (1%) com Gel Red e marcador de 1 kb, a fim de verificar se a região de interesse foi amplificada. Posteriormente, as amostras foram purificadas com 4 µl de enzimas Exonuclease e Fosfatase alcalina (ExoSAP) (Werle et al. 1994), e foram submetidas às seguintes condições de ciclagem: 37 °C por 30 min, para ativar a atividade enzimática da ExoSap; e 80 °C por 15 min, para inativar a ExoSap.

Para as reações de sequenciamento foram utilizados os seguintes componentes: 4.5 µl de água deionizada autoclavada, 1.45 µl de tampão de sequenciamento (*buffer*), 0.3 µl de *mix* de sequenciamento (*ABI BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1*) disponível no *Kit Cycle Sequencing da Applied Biosystems<sup>®</sup>*, e 2.0 µl do *primer*. Sendo que, para cada *primer* foi feito um *mix*. Para a região controle foram utilizados os mesmos *primers* usados para a amplificação; e para o Cytb foram utilizados os *primers* internos IniaCytbF1 (*foward*), IniaCytbF2 (*foward*) e IniaCytbR1 (*reverse*) (Gravena et al. 2014). Os volumes totais de 10.0 µl de reação foram alcançados adicionando 8.0 µl do *mix* preparado para a reação e 2.0 µl do produto da amplificação purificado.

O programa de amplificação das reações de sequenciamento seguiu o protocolo recomendado pelo fabricante para o *mix* de sequenciamento *BigDye (Life Technologies)*, com temperatura de anelamento a 50 °C (Platt et al. 2007). Aos produtos da amplificação foram adicionados 2.5 µl de EDTA a 125mM e 30 µl de álcool 100% para reação de precipitação. Posteriormente, estes produtos foram analisados em um sequenciador *ABI3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems<sup>®</sup>)*.

As sequências geradas foram importadas para o programa *Geneious v. 6.1.3* (Drummond et al. 2012), onde com auxílio da interface gráfica para manipulação do

programa Clustal W (Thompson et al. 1994), foram alinhadas, de acordo com a homologia posicional das bases, e editadas manualmente. Com isso, foram estabelecidas as sequências individuais finais, que foram utilizadas para as análises estatísticas que descrevo a seguir.

## **ANÁLISES**

Para verificar se os indivíduos analisados efetivamente formam grupos biológicos distintos, foi utilizada uma análise Bayesiana através da análise da formação de *clusters* pelos marcadores microssatélites, cujo algoritmo básico foi descrito por Pritchard et al. (2000). O método utilizado por tal análise é capaz de identificar populações biológicas, bem como acessar os indivíduos mesmo quando há pouca informação sobre a estrutura populacional (Pritchard et al. 2000). Tais indivíduos são então agrupados de acordo com o compartilhamento de sistemas de acasalamento, mesmo utilizando um número relativamente baixo de *loci* (Pritchard et al. 2000).

Essa análise assume um modelo no qual há  $K$  populações (cujo número é definido previamente, neste trabalho testamos sete), que em seguida são testadas quanto a sua existência (teoricamente cada uma das quais seria caracterizada por um conjunto de frequências alélicas em cada *locus*) (Pritchard et al. 2000). Os indivíduos amostrados são acessados probabilisticamente para estas populações com base no genótipo que possuem, enquanto simultaneamente estima-se as frequências alélicas populacionais (Pritchard et al. 2000). Assume-se o equilíbrio de Hardy-Weinberg dentro das populações e desequilíbrio de ligação entre as populações; e, considera a existência de mais de uma população quando  $K$  for maior que 1 (Pritchard et al. 2000).

Para realizar tal análise, foram utilizados os modelos de mistura (*admixture model*) e de frequências alélicas correlacionadas entre populações (*correlated allele frequencies*). O primeiro, como o próprio nome sugere, permite que cada indivíduo possa apresentar uma característica genética não necessariamente exclusiva à apenas uma população, uma vez que esses organismos podem trazer consigo uma herança genética de ancestrais recentes derivados de mais de uma população (Falush et al. 2003). Já o

segundo modelo, assume que em populações relacionadas as frequências alélicas devem ser similares, sendo ele capaz de identificar populações que são subestruturadas uma vez que estrutura populacional gera desequilíbrio de ligação (Falush et al. 2003). Todos esses modelos foram então implementados na interface gráfica do programa *STRUCTURE* versão 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003; 2007).

Para cada valor de  $K$  testado, foram realizadas 1000 réplicas com valores de corte (*burn-in*) de 100,000 permutações, sob o método Monte Carlo via Cadeias de Markov. Repetiu-se dez vezes cada análise a partir de um ponto inicial diferente, selecionado aleatoriamente. Os *outputs* produzidos foram importados dentro do programa *STRUCTURE HARVESTER* 0.6.92 (Earl & VonHoldt 2012), onde os dados obtidos foram sintetizados. Essas dez corridas foram então permutadas no programa *CLUMP* 1.1.2 (Jakobsson & Rosenberg 2007), que avalia a similaridade de tais resultados e produz uma matriz final dos dados. Tal matriz foi analisada dentro do programa *DISTRUCT* 1.1 (Rosenberg 2004), onde foi elaborada a representação gráfica dos mesmos. O valor de  $K$  escolhido foi aquele maximizado *log-likelihood* ( $\log(P(X/K))$ ) do modelo, por esta ser frequentemente a melhor escolha para o número de populações de acordo com os modelos testados (Falush et al. 2003).

Para avaliar se *Inia g. humboldtiana* compõe uma linhagem independente das demais espécies e subespécies do gênero, foi reconstruída a genealogia de todos os grupos biológicos sugeridos pela análise anterior. Elaborar genealogias, a partir de dados genéticos de haplótipos de espécies proximamente relacionadas, possibilita acessar informações referentes a filogenética, genética populacional e filogeografia dos organismos em questão (Salzburger et al. 2011). Para reconstruir tais genealogias foram utilizadas sequências do citocromo *b* e da região controle de indivíduos representantes de todas espécies/subespécies do gênero.

Com as referidas sequências foi construída uma árvore filogenética usando o algoritmo filogenético de Máxima Verossimilhança através do software *PhyML* versão 3.0 (Guindon & Gascuel 2003), implementado no programa *Geneious* v. 6.1.3 (Drummond et al. 2012; Kearse et al. 2012), com *bootstrap* de 1000 reamostragens. O modelo de

evolução molecular mais apropriado para o banco de dados foi inferido usando a correção de Akaike (*Akaike Information Criterion*) (Akaike 1974) no programa *jModelTest* versão 2.1.5 (Darriba et al. 2012). A árvore obtida foi então importada para o programa *Haploviewer* (Salzburger et al. 2011), onde foi construída a árvore genealógica de haplótipos.

Para os grupos biológicos observados com base nos resultados da análise anterior, foram inferidos os caracteres diagnósticos (apomorfias), tanto para as sequências de citocromo *b* quanto para as da região controle. Essa análise foi conduzida na interface do *software* R versão 2.14.1 (R Core Team 2013), através do pacote *SPIDER*, cujas ferramentas permitem explorar e testar os dados moleculares para esse tipo de investigação taxonômica em nível de espécie (Brown et al. 2012).

Diante dos resultados das análises anteriores, por estes apresentarem dois grupos diferentes dentro de *Inia g. humboldtiana* (*Inia humboldtiana* stat. nov. e *Inia* aff. *geoffrensis*), optou-se por utilizar na análise Bayesiana para construir a árvore filogenética e estimar o tempo de divergência das linhagens, um indivíduo de cada um desses grupos, sendo um do Rio Bitá (alto/médio Orinoco) e um do Rio Arauca (médio/baixo Orinoco). Esta análise foi realizada com o propósito de verificar o tempo de divergência entre os grupos biológicos estudados. Para tal, além de incluir um indivíduo de cada linhagem de *Inia* da bacia do Orinoco, também utilizamos um indivíduo representativo de cada um dos demais grupos biológicos do gênero (*I. geoffrensis* da Amazônia Central, *I. araguaiaensis* e *I. boliviensis*).

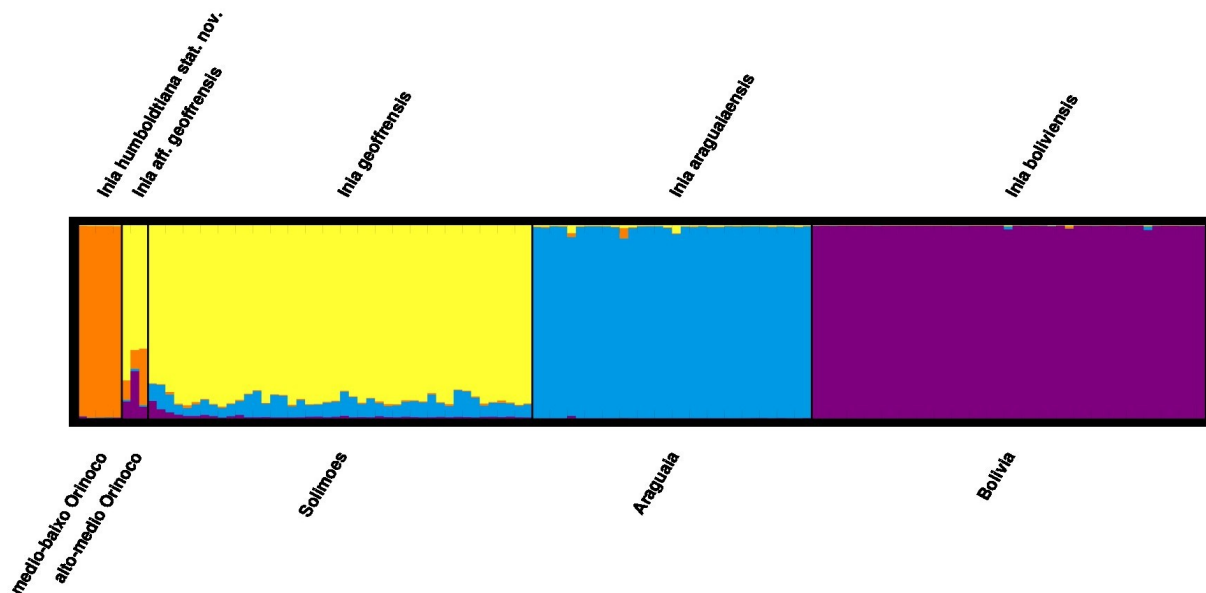
Nesse tipo de análise é necessário que sejam incluídos pontos de calibração, que permitirão datar a divergência entre os taxa analisados. Os pontos de calibração foram considerados com base na inserção de taxa que resultaram de eventos de diversificação para os quais existem registros fósseis robustos (datação conhecida), também foram consideradas as taxas de divergência do citocromo *b*. As calibrações foram realizadas no programa *BEAST* versão 1.7.1 (Drummond & Rambaut 2007), com tempos de divergência com distribuições lognormal. Todos os parâmetros utilizados nesta análise seguiram aqueles utilizados por Hrbek et al. (2014) para datar os tempos de divergência entre *Inia*

*araguaiaensis* e as demais linhagens do gênero conhecidas até então. A árvore obtida foi visualizada no software *FigTree* (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree>), onde também foi elaborada a representação gráfica da mesma.

## RESULTADOS

Um total de 143 indivíduos foram analisados, utilizando os dez *loci* de microssatélites, sendo 8 indivíduos de *I. g. humboldtiana*, 44 de *I. g. geoffrensis*, 45 de *I. boliviensis* e 32 de *I. araguaiaensis*. Apesar do alto número amostral, a quantidade de indivíduos utilizados por análise variou em função da disponibilidade de dados para as mesmas (para informações detalhadas ver Material Suplementar: Tabela 1-A). Para as sequências de citocromo *b* foram obtidos 1140 pares de bases de 7 indivíduos de *Inia g. humboldtiana*; que foram analisados com 35 sequências de *I. g. geoffrensis*, 48 de *I. boliviensis* e 32 de *I. araguaiaensis*, de igual tamanho, obtidas do banco de dados do GenBank. Para as sequências da região controle, foram obtidos 621 pares de bases de 8 indivíduos de *Inia g. humboldtiana*; que foram comparados com 19 de *I. g. geoffrensis*, 48 de *I. boliviensis* e 33 de *I. araguaiaensis*, também obtidas do banco de dados do GenBank.

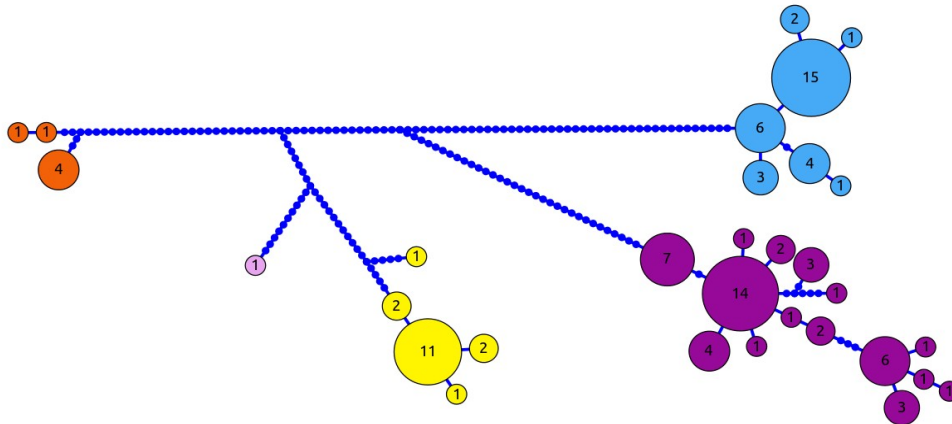
O método de agrupamento Bayesiano realizado no programa *STRUCTURE* resultou em um *K* igual a 4 (Figura 2) e probabilidade  $\text{LnP}(K = 4) = -2162.88$  (Material Suplementar: Figura 1-A; Tabela 1-B), como a melhor probabilidade para explicar o número de grupos biológicos (*clusters*) obtidos. Os dados indicam a existência dos seguintes grupos biológicos: *Inia g. humboldtiana* (bacia do Orinoco), *I. geoffrensis* (Amazônia Central), *I. araguaiaensis* (bacia Araguaia/Tocantins) e *Inia boliviensis* (sub-bacia Boliviana). Dentro do agrupamento *Inia g. humboldtiana* é perceptível a existência de dois sub-grupos biológicos, sendo um homogêneo, correspondendo aos indivíduos do do Rio Arauca (médio/baixo Orinoco); e outro claramente heterogêneo, possuindo uma mistura alélica de todos os *clusters* obtidos, composto pelos indivíduos dos rios Bitá e Meta (alto/médio Orinoco).



**Figura 2.** Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). A análise foi realizada sob 10 *loci* de microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco (5 de *Inia humboldtiana stat. nov.* e 3 de *Inia aff. geoffrensis*), 44 de *I. geoffrensis*, 45 de *I. boliviensis* e 32 de *I. araguaiaensis*. No gráfico cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada uma das cores indica um *cluster* (grupo biológico) baseado em semelhanças genotípicas. O nome das espécies/subespécie e área correspondente são mostrados acima e abaixo da figura, respectivamente.

Para a construção da árvore de máxima verossimilhança, o modelo de evolução molecular que melhor se ajustou aos dados foi HKY+I (-lnL 3685.7294, AICc 7847.6793). A partir desta árvore foi construída a árvore genealógica de haplótipos (Figura 3), que mostra claramente dois grupos dentro da bacia do Orinoco; sendo uma linhagem composta pelos indivíduos dos rios Meta e Arauca (médio/baixo Orinoco); e a outra composta por um indivíduo do Rio Bitá (alto/médio Orinoco). Tais linhagens estão desassociadas das demais do gênero por uma série de passos mutacionais, sendo a primeira (médio/baixo Orinoco) muito mais distante das demais do que a segunda (alto/médio Orinoco), que por sua vez está muito mais próxima de *Inia geoffrensis* da Amazônia Central do que da linhagem do médio/baixo Orinoco.





**Figura 3.** Rede de haplótipos elaborada no programa *Haploviewer* (Salzburger et al. 2011), com base em árvore de máxima verossimilhança construída a partir de sequências concatenadas de citocromo *b* (1140 pares de bases) e região controle (621 pares de base) do DNA mitocondrial. Os números no interior de cada haplótipo representam o número de indivíduos que o compartilham. Os indivíduos da bacia do Orinoco compõem distintos grupos de haplótipos, sendo em laranja os indivíduos dos rios Meta e Arauca (*Inia humboldtiana* stat. nov.) e em rosa um indivíduo do alto Orinoco (*Inia* aff. *geoffrensis*). Haplótipos em amarelo, roxo e azul representam *Inia geoffrensis*, *I. boliviensis* e *I. araguaiaensis*, respectivamente.

Todos os grupos observados pela análise anterior apresentam caracteres em estado apomórfico, tanto para o citocromo *b* quanto para a região controle (Tabela 1). A linhagem do médio/baixo Orinoco (*Inia humboldtiana* stat. nov.) possui 11 caracteres em estado apomórfico para a região de citocromo *b* e 6 para a região controle do DNA mitocondrial. A segunda linhagem observada para a bacia do Orinoco, do alto/médio Orinoco (*Inia* aff. *geoffrensis*), apresenta 4 caracteres em estado apomórfico para o citocromo *b* e 5 para a região controle. Enquanto que *Inia geoffrensis* possui 4 caracteres diagnósticos no citocromo *b* e 1 na região controle; *Inia boliviensis* apresenta 20 para o citocromo *b* e 9 para a região controle; e *Inia araguaiaensis* possui 24 para o citocromo *b* e 7 para a região controle.

**Tabela 1.** Caracteres diagnósticos (apomorfias) para os grupos biológicos observados em *Inia* das bacias do Orinoco (*Inia humboldtiana* stat. nov. e *Inia* aff. *geoffrensis*), Amazônica (*Inia geoffrensis*), Tocantins/Araguaia (*Inia araguaiaensis*) e sub-bacia Boliviana (*Inia boliviensis*), baseados em sequências do citocromo *b* e da região controle do DNA mitocondrial.

<b>A – caracteres diagnósticos para o citocromo <i>b</i></b>					
<b>Caráter</b>	<b><i>Inia humboldtiana</i> stat. nov.</b>	<b><i>Inia</i> aff. <i>geoffrensis</i></b>	<b><i>Inia</i> <i>geoffrensis</i></b>	<b><i>Inia</i> <i>araguaiaensis</i></b>	<b><i>Inia</i> <i>boliviensis</i></b>
38	T	T	T	T	C
45	T	T	T	C	T
51	A	A	A	T	A
66	C	T	T	T	T
102	T	C	C	C	C
129	T	C	C	C	C
144	T	C	C	C	C
165	C	C	C	C	T
169	C	T	C	C	C
186	C	C	C	C	T
201	T	T	T	C	T
210	C	C	C	C	T
240	G	A	A	A	A
243	T	T	C	T	T
244	T	T	T	C	T
264	C	C	C	C	T
282	T	T	T	T	C
288	T	T	C	T	T
294	C	T	T	T	T
306	G	G	G	A	G
365	T	T	T	C	T
384	T	T	T	T	C
471	T	C	C	C	C
480	A	A	A	A	G
555	C	C	C	C	T
569	C	C	C	T	C
576	A	A	A	G	A
582	T	T	T	T	C
585	G	A	G	C	A

589	C	C	C	T	C
633	C	C	C	C	T
654	C	C	C	T	C
657	A	A	A	T	A
693	A	A	A	A	G
699	T	T	T	T	C
702	A	A	A	G	A
724	T	T	T	C	T
744	<b>T</b>	C	C	C	C
745	C	C	C	C	T
753	A	A	A	A	G
770	C	C	C	C	T
771	C	C	C	T	C
792	C	C	C	T	C
801	C	C	C	C	T
804	<b>T</b>	C	C	C	C
813	G	G	G	A	G
816	G	G	G	G	A
819	T	T	C	T	T
825	G	G	G	A	G
850	A	A	A	A	G
867	A	A	A	G	A
870	A	A	A	A	G
891	C	C	T	C	C
979	A	A	A	A	G
1008	<b>G</b>	C	C	C	C
1020	C	C	C	C	T
1041	C	C	C	C	T
1047	C	C	C	T	C
1065	C	<b>T</b>	C	C	C
1066	A	A	A	A	C
1128	T	<b>C</b>	T	T	T
1181	G	<b>A</b>	G	G	G

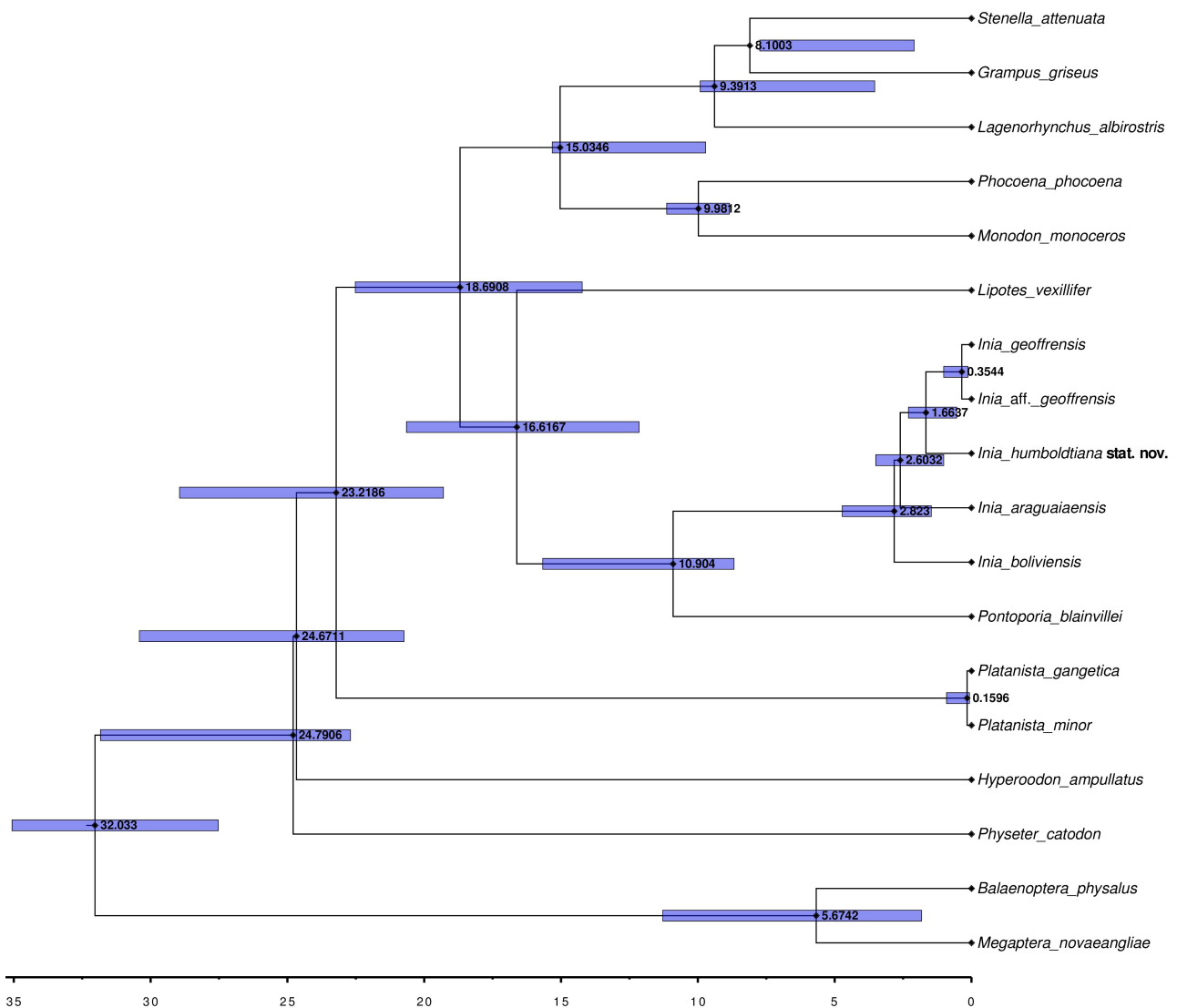
1226      **C**      T      T      T      T

**B – caracteres diagnósticos para região controle**

<b>Caráter</b>	<i>Inia humboldtiana</i> stat. nov.	<i>Inia aff.</i> <i>geoffrensis</i>	<i>Inia</i> <i>geoffrensis</i>	<i>Inia</i> <i>araguaiaensis</i>	<i>Inia</i> <i>boliviensis</i>
51	A	A	A	G	A
54	G	G	G	G	A
55	C	C	C	T	C
57	G	G	G	G	A
58	T	T	T	T	C
75	C	C	C	C	T
84	<b>G</b>	A	A	A	A
93	<b>G</b>	A	A	A	A
96	C	<b>T</b>	C	C	C
108	T	T	T	T	C
129	A	A	A	A	G
134	T	T	T	T	C
136	C	C	C	T	C
143	G	G	G	A	G
157	C	C	C	C	T
158	C	C	C	C	T
165	<b>G</b>	A	A	A	A
166	C	C	T	C	C
169	<b>G</b>	A	A	A	A
171	T	<b>C</b>	T	T	T
211	<b>C</b>	A	A	A	A
259	T	<b>C</b>	T	T	T
275	T	T	T	C	T
276	T	<b>C</b>	T	T	T
300	<b>G</b>	A	A	A	A
351	C	C	C	T	C

504	C	C	C	T	C
568	T	C	T	T	T

A análise Bayesiana para verificar o tempo de divergência entre *Inia* da bacia do Orinoco e os demais membros do gênero, mostrou uma datação comparável à divergência já conhecida para as demais espécies do gênero apresentada por Hrbek et al. (2014) (Figura 4). A árvore mostra que o tempo de divergência entre a linhagem *Inia boliviensis* e o ramo que dá origem as demais é de 2.82 milhões de anos (95% HPD 1.467-4.724 milhões de anos). *Inia araguaiaensis* diverge do ramo que dá origem a *I. humboldtiana* stat. nov. em 2.60 milhões de anos (95% HPD 1.013-3.499 milhões de anos). Este por sua vez, diverge do clado *Inia* aff. *geoffrensis* (alto/médio Orinoco) e sua linhagem irmã, *Inia geoffrensis* (Amazônia Central), em 1.66 milhões de anos (95% HPD 0.536-2.305 milhões de anos). Essas linhagens deste último clado divergiram a 354 mil anos (95% HPD 0.125-1.0148 milhões de anos).



**Figura 4.** Análise filogenética Bayesiana e estimativa do tempo de divergência através do *BEAST* v. 1.7.1 (Drummond & Rambaut 2007), usando sequências do gene citocromo *b* (1140 pares de bases) do DNA mitocondrial. Os números nos nós representam estimativas de tempo de divergência com a maior probabilidade posterior, e as barras em lilás representam 95% da maior densidade posterior da estimativa.

Pilleri e Gihl (1977) analisaram seis medidas do crânio de quatro espécies de *Inia* da localidade de San Fernando de Apure, Rio Apure, Venezuela; um indivíduo mencionado como sendo da Guiana Francesa\* (com localidade não identificada); um indivíduo do Rio Duda, Serra de La Macarena, Departamento de Meta; dois indivíduos do

\*O espécime certamente não pertence a área mencionada, uma vez que a distribuição do gênero nunca foi confirmada para os rios que drenam na Guiana Francesa.

Rio Guaviare; e vários espécimes de diferentes regiões da bacia Amazônica (incluindo a sub-bacia Boliviana). Os autores concluíram que *Inia* da bacia do Orinoco (incluindo o indivíduo designado como pertencente a Guiana Francesa) seria um grupo biológico diferente das demais subpopulações do gênero, e o denominaram *Inia geoffrensis humboldtiana*. Posteriormente, Pilleri et al. (1982) consideraram que *Inia g. humboldtiana* ocorreria apenas na área que se estende desde o Rio Guaviare até o delta do Orinoco. Diante dos resultados das análises apresentadas aqui, nós inferimos que os indivíduos que compõem a verdadeira linhagem *humboldtiana* estão distribuídos ao longo do médio/baixo Orinoco, mas com início de sua distribuição a partir do Rio Meta. Por isso, para tal população (médio/baixo Orinoco), propomos um novo tratamento taxonômico.

#### TRATAMENTO TAXONÔMICO

Ordem Cetartiodactyla Montgelard, Catzeflis & Douzery, 1997

Cetacea Brisson, 1762

Odontoceti Flower, 1867

Iniidae Gray, 1846

*Inia* d'Orbigny, 1834

*Inia humboldtiana* stat. nov. (Pilleri & Gühr 1977)

#### *Etimologia*

O nome científico foi designado por Pilleri e Gühr (1977) em memória ao cientista e explorador do Orinoco Alexander Von Humboldt. Na Colômbia e Venezuela, a espécie é conhecida como tonina del Orinoco, tonina rosada, tonina rosada del Orinoco e bufeo colorado (Portocarrero-Aya et al. 2010).

### *Holótipo*

Crânio de uma fêmea, depositado no Museu de Ciências de Caracas, Caracas, Venezuela, sob número de coleção MBUCV 1-135 (Trebbaú & Van Bree 1974; Pilleri & Gihl 1977). Coletado no Rio Apure, em San Fernando de Apure, Venezuela, por Trebbaú em 14 de maio de 1966 (Pilleri & Gihl 1977).

### *Paratipos*

Três crânios, coletados por Trebbaú e Van Bree (1974) em San Fernando de Apure, Venezuela, também estão depositados no Museu de Ciências de Caracas, Caracas, Venezuela, sob números de coleção MCN b, MCN d e MCN e (Pilleri & Gihl 1977).

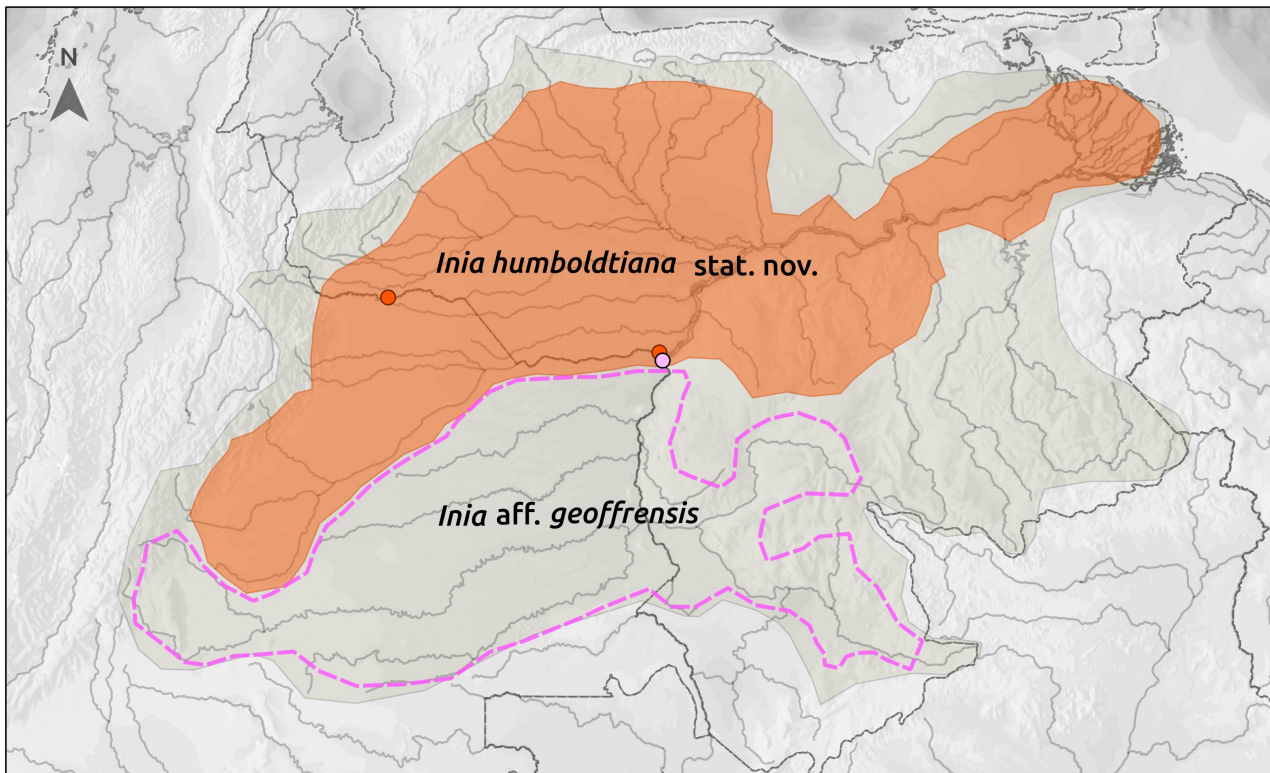
### *Material examinado*

O DNA de seis indivíduos foi examinado (Apêndice A). A biópsia dos tecidos destes animais foi realizada durante resgate dos mesmos em canais que se desconectaram dos rios Arauca e Meta.

### *Distribuição*

*Inia humboldtiana* stat. nov. deve ocorrer na região média e baixa da bacia do Orinoco, com início de sua distribuição abaixo das corredeiras de Atures (Figura 5). A espécie provavelmente distribuiu-se por toda essa área, o que inclui o canal principal do Rio Orinoco, e todos os seus grandes e pequenos tributários como os rios Meta, Cinaruco, Capanaparo, Arauca, Apure (rios Portuguesa, Guanare e Guaritico), baixo Rio Caura e a região do delta do Orinoco (Pilleri & Gihl 1977; Meade & Koehnken 1991; Portocarrero-Aya et al. 2010; Trujillo et al. 2010). *Inia* não habita as águas da região média e alta dos rios Caura e Caroní, por estes possuírem grandes cachoeiras, as Cataratas Para e as Cataratas La Llovizna, respectivamente (Meade & Koehnken 1991).





**Figura 5.** Provável distribuição geográfica de *Inia humboldtiana* stat. nov. (regiões média e baixa da bacia do Orinoco), e de *Inia* aff. *geoffrensis* (regiões alta e média da bacia do Orinoco). Mapa elaborado no software QGIS (QGIS Development Team 2014).

### *Caracteres diagnósticos*

*Inia humboldtiana* stat. nov. difere dos demais representantes do gênero por possuir os seguintes caracteres únicos (em estado apomórfico): 11 sítios diagnósticos para a região de citocromo *b* e 6 para a região controle do DNA mitocondrial (Tabela 1). Além disso, o número de dentes por ramo em indivíduos de *I. humboldtiana* varia entre 24-26, enquanto que em *Inia geoffrensis* essa variação é de 25-31, em *Inia araguaiaensis* de 24-28, e em *Inia boliviensis* de 31-35 (Pilleri & Gihl 1977; da Silva 1994; Hrbek et al. 2014).

## DISCUSSÃO

Os resultados aqui apresentados (grupos biológicos, árvores filogenéticas baseadas em máxima verossimilhança e em análise Bayesiana e os caracteres diagnósticos), corroboram entre si ao identificar que os indivíduos da bacia do Orinoco representam um grupo biológico disassociado dos demais membros do gênero. Tanto os *clusters*, quanto as árvores filogenéticas de máxima verossimilhança (redes de haplótipos), concordam com o fato de existirem dois grupos biológicos dentro de *Inia geoffrensis humboldtiana*. Indivíduos pertencentes a esses diferentes grupos possuem caracteres apomórficos, tempos de divergência e posicionamento na árvore filogenética Bayesiana semelhantes ao padrão observado nas análises anteriores. Esse cenário, além de mostrar a existência de linhagens independentes dentro de *Inia geoffrensis* ssp., permitiria delimitá-las como espécies diferentes?

A delimitação de espécies é um dos tópicos que tem crescente interesse na Biologia Evolutiva (Camargo & Sites 2013), por estar diretamente ligada à compreensão da diversidade taxonômica, que é um problema fundamental dessa ciência (Cracraft 1983). Não existe uma definição universalmente aceita, e novas têm sido propostas continuamente, o que denota a não concordância geral sobre o que é uma espécie (de Queiroz 1998). Essa “diversidade de definições alternativas de espécie está diretamente relacionada à diversidade de eventos ou subprocessos que ocorrem durante o processo de especiação” (de Queiroz 1998: 64). Os processos de especiação (mutação, seleção natural, migração e deriva genética) afetam diversas características de um organismo (sejam elas genéticas, morfológicas, fisiológicas ou comportamentais), mas não necessariamente em uma ordem regular (de Queiroz 2007). Por isso, quando uma espécie é identificada sob um determinado critério, pode frequentemente não ser por outro (Knowles & Carstens 2007). Embora haja uma concordância geral sobre a natureza de espécie (Cracraft 1983; de Queiroz & Donoghue 1988), existem muitas definições que são incompatíveis. No entanto, os conceitos modernos (conceitos fenético, biológico, filogenético e *cluster* genotípico) possuem um elemento comum (implícito ou explícito) ao considerar espécies como segmentos de linhagens em nível populacional (de Queiroz 1998; 2007).

Uma linhagem, portanto, “não tem que ser feneticamente distinguível, diagnosticável, intrinsecamente isolada reprodutivamente, ecologicamente divergente, ou qualquer outra coisa para ser considerada espécie. Ela apenas precisa estar evoluindo separadamente de outras linhagens” (de Queiroz 2007: 882). Este conceito unificado proposto por de Queiroz (1998; 2007) é semelhante às definições de Simpson (1951) e Wiley (1978), porque ambos não incluem critérios operacionais (linhas de evidência que seriam utilizadas para as aplicações empíricas) (de Queiroz 2007). Nesse sentido, Cracraft (1983) afirma que é importante ver o conceito de espécie por uma perspectiva do resultado da evolução, e não dos processos para produzir tais resultados.

Para Simpson (1951) e Wiley (1978, 1981) o resultado da evolução revela uma espécie como uma linhagem de organismos que têm evoluído separadamente de outras, apresenta identidade própria em relação àquelas comparadas, e possui suas próprias tendências evolutivas e destino histórico. Sob esse ponto de vista, as evidências aqui apresentadas permitem concluir que os indivíduos da área próxima à localidade tipo de *Inia geoffrensis humboldtiana* (que aqui representam a região médio/baixo Orinoco) claramente constituem uma espécie. Esses botos compõem uma linhagem que está completamente separada das demais espécies/subespécie do gênero; pois possui conjunto de alelos e haplótipos próprios e divergiu a 1.66 milhão de anos. Portanto, consideramos o taxon válido e estabelecemos que o mesmo deve ser elevado ao nível de espécie *Inia humboldtiana* stat. nov. (Pilleri & Gihl 1977).

Ademais, outros conceitos de espécie corroboram para o resultado que propomos aqui. De acordo com o conceito genético de espécie (que é uma operacionalização do conceito biológico) (Dobzhansky 1950; Mayden 1997), o isolamento reprodutivo e a independência evolutiva permitem diagnosticar uma espécie. Tais critérios estão representados nesta população pelas medidas das diferenças genéticas deste grupo de indivíduos (caracteres diagnósticos herdáveis, Tabela 1), que se reproduzem entre si e compartilham um *pool* gênico comum. Por possuir múltiplos traços genéticos independentes, esta unidade populacional também pode ser reconhecida como um taxon filogenético; sendo considerada uma espécie de acordo com os critérios estabelecidos pelo conceito genealógico de espécie (Avice & Wollenberg 1997). Por fim, tal qual as

demais espécies do gênero, *Inia humboldtiana* stat. nov. também exibe um padrão ancestral e descendente. Nesse sentido, de acordo com o conceito filogenético de espécie (Eldredge & Cracraft 1980; Cracraft 1983; Wheeler & Platnick 2000), esses grupos biológicos observados são o resultado de processos de especiação que conduziram a um "desenvolvimento filogenético de diferenciação de unidades taxonômicas através do espaço e do tempo" (Cracraft 1983: 160).

#### LINHAS DE EVIDÊNCIA PARA *INIA HUMBOLDTIANA* STAT. NOV.

A análise Bayesiana de agrupamento sugeriu quatro grupos biológicos (*clusters*) dentro do gênero *Inia*: *Inia humboldtiana* stat. nov., *Inia geoffrensis*, *I. araguaiaensis* e *I. boliviensis* (Figura 2). Entre os indivíduos da bacia do Orinoco observa-se ainda uma abrupta divisão, onde é possível identificar indivíduos que compõem um grupo homogêneo (médio/baixo Orinoco, Rio Arauca) e indivíduos com características de mistura (alto e médio Orinoco, rios Bitá e Meta). O modelo de mistura (*admixture model*) assumido na análise (Falush et al. 2003) permitiu identificar tais indivíduos não homogêneos, com características genéticas de mais de uma população. Essa miscigenação observada pode ser devido ao fato de que os limites entre essas diferentes linhagens ainda não estão completamente estabelecidos, podendo ser semi-permeáveis.

O que provavelmente delimita a distribuição das duas linhagens da bacia do Orinoco são duas importantes corredeiras, chamadas de Maipures e Atures, localizadas no Rio Orinoco abaixo da junção do Rio Tomo e acima da junção do Rio Meta, respectivamente (Silva-León 2005; Winemiller & Willis 2011). Essas corredeiras têm ao menos restringido o fluxo gênico entre os indivíduos do alto e médio Orinoco, uma vez que botos podem ser observados não apenas acima e abaixo de tais corredeiras, mas também entre ambas (Meade & Koehnken 1991). Botos são capazes de passar extensas corredeiras na época da cheia (Best & da Silva 1989b). Porém, somente uma análise de mais indivíduos permitiria compreender melhor como a diferenciação genética se mantém nesses taxa parapátricos (Harrison & Larson 2014); bem como definir com clareza se a região do Rio Meta seria uma área de contato entre essas diferentes linhagens, tal qual a

localidade de Borba (baixo Madeira) é para *I. geoffrensis* e *I. boliviensis* (Gravena et al. 2014).

A árvore haplotípica (Figura 3), também reconheceu dois grupos dentro de *Inia* da bacia do Orinoco, sendo estes formados por quase os mesmos indivíduos sugeridos pela análise anterior. Mas, nesta análise o indivíduo do Rio Meta é agrupado com os indivíduos do Rio Arauca, compondo o grupo do médio/baixo Orinoco, que é claramente um ramo diferente das demais espécies/subespécie do gênero, estando separados por vários passos mutacionais. O indivíduo do Rio Bitá (alto/médio Orinoco) também apresenta conjunto de haplótipos próprios, mas está separado de *Inia geoffrensis* por menos passos mutacionais do que os dos rios Meta e Arauca (médio/baixo Orinoco). Com isso, consideramos que a afirmação de Pilleri et al. (1982) de que os botos do alto Orinoco (acima do Rio Guaviare) pertenceriam a subespécie *I. g. geoffrensis*, deve estar correta; uma vez que nós observamos que os indivíduos do Rio Bitá compreendem uma linhagem de *Inia* muito próxima de *Inia geoffrensis* da bacia Amazônica do que de *Inia humboldtiana* stat. nov.

Tal qual observamos através destes dados, o estudo de Banguera-Hinestroza et al. (2002) também demonstrou que os botos da bacia do Orinoco possuem identidade genética própria, com conjunto de haplótipos não compartilhados com indivíduos da bacia Amazônica. Os autores também mencionaram a existência de duas linhagens para a bacia do Orinoco, sendo derivadas de uma linhagem da bacia Amazônica. Mas, apesar de sugerirem que a ausência de haplótipos compartilhados possa ser devido a múltiplos eventos de isolamento genético como um mecanismo para geração tais haplótipos, os referidos autores não concordam que os botos da bacia do Orinoco devam ser considerados uma linhagem diferente dos da bacia Amazônica. Todavia, o não compartilhamento de haplótipos é uma forte evidência da inexistência de fluxo gênico entre tais grupos biológicos, e tal condição é um dos componentes do processo de divergência que permite distinguir entre uma espécie e uma diferenciação em nível populacional (Camargo & Sites 2013).

Outro componente importante para se distinguir entre uma espécie e uma diferenciação em nível populacional é o tempo de divergência entre os grupos analisados (Camargo & Sites 2013). Identificar quando as linhagens evolutivas se separaram é um critério (embora não explícito) do conceito evolutivo de espécie (critério de divisão inicial) (de Queiroz 1998). A divergência entre *Inia humboldtiana* stat. nov. e o clado *Inia geoffrensis* (Amazônica Central) e *Inia* aff. *geoffrensis* (alto/médio Orinoco), revelada pela análise Bayesiana, é de 1.66 milhão de anos (95% HPD 0.536-2.305 milhões de anos) (Figura 4). Já entre as linhagens desse clado é de 354 mil de anos (95% HPD 0.125-1.0148 milhões de anos).

Essa análise também mostra os tempos de divergência entre as demais espécies do gênero, que permitem inferir que todas elas, indubitavelmente, têm uma história evolutiva independente. Dentre tais espécies, a divergência mais antiga é entre a linhagem *Inia boliviensis* e o ramo que dá origem às demais, datando de 2.82 milhões de anos. Seguido da linhagem *Inia araguaiaensis*, que diverge em 2.60 milhões de anos do ramo que dá origem a *Inia humboldtiana* stat. nov e o clado *Inia geoffrensis* e *Inia* aff. *geoffrensis*. Essas datações confirmam que as atuais espécies do gênero divergiram entre o final do Plioceno e meados do Pleistoceno, como proposto por Hrbek et al. (2014).

Recentemente, Hrbek et al. (2014) descreveram a espécie *Inia araguaiaensis* e propuseram tempos de divergência entre todas as espécies conhecidas do gênero. Os autores sugeriram 2.86 milhões de anos como tempo de divergência entre o clado *Inia boliviensis* e o ramo que dá origem aos clados *Inia geoffrensis* e *Inia araguaiaensis*, estes por sua vez teriam se diferenciado a 2.07 milhões de anos. Ao incluirmos as linhagens da bacia do Orinoco na análise, os resultados obtidos são similares aos de Hrbek et al. (2014), bem como trazem informações complementares sobre os tempos de divergência entre as linhagens do gênero, apresentadas por tais autores. Porém, uma comparação com espécies válidas de um grupo relacionado reforçaria ainda mais a evidência (Frankham et al. 2008) de que *Inia* do médio/baixo Orinoco é uma espécie diferente de *Inia geoffrensis*.

Os tempos de divergência entre algumas espécies irmãs da família Delphinidae são muito menores do que é reportado aqui entre *I. humboldtiana* stat. nov. e o ramo que dá origem ao clado de *Inia geoffrensis* (Amazônica Central) e *Inia* aff. *geoffrensis* (alto/médio Orinoco). *Sotalia fluviatilis* e *Sotalia guianensis* divergiram entre 1-1.2 milhão de anos (Caballero et al. 2007). Entre *Cephalorhynchus eutropia* e *C. commersonii* a divergência data de 0.82 milhão de anos, entre *Globicephala melas* e *G. macrorhynchus* data de 0.67 milhão de anos, e entre *Delphinus delphis* e *D. capensis* data de 0.66 milhão de anos (McGowen et al. 2009). É notório que Iniidae tal qual Delphinidae parece ser um dos taxa mais especiosos dentro de Cetacea, que por sua vez, dentre os atuais mamíferos aquáticos, é o grupo mais especioso (McGowen et al. 2009).

Os tempos de divergência entre as linhagens da bacia do Orinoco e as demais espécies de *Inia*, são posteriores aos eventos geológicos que separaram as bacias do Amazonas e do Orinoco; e àqueles que deram início à evolução das condições hidrológicas atuais dentro desta última bacia. A separação entre essas duas bacias data entre 8 e 11 milhões de anos (Mioceno tardio), e ocorreu com o soergimento do arco do Vaupes, que se estendeu do oeste do escudo das Guianas até as proximidades da Serra de Macarena, Colômbia (Lundberg et al. 1998; Machado-Allison 2008; Wesselingh & Hoorn 2011; Winemiller & Willis 2011).

Apesar de ainda não compreendermos claramente se e como a evolução geológica pode ter influenciado a história de tais grupos biológicos, é evidente que esses golfinhos de água doce exclusivamente sulamericanos possuem uma série de especializações peculiares que têm sido fundamentais para entender os aspectos biológicos, ecológicos e evolutivos desses grupos (Pilleri & Gahr 1977; Sylvestre 1985; Best & da Silva 1989b; da Silva 1994; Cassens et al. 2000; Martin et al. 2006; Santos et al. 2012). Certamente as características físicas dos botos têm permitido ao longo dos milhares de anos de evolução dessas espécies uma diferenciação das mesmas conforme a área em que habitam. Além disso, a possível inexistência de uma barreira geográfica efetiva entre tais taxa, também sugere que outras forças evolutivas (deriva, seleção natural ou sexual) possam estar atuando na divergência dos mesmos.

As características genéticas confirmam a divergência dos grupos analisados, mas não excluem a importância de se utilizar outras linhas de evidências para delimitar a espécie em questão (de Queiroz 2007; Knowles & Carstens 2007; Camargo & Sites 2013). Por isso, ressaltamos aqui que os indivíduos que identificamos como *Inia humboldtiana* stat. nov. (região média/baixa da bacia do Orinoco), além de possuírem diferenças no número de dentes comparados às demais espécies (Pilleri & Gehr 1977; da Silva 1994), também apresentam aspectos comportamentais peculiares. Os botos observados na confluência do Rio Meta produzem cliques de mandíbula na superfície da água (aparentemente relacionados com comportamento agressivo), possuem tamanhos de grupos maiores, grupos reprodutivos grandes e com interações agressivas, e maiores atividades aéreas com saltos e exposição das aletas caudal e peitoral do que os botos da bacia Amazônica (Trujillo, comunicação pessoal; Fuentes et al. 2004; Gomez-Salazar et al. 2012). Além disso, esses botos apresentam frequência dos sons emitidos significativamente diferente daquelas de *Inia geoffrensis*, além de possuírem um som do tipo assobio exclusivo (Diazgranados, comunicação pessoal; Diazgranados & Trujillo 2004).

Ao utilizarmos diferentes linhas de evidência (marcadores moleculares do DNA mitocondrial e nuclear; dados comportamentais e morfológicos disponíveis na literatura) para inferir que *Inia humboldtiana* stat. nov. representa uma unidade evolutiva independente das demais espécies do gênero, seguimos as recomendações de Reeves et al. (2004), apresentadas durante um *workshop* sobre taxonomia de cetáceos. Segundo os autores, para validar uma espécie é necessário que sejam empregadas diferentes abordagens com a finalidade de identificar através dos grupos analisados uma “divergência irreversível”. Nesse sentido, tanto os dados morfológicos quanto os genéticos podem ser utilizados como linhas de evidência robustas para demonstrar divergência irreversível. Ademais, o uso de *loci* genéticos independentes representaria um conjunto ideal de dados (ou seja, múltiplas linhas de evidência), por possibilitar compreender e avaliar a incerteza associada à decisão taxonômica em questão (Reeves et al. 2004).



Indubitavelmente as adaptações locais somadas a ausência de fluxo gênico ao longo de muito tempo, têm possibilitado separar as linhagens de *Inia* da bacia do Orinoco, mantendo-os com suas identidades, tendências e destino histórico independentes. Apesar do baixo número amostral utilizado, é incontestável que os botos do médio/baixo Orinoco representam uma linhagem independente de *Inia geoffrensis*, que é composta pelos verdadeiros representantes de *humboldtiana*, cuja distribuição se estende desde o Rio Meta até provavelmente o delta do Orinoco. Por fim, somente uma análise com um maior número amostral, proveniente de uma amostragem sistemática nos rios acima de Maipures e Atures, permitirá verificar com maior precisão o limite geográfico entre tais linhagens do Orinoco; bem como definir o real *status* taxonômico dessa segunda linhagem que, aparentemente, é um grupo biológico próximo a *Inia geoffrensis* da bacia Amazônica.

## CAPÍTULO II

### PADRÕES GEOGRÁFICOS DE ESTRUTURA POPULACIONAL EM *INIA GEOFFRENSIS* (CETARTIODACTYLA: INIIDAE) NOS RIOS NEGRO E BRANCO

#### RESUMO

Padrões de estrutura populacional revelam o cenário atual das interrelações entre os indivíduos em suas áreas de distribuição. Neste estudo, buscamos avaliar tais padrões para o boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) dos rios Negro e Branco. Para tal, além da amostragem realizada nesses rios, incluímos indivíduos das seguintes áreas adjacentes: bacia do Orinoco (rios Bitá, Meta e Arauca), baixo Rio Madeira e Rio Solimões. No total 147 indivíduos foram analisados utilizando 621 pares de bases da região controle e 1241 pares de bases do citocromo *b* e/ou 10 *loci* microssatélites. As análises Bayesianas de formação de grupos biológicos resultaram em distintos padrões de diferenciação genética para as áreas de estudo, conforme o marcador utilizado. Para os indivíduos da bacia do Orinoco, o resultado foi semelhante aquele apresentado no Capítulo I desta dissertação. Foram designadas distintas subpopulações (mtDNA e nuDNA) apenas para os rios Negro, Branco, Madeira e Solimões. Para as subpopulações consideradas com base no DNA nuclear (nuDNA) o baixo grau de subdivisão populacional ( $F_{ST} = 0.04762$ ,  $P < 0.001$ ) e altos valores de fluxo gênico indicam uma diferenciação em formato de clina. Para as subpopulações consideradas com base no DNA mitocondrial (mtDNA) são observados níveis significantes de subdivisão populacional ( $\Phi_{ST} = 0.75490$ ,  $P < 0.001$ ) e baixos níveis de fluxo gênico. O teste de Mantel não foi significativo, indicando que a estruturação observada não pode ser explicada por isolamento causado por distância geográfica. Os padrões de compartilhamento e proximidade (passos mutacionais) de haplótipos foram semelhantes aos padrões de subdivisão populacional observados pela análise Bayesiana com o mtDNA. Baixos níveis de diversidade genética são vistos apenas para o Solimões ( $\hat{H} = 0.4297$ ) e a porção alta (e média, no caso de nuDNA) do Rio Negro ( $\hat{H} = 0.6250$ ;  $H_D = 0.470$ ;  $H_E = 0.475$ ). As diferenciações genéticas observadas para os rios Negro, Branco, baixo Madeira e Solimões, parecem corresponder à história evolutiva dessas áreas. Além disso, a filopatria observada para as fêmeas corrobora outros estudos sobre a biologia de *Inia geoffrensis*, que indicam que elas tendem a ser mais residentes, enquanto os machos percorrem distâncias maiores. As corredeiras de São Gabriel da Cachoeira (Rio Negro) e do Bem Querer (Rio Branco) não são barreira para os botos dessas áreas. Para estes rios estão projetadas construções de hidrelétricas, que, obviamente, causarão fragmentação demográfica e genética nas subpopulações de botos observadas. Assim sendo, sugerimos a ampliação dos estudos genéticos e a inclusão de avaliações ecológicas demográficas, para melhor definir estratégias de conservação para essas distintas subpopulações.

**PALAVRAS-CHAVE:** filogeografia, filopatria, corredeiras, boto-vermelho, hidrelétricas

## INTRODUÇÃO

Padrões de estrutura populacional revelam o cenário atual das interações entre os indivíduos em suas áreas de distribuição. Tais padrões são uma resposta espaço/temporal aos processos biológicos/ecológicos/evolutivos e/ou eventos históricos que os indivíduos têm vivenciado (Sunnucks 2000). Por consequência, entender a estrutura genética populacional permitirá pressupor os padrões de isolamento reprodutivo e migração (fluxo gênico) atuais, bem como inferir os limites entre (sub) populações de uma dada espécie e avaliar o nível de contribuição desses processos em tais subdivisões (Sunnucks 2000; Sethuraman 2013). Além disso, analisar tais características demográficas é importante para avaliação do *status* populacional, permitindo melhor subsidiar planos de manejo e estratégias de conservação da espécie em questão (Galetti Jr. et al. 2008; Parsons et al. 2013).

Como a distância geográfica não necessariamente condiciona isolamento reprodutivo em populações da mesma espécie ou de subespécies correlacionadas (Mayr 1996; Frankham et al. 2008), torna-se necessário avaliar tanto os aspectos biológicos envolvidos no processo de estruturação populacional, quanto as características atuais e históricas dos habitats em questão (Sunnucks 2000). A junção desses diferentes aspectos pode produzir diversos cenários biológicos. Para tais, os cetáceos têm sido um grupo modelo. Suas espécies apresentam distintos padrões de estrutura populacional, até mesmo em habitats fisicamente contínuos (Hoelzel 1992; Hollatz et al. 2011; Jackson et al. 2014). Suas “adaptações aquáticas” garantiram-lhes características biológicas para ocuparem e se locomoverem com sucesso em diversos ambientes aquáticos, desde marinhos a dulcícolas (Berta et al. 2006).

Apesar de ser mais provável que a notável capacidade de mobilidade dos cetáceos gere altos níveis de fluxo gênico (Parsons et al. 2013), é razoável pressupor que um habitat heterogêneo como o de água doce (Barthem & Goulding 2007) poderia levar a um cenário de subpopulações estruturadas, submetidas à adaptações locais. Além disso, mesmo que os dados disponíveis ainda não possibilitem esclarecer quais fatores têm atuado para manter a estruturação populacional de uma determinada espécie, é possível ao

menos avaliar (ou reavaliar) os locais que devem ser considerados como áreas de conservação de suas populações, como no caso de *Pontoporia blainvillei* (Lázaro et al. 2004; Costa-Urrutia et al. 2011; Cunha et al. 2014), espécie irmã dos golfinhos de água doce do gênero *Inia* (Cassens et al. 2000; Hamilton et al. 2001).

As espécies do gênero *Inia* são popularmente conhecidas principalmente como “boto” ou “boto-vermelho” (da Silva et al. 2008). Estudos recentes têm mostrado padrões de estrutura populacional discordantes com o que era esperado até então para *Inia boliviensis* e *I. geoffrensis*, na área limite entre essas duas espécies (Gravena et al. 2014; Gravena et al. 2015). Os botos na região do alto rio Madeira, *I. boliviensis*, são capazes de cruzar grande parte das corredeiras deste rio, e nesta região ocorre fluxo gênico restrito entre indivíduos de diferentes unidades de conservação dessa espécie, que estão a montante e a jusante de tais corredeiras (Gravena et al. 2014; 2015). Além disso, Gravena et al. (2015) mostram a existência de uma área de hibridização entre esta espécie e *I. geoffrensis*, logo abaixo da última grande corredeira do Rio Madeira. Esses resultados demonstram a importância de se avaliar áreas de corredeiras a fim de verificar se tais estruturas geológicas direcionam padrões de estruturação das populações de *Inia*.

Embora não tão conspícuas quanto as corredeiras do Rio Madeira, no alto Rio Negro a série de corredeiras de São Gabriel da Cachoeira (0°9'28.07"S; 66°54'58.91"W) cobre uma área com de cerca de 20 quilômetros de extensão. Todavia, afloramentos rochosos dispersos são vistos em vários pontos a montante (baixo Rio Uaupés e áreas próximas a sua foz) e a jusante (proximidades do município de Santa Isabel do Rio Negro (Bringel & Pascoaloto 2012)) dessas corredeiras. A nascente deste rio está localizada na região pré-andina colombiana (Zeidemann 2001), na Serra do Junai, onde ele recebe o nome de Guainia (Bringel & Pascoaloto 2012). Em sua porção alta está a mais importante conexão atual da bacia Amazônica com a bacia do Orinoco: o Canal Casiquiare (Zeidemann 2001). Localizado na Venezuela, este canal liga o alto Rio Orinoco ao alto Rio Negro e tem sido reportado tanto como corredor (Winemiller et al. 2008; Willis et al. 2010), quanto como rota alternativa, ou não utilizada, de dispersão (Albert et al. 2006; Escobar et al. 2015) para algumas espécies da fauna de peixes.

O Rio Negro é o principal afluente da margem esquerda do complexo Solimões/Amazonas (Zeidemann 2001), sua drenagem chega a cobrir uma área de aproximadamente 700.000 km<sup>2</sup>, e dos seus 1.700 km de extensão 1.200 km encontram-se em território brasileiro (Bringel & Pascoaloto 2012). Na região média do Rio Negro deságua o mais importante afluente de sua margem esquerda: o Rio Branco (Latrubesse & Franzinelli 2005). Este rio possui 584 km de extensão e é formado pela confluência dos rios Uraricoera e Tacutu (Freitas 1997; Ferreira et al. 2007). Sua drenagem ocupa uma área de aproximadamente 204.640 km<sup>2</sup>, e está localizada quase inteiramente no Estado de Roraima, extremo norte do Brasil, o qual faz fronteira com a Guiana e a Venezuela (Evangelista et al. 2008). O Rio Branco, tal qual o Negro, também possui uma importante área de corredeiras, conhecidas como corredeiras do Bem Querer (1°54'45.18"N; 61°1'16.53"W), localizadas na região média do rio (Freitas 1997; Ferreira et al. 2007).

Apesar de estarem interconectados, os rios Negro e Branco possuem habitats caracteristicamente diferentes (Ferreira et al. 2007; Evangelista et al. 2008; Ussami 2010), que poderiam conduzir a diferentes padrões de estrutura populacional nos botos que habitam suas águas. Além disso, o fato de estarem previstas construções de hidrelétricas em tais regiões (Fearnside 1995; Brasil & EPE 2014; Fearnside 2015), aliado às incertezas quanto à atuação dessas corredeiras como barreiras ao fluxo dos botos e quanto à conectividade entre esses indivíduos e àqueles da bacia do Orinoco (Best & da Silva 1989a;b; 1993; da Silva 2010), torna relevante a análise genética que propomos aqui.

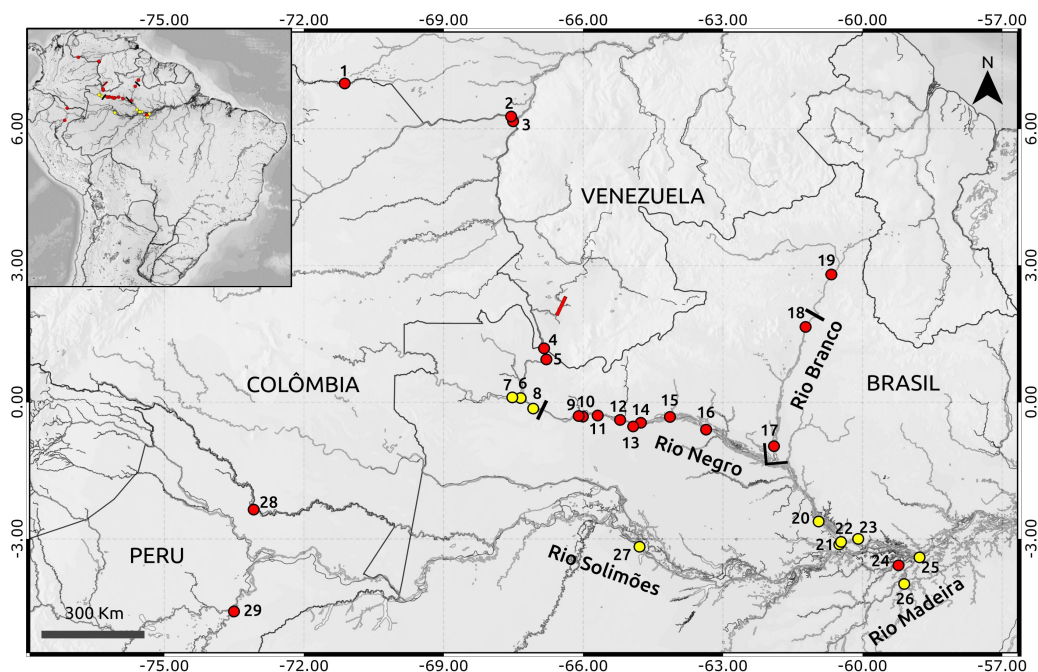
Por tais razões, este estudo tem por objetivos: entender os padrões geográficos da estrutura populacional de *Inia geoffrensis* nos rios Negro e Branco; avaliar a atuação das corredeiras de São Gabriel da Cachoeira e do Bem Querer como barreira ao fluxo de botos; e verificar se existe compartilhamento genético entre os botos desses rios e àqueles da bacia do Orinoco.

## MATERIAL E MÉTODOS

### AMOSTRAGEM

Neste estudo foram amostradas dez localidades no Rio Negro (N=40) e três localidades no Rio Branco (N=24) (Figura 1). Para entender os padrões geográficos da estrutura populacional dos botos dessas áreas, incluímos nas análises parte dos dados coletados anteriormente por nosso grupo de pesquisa (N=31); além de dados sobre indivíduos de duas localidades no baixo Rio Madeira (N=18) e de uma localidade no Rio Solimões (N=15), publicados nos estudos de Gravena et al. (2014) e Hrbek et al. (2014); e dados não publicados sobre indivíduos de duas localidades no alto Rio Solimões (Amazonas colombiano e Ucayali) (N=3) e uma localidade na região do baixo Rio Madeira (N=1) (Figura 1) (para informações complementares ver Material Suplementar: Tabela 2-A). Para parte das análises, também foram utilizados os dados sobre as linhagens da bacia do Orinoco, apresentados no primeiro capítulo desta dissertação (Figura 1).

Para esta pesquisa utilizamos duas classes de marcadores moleculares, sendo um nuclear (10 *loci* microssatélites) e um mitocondrial (dois *loci*: citocromo *b* – Cytb e parte da região controle – Dloop). O banco de dados das regiões de microssatélites dos estudos acima referidos está depositado no banco de dados moleculares do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (ICB/UFAM). Enquanto o banco de dados das sequências nucleotídicas de tais estudos está disponível na plataforma *GenBank*<sup>®</sup> sob os seguintes números de acesso: KF802316 – KF802348 para regiões de citocromo *b*; KF802280 – KF802312 para regiões controle.



**Figura 1.** Mapa das localidades amostradas durante este estudo (círculos em vermelho), e de localidades amostradas em outros estudos (círculos em amarelo), cujos dados também foram utilizados por este trabalho. Bacia do Orinoco: (1) Rio Arauca; (2) Puerto Carreño – Rio Meta; (3) Confluência Rio Bitá. Rio Negro: (4) Cucui; (5) Lago Mabi; (8) Ilha da Juíza/São Gabriel da Cachoeira; (9) Comunidade Vila Nova; (10) Sítio Caristino; (11) Castanheira; (12) Marauíá; (13) Tapuruquara; (14) Darará; (15) Comunidade Nova Vida; (16) Darauacá; (20) Novo Airão; (21) Lago do Acajatuba; (22) Furo do Ariaú; (23) Igarapé Tarumã. Rio Uaupés: (6) Igapó Japú/Comunidade Trovão; (7) Comunidade Açai. Rio Branco: (17) Baixo Rio Branco; (18) Vista Alegre/Caracará; (19) Boa Vista. Rio Madeira: (24) Paraná do Mamurí; (25) Boca do Rio Madeira; (26) Foz do Rio Canumã. Sistema Solimões: (27) Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá; (28) Rio Putumayo; (29) Rio Ucayali. As barras negras simbolizam as subdivisões para os Rios Negro e Branco, adotadas por este trabalho (as corredeiras de São Gabriel da Cachoeira, abaixo da localidade 8, delimitam o alto e o médio Rio Negro; as corredeiras do Bem Querer, acima da localidade 18, delimitam o alto e baixo Rio Branco; e a foz do Rio Branco delimita o médio e baixo Rio Negro). A barra vermelha indica a localização Canal Casiquiare.

## COLETA DO MATERIAL BIOLÓGICO

Os espécimes foram capturados segundo a metodologia proposta por da Silva e Martin (2000). As capturas foram realizadas com auxílio de redes específicas para este

tipo de coleta, com linhas de 42 a 72 mm e malhas de 100 a 120 mm; com cerca de 150 metros de comprimento e entre 6 e 12 metros de altura. As localidades de captura foram canais estreitos dos rios, que são formados quando o nível da água está baixo. Seguindo a metodologia proposta por tais autores, foram escolhidos canais que possuíam no máximo 10 metros de profundidade, estavam livres de árvores submersas, e não possuíam fortes correntezas e pedras.

Para captura dos animais que adentraram tais canais, as redes foram emalhadadas de modo a bloquear a saída dos mesmos, sendo então progressivamente manuseadas para formar uma espécie de “cercado” próximo à margem, onde foi possível, com segurança, retirar os botos manualmente. Os animais foram capturados e manipulados cuidadosamente e individualmente, exceto no caso de mãe e filhote, cujos manuseios ocorreram simultaneamente. Esses procedimentos foram realizados com os motores dos botes desligados, de modo a evitar estresse sonoro excessivo aos botos.

As capturas foram conduzidas por pescadores experientes, que trabalham há duas décadas com este tipo de pesquisa, junto à equipe de pesquisa do Projeto Boto, coordenado pela Dra. Vera da Silva e pelo Dr. Anthony Martin; cujas atividades de captura de botos são conduzidas na Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá, estado do Amazonas. Durante todo o processo os botos foram constantemente monitorados, e ao menor sinal de estresse, o animal era imediatamente liberado, sendo ainda observado até o retorno de suas funções normais. Foram gastos, no máximo, entre cinco e sete minutos no manuseio de cada animal. As capturas e coletas de tecidos foram autorizadas pelo IBAMA através do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBIO), com número de licença 37845-2, conferido a mim, como bióloga pesquisadora titular responsável pelas atividades científicas deste projeto.

Para análise genética, foram utilizados os tecidos retirados através de biópsia de tecido da nadadeira caudal, feita com auxílio de bisturi cirúrgico (cerca de 10 mm de tecido). Após todo e qualquer procedimento de corte, imediatamente foi aplicado medicamento antisséptico nas regiões incisadas. O fragmento de tecido foi depositado em tubos criogênicos de 1.5 mL contendo álcool 96%. Foram feitas alíquotas destes tecidos,



e tais materiais foram tombados e depositados na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA/ICB/UFAM (CGEN, Deliberação No. 75, de 26 de agosto de 2004) do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Amazonas (ICB/UFAM) (para informações complementares ver Material Suplementar: Tabela 2-A).

### **OBTENÇÃO DO MATERIAL GENÉTICO**

Todos os procedimentos para obtenção do material genético (dados moleculares) foram realizados de acordo com os protocolos descritos no capítulo I desta dissertação.

### **ANÁLISES**

Com o propósito de entender os padrões geográficos da estrutura populacional de *Inia geoffrensis* na bacia do Rio Negro e sub-bacia do Rio Branco, optamos por manter denominações de algumas das subdivisões para esses rios, apenas como forma de agregar aos resultados um contexto geográfico. No entanto, para nenhuma das análises realizadas foi testada a existência de reais subpopulações (grupos biológicos) em tais subdivisões.

Para o Rio Negro, distinguimos três principais subdivisões: alto, médio e baixo (Figura 1). Consideramos como alto Rio Negro o trajeto que abrange todas as localidades a montante das corredeiras São Gabriel da Cachoeira (incluindo a amostragem no baixo Rio Uaupés). A jusante das corredeiras de São Gabriel da Cachoeira até a confluência do Rio Branco consideramos como médio Rio Negro. A partir desta região, até a foz no Solimões/Amazonas, denominamos baixo Rio Negro.

Para o Rio Branco, todavia, consideramos apenas duas subdivisões: alto e baixo Rio Branco (Figura 1), sendo as corredeiras do Bem Querido o marco divisor entre ambas. Entre as demais áreas incluídas nas análises, foi determinada uma subdivisão apenas para a bacia do Orinoco (alto/médio e médio/baixo Orinoco), conforme os resultados apresentados no primeiro capítulo desta dissertação.

Seguindo o contexto geográfico proposto, para as representações gráficas das análises cujo ordenamento dos indivíduos mostrados puderam ser determinados *a priori* (*STRUCTURE* e *BAPS*), os resultados foram organizados seguindo uma lógica em termos de distribuição hidrogeográfica. Para o Rio Negro a distribuição representada seguiu o curso montante-juzante, sendo que entre as regiões média e baixa deste rio foram inseridas as informações sobre os indivíduos do Rio Branco, estes por sua vez, foram dispostos seguindo um curso foz-montante (por ser a atual rota de entrada dos botos no Rio Branco via Rio Negro). Por fim, para tais análises, estabelecemos as seguintes regiões hidrogeográficas: médio/baixo Orinoco, alto/médio Orinoco, alto Negro, médio Negro, baixo Branco, alto Branco, baixo Negro, baixo Madeira e Solimões.

#### *ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E PADRÃO GEOGRÁFICO*

Para observar a existência de agrupamentos subpopulacionais formados pelas localidades em estudo, foram realizadas duas análises Bayesianas de formação de grupos biológicos, sendo uma delas realizada com os dados de microssatélites e a outra com os dados do mtDNA. Para ambas análises, foram utilizados os dados dos indivíduos dos rios Negro, Branco, baixo Madeira, Solimões e do sistema Orinoco. Optou-se pelo método Bayesiano por ser este extremamente eficaz em termos de inferência sobre estrutura genética populacional, sendo amplamente utilizado para estimar a diferenciação entre populações (Corander et al. 2003).

A primeira inferência foi conduzida através da análise da formação de grupos biológicos (*clusters* ou populações) pelos marcadores microssatélites, realizada no programa *STRUCTURE*, seguindo os mesmos parâmetros descritos para esta análise na seção “Análises” do capítulo I desta dissertação (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003; 2007; Rosenberg 2004; Jakobsson & Rosenberg 2007; Earl & VonHoldt 2012).

A segunda análise Baeynsiana foi conduzida através da análise da formação de grupos biológicos (*clusters* ou populações) pelas sequências concatenadas da região controle e do citocromo *b* do DNA mitocondrial, através do programa *BAPS* (*Bayesian*

*Analysis of Genetic Population Structure*) versão 6.0 (Corander et al. 2013). Essa análise também é conduzida utilizando o algoritmo MCMC (Corander et al. 2003).

O uso desse algoritmo minimiza o problema de rotular como populações (estruturadas) grupos de indivíduos que apresentam fluxo gênico entre si, porque ele considera que o número de populações é desconhecido (Corander et al. 2003). Com isso, além dos *loci* serem assumidos como independentes (Corander et al. 2004), a população como um todo é considerada panmítica, embora atribua-se previamente a quantidade máxima de populações a ser testada (Corander et al. 2003). Os grupos biológicos são então estimados de acordo com a distribuição das frequências alélicas e do melhor valor de probabilidade encontrado para o número de *clusters* testados (Corander et al. 2003). Para essa análise, testamos quinze (15) como número máximo de populações.

Para quantificar o nível de estruturação genética entre as subpopulações observadas pelas análises do *STRUCTURE* e *BAPS*, os dados moleculares foram submetidos à análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992). Essa análise baseia-se no teste da significância dos componentes de variância, que são estimados com base em matrizes de distância euclidiana calculadas entre os indivíduos, através de 1.000 permutações (Excoffier et al. 1992). Com isso, obtém-se a distribuição nula que é então testada para a significância de  $F_{ST}$  (Wright 1965) e  $\Phi_{st}$  (Weir & Cockerham 1984) e o componente de variância (extraído pela equação das médias dos quadrados) (Excoffier et al. 1992). A estrutura dessa análise tem base nas estatísticas F ( $F_{ST}$ ) de Wright (Wright 1965) e foi realizada através do programa ARLEQUIN versão 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010), utilizando 1.000 permutações para avaliar a significância do teste, ao nível de significância de  $P < 0.008$  (microsatélites) e  $P < 0.005$  (sequências) após correção de Bonferroni (Rice 1989). Para estas análises foram excluídos os indivíduos do sistema Orinoco, em consequência do baixo número amostral.

Para verificar se as distâncias genéticas observadas (baseadas nos valores de  $F_{ST}$  e  $\Phi_{st}$ ) apresentam correlação com as geográficas, foi realizado o teste de Mantel (Mantel 1967). Enquanto a matriz de distância genética foi obtida no programa ARLEQUIN, a de distância geográfica foi construída com auxílio do programa Google Earth. Para mensurar

a distância de uma subpopulação à outra, foi considerado um ponto central na área de distribuição de cada subpopulação, de modo a viabilizar a obtenção destes dados, uma vez que a amostragem foi conduzida de forma sistemática. Foram utilizadas 1.000 permutações para avaliar a significância do teste, ao nível de significância de  $P < 0.05$ , sendo o mesmo realizado no programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010).

#### FLUXO GÊNICO E DIVERSIDADE GENÉTICA

Para inferir se existe fluxo gênico entre os indivíduos das localidades em estudo, primeiramente identificamos os haplótipos compartilhados entre os mesmos, bem como o número de passos mutacionais entre estes. Para tal, foi reconstruída a genealogia dos grupos (rios Negro, Branco, baixo Madeira, Solimões e do sistema Orinoco) com base nas sequências concatenadas do DNA mitocondrial da região controle e do citocromo *b*. A análise de genealogias permite realizar inferências sobre filogenética, genética populacional e filogeografia, importantes parâmetros no estudo de populações (ou grupos biológicos) proximamente relacionadas (Salzburger et al. 2011).

Para reconstruir a genealogia dos grupos estudados, seguiu-se os mesmos parâmetros descritos para esse tipo de análise na seção “Análises” do capítulo I desta dissertação (Akaike 1974; Guindon & Gascuel 2003; Salzburger et al. 2011; Drummond et al. 2012; Durrin et al. 2012). Sendo que, para a árvore de máxima verossimilhança foi utilizado o modelo TVM+G (-lnL 3393.19656, AICc 7391.165137).

A segunda inferência sobre fluxo gênico foi feita com base na estimativa do número de migrantes por geração ( $N_m$ ) entre subpopulações. Para esta análise consideramos as subpopulações observadas pelas análises do *STRUCTURE* e do *BAPS*, exceto os indivíduos do sistema Orinoco (em consequência do baixo número amostral). Essa estimativa é baseada no modelo de ilhas, cujo pressuposto biológico fundamenta-se na relação simples entre os valores de  $F_{ST}$  e o número de migrantes que a população recebe por geração ( $N_m = (1/F_{ST} - 1)/4$ ) (Whitlock & McCauley 1999). Apesar de assumir pressupostos simplistas, essa análise é amplamente utilizada e facilmente executada a partir dos resultados das comparações par-a-par dos valores de  $F_{ST}$  e  $\Phi_{st}$  (obtidos por

meio da AMOVA) (Whitlock & McCauley 1999), sendo realizada no programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010).

Para avaliar os níveis de polimorfismos do DNA, foram estimados índices de diversidade padronizados, avaliados ao nível intra populacional, para as mesmas subpopulações consideradas pela análise anterior ( $N_m$ ). Essas inferências permitem conhecer alguns aspectos da composição genética dos grupos populacionais observados, sendo possível utilizá-las para subsidiar propostas de manutenção da diversidade genética das populações em estudo (Galetti Jr. et al. 2008). Tais índices também foram calculados através do programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (Excoffier & Lischer 2010).

Para os microssatélites, foram obtidos o número médio de alelos por loco, a heterozigosidade observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ); este último parâmetro equivale a diversidade gênica ( $\hat{H}$ ) (probabilidade de que dois alelos escolhidos aleatoriamente em uma amostragem não sejam idênticos por descendência) (Nei 1987). Para o mtDNA, foram estimados o número de haplótipos e de sítios polimórficos, e a diversidade haplotípica ( $\hat{H}$ ) (probabilidade de que dois sítios homólogos escolhidos randomicamente sejam diferentes) e nucleotídica ( $\pi$ ) (equivale a diversidade gênica, é a média das diferenças nucleotídicas em cada sítio, medidas par-a-par entre todos os pares de haplótipos) (Tajima 1983; Nei 1987).

## RESULTADOS

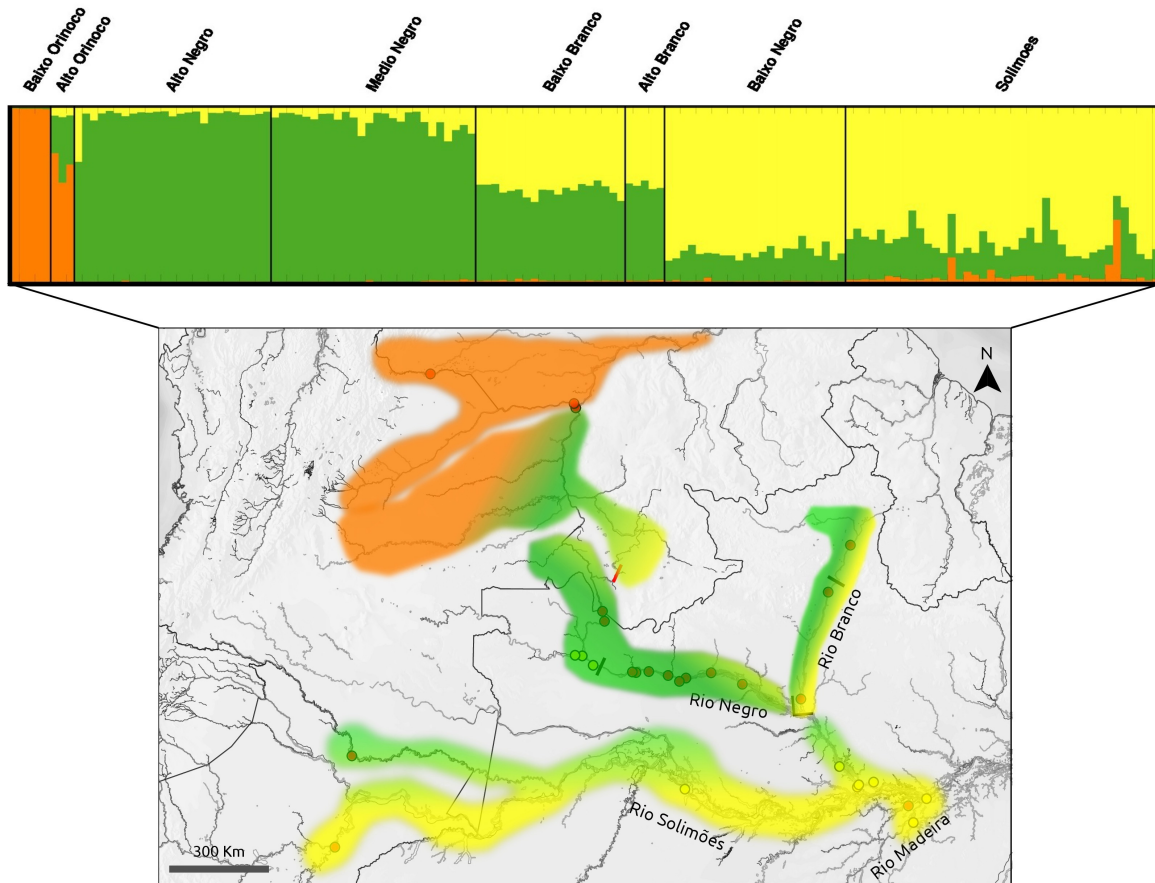
No total 147 indivíduos foram analisados utilizando 621 pares de bases da região controle, 1241 pares de bases do citocromo *b* e/ou 10 *loci* de microssatélites (Material Suplementar: Tabela 2-A). Foi possível concatenar as sequências do mtDNA para 127 destes indivíduos, que foram utilizadas para realizar as análises de identificação de grupos biológicos (no programa *BAPS*) e reconstrução de genealogia (rede de haplótipos, no programa *Haploviewer*); e de 120 para as demais análises de parâmetros populacionais (realizadas no programa ARLEQUIN). Foram utilizadas as informações dos 10 *loci* de microssatélites de 143 indivíduos para realizar a análise de *clusters* (no

programa *STRUCTURE*); e de 135 para as demais análises de parâmetros populacionais (realizadas no programa ARLEQUIN).

#### *ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E PADRÃO GEOGRÁFICO*

O método de agrupamento Bayesiano realizado no programa *STRUCTURE* resultou em um  $K$  (grupo biológico ou *cluster*) igual a 3 (Figura 2.A) e probabilidade  $\text{LnP}(K = 3) = -3048.0800$  (Material Suplementar: Figura 2-A, Tabela 2-B), como a melhor probabilidade para explicar o número de grupos biológicos (*clusters*) obtidos. Os três *clusters* observados (representados no gráfico pelas cores laranja, verde e amarelo) não são compostos por indivíduos completamente homogêneos. Dentre os indivíduos da bacia do Orinoco, àqueles do Rio Arauca (médio/baixo Orinoco) pertencem exclusivamente ao *cluster* laranja e os das demais localidades (rios Meta e Bitá) possuem características de mistura com os demais *clusters* observados (padrão semelhante ao observado no resultado apresentado no primeiro capítulo desta dissertação).

Os botos dos rios Negro e Branco apresentam estrutura populacional em formato de clina, seguindo a distribuição hidrogeográfica desses indivíduos nas localidades amostradas (Figura 2). Para as áreas alto e médio Rio Negro observamos indivíduos quase completamente puros, para os quais o *cluster* verde é predominante, e há uma ínfima porção de mistura com o *cluster* amarelo. Os indivíduos do Rio Branco apresentam partes proporcionais de ambos *clusters*. Já aqueles do baixo Rio Negro, baixo Rio Madeira e médio Solimões, possuem uma porcentagem maior do *cluster* amarelo em relação ao verde, e apenas uma ínfima porção do *cluster* laranja.



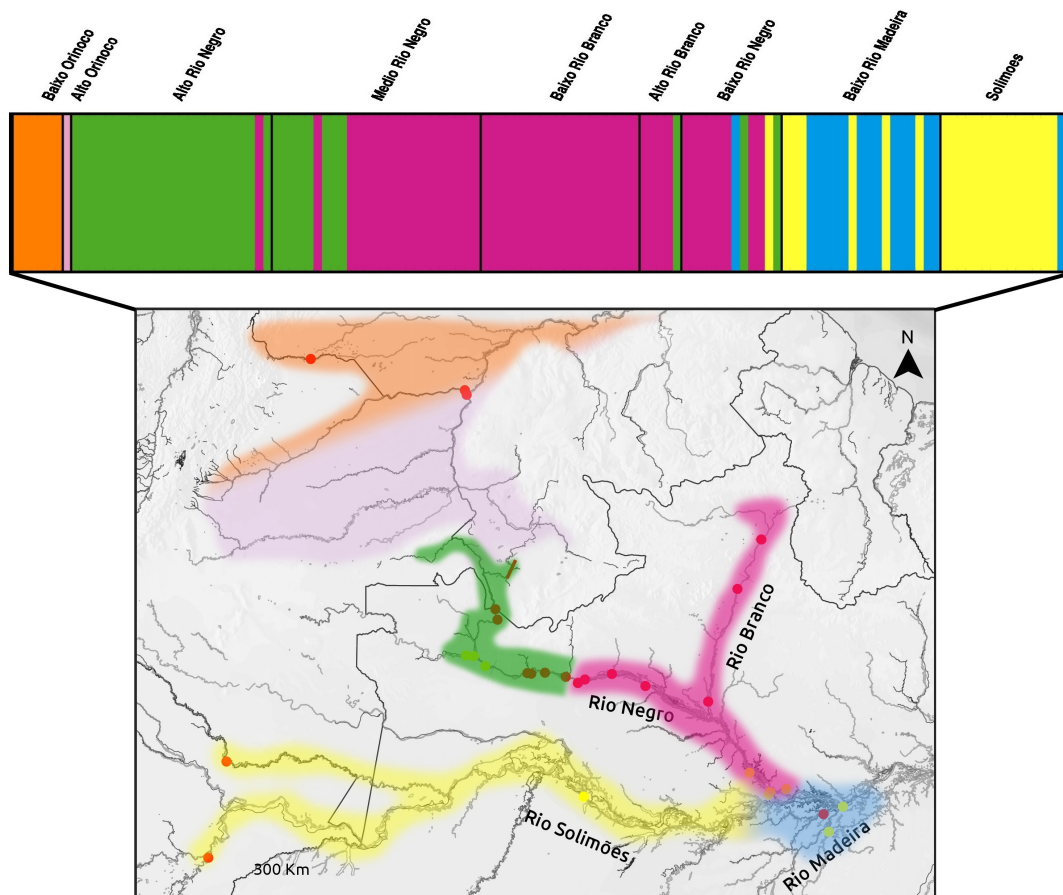
**Figura 2.** Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). Análise realizada sob 10 *loci* de microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco; 74 do Rio Negro (alto: 25; médio: 26; baixo: 23); 24 do Rio Branco (baixo: 15; alto: 5); 19 do baixo Rio Madeira e 18 do médio Solimões. No gráfico cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada uma das cores indica um *cluster* (grupo biológico) baseado em semelhanças genotípicas; o nome da porção do rio correspondente aos indivíduos é mostrado acima da figura. Abaixo do gráfico é mostrado um mapa hipotético da distribuição hidrogeográfica da estrutura populacional de *Inia* nas áreas em estudo. Mapa elaborado no *software* QGIS (QGIS Development Team 2014) e editado no *software* Inkscape versão 0.91 (<<https://inkscape.org/en/>>).

O resultado da análise Bayesiana de estrutura populacional realizada pelo *BAPS* indicou seis *clusters* (representados pelas cores laranja, rosa claro, verde, magenta, azul e amarelo) como melhor valor de probabilidade posterior (100%), cujo  $\log(\text{ML})$  foi igual a -1546.032 (Figura 3). Os dados mostram dois *clusters* para a bacia do Orinoco, sendo um com os indivíduos do médio/baixo Orinoco (rios Meta e Arauca, *cluster* laranja) e outro

com o indivíduo do Rio Bitá (*cluster* rosa claro). Já o alto Rio Negro é composto por indivíduos que pertencem majoritariamente a um único *cluster* (verde), com apenas um indivíduo apresentando frequência alélica tal qual a de indivíduos do *cluster* magenta. No entanto, oito indivíduos amostrados no início da distribuição do médio Rio Negro pertencem ao *cluster* verde.

Os demais indivíduos do médio Rio Negro, todos do baixo Rio Branco, e a maioria do alto Rio Branco e baixo Rio Negro pertencem majoritariamente a um único *cluster* (magenta). Apenas um indivíduo no alto Rio Branco apresenta característica genética do *cluster* predominante para aqueles do alto Rio Negro (verde). Já no baixo Rio Negro, dois indivíduos também apresentaram frequências alélicas do *cluster* verde, enquanto outros dois dos *clusters* predominantes em indivíduos do baixo Rio Madeira e Rio Solimões (azul e amarelo, respectivamente). Dentre essas duas últimas localidades, o baixo Madeira possui indivíduos que pertencem a dois *clusters* (azul e amarelo), embora um deles predomine (azul). Os indivíduos do médio Solimões pertencem em sua maioria ao *cluster* amarelo, com apenas um indivíduo do *cluster* azul.





**Figura 3.** Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *BAPS*. A análise foi realizada sob 1862 pares de bases concatenados da região controle (621) e citocromo *b* (1241), para 7 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco, 61 do Rio Negro (alto: 25; médio: 24; baixo: 12), 24 do Rio Branco (baixo: 19; alto: 5), 19 do baixo Rio Madeira e 16 do médio Solimões. No gráfico cada indivíduo é representado por uma linha vertical e cada uma das cores indica um *cluster* (totalizando seis grupos biológicos) baseado na distribuição das frequências alélicas e melhor valor de distribuição da probabilidade posterior. Abaixo do gráfico é mostrado um mapa hipotético da distribuição hidrogeográfica da estrutura populacional de *Inia* nas áreas em estudo. Mapa elaborado no software QGIS (QGIS Development Team 2014) e editado no software Inkscape versão 0.91 (<<https://inkscape.org/en/>>).

Embora os resultados do *STRUCTURE* e do *BAPS* tenham indicado três e quatro *clusters*, respectivamente, distribuídos entre os indivíduos dos rios Negro, Branco, Madeira e Solimões, para as análises de parâmetros populacionais (realizadas no programa ARLEQUIN) as subpopulações foram designadas baseadas em diferentes aspectos associados a estes resultados. Com relação ao resultado do *STRUCTURE*,

consideramos as quebras em nível de mistura como divisão entre uma subpopulação e outra. Então, com base nessas distinções, determinamos três grupos de indivíduos como subpopulações: 1. alto e médio Rio Negro; 2. Rio Branco; e 3. baixo Rio Negro, baixo Madeira e Solimões.

Quanto ao resultado do *BAPS*, designamos as subpopulações obedecendo a distribuição hidrogeográfica majoritária dos *clusters*. Por isso, estas subpopulações puderam ter seus limites além das subdivisões dos rios previamente estabelecidas (conforme descrito na seção Análises). Além disso, mesmo na existência de um ou mais indivíduos (dispersos ou agrupados pelas localidades) pertencentes a outro *cluster* que não a maioria dos indivíduos da subpopulação a qual foram designados, estes ainda assim foram considerados como membros da subpopulação de *cluster* predominante. Dessa forma, foram determinamos quatro subpopulações: 1. alto Negro (indivíduos amostrados desde a localidade de Cucuí [4] até a localidade de Castanheira [11]); 2. Negro/Branco (todas as demais localidades do Rio Negro e àquelas do Rio Branco); 3. Baixo Madeira (todas as localidades do baixo Madeira, incluindo o Paraná do Mamuri [24]); e 4. Solimões (localidades dos rios Ucayali, Putumayo e Solimões).

A avaliação do nível de estruturação genética (AMOVA), para as subpopulações acima apresentadas, também resultou em diferentes níveis de estruturação. Para as subpopulações consideradas com base no resultado do *STRUCTURE*, observamos um baixo grau de subdivisão populacional com significativo valor de  $P$  ( $F_{ST} = 0.04762$ ,  $P < 0.001$ ), com maior variação ocorrendo dentro dos indivíduos (85.05%). Todos os resultados das comparações par-a-par de  $F_{ST}$  indicaram valores significativos (Tabela 1, diagonal abaixo).

**Tabela 1.** Valores de  $F_{ST}$  (diagonal abaixo) e  $N_m$  (diagonal acima) obtidos com os dados dos 10 *loci* de microssatélites para as subpopulações de *Inia geoffrensis*, consideradas de acordo com as “quebras” populacionais observadas pelo resultado da análise do *STRUCTURE*.

	Alto e médio Negro	Rio Branco	Baixo Negro, baixo Madeira e Solimões
Alto e médio Negro	---	6.716	10.052
Rio Branco	0.069	---	13.193
Baixo Negro, baixo Madeira e Solimões	0.047	0.036	---

Todos os resultados de  $F_{ST}$  foram significativos ( $P < 0.001$ ).

O contrário foi observado para as subpopulações sugeridas com base no resultado da análise do *BAPS*. Cujo grau de subdivisão populacional foi elevado, com valor de  $P$  também significativo ( $\Phi_{ST} = 0.75490$ ,  $P < 0.001$ ), porém maior variação ocorrendo entre populações (75.49%). Outrossim, todos os resultados das comparações par-a-par de  $\Phi_{ST}$  indicaram valores significativos (Tabela 2, diagonal abaixo).

**Tabela 2.** Valores de  $\Phi_{ST}$  (diagonal abaixo) e  $N_m$  (diagonal acima) obtidos com os dados concatenados da região controle e citocromo *b* do mtDNA para as subpopulações de *Inia geoffrensis*, consideradas de acordo com a distribuição hidrogeográfica majoritária dos *clusters* observados pelo resultado da análise do *BAPS*.

	Alto Negro	Negro/Branco	Baixo Madeira	Solimões
Alto Negro	---	0.129	0.140	0.074
Negro/Branco	0.794	---	0.294	0.182
Baixo Madeira	0.780	0.629	---	0.872
Solimões	0.870	0.732	0.364	---

Todos os resultados de  $\Phi_{ST}$  foram significativos ( $P < 0.001$ ).

Os resultados para o coeficiente de correlação do teste de Mantel não foram significativos, tanto para as sequências concatenadas da região controle e do citocromo *b*

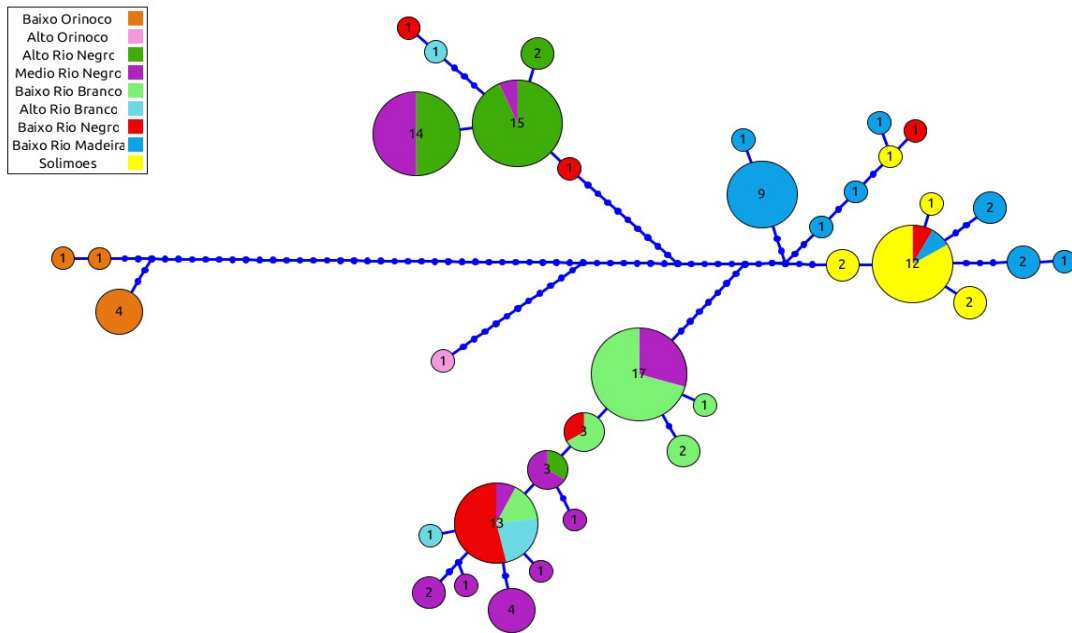
( $rY1 = 0.580580$ ,  $P=0.20300$ ), quanto para os marcadores microssatélites ( $rY1 = -0.777605$ ,  $P=0.85100$ ). O que indica que não há isolamento por distância entre as subpopulações observadas.

#### *FLUXO GÊNICO E DIVERSIDADE GENÉTICA*

A árvore genealógica, construída para os 127 indivíduos de todas as regiões hidrogeográficas, resultou em 36 haplótipos (Figura 4), destes dezenove são únicos (com exceção do alto Rio Negro, todas as demais áreas apresentaram pelo menos um haplótipo único). Mesmo considerando as particularidades desse tipo de análise, uma observação geral permite identificar que os padrões de compartilhamento e proximidade (passos mutacionais) de haplótipos aqui apresentados, são semelhantes aos padrões vistos pelo gráfico do *BAPS* (ver Figura 3).

Para a bacia do Orinoco há um grupo de haplótipos proximamente relacionados contendo os indivíduos do baixo Orinoco; e um haplótipo único para o indivíduo do alto Orinoco, que por sua vez possui mais passos mutacionais em relação ao baixo Orinoco do que em relação a qualquer outra região. Os indivíduos do alto Rio Negro compartilham predominantemente dois haplótipos, em ambos ocorre compartilhamento com um total de oito indivíduos amostrados no início da distribuição da região que consideramos como médio Rio Negro (ou seja, abaixo das corredeiras de São Gabriel da Cachoeira).

Os indivíduos das regiões médio e baixo Rio Negro e alto e baixo Rio Branco, compartilham alguns haplótipos que compõem um conjunto de haplótipos proximamente relacionados. Para os indivíduos do sistema Solimões, o haplótipo de maior frequência é compartilhado por dez indivíduos deste rio, além de um indivíduo do baixo Rio Negro e um do baixo Rio Madeira. O baixo Rio Madeira também possui um haplótipo de maior frequência, compartilhado por nove indivíduos. Os haplótipos do baixo Rio Madeira e Solimões são separados por poucos passos mutacionais (quando se compara a distância entre esses para com as demais regiões analisadas).



**Figura 4.** Rede de haplótipos elaborada no programa *Haploviewer* (Salzburger et al. 2011), com base em árvore de máxima verossimilhança construída a partir de sequências concatenadas da região controle (621 pares de base) e do citocromo *b* (1241 pares de bases) do DNA mitocondrial. Nesta análise foram utilizados 7 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco, 61 do Rio Negro (alto: 25; médio: 24: baixo: 12), 24 do Rio Branco (baixo: 19; alto: 5), 19 do baixo Rio Madeira e 16 do médio Solimões. Os números no interior de cada haplótipo representam o número de indivíduos que o compartilham, as cores apenas designam tais indivíduos conforme a porção do rio onde foram amostrados.

A estimativa indireta do número de migrantes por geração ( $N_m$ ) indica um elevado fluxo gênico entre as subpopulações consideradas de acordo com o resultado da análise do *STRUCTURE* (exceto indivíduos do sistema Orinoco) (Tabela 1, diagonal acima). Para as quais o menor valor de  $N_m$  ocorre entre os grupos alto e médio Negro e Rio Branco; e o maior entre este último e o grupo baixo Negro, baixo Madeira e Solimões. O contrário foi observado para as populações sugeridas pela análise do *BAPS*. Onde todas as comparações mostram baixo fluxo gênico (Tabela 2, diagonal acima).

Os 10 *loci* de microssatélites de 135 indivíduos, utilizados para avaliar a diversidade genética, foram polimórficos, com número de alelos por *locus* variando entre cinco (Ilg11D2 e Ig7F2) e 16 (Ttr11) e média de 8.3. A heterozigosidade observada variou

de 0.260 (Ig8H1) a 0.771 (Ttr11), enquanto que a heterozigidade esperada variou de 0.323 (Ig8H1) a 0.799 (Ttr11) por *locus*. Os valores por *locus* e considerando cada *locus* por população são mostrados nas Tabelas 2-C e 2-D (Material Suplementar), respectivamente.

Em nível populacional, a heterozigidade observada foi de 0.490 e a esperada de 0.566. A subpopulação alto e médio Negro apresentou os menores valores de heterozigidade observada (0.470) e esperada (0.475) e valor intermediário de número médio de alelos (5.2). A subpopulação Rio Branco apresentou valores intermediários para heterozigidade observada (0.545) e esperada (0.569) e o menor valor de número médio de alelos (4.5). A subpopulação baixo Negro, baixo Madeira e Solimões apresentou maiores valores para heterozigidade esperada (0.601) e número médio de alelos (7.3), e o menor valor para heterozigidade observada (0.485). Esses resultados estão compilados na tabela abaixo.

**Tabela 3.** Índices de diversidade genética resultantes dos 10 *loci* de microssatélites analisados para as subpopulações *Inia geoffrensis*, considerandas de acordo com as “quebras” populacionais observadas pelo resultado da análise do *STRUCTURE*.

Subpopulação	N	$N_A$	$H_o$	$H_E$
Alto e médio Negro	51	5.2 ( $\pm 2.3$ )	0.470 ( $\pm 0.240$ )	0.475 ( $\pm 0.228$ )
Rio Branco	24	4.5 ( $\pm 1.4$ )	0.545 ( $\pm 0.207$ )	0.569 ( $\pm 0.163$ )
Baixo Negro, baixo Madeira e Solimões	60	7.3 ( $\pm 2.3$ )	0.485 ( $\pm 0.179$ )	0.601 ( $\pm 0.108$ )
<b>Total</b>	135	83	0.490 ( $\pm 0.184$ )	0.566 ( $\pm 0.145$ )

N, número amostral;  $N_A$ , média do número de alelos;  $H_o$ , heterozigidade observada;  $H_E$ , heterozigidade esperada.

As 120 sequências concatenadas da região controle e citocromo *b* comportam 32 haplótipos (Tabela 4). Para os haplótipos, foram observados 58 sítios polimórficos, destes 53 são informativos para parcimônia; 54 são mutações do tipo transição (substituição de

uma purina por outra purina ou de uma pirimidina por outra pirimidina), e quatro do tipo transversão (substituição de uma purina por uma pirimidina ou vice-versa).

O resultado da análise de variabilidade genética mostra um alto valor para a diversidade haplotípica  $\hat{H}$ , considerando todas as subpopulações, e valores variáveis para cada uma destas (Tabela 4). As subpopulações Negro/Branco e baixo Madeira apresentaram os maiores valores ( $\hat{H} = 0.8303$  e  $\hat{H} = 0.7778$ , respectivamente), seguida de alto Negro ( $\hat{H} = 0.6250$ ) e Solimões ( $\hat{H} = 0.4297$ ). Também é observado um valor alto para a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) total; sendo os maiores valores para as subpopulações baixo Madeira e Negro/Branco ( $\pi = 0.004152$  e  $\pi = 0.002849$ , respectivamente), seguida de alto Negro ( $\pi = 0.001721$ ) e Solimões ( $\pi = 0.001038$ ) (Tabela 4).

**Tabela 4.** Parâmetros genéticos obtidos com os dados concatenados da região controle e citocromo *b* do mtDNA para as subpopulações de *Inia geoffrensis*, consideradas de acordo com a distribuição hidrogeográfica majoritária dos *clusters* observados pelo resultado da análise do BAPS.

Subpopulação	N	<i>h</i>	S	$\hat{H}$	$\pi$
Alto Negro	33	4	24	0.625 ( $\pm 0.477$ )	0.0017 ( $\pm 0.0010$ )
Negro/Branco	52	17	45	0.830 ( $\pm 0.037$ )	0.0028 ( $\pm 0.0015$ )
Baixo Madeira	19	9	25	0.777 ( $\pm 0.095$ )	0.0041 ( $\pm 0.0022$ )
Solimões	16	5	13	0.429 ( $\pm 0.130$ )	0.0010 ( $\pm 0.0006$ )
<b>Total</b>	120	32	58	0.925 ( $\pm 0.009$ )	0.0079 ( $\pm 0.0039$ )

N, número amostral; *h*, número de haplótipos; S, número de sítios polimórficos;  $\hat{H}$ , diversidade haplotípica;  $\pi$ , diversidade nucleotídica.

## DISCUSSÃO

Em um contexto biogeográfico, nosso estudo apresenta a primeira inferência sobre os padrões de subdivisão genética populacional e de distribuição da diversidade genética de *Inia geoffrensis* ao longo dos rios Negro e Branco. Diferentes resultados são observados conforme marcador e análise utilizados, e níveis significantes de subdivisão populacional são observados apenas para o mtDNA, enquanto os dados do nuDNA

mostram uma diferenciação em formato de clina. Essa discrepância em termos de marcador molecular também é observada para os níveis de fluxo gênico.

As evidências também indicam subpopulações na mesma região geográfica, aparentemente sem nenhuma barreira física atual. As corredeiras de ambos rios (Negro e Branco) efetivamente não são barreira ao fluxo dos botos que estão a montante e a jusante destas. Ademais, com relação a possível conectividade entre indivíduos da bacia Amazônica e bacia do Orinoco, somente os indivíduos do alto Orinoco apresentaram algum componente de mistura com àqueles do alto Rio Negro e sistema Solimões.

#### *PADRÃO GEOGRÁFICO*

Apesar do baixo número amostral, é possível sugerir um padrão biogeográfico para os botos da bacia do Orinoco. Nela existem duas linhagens distintas às da bacia Amazônica (como observado pelos dados apresentados no Capítulo I desta dissertação). Uma delas, *Inia humboldtiana*, está restrita a região média e baixa da bacia do Orinoco, a jusante das grandes corredeiras do Rio Orinoco, Maipures (a jusante da confluência do Rio Tomo) e Atures (a jusante da confluência do Rio Meta), que provavelmente têm restringido o fluxo entre os indivíduos da porção alta e média/baixa da bacia (Herrera Trujillo 2013).

A bacia do Orinoco e a bacia Amazônica foram separadas entre 8 e 11 milhões de anos atrás (final do Mioceno) com o soergimento do arco do Vaupes, que se estendeu do oeste do escudo das Guianas até as proximidades da Serranía de la Macarena, Colômbia (Lundberg et al. 1998; Machado-Allison 2008; Wesselingh & Hoorn 2011; Winemiller & Willis 2011). Mesmo depois de separadas, áreas alagáveis ainda conectavam o alto Orinoco à bacia Amazônica (Grabert 1984). Atualmente ainda existem áreas alagáveis conectando as cabeceiras das bacias dos rios Atabapo e Negro, porém o Casiquiare ainda permanece como sendo a principal conexão entre ambas bacias (Machado-Allison 2008; Silva-León 2005; Winemiller & Willis 2011).

As características físico-químicas do canal Casiquiare (alternância de fluxo e gradiente de pH, por exemplo) restringem a conectividade para algumas espécies de



peixes com baixa tolerância fisiológica e ecológica (Albert et al. 2006; Winemiller et al. 2008; Winemiller & Willis 2011). Por outro lado, a continuidade de conexão entre ambas bacias via Casiquiare tem possibilitado a manutenção do fluxo gênico entre espécies de peixes compartilhadas por elas (Winemiller et al. 2008; Willis et al. 2010). Além disso, a ictiofauna de áreas do alto Orinoco tem sido descrita como mais relacionada àquela do Casiquiare e alto Rio Negro (Hubert & Renno 2006).

Ainda assim, nós observamos pouca (nuDNA) ou nenhuma (mtDNA) conectividade entre botos do alto Orinoco e do alto Rio Negro. O que certamente é consequência da ausência de uma amostragem sistemática no alto Orinoco, especialmente no canal Casiquiare, que possui densidade de botos mais alta do que em muitas áreas do alto, médio e baixo Orinoco (Herrera Trujillo et al. 2014). Dessa forma, não descartamos a possibilidade de que os botos do alto Orinoco possuam algum nível de fluxo gênico com os do alto Rio Negro.

Os indivíduos do alto Rio Negro também são geneticamente diferentes daqueles da porção baixa deste rio e dos demais rios amostrados. Essa diferenciação ocorre além das corredeiras de São Gabriel da Cachoeira, alcançando parte (mtDNA) ou toda (nuDNA) a região média deste rio. Essa região do alto Rio Negro é uma das áreas geológicas menos conhecidas do Brasil (Filardi 1998). A maior parte de seu curso localiza-se na região do escudo das Guianas, onde o canal do rio é mais estreito, flui mais lentamente e tem menor profundidade comparado às suas demais seções (Franzinelli & Igreja 2002). Provavelmente essa peculiaridade geológica tem contribuído para manutenção desta subpopulação geneticamente coesa.

A quebra populacional que identificamos nas proximidades de Santa Isabel do Rio Negro (mtDNA), também já foi observada para outras espécies da fauna aquática. Para o peixe *Fluviphylax*, uma divisão em termos de linhagem nesta região separa a linhagem alto (que é relacionada com a de espécimes do Orinoco) e médio Rio Negro (composta também por indivíduos do baixo Rio Branco) (Souza 2008). Para o peixe lápis (*Nannostomus eques*) os indivíduos do médio Rio Negro são mais proximamente relacionados aos da porção baixa deste rio (Terencio et al. 2012), sendo que a linhagem

do alto Rio Negro também segue até as proximidades de Santa Isabel do Rio Negro (Terencio et al. 2012).

A partir da região de Santa Isabel do Rio Negro o rio passa a fluir através dos depósitos sedimentares da bacia Amazônica (com idade do Pleistoceno superior), seu canal se torna mais largo, com profundidades médias, mas várias barreiras são vistas próximo a confluência com o Rio Branco, onde o rio torna-se abruptamente estreito (Franzinelli & Igreja 2002; Latrubesse & Franzinelli 2005).

A atual drenagem do Rio Branco tem uma história geológica mais recente. Até o início do Pleistoceno ela provavelmente era dirigida para o Norte, fluindo em direção ao Atlântico, e somente entre meados e o final dessa Época diversos eventos (tectônicos, sedimentares e climáticos) a redirecionaram para o sul, onde ela foi capturada pela drenagem do Negro/Amazonas (Schaefer & Darlymple 1996; Schaefer & Vale Júnior 1997).

Essa recente formação do Rio Branco pode explicar porque os botos que habitam suas águas são geneticamente “intermediários” (nuDNA) aos das demais áreas, bem como semelhantes (mtDNA) aos do médio e baixo Rio Negro. Provavelmente o Rio Branco foi colonizado posteriormente por indivíduos que migraram das regiões média e baixa do Rio Negro. Esse padrão do Rio Branco como divisor de subpopulações (ou até mesmo de linhagens) foi observado para o peixe-borboleta (*Carnegiella strigata*), que possui uma linhagem para o médio e outra para o baixo Rio Negro (Schneider et al. 2012).

Nós também observamos que os botos do baixo Rio Negro são geneticamente semelhantes àqueles do baixo Rio Madeira e Solimões. Esse tipo de “compartilhamento genético”, provavelmente histórico, entre o Negro com o baixo Madeira “ignorando” a grande barreira que é o Rio Amazonas/Solimões, já foi observado para outros grupos taxonômicos da fauna aquática realizados pelo nosso grupo de pesquisa. Em nível de distribuição de espécies, como observado em espécies de peixes, tais como em tucunaré (*Cichla monoculus*) (Willis et al. 2010) e em acará-disco (*Symphysodon*) (Farias & Hrbek

2008; Amado et al. 2011). Este padrão pode estar indicando uma conexão histórica entre o baixo Negro e o baixo Madeira.

A região da confluência do Rio Negro sofreu mudanças da sua posição, que estariam ligadas à história da evolução da seção baixa deste rio (Franzinelli 2011), fortemente influenciada por movimentos neotectônicos no Quaternário (Igreja et al. 1999; Franzinelli & Igreja 2002; Almeida-Filho & Miranda 2007; Silva et al. 2007; Franzinelli 2011). Na região do Rio Paduari (tributário da margem direita do Rio Negro) existiu um grande canal cujo fluxo seguia em direção sul, conectando-se ao Rio Manacapuru (Almeida-Filho & Miranda 2007). Esse antigo canal provavelmente era o antigo curso do Rio Negro, e sua confluência seria localizada onde hoje é a foz do Rio Manacapuru, ou seja, 60 km a oeste de Manaus (Almeida-Filho & Miranda 2007).

Após essa inversão de fluxo o baixo Rio Negro ainda não atingira sua configuração atual. Um segundo paleocanal é descrito para a região do rio Ariaú, sendo provavelmente este outro antigo canal do Rio Negro (Silva et al. 2007). Na confluência deste canal com o Rio Solimões ocorreram diversos processos de sedimentação, fazendo com que o curso do rio migrasse, formando o Rio Ariaú, também de idade Quaternária (Silva et al. 2007). Essas inversões de fluxo trouxeram a confluência do Rio Negro para áreas cada vez mais próximas ao baixo Rio Madeira. Essa aproximação consequentemente deixou mais próximos os botos da porção baixa deste rio com àqueles do baixo Rio Madeira, resultando na similaridade genética observada em nossos resultados (nuDNA).

Além disso, o próprio baixo Rio Negro, especialmente a região do Arquipélago de Anavilhanas (Franzinelli & Igreja 1990), foi um dos maiores lagos Ria do final do Pleistoceno, alcançando uma extensão de mais de 100 km (Irion et al. 2011). Lagos do tipo Ria seriam antigos sistemas fluviais, profundamente incisados e preenchidos por água doce (Irion et al. 2011). Essa região lacustre passou por diversos graus de enchimento devido as alterações no nível do mar, que chegaram a atingir até 2.500 km da foz a montante do Rio Amazonas (Irion et al. 2011). Esses cenários de águas baixas e altas, relacionados aos períodos glaciais, nos levam a pressupor que a subpopulação de botos do alto Rio Negro provavelmente tenha ficado isolada das demais durante os

períodos glaciais. Período em que as águas deste rio atingiram um nível tão baixo a ponto de tornar as rochas de sua porção alta mais expostas, inviabilizando o fluxo de indivíduos do alto para as regiões média/baixa ou até mesmo para o Rio Branco.

Mas, apesar de a evolução do vale do Rio Negro provavelmente ter dado início muito antes do último glacial (Irion et al. 2011), todas as seções desse rio ainda vêm sofrendo mudanças evolutivas importantes desde o final do Pleistoceno (Latrubesse & Franzinelli 2005). Entre 27 e 60 mil anos atrás, na região do alto Rio Negro, o rio chegou a ter 14 m acima do nível da água atual (Latrubesse & Franzinelli 2005). Desde meados do Holoceno (14 -1 mil anos atrás), as áreas dos arquipélago de Marauíá (médio Rio Negro) e Anavilhanas (baixo Rio Negro) vêm sendo moldadas (Latrubesse & Franzinelli 2005). É provável que essas alterações de origem recente, aliadas às características atuais dos sistemas de rios aqui mencionados, tenham contribuído para manter os padrões populacionais observados nos botos dessas áreas.

#### *ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA E FLUXO GÊNICO*

Valores altos (mtDNA) e baixos (nuDNA) de estruturação genética ( $F_{ST}$  e  $\Phi_{ST}$ ) e fluxo gênico ( $N_m$ ) foram observados para as subpopulações inferidas, e a hipótese de isolamento por distância entre elas foi descartada. Apesar de distinguirmos subpopulações geneticamente diferenciadas através do resultado do *STRUCTURE*, os valores de  $F_{ST}$  indicam fraca diferenciação genética. Mesmo estando um pouco acentuado, o aspecto “gradual” de diferenciação genética explica os baixos valores de  $F_{ST}$ , e provavelmente a inclusão de indivíduos de áreas entre Barcelos e Novo Airão tornaria menos bruscas essas divisões subpopulacionais.

O contrário é observado para os dados de mtDNA, onde tanto a análise de *clusters* (*BAPS*) quanto os valores de  $\Phi_{ST}$  mostram forte diferenciação genética para as subpopulações inferidas. Além disso, os poucos haplótipos compartilhados também evidenciam a existência de subgrupos (Figura 4). Duas principais subpopulações ocorrem no Rio Negro, sendo uma composta pelos indivíduos distribuídos ao longo do alto e parte do médio Rio Negro (até a localidade de Castanheira [11]); e outra por aqueles das

demais localidades do médio e baixo Rio Negro e do Rio Branco, com poucos indivíduos geneticamente relacionados ao baixo Madeira e Solimões.

Esse tipo de discordância entre mtDNA e nuDNA em estudos sobre cetáceos é comum de ser observada. Em cachalotes (*Physeter macrocephalus*), cuja distribuição é cosmopolita, as restrições energéticas impostas pelas fêmeas e filhotes provavelmente os restringem a baixas latitudes, enquanto os machos se dispersam amplamente indo aos pólos e retornando aos trópicos para se reproduzirem (Lyrholm et al. 1999). Nesta espécie, a nível de DNA mitocondrial, a estruturação em populações de áreas próximas é alta, indicando filopatria nas fêmeas (Engelhaupt et al. 2009). *Sotalia guianensis*, que ocorre do Caribe (Nicaragua) à costa do Atlântico da América do Sul (Florianópolis, sul do Brasil), também apresenta unidades populacionais em estruturas regionais, com fluxo gênico restrito de fêmeas, o que também demonstra filopatria por estas (Cunha et al. 2005; Caballero et al. 2010).

Baixos níveis de fluxo gênico, como os que observamos para as populações analisadas, já foram mencionados por outros trabalhos sobre variação populacional em *Inia*, evidenciando isolamento demográfico e genético em populações de várias áreas da distribuição do gênero (Hollatz et al. 2011; Banguera-Hinestroza et al. 2002). Na Amazônia Central, análises sobre populações de *Inia geoffrensis* de áreas relativamente próximas (distantes cerca de 45 km), mostraram estruturação populacional com base no DNA mitocondrial, mas não pelo DNA nuclear (Hollatz et al. 2011). Tanto os baixos níveis de fluxo gênico quanto os altos valores de estrutura populacional ( $\Phi_{ST}$ ), revelados apenas pelos dados de mtDNA, indicam filopatria das fêmeas (Hollatz et al. 2011).

Um contraponto entre a filopatria mencionada por Hollatz et al. (2011) e pelos nossos resultados, são os dados ecológicos, sobre uma população de botos da Amazônia Central, apresentados por Mintzer et al. (2013). Os quais demonstram que tanto machos quanto fêmeas apresentam fidelidade ao local. Por outro lado, sabe-se que os machos da espécie percorrem distâncias maiores do que as fêmeas (Martin & da Silva 2004; Hollatz et al. 2011). Talvez seja esta a razão de a estruturação genética em fêmeas ser mais marcada, e em machos o que se vê é um gradiente de estrutura populacional, mas não

supopulações completamente isoladas. De qualquer forma, essa questão de filopatria nas espécies do gênero ainda precisa ser melhor avaliada.

Outro aspecto interessante é o fato de o isolamento por distância não explicar esse tipo de estruturação observada em populações de *Inia geoffrensis* (Hollatz et al. 2011), tal qual constatamos nos resultados aqui apresentados, para ambos marcadores moleculares. Em *Pontoporia blainvillei*, espécie irmã das espécies do gênero *Inia* (Cassens et al. 2000; Hamilton et al. 2001), a hipótese de isolamento por distância (Lázaro et al. 2004) também não explica as divergências genéticas observadas entre as distintas unidades de manejo da espécie (Cunha et al. 2014).

Também não se pode descartar a influência do ambiente como um forte definidor de estrutura populacional nesses animais (Hollatz et al. 2011). A variação no nível da água (períodos de seca e cheia) nas diferentes seções do Rio Negro não ocorre concomitantemente. Por exemplo, enquanto o alto Rio Negro está com níveis de água baixos entre os meses de novembro e fevereiro, o baixo Rio Negro está em período de inundação (Zeidemann 2001). Essa diferença ocorre porque nessa época o Solimões recebe grandes quantidades de água de seus diversos tributários que estão em época de enchente, e é ele que exerce maior influência sobre o nível das águas da região do baixo Rio Negro (Zeidemann 2001; Latrubesse & Franzinelli 2005). A variação no nível das águas na região do médio Rio Negro é fortemente influenciada pelo Rio Branco, e nesta área o período de seca ocorre entre os meses de outubro a novembro (Zeidemann 2001).

Apesar de a reprodução na espécie ser flexível e adaptada às condições locais, e não diretamente ao nível das águas (da Silva et al. 2008), os períodos de acasalamento e reprodução nas espécies do gênero têm sido reportados com ocorrência de acordo com a sazonalidade (Gomez-Salazar et al. 2012). Portanto, essa diferença em termos de sazonalidade em cada subregião hidrográfica pode ter influência sob os aspectos reprodutivos da espécie, mas suas prováveis consequências sobre a estrutura populacional ainda precisam ser investigadas.

Por outro lado, o fato de as amostragens serem realizadas apenas em períodos de seca (por uma questão de viabilidade do uso da técnica) pode resultar em informação

enviesada sobre indivíduos migrantes na espécie. Sendo assim, o que podemos considerar é que tanto os aspectos ecológicos quanto os comportamentais precisam ser melhor investigados, a fim de compreender suas influências sobre a estrutura genética populacional de botos, bem como os níveis e direcionamento de fluxo gênico.

#### *DIVERSIDADE GENÉTICA E IMPLICAÇÕES PARA CONSERVAÇÃO*

Níveis relativamente altos de diversidade genética foram observados, tanto para o DNA nuclear quanto para o mitocondrial, exceto para o parâmetro de diversidade nucleotídica. Hollatz et al. (2011) ao analisarem populações de *Inia geoffrensis* da Amazônia Central, também encontraram altos níveis de diversidade. No entanto, apesar de termos analisado um menor número de indivíduos, observamos um número maior de sítios polimórficos quando comparado aos resultados desses autores. Para ambos marcadores, os maiores valores são observados para as áreas do Rio Branco, baixo (e médio, no caso do mtDNA) Rio Negro e baixo Rio Madeira. Enquanto que, os valores mais baixos, são observados para o Solimões e alto (e médio, no caso de nuDNA) Rio Negro.

Altas taxas de diversidade genética tornam uma população capaz de responder e se adaptar às mudanças ambientais. Isto torna possível que ela mantenha seu potencial evolutivo (Frankham et al. 2008). Para a subpopulação do alto Rio Negro, que apresenta menores valores para esses índices, acreditamos ser provável que o número de emigrantes exceda o de imigrantes; isso considerando a hipótese de que ela possua um padrão de direcionamento de fluxo gênico semelhante ao das populações de boto do alto Rio Madeira (Gravena et al. 2015).

Nossos resultados não excluem a importância de ampliar a amostragem ao longo do Rio Negro, especialmente em áreas que seguem desde o município de Barcelos até sua foz; além de uma melhor amostragem no Rio Branco. Mas, é possível constatamos que as subpopulações dos rios Negro e Branco não estão limitadas pelas corredeiras de São Gabriel da Cachoeira e do Bem Querer, respectivamente. Portanto, a construção dos empreendimentos hidrelétricos, anteriormente projetados para essas áreas (Fearnside

1995; Ussami 2010; Brasil & EPE 2014), trará sérias implicações sobre tais subpopulações. Ambas serão fragmentadas demograficamente e geneticamente, o que reduzirá sua probabilidade de persistência em tais ambientes.

As hidrelétricas afetam todo o sistema de um rio, o desmatamento da mata ciliar por supressão das margens e áreas adjacentes, além de toda a cadeia de degradação e assoreamentos consequentes de todo o processo de implementação do empreendimento, que diretamente alteram o ecossistema devido às mudanças no suprimento de nutrientes e sedimentos (Latrubesse et al. 2005; Coelho 2008). Para o golfinho do rio Indu (*Platanista gangetica minor*) a redução do fluxo de água durante a estação da seca, ocasionada pela captação de água pelas barragens, foi o principal fator para explicar o declínio de suas populações, que em alguns trechos dos rios foi extinguida (Braulik et al. 2014). Por isso, sugerimos que, além da ampliação dos estudos genéticos nas áreas dos rios Negro e Branco, avaliações ecológicas demográficas também serão cruciais para melhor definir estratégias de conservação para essas distintas subpopulações.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Para as áreas deste estudo, por apresentarem linhagens e subpopulações geneticamente diferenciadas, consideramos que:

Na bacia do Orinoco, a linhagem que corresponde à região médio/baixo Orinoco apresenta diferenciação em nível de espécie. Enquanto que, a do alto/médio Orinoco deve ser melhor avaliada em estudos futuros, para que seu *status* taxonômico seja identificado, bem como para verificar a possível relação com indivíduos do alto Rio Negro, via Canal Casiquiare.

Para as áreas de ambas bacias (do Orinoco e Amazonas), as diferenciações genéticas aqui observadas, precisam ser reavaliadas, a fim de verificar adaptações aos diferentes sistemas de rios.

Para os rios Negro, Branco, baixo Madeira e Solimões, as diferenciações genéticas que permitiram identificar subpopulações parecem corresponder à história evolutiva



dessas áreas, bem como terem sido mantidas em resposta aos aspectos biológicos e ecológicos de *Inia geoffrensis*.

Devido a diferenciação genética observada nos botos dos rios Branco e Negro, tanto para o mtDNA quanto para o nuDNA, consideramos que, a existência de distintas Unidades de Conservação (UC), bem como a permutabilidade ecológica entre tais UC's, deve ser criteriosamente avaliada. Para definí-las, é importante que se avalie tanto o direcionamento do fluxo gênico entre tais subpopulações, quanto sua história demográfica. O que permitirá, inclusive, corroborar as hipóteses filogeográficas aqui propostas.

Por fim, ressaltamos que qualquer empreendimento hidrelétrico a ser construído em quaisquer das corredeiras dos rios Negro e Branco, comprometerá drasticamente a integridade populacional de *Inia geoffrensis* nessas áreas. Isso se deve ao fato de tais corredeiras não delimitarem as diferentes subpopulações observadas, o que significa que ocorre fluxo gênico entre os botos que estão a jusante e a montante destas corredeiras.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Akaike, H., 1974. A new look at the Statistical Model Identification. *IEEE Transactions on Automatic Control*, AC-19(6), pp.716–723.
- Albert, J.S., Lovejoy, N.R. & Crampton, W.G.R., 2006. Miocene tectonism and the separation of cis- and trans-Andean river basins: Evidence from Neotropical fishes. *Journal of South American Earth Sciences*, 21(1-2), pp.14–27. Disponível em: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0895981105001392>.
- Aleixo, A., 2009. Conceitos de espécie e suas implicações para a conservação. *Megadiversidade*, 5(1-2), pp.87–95.
- Aliaga-Rossel, E. & Quevedo, S., 2011. The bolivian river dolphin in the Tijamuchi and Ibare rivers (upper Madeira basin) during the rainy season in “La Niña” event. *Mastozoologia Neotropical*, 18(2), pp.293–299.
- Aliaga-Rossel, E., 2002. Distribution and abundance of the river dolphin (*Inia geoffrensis*) in the Tijamuchi river, Beni, Bolivia. *Aquatic Mammals*, 28(3), pp.312–323.
- Aliaga-Rossel, E., 2003. Situación actual del delfín de río (*Inia geoffrensis*) en Bolivia. *Ecología en Bolivia*, 38(2), pp.167–177.
- Aliaga-Rossel, E., McGuire, T.L. & Hamilton, H., 2006. Distribution and encounter rates of the river dolphin (*Inia geoffrensis boliviensis*) in the central Bolivian Amazon. *J. Cetacean Res. Manage*, 8(1), pp.87–92.
- Almeida-Filho, R. & Miranda, F.P., 2007. Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: Evidences in an SRTM digital elevation model. *Remote Sensing of Environment*, 110(3), pp.387–392.
- Alves, L.C.P.D.S., Zappes, C.A. & Andriolo, A., 2012. Conflicts between river dolphins (Cetacea: Odontoceti) and fisheries in the Central Amazon: a path toward tragedy? *Zoologia (Curitiba)*, 29(5), pp.420–429. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1984-46702012000500005&lng=en&nrm=iso&tlng=en](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1984-46702012000500005&lng=en&nrm=iso&tlng=en).
- Amado, M.V., Hrbek, T. & Farias, I.P., 2011. A molecular perspective on systematics, taxonomy and classification Amazonian discus fishes of the genus *Symphysodon*. *International Journal of Evolutionary Biology*, p.360654. Disponível em: <http://mbe.oxfordjournals.org>.
- Araújo, C.C. & da Silva, V.M.F., 2014. Spatial distribution of river dolphins, *Inia geoffrensis*, in the Araguaia River (central Brazil). *Mammalia*, pp.1–6.

- Avise, J.C. & Wollenberg, K., 1997. Phylogenetics and the origin of species. *Proceedings of Natl. Acad. Sci.*, 94(July), pp.7748–7755.
- Avise, J.C., 1991. Ten unorthodox perspectives on evolution prompted by comparative population genetic findings on mitochondrial DNA. *Annual Rev. Genet.*, 22, pp.45–69.
- Avise, J.C., 1998. The history and purview of phylogeography: a personal reflection. *Molecular Ecology*, 7(4), pp.371–379. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1365-294x.1998.00391.x>.
- Avise, J.C., 2004. *Molecular Markers, Natural History, and Evolution* 2nd ed., Sunderland, MA, USA: Sinauer Associates, Inc.
- Avise, J.C., Neigel, J.E. & Arnold, J., 1984. Demographic influences on mitochondrial DNA lineage survivorship in animal populations. *Journal of Molecular Evolution*, 20, pp.99–105.
- Banguera-Hinestroza, E. et al., 2002. Molecular identification of evolutionarily significant units in the amazon river dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *The Journal of Heredity*, 93(5), pp.312–322.
- Barthem, R. & Goulding, M., 2007. *An unexpected ecosystem: the Amazon as revealed by fisheries*, Missouri Botanical Garden Press: Amazon Conservation Association (ACA).
- Berta, A., Sumich, J.L. & Kovacs, K.M., 2006. *Marine mammals: Evolutionary Biology* 2nd ed. Academic Press, ed., San Diego, CA, USA: Elsevier Inc.
- Best, R.C. & da Silva, V.M.F., 1989a. Amazon river dolphin, boto *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817). Em: *Handbook of Marine Mammals*. Academic Press Limited, pp. 1–23.
- Best, R.C. & da Silva, V.M.F., 1989b. Biology, status and conservation of *Inia geoffrensis* in the Amazon and Orinoco river basins. Em: W. F. Perrin et al., eds. *Biology and Conservation of the River Dolphins*. pp. 23–34.
- Best, R.C. & da Silva, V.M.F., 1993. *Inia geoffrensis*. *Mammalian Species*, 426, pp.1–8.
- Bolaños-Jiménez, J. et al., 2008. Tonina del Orinoco, *Inia geoffrensis* (Blainville 1817). Em: J. P. Rodríguez & F. Rojas-Suárez, eds. *Libro Rojo de la Fauna Venezolana*. Caracas, Venezuela: Provita y Shell Venezuela, S.A., p. 113.
- Brasil, M. de M. e E. & EPE, E. de P.E., 2014. *Plano Decenal de Expansão de Energia 2023*, Brasília: MME/EPE.

- Brasil, M. de M. e E., 1997. *Portaria nº 55, de 17 de março de 1997. Aprova o novo Projeto Básico relativo ao aproveitamento hidrelétrico PCH São Gabriel da Cachoeira*, Brasília, DF: Diário Oficial [da República Federativa do Brasil].
- Braulik, G.T. et al., 2014. Habitat fragmentation and species extirpation in freshwater ecosystems; causes of range decline of the indus river dolphin (*Platanista gangetica minor*). *PLoS ONE*, 9(7), p.e101657.
- Bringel, S.R.B. & Pascoaloto, D., 2012. As águas transfronteiriças do alto rio Negro. Em: L. A. G. de Souza & E. G. Castellón, eds. *Desvendando as fronteiras do conhecimento na região do alto rio Negro*. Manaus, AM: INPA, pp. 7–21.
- Brown, S.D.J. et al., 2012. SPIDER: An R package for the analysis of species identity and evolution, with particular reference to DNA barcoding. *Molecular Ecology Resources*, 12(3), pp.562–565.
- Caballero, S. et al., 2007. Taxonomic status of the genus *Sotalia*: species level ranking for “tucuxi” (*Sotalia fluviatilis*) and “costero” (*Sotalia guianensis*) dolphins. *Marine Mammal Science*, 23(2), pp.358–386.
- Caballero, S. et al., 2010. Mitochondrial DNA diversity, differentiation and phylogeography of the South American riverine and coastal dolphins *Sotalia fluviatilis* and *Sotalia guianensis*. *LAJAM*, 8(1-2), pp.69–79.
- Caixeta, E.T. et al., 2009. Tipos de marcadores moleculares. Em: A. Borém & E. T. Caixeta, eds. *Marcadores moleculares*. Viçosa - MG: Editora Folha de Viçosa, pp. 11–94.
- Caldwell, M., Gaines, M.S. & Hughes, C.R., 2002. Eight polymorphic microsatellite loci for bottlenose dolphin and other cetacean species. *Molecular Ecology Notes*, 2, pp.393–395.
- Camargo, A. & Sites, J.J., 2013. Species Delimitation: A Decade After the Renaissance. Em: I. Y. Pavlinov, ed. *The Species Problem - Ongoing Issues*. InTech, pp. 225–247.
- Casinos, A. & Ocaña, J., 1979. A craniometrical study of the genus *Inia* D’Orbigny, 1834, Cetacea, Platanistoidea. *Saugetierkunde. Mitteilung*, 27, pp.194–206.
- Cassens, I. et al., 2000. Independent adaptation to riverine habitats allowed survival of ancient cetacean lineages. *PNAS*, 97(21), pp.11343–11347.
- Cassens, I. et al., 2005. Evidence for male dispersal along the coasts but no migration in pelagic waters in dusky dolphins (*Lagenorhynchus obscurus*). *Molecular Ecology*, 14, pp.107–121.

- Coelho, A.L.N., 2008. Geomorfologia fluvial de rios impactados por barragens. *Caminhos de Geografia*, 9(26), pp.16–32.
- Corander, J. et al., 2004. BAPS 2: enhanced possibilities for the analysis of genetic population structure. *Bioinformatics*, 20(15), pp.2363–2369.
- Corander, J. et al., 2013. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. pp.1–28. Disponível em:  
<http://www.helsinki.fi/bsg/software/BAPS/macSnow/BAPS6manual.pdf>.
- Corander, J., Waldmann, P. & Sillanpaa, M.J., 2003. Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163(1), pp.367–374. Disponível em:  
<http://www.genetics.org/cgi/content/abstract/163/1/367>.
- Costa-Urrutia, P. et al., 2011. Population genetic structure and social kin associations of Franciscana dolphin, *Pontoporia blainvillei*. *Journal of Heredity*, pp.1–11.
- Cozzuol, M.A., 1985. The odontoceti of the Mesopotamiense of the Parana river ravines. Systematic Review. *Investigations on Cetacea*, XVII, pp.39–51.
- Cracraft, J., 1983. Species concepts and speciation analysis. Em: *Current Ornithology*. pp. 159–187.
- Cunha, H.A. et al., 2005. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Marine Biology*.
- Cunha, H.A. et al., 2014. Population structure of the endangered Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*): Reassessing Management Units. *PLoS ONE*, 9(1), pp.1–8.
- da Silva, V.M.F. & Martin, A.R., 2000. A study of the boto, or amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*), in the Mamirauá Reserve, Brazil: operation and techniques. Em: R. R. Reeves, B. D. Smith, & T. Kasuya, eds. *Biology and Conservation of freshwater cetaceans in Asia*. pp. 121–131.
- da Silva, V.M.F., 1986. Separação ecológica dos golfinhos de água doce da Amazônia. Em: *Actas de la Primera Reunion de Trabajo de Expertos em Mamiferos Acuaticos de America del Sur*. Buenos Aires.
- da Silva, V.M.F., 1994. *Aspects of the biology of the amazonian dolphins genus Inia and Sotalia fluviatilis*. Cambridge, UK.
- da Silva, V.M.F., 2009. Amazon river dolphin: *Inia geoffrensis*. Em: W. F. Perrin, B. Würsig, & J. G. M. Thewissen, eds. *Encyclopedia of marine mammals*. London: Academic Press, pp. 26–28.

- da Silva, V.M.F., 2010. Boto cor-de-rosa (*Inia geoffrensis*). Em: C. C. Rocha-Campos, I. de G. Câmara, & D. J. Pretto, eds. *Plano de Ação Nacional para a Conservação dos Mamíferos Aquáticos: Pequenos Cetáceos*. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, pp. 17–20.
- da Silva, V.M.F., Goulding, M. & Barthem, R., 2008. *Golfinhos da Amazônia*, Manaus: INPA.
- da Silva, V.M.F., Martin, A.R. & Carmo, N.A.S. do, 2011. Boto bait: amazonian fisheries pose threat to elusive dolphin species. *Magazine of the Species Survival Commission*, (53), pp.10–11.
- Darriba, D. et al., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nature Methods*, 9(8), p.772. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nmeth.2109>.
- de Queiroz, K. & Donoghue, M.J., 1988. Phylogenetic systematics and the species problem. *Cladistics*, 4, pp.317–338.
- de Queiroz, K., 1998. The general lineage concept of species, species criteria, and the process of speciation: A conceptual unification and terminological recommendations. Em: D. J. Howard & S. H. Berlocher, eds. *Endless Forms: Species and Speciation*. New York: Oxford University Press, pp. 57–75.
- de Queiroz, K., 2007. Species concepts and species delimitation. *Systematic biology*, 56(6), pp.879–86. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18027281>.
- Diazgranados, M.C. & Trujillo, F., 2004. Repertorio vocal de los delfines de río *Inia geoffrensis* y *Sotalia fluviatilis* en la Orinoquia y Amazonia colombianas. Em: F. Trujillo et al., eds. *Estudios de fauna silvestre en ecosistemas acuáticos en la Orinoquia colombiana*. Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Estudios Ambientales y Rurales Instituto de Estudios Ambientales para el Desarrollo Departamento de Ecología y Territorio, pp. 85–108.
- Diniz, K.S., 2011. *La pesca del bagre zamurito (Calophysus macropterus, Siluriformes: Pimelodidae) y su efecto potencial sobre la extracción de toninas (Inia geoffrensis, Cetacea: Iniidae) y babas (Caiman crocodilus, Crocodilia: Aligatoridae) en Venezuela*. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.
- Dobzhansky, T., 1950. Mendelian populations and their evolution. *The American Naturalist*, 74(819), pp.312–321.
- Donoghue, M.J., 1985. A critique of the Biological Species Concept and recommendations for a Phylogenetic alternative. *The Bryologist*, 88(3), pp.172–181.

- Drummond, A.J. & Rambaut, A., 2007. BEAST: Bayesian evolutionary analysis by sampling trees. *BMC evolutionary biology*, 7(214). Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2247476&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Drummond, A.J. et al., 2012. Geneious v5.6.6[wwdocument]. Disponível em: <http://www.geneious.com>.
- Earl, D.A. & VonHoldt, B.M., 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2), pp.359–361.
- Eldredge, N. & Cracraft, J., 1980. *Phylogenetic patterns and the evolutionary process. Method and theory in comparative Biology*, New York: Columbia University Press.
- Engelhaupt, D. et al., 2009. Female philopatry in coastal basins and male dispersion across the North Atlantic in a highly mobile marine species, the sperm whale (*Physeter macrocephalus*). *Molecular Ecology*, 18(20), pp.4193–4205.
- Escobar, M.D.L. et al., 2015. Delimiting evolutionary significant units of *Piaractus brachypomus* (Characiformes: Serrasalminidae) from the Orinoco and Amazon River basins with insight on routes of historical connectivity. *Journal of Heredity*, pp.428–438.
- Evangelista, R.A., Sander, C. & Wankler, F.L., 2008. Estudo preliminar da distribuição pluviométrica e do regime fluvial da bacia do rio Branco, estado de Roraima. Em: P. R. F. Silva & R. S. Oliveira, eds. *Roraima 20 anos: as geografias de um novo Estado*. Boa Vista: Editora da UFPR, pp. 142–167.
- Excoffier, L. & Lischer, H.E.L., 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10(3), pp.564–567.
- Excoffier, L., Smouse, P.E. & Quattro, J.M., 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2), pp.479–491.
- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K., 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4), pp.1567–87. Disponível em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1462648&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

- Falush, D., Stephens, M. & Pritchard, J.K., 2007. Inference of population structure using multilocus genotype data: dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 7, pp.574–578.
- Farias, I.P. & Hrbek, T., 2008. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 49(1), pp.32–43.
- Fearnside, P.M., 1995. Hydroelectric Dams in the Brazilian Amazon as Sources of “Greenhouse” Gases. *Environmental Conservation*, 22(01), pp.7–19.
- Fearnside, P.M., 2015. *Hidrelétricas na Amazônia* M. Cohn-Haft, ed., INPA.
- Ferreira, E. et al., 2007. *Rio Branco: ecologia, peixes e conservação de Roraima*, Manaus: ACA/INPA/Mamirauá.
- Filardi, M.C.L., 1998. *Contribuição à geologia da região do alto Rio Negro, utilizando o processamento digital de dados aerogeofísicos e de imagens de radar (RADAMBRASIL, JERS 1 - SAR)*. Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.unicamp.br/document/?code=vtls000130116&fd=y>.
- Fitzpatrick, J.W., 2010. Subspecies are for convenience. Em: *Ornithological Monographs*. The American Ornithologists' Union, pp. 54–61.
- Frankham, R., Ballou, J.D. & Briscoe, D.A., 2008. Resolução de incertezas taxonômicas e definição de unidades de manejo. Em: R. Frankham, J. D. Ballou, & D. A. Briscoe, eds. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, pp. 103–124.
- Franzinelli, E. & Igreja, H., 1990. Utilização de sensoriamento remoto na investigação do baixo Rio Negro e grande Manaus. Em: Anais do VI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto, ed. *VI Simpósio Brasileiro de Sensoriamento Remoto*. Manaus, AM: INPE, pp. 641–648.
- Franzinelli, E. & Igreja, H., 2002. Modern sedimentation in the Lower Negro River, Amazonas State, Brazil. *Geomorphology*, 44, pp.259–271.
- Franzinelli, E., 2011. Características morfológicas da confluência dos rios Negro e Solimões (Amazonas, Brasil). *Revista Brasileira de Geociências*, 41(4), pp.587–596.
- Freitas, L.A.S., 1997. *Geografia e história de Roraima* 5th ed., Manaus-AM: Grafima.
- Fuentes, L., Trujillo, F. & Diazgranados, M.C., 2004. Evaluación de los patrones de comportamiento del delfín de río *Inia geoffrensis humboldtiana*. Em: F. Trujillo et al., eds. *Estudios de fauna silvestre en ecosistemas acuáticos en la Orinoquia*



*colombiana*. Pontificia Universidad Javeriana Facultad de Estudios Ambientales y Rurales Instituto de Estudios Ambientales para el Desarrollo Departamento de Ecología y Territorio, pp. 41–68.

- Galetti Jr., P.M. et al., 2008. Genética da conservação na biodiversidade brasileira. Em: R. Frankham, J. D. Ballou, & D. A. Briscoe, eds. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto, SP, Brazil: Editora SBG, pp. 244–74.
- Galetti, M. et al., 2010. Mudanças no Código Florestal e seu impacto na ecologia e diversidade dos mamíferos no Brasil. *Biota Neotropica*, 10(4), pp.47–52.
- Gomez-Salazar, C., Trujillo, F. & Whitehead, H., 2012. Ecological factors influencing group sizes of river dolphins (*Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis*). *Marine Mammal Science*, 28(2), pp.E124–E142. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2011.00496.x>.
- Gomez-Salazar, C., Trujillo, F., Portocarrero-Aya, M., et al., 2012. Population, density estimates, and conservation of river dolphins (*Inia* and *Sotalia*) in the Amazon and Orinoco river basins. *Marine Mammal Science*, 28(1), pp.124–153. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2011.00468.x>.
- Grabert, H., 1984. Migration and speciation of the South American Iniidae (Cetacea, Mammalia). *Zeitschrift Säugetierkunde*, 49(1978), pp.334–341.
- Gravena, W. et al., 2008. Amazon River dolphin love fetishes: from folklore to molecular forensics. *Marine Mammal Science*, 24(4), pp.969–978. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1748-7692.2008.00237.x>.
- Gravena, W. et al., 2009. Microsatellite loci for population and parentage analysis in the Amazon River dolphin (*Inia geoffrensis* de Blainville, 1817). *Molecular Ecology Resources*, 9, pp.600–603. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1755-0998.2008.02458.x/full>.
- Gravena, W. et al., 2014. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: Iniidae)? *Conservation Genetics*.
- Gravena, W. et al., 2015. Living between rapids: genetic structure and hybridization in botos (Cetacea: Iniidae: *Inia* spp.) of the Madeira River, Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*, 114, pp.764–777.
- Guindon, S. & Gascuel, O., 2003. PhyML: A simple, fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology*, 52(5), pp.696–704.

- Hamilton, H. et al., 2001. Evolution of river dolphins. *The Royal Society*, 268, pp.549–556.
- Harrison, R.G. & Larson, E.L., 2014. Hybridization, Introgression, and the Nature of Species Boundaries. *Journal of Heredity*, 105(S1), pp.795–809. Disponible em: <http://jhered.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/jhered/esu033>.
- Herrera Trujillo, O.L., 2013. *Estatus de los delfines de río Sotalia sp. e Inia geoffrensis en la cuenca del Orinoco*. Universidad Internacional Menéndez Pelayo.
- Herrera Trujillo, O.L., Portocarrero Aya, M. & Trujillo, F., 2014. Distribución, abundancia y uso de hábitat de los delfines de río en la cuenca del Orinoco y el Brazo Casiquiare. Em: *XVI Reunión de Trabajo de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur*. Cartagena, Colombia: Libro de resúmenes. 4º Congreso Colombiano de Zoología, p. 777.
- Hershkovitz, P., 1963. Notes on south american dolphins of the genera *Inia*, *Sotalia* and *Tursiops*. *Journal of Mammalogy*, 44(1), pp.98–103.
- Hoelzel, A.R., 1992. Conservation genetics of whales and dolphins. *Molecular Ecology*, 1, pp.119–125.
- Hollatz, C. et al., 2011. The Amazon River system as an ecological barrier driving genetic differentiation of the pink dolphin (*Inia geoffrensis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 102, pp.812–827.
- Hrbek, T. et al., 2014. A new species of river dolphin from Brazil or: how little do we know our biodiversity? *PLoS ONE*, 9(1), p.e83623. Disponible em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3898917&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Hubert, N. & Renno, J.-F., 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, 33, pp.1414–1436.
- Igreja, H., Franzinelli, E. & Repolho, T., 1999. Neotectonic influence on fluvial capture in the Amazon Basin, State of Amazonas, Brazil. *GLOCOPH/98*, 49(2), pp.197–206.
- Irion, G. et al., 2011. Development of the Amazon valley during the Middle to Late Quaternary: sedimentological and climatological observations. Em: W. J. Junk et al., eds. *Amazonian Floodplain Forests: Ecophysiology, Biodiversity and Sustainable Management*. Ecological Studies. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 27–42. Disponible em: <http://link.springer.com/10.1007/978-90-481-8725-6>.

- Jackson, J.A. et al., 2014. Global diversity and oceanic divergence of humpback whale (*Megaptera novaeangliae*). *Proceedings of the Royal Society of Biological sciences*, 281: 20133222.
- Jakobsson, M. & Rosenberg, N.A., 2007. CLUMP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. *Bioinformatics*, 23(14), pp.1801–1806.
- Kearse, M. et al., 2012. Geneious basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics Applications Note*, 28(12), pp.1647–1649.
- Knowles, L.L. & Carstens, B.C., 2007. Delimiting species without monophyletic gene trees. *Systematic Biology*, 56(6), pp.887–95. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18027282>.
- Krebs, C.J., 2001. *Ecology: The Experimental Analysis of Distribution and Abundance* 5th ed., New York: Addison Wesley Longman, Inc.
- Lailson-Brito Jr., J. et al., 2008. Dolphins as indicators of micropollutant trophic flow in Amazon basin. *Oecologia Brasiliensis*, 12(3), pp.531–541.
- Latrubesse, E.M. & Franzinelli, E., 2005. The late Quaternary evolution of the Negro River, Amazon, Brazil: Implications for island and floodplain formation in large anabranching tropical systems. *Geomorphology*, 70(3-4), pp.372–397.
- Latrubesse, E.M., Stevaux, J.C. & Sinha, R., 2005. Tropical rivers. *Geomorphology*, 70(3-4), pp.187–206.
- Layne, J.N., 1958. Observation on freshwater dolphins in the upper Amazon. *Journal of Mammalogy*, 39(1), pp.1–22.
- Lázaro, M., Lessa, E.P. & Hamilton, H., 2004. Geographic genetic structure in the Franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Marine Mammal Science*, 20(2), pp.201–214.
- Loch, C., Marmontel, M. & Simões-Lopes, P.C., 2009. Conflicts with fisheries and intentional killing of freshwater dolphins (Cetacea: Odontoceti) in the Western Brazilian Amazon. *Biodiversity and Conservation*, 18(14), pp.3979–3988. Disponível em: <http://link.springer.com/10.1007/s10531-009-9693-4>.
- Lundberg, J.G. et al., 1998. The stage for neotropical fish diversification: a history of tropical South American rivers. Em: L. R. Malabarba et al., eds. *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes*. Porto Alegre: Edipicrs, pp. 13–48.

- Lyrholm, T. et al., 1999. Sex-biased dispersal in sperm whales: contrasting mitochondrial and nuclear genetic structure of global populations. *The Royal Society*, 266, pp.347–354.
- Machado-Allison, A., 2008. Sobre el origen del Orinoco, su relación con cuencas vecinas, las evidencias biológico-paleontológicas y la conservación de hábitat acuáticos: una revisión basada en la información íctinica. *Boletín Acad. C. Fis., Mat. y Nat.*, LXVIII(1-2), pp.1–39.
- Magnusson, W.E., Best, R.C. & da Silva, V.M.F., 1980. Numbers and behaviour of Amazon dolphins, *Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis fluviatilis*, in the rio Solimões, Brasil. *Aquatic Mammals*, 8(1), pp.27–32.
- Mantel, N., 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2), pp.209–220.
- Martin, A.R. & da Silva, V.M.F., 2004a. Number, seasonal movements, and residency characteristics of river dolphins in an Amazonian floodplain lake system. *Can J. Zool.*, 82, pp.1307–1315.
- Martin, A.R. & da Silva, V.M.F., 2004b. River dolphins and flooded forest: seasonal habitat use and sexual segregation of botos (*Inia geoffrensis*) in an extreme cetacean environment. *J. Zoological Society of London*, 263, pp.295–305.
- Martin, A.R. & da Silva, V.M.F., 2006. Sexual dimorphism and body scarring in the boto (amazon river dolphin) *Inia geoffrensis*. *Marine Mammal Science*, 22(1), pp.25–33.
- Martin, A.R., da Silva, V.M.F. & Rothery, P.R., 2006. Does radio tagging affect the survival or reproduction of small cetaceans? A test. *Marine Mammal Science*, 22(1), pp.17–24.
- Martin, A.R., da Silva, V.M.F. & Rothery, P.R., 2008. Object carrying as socio-sexual display in an aquatic mammal. *Biology Letters*, 4, pp.243–245.
- Martin, A.R., da Silva, V.M.F. & Salmon, D.L., 2004. Riverine habitat preferences of botos (*Inia geoffrensis*) and tucuxis (*Sotalia fluviatilis*) in the Central Amazon. *Marine Mammal Science*, 20(2), pp.189–200.
- Mayden, R.L., 1997. A hierarchy of species concepts: the denouement in the saga of the species problem. Em: M. F. Claridge, H. A. Dawah, & M. R. Wilson, eds. *Species: The Units of Biodiversity*. Chapman & Hall, pp. 381–424.
- Mayr, E., 1996. What is a species, and what is not? *Philosophy of Science*, 63(2), pp.262–277.

- McGowen, M.R., Spaulding, M. & Gatesy, J., 2009. Divergence date estimation and a comprehensive molecular tree of extant cetaceans. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 53(3), pp.891–906.
- McGuire, T.L. & Aliaga-Rossel, E.R., 2007. Seasonality of reproduction in amazon river dolphins (*Inia geoffrensis*) in three major river basins of South America. *Biotropica*, 39(1), pp.129–135.
- McGuire, T.L. & Winemiller, K.O., 1998. Occurrence patterns, habitat associations, and potential prey of the river dolphin, *Inia geoffrensis*, in the Cinaruco river, Venezuela. *Biotropica*, 30(4), pp.625–638.
- Meade, R.H. & Koehnken, L., 1991. Distribution of the river dolphin, tonina *Inia geoffrensis* in the Orinoco river basin of Venezuela and Colombia. *Interciencia*, 16(6), pp.300–312.
- Mintzer, V.J. et al., 2013. Effect of illegal harvest on apparent survival of Amazon River dolphins (*Inia geoffrensis*). *Biological Conservation*, 158(1), pp.280–286.
- Montgelard, C., Catzeflis, F.M. & Douzery, E., 1997. Phylogenetic relationships of artiodactyls and cetaceans as deduced from the comparison of Cytochrome b and 12S rRNA mitochondrial sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 14(5), pp.550–9. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9159933>.
- Nei, M., 1987. *Molecular evolutionary genetics*, New York: Columbia University Press.
- Parker, P. et al., 1998. What molecules can tell about populations: choosing and using e molecular marker. *Molecular Techniques in Ecology*, 79(2), pp.361–382. Disponível em: [http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/0012-9658\(1998\)079%5B0361:WMCTUA%5D2.0.CO%3B2](http://www.esajournals.org/doi/abs/10.1890/0012-9658(1998)079%5B0361:WMCTUA%5D2.0.CO%3B2).
- Parsons, K.M. et al., 2013. Geographic patterns of genetic differentiation among killer whales in the northern North Pacific. *The Journal of Heredity*, 104(6), pp.737–54. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23846984>.
- Pilleri, G. & Gahr, M., 1977. Observations on the bolivian (*Inia boliviensis* d'Orbigny, 1834) and the amazonian bufeo (*Inia geoffrensis* de Blainville, 1817) with description of a new subspecies (*Inia geoffrensis humboldtiana*). *Investigations on Cetacea*, pp.11–91.
- Pilleri, G. & Gahr, M., 1980. Additiional considerations on the Taxonomy of the genus *Inia*. *Investigations on Cetacea*, 11, pp.15–27.

- Pilleri, G., Marcuzzi, G. & Pilleri, O., 1982. Speciation in the Platanistoidea. Systematic, Zoogeographical and Ecological observations on recent species. *Investigations on Cetacea*, 14, pp.15–46.
- Platt, A., Woodhall, R. & George Jr, A., 2007. Improved DNA sequencing quality and efficiency using an optimized fast cycle sequencing protocol. *BioTechniques*, 43(1), pp.58–62. Disponible em: <http://www.biotechniques.com/article/000112499>.
- Portocarrero-Aya, M. et al., 2010. Status, distribution and conservation of the river dolphin *Inia geoffrensis* and *Sotalia* spp. in Venezuela. Em: F. Trujillo et al., eds. *The Action Plan for South American River Dolphins 2010-2020*. Bogotá, Colombia: WWF - Fundación Omacha - WCS - WDCS - Solamac, pp. 17–28.
- Pritchard, J.K., Stephens, M. & Donnelly, P., 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2), pp.945–59. Disponible em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1461096&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- Pyenson, N.D. et al., 2015. *Isthminia panamensis*, a new fossil inioid (Mammalia, Cetacea) from the Chagres Formation of Panama and the evolution of “river dolphins” in the Americas. *PeerJ*, 3, p.e1227. Disponible em: <https://peerj.com/articles/1227>.
- QGIS Development Team, 2014. Geographic Information System User Guide. Open Source Geospatial Foundation Project. p.281. Disponible em: <http://docs.qgis.org/2.0/pdf/uk/QGIS-2.0-UserGuide-uk.pdf>.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. Disponible em: <http://www.r-project.org/>.
- Reeves, R. et al., 2013. *Inia geoffrensis*. *The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2014.3*. <[www.iucnredlist.org](http://www.iucnredlist.org)>. Disponible em: <http://www.iucnredlist.org/details/10831/0>.
- Reeves, R.R. et al., 2004. *Report of the workshop on shortcomings of Cetacean taxonomy in relation to needs of conservation and management*, La Jolla, California, U.S. Disponible em: <http://www.iucn-csg.org/wp-content/uploads/2010/03/reevesetal2004.pdf>.
- Rice, W.R., 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43(1), pp.223–225.
- Ristau, N. et al., 2014. O boto *Inia araguaiaensis* (Cetartiodactyla: Iniidae) e as hidrelétricas no Rio Tocantins, Brasil. Em: *XVI Reunión de Trabajo de Expertos en Mamíferos Acuáticos de América del Sur*. Cartagena, Colombia: Libro de resúmenes. 4º Congreso Colombiano de Zoología, p. 781.

- Rosa, S. et al., 2005. Population structure of nuclear and mitochondrial DNA variation among South American burmeister's porpoises (*Phocoena spinipinnis*). *Conservation Genetics*, 6, pp.431–443.
- Rosel, P.E., Forgetta, V. & Dewar, K., 2005. Isolation and characterization of twelve polymorphic microsatellite markers in bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*). *Molecular Ecology Notes*, 5, pp.830–833.
- Rosenberg, N.A., 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, pp.137–138.
- Salzburger, W., Ewing, G.B. & Von Haeseler, A., 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular ecology*, 20(9), pp.1952–63. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21457168>.
- Sambrook, J. & Russel, D.W., 2001. *Molecular cloning: a laboratory manual*, New York: Cold Spring Harbor Laboratory press, Cold Spring Harbor.
- Santos, G.M.A. et al., 2012. Etho-ecological study of the amazon river dolphin, *Inia geoffrensis* (Cetacea: Iniidae), and the dolphins of the genus *Sotalia* (Cetacea: Delphinidae), in Guamá river, Amazonia. *Marine Biodiversity Records*, 5, pp.1–5.
- Schaefer, C.E.R. & Darlymple, J., 1996. Pedogenesis and relict properties of soils with columnar structure from Roraima, north Amazonia. *Geodema*, 71, pp.1–17.
- Schaefer, C.E.R. & Vale Júnior, J.F., 1997. Mudanças climáticas e evolução da paisagem em Roraima: uma resenha do Cretáceo ao recente. Em: R. I. Barbosa, E. J. G. Ferreira, & E. G. Castellón, eds. *Homem, Ambiente e Ecologia no Estado de Roraima*. Manaus, AM: INPA, pp. 231–266.
- Schneider, C.H. et al., 2012. Cryptic diversity in the mtDNA of the ornamental fish *Carnegiella strigata*. *Journal of fish biology*, 81(4), pp.1210–24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22957865>.
- Sethuraman, A., 2013. *On inferring and interpreting genetic population structure - applications to conservation, and the estimation of pairwise genetic relatedness*. Iowa State University.
- Silva-León, G., 2005. La cuenca del río Orinoco: visión hidrográfica y balance hídrico. *Revista Geográfica Venezolana*, 46(1), pp.75–108.
- Silva, C.L. et al., 2007. Analysis of tectonic-controlled fluvial morphology and sedimentary processes of the western Amazon Basin: an approach using satellite images and digital elevation model. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79(4), pp.693–711.

- Simpson, G.G., 1951. The species concept. *Evolution*, 5, pp.285–298.
- Souza, E.R., 2008. *Filogeografia do gênero neotropical Fluviphylax (Cyprinodontiformes: Poeciliidae) das bacias do Amazonas e do Orinoco*. Manaus: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia.
- Sunnucks, P., 2000. Efficient genetic markers for population biology. *Trends in Ecology & evolution*, 15(5), pp.199–203. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10782134>.
- Sylvestre, J.-P., 1985. Some observations on behaviour of two Orinoco dolphins (*Inia geoffrensis humboldtiana*, Pilleri and Gihl 1977), in captivity, at Duisburg Zoo. *Aquatic Mammals*, 11.2, pp.58–65.
- Tajima, F., 1983. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, 105, pp.437–460.
- Taylor, P.J., 2009. Evolution and the species concept. Em: A. Minelli & G. Contrafatto, eds. *Biological Science Fundamentals and Systematics*. Encyclopedia of Life Support Systems (EOLSS), pp. 289–310. Disponível em: <http://www.eolss.net/sample-chapters/c03/E6-71-03-03.pdf>.
- Terencio, M.L., Schneider, C.H. & Porto, J.I.R., 2012. Molecular signature of the D-loop in the brown pencilfish *Nannostomus eques* (Characiformes, Lebiasinidae) reveals at least two evolutionary units in the Rio Negro basin, Brazil. *Journal of fish biology*, 81(1), pp.110–24. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22747807>.
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. & Gibson, T.J., 1994. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22(22), pp.4673–4680.
- Torres, J.P.M. et al., 2009. Persistent toxic substances in the Brazilian Amazon: contamination of man and the environment. *J. Braz. Chem. Soc.*, 20(6), pp.1175–1179.
- Trebbau, P. & Van Bree, P.J.H., 1974. Notes concerning the freshwater dolphin *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817) in Venezuela. *Zeitschrift Säugetierkunde*, 39, pp.50–57.
- Trujillo, F. et al., 2010. Conservation status of river dolphin *Inia geoffrensis* and *Sotalia fluviatilis* in the Amazon and Orinoco River Basins in Colombia. Em: F. Trujillo et al., eds. *The Action Plan for South American River Dolphins 2010-2020*. Bogota, Colombia: WWF - Fundación Omacha - WCS - WDCS - Solamac, pp. 29–57.



- Ussami, H., 2010. *Bacia hidrográfica do rio Branco/RR: estudos de inventário hidrelétrico*, Brasília: Empresa de Pesquisa Energética.
- Vidal, O. et al., 1997. Distribution and abundance of the amazon river dolphin (*Inia geoffrensis*) and the tucuxi (*Sotalia fluviatilis*) in the upper Amazon river. *Marine Mammal Science*, 13(3), pp.427–445.
- Vidal, O., 1993. Aquatic mammal conservation in Latin America: problems and perspectives. *Conservation Biology*, 7(4), pp.788–795.
- Waples, R.S. & Gaggiotti, O., 2006. What is a population? An empirical evaluation of some genetic methods for identifying the number of gene pools and their degree of connectivity. *Molecular ecology*, 15(6), pp.1419–39. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16629801>.
- Weir, B.S. & Cockerham, C.C., 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38(6), pp.1358–1370.
- Werle, E. et al., 1994. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Research*, 22, pp.4354–55.
- Wesselingh, F.P. & Hoorn, C., 2011. Geological development of Amazon and Orinoco basins. Em: J. S. Albert & R. E. Reis, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley: UCPress, pp. 59–68.
- Wheeler, Q.D. & Platnick, N.I., 2000. The Phylogenetic Species Concept (*sensu* Wheeler and Platnick). Em: Q. D. Wheeler & R. Meier, eds. *Species concept and phylogenetic theory: a debate*. New York: Columbia University Press, pp. 55–69.
- Whitlock, M.C. & McCauley, D.E., 1999. Indirect measures of gene flow and migration:  $F_{ST}$  not equal to  $1/(4Nm + 1)$ . *Heredity*, 82, pp.117–25. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10098262>.
- Wiley, E.O., 1978. The evolutionary species concept reconsidered. *Systematic Zoology*, 27, pp.17–26.
- Wiley, E.O., 1981. Remarks on Willis' species concept. *Systematic Zoology*, 30(1), pp.86–87.
- Wilkins, J., 2002. Summary of 26 species concepts. *National Center for Science Education*. Disponível em: <http://scienceblogs.com/evolvingthoughts/2006/10/01/a-list-of-26-species-concepts/>.
- Willis, S.C. et al., 2010. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. *Molecular*

*ecology*, 19(5), pp.1014–30. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20149086>.

- Wilson, E.O. & Brown, W.L., 1953. The subspecies concept and its taxonomic application. *Systematic Zoology*, 2(3), pp.97–111.
- Winemiller, K.O. & Willis, S.C., 2011. The Vaupes Arch and Casiquiare Canal: barriers and passages. Em: J. S. Albert & R. E. Reis, eds. *Historical Biogeography of Neotropical Freshwater Fishes*. Berkeley: UCPress, pp. 225–242.
- Winemiller, K.O. et al., 2008. Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. *Journal of Biogeography*, 35(9), pp.1551–1563. Disponível em:  
<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2699.2008.01917.x>.
- Wright, S., 1965. The interpretation of population structure with special regard to systems of matting. *Evolution*, 19(3), pp.395–420.
- Yumi, C., 2009. Filogeografia e a descrição da diversidade genética da fauna brasileira. *Megadiversidade*, 5(1-2).
- Zeidemann, V.K., 2001. O rio das águas negras. Em: D. Varella, ed. *Florestas do rio Negro*. São Paulo: Companhia das Letras, UNIP, pp. 61–87.
- Zhu, Y., Strassmann, J.E. & Queller, D.C., 2000. Insertions, substitutions, and the origin of microsatellites. *Genetical research*, 76(3), pp.227–36. Disponível em:  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204970>.

## **MATERIAL SUPPLEMENTAR**

**Tabela 1-A.** Localidades (rios), Região geopolítica, taxon, número de tombo do tecido (CTGA), número amostral por marcador, coordenadas geográficas (em graus, minutos e segundos) e referência do material analisado, para os indivíduos cujas análises estão apresentadas no capítulo I desta dissertação.

Localidade	Região geopolítica	Taxon	CTGA	Número amostral por marcador			Latitude	Longitude	Referência
				D-loop	Cytb	SSR			
1. Rio Arauca	Colômbia	<i>Inia geoffrensis humboldtiana</i>	CTGA_M_10393 CTGA_M_10394 CTGA_M_10395 CTGA_M_10396 CTGA_M_10397	5	5	5	6°59'30.38"N*	71°7'18.32"W*	Este estudo
2. Puerto Carreño (Rio Meta)	Colômbia	<i>Inia geoffrensis humboldtiana</i>	CTGA_M_10392	1	1	1	6°9'35.00"N*	67°30'15.00"W*	Este estudo
3. Confluência Rio Bitá	Colômbia	<i>Inia geoffrensis humboldtiana</i>	CTGA_M_10390 CTGA_M_10391	2	1	2	6°15'58.21"N*	67°32'47.74"W*	Este estudo
4. Amazonas Colombiano (Rio Putumayo)	Colômbia	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10398 CTGA_M_10399	2	1	-	2°21'36.29"S*	73°4'38.72"W*	Este estudo
5. Rio Ucayali	Peru	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10400	1	1	-	4°35'21.42"S*	73°29'51.93"W*	Este estudo
6. Mamirauá – Pagão (Rio Japurá)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10152	-	-	1	3°3'3.84"S	64°50'25.51"W	Hrbek et al. (2014)
7. Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (Rio Solimões)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10353 CTGA_M_10354 CTGA_M_10355 CTGA_M_10356 CTGA_M_10357 CTGA_M_10358	15	14	15	2°11'37.39"S	65°42'30.86"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)

			CTGA_M_10359 CTGA_M_10360 CTGA_M_10361 CTGA_M_10362 CTGA_M_10363 CTGA_M_10364 CTGA_M_10365 CTGA_M_10366 CTGA_M_10367						
8. Marchantaria/Alvarães (Rio Solimões)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10139	-	-	1	3°11'44.74"S	64°48'21.56"W	Hrbek et al. (2014)
9. Praia do Catitu/Tefé (Rio Tefé)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10148	-	-	1	3°19'52.76"S	64°44'36.26"W	Hrbek et al. (2014)
10. Coari (Rio Solimões)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10136 <sup>‡</sup> CTGA_M_10137 CTGA_M_10138 CTGA_M_10181 CTGA_M_10182	-	-	5	4°3'13.88"S	63°8'2.71"W	Hrbek et al. (2014)
11. Curari (Rio Solimões)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10142	-	-	1	3°19'5.31"S	60°5'51.07"W	Hrbek et al. (2014)
12. Marajaí/Iranduba (Rio Solimões)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10141	-	-	1	3°13'25.12"S	59°56'49.70"W	Hrbek et al. (2014)
13. Paraná do Mamurí (Rio Mamurí)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10411	1	1	-	3°38'50.19"S	59°53'53.51"W	Este estudo
14. Boca do Rio Madeira - AM	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10350 CTGA_M_10351	-	2	2	3°24'29.6"S	58°46'19"W	<sup>‡</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)

15. Foz do Rio Canumã	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10334	-	16	16	3°59'32.9"S	59°06'3.8"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)
			CTGA_M_10335						
			CTGA_M_10336						
			CTGA_M_10337						
			CTGA_M_10338						
			CTGA_M_10339						
			CTGA_M_10340						
			CTGA_M_10341						
			CTGA_M_10342						
			CTGA_M_10343						
			CTGA_M_10344						
			CTGA_M_10345						
			CTGA_M_10346						
CTGA_M_10347									
CTGA_M_10348									
CTGA_M_10349									
16. Lago do Tracajá – Careiro (Rio Amazonas)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10179	-	-	1	2°13'1.33"S*	56°18'12.47"W*	Hrbek et al. (2014)
17. Fortaleza do Abunã (Rio Abunã)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10163	-	-	4	9°47'10.9"S	65°31'30.9W	Hrbek et al. (2014)
			CTGA_M_10164						
			CTGA_M_10165						
			CTGA_M_10166						
18. Rio Pakaás	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10323	-	-	1	10°52'33.8"S	65°18'47.7"W	Hrbek et al. (2014)
19. Boca do Lago Mercedes (Rio Mamoré)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10309	14	14	9	11°43'20.0"S	65°07'49.1"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)
			CTGA_M_10310						
			CTGA_M_10311						
			CTGA_M_10312 <sup>§</sup>						
			CTGA_M_10313						
CTGA_M_10314 <sup>§</sup>									

			CTGA_M_10315 CTGA_M_10316 CTGA_M_10317 CTGA_M_10318 CTGA_M_10319 CTGA_M_10320 <sup>§</sup> CTGA_M_10321 <sup>§</sup> CTGA_M_10322 <sup>§</sup>						
20. Comunidade Surpresa (Rio Mamoré)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10157	-	-	1	11°53' 15.2"S	65°01'16.1"W	Hrbek et al. (2014)
21. Foz do Rio Cautário (Rio Guaporé)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10300 CTGA_M_10301 CTGA_M_10302 CTGA_M_10303 CTGA_M_10304 CTGA_M_10305 CTGA_M_10306 CTGA_M_10307 CTGA_M_10308	9	9	9	12°12'49.1"S	64°35'30.0"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)
22. Porto Acre (Rio Guaporé)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10297 CTGA_M_10298 CTGA_M_10299	3	3	3	12°21'14.8"S	64°30'37.2"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)
23. Porto França (Rio Guaporé)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10283 <sup>§</sup> CTGA_M_10284 CTGA_M_10285 CTGA_M_10286 CTGA_M_10287 CTGA_M_10288 CTGA_M_10289	14	14	12	12°27'40.6" S	64°17'20.0"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)

			CTGA_M_10290 CTGA_M_10291 CTGA_M_10292 CTGA_M_10293 <sup>§</sup> CTGA_M_10294 CTGA_M_10295 CTGA_M_10296							
24. Contra Fiado (Rio Guaporé)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10279 CTGA_M_10280 CTGA_M_10281 CTGA_M_10282	4	4	4	12°28'37.8"S	64°07'40.4"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)	
25. Baía Grande (Rio Guaporé)	Rondônia/Brasil	<i>Inia boliviensis</i>	CTGA_M_10275 <sup>‡</sup> CTGA_M_10276 <sup>§</sup> CTGA_M_10277 <sup>§</sup> CTGA_M_10278	4	4	2	12°29'32.80"S	64°03' 26.10"W	<sup>ψ</sup> <sup>¶</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)	
26. Lago Brito – Luiz Alves (Rio Araguaia)	Goiás/Brasil	<i>Inia araguaiaensis</i>	CTGA_M_10208 CTGA_M_10209 CTGA_M_10210 CTGA_M_10211 CTGA_M_10212 CTGA_M_10213 CTGA_M_10214 CTGA_M_10215 CTGA_M_10216	9	9	9	13°10'19.8"S	50°34'57.8"W	Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> LEGAL	
27. Lago Montaria – Luiz Alves (Rio Araguaia)	Goiás/Brasil	<i>Inia araguaiaensis</i>	CTGA_M_10202 CTGA_M_10203 CTGA_M_10204 CTGA_M_10205 CTGA_M_10206	6	6	6	13°22'11.2" S	50°39'36.29"W	Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> LEGAL	



CTGA_M_10207									
28. Bandeirantes (Rio Araguaia)	Goiás/Brasil	<i>Inia araguaiaensis</i>	CTGA_M_10201	1	1	1	13°41'21.36"S	50°48'19.63"W	Hrbek et al. (2014) *LEGAL
29. Lago dos Cavalos – Aruanã (Rio Vermelho)	Goiás/Brasil	<i>Inia araguaiaensis</i>	CTGA_M_10189	12	11	12	14°57'20.21"S	51°6'37.88"W	Hrbek et al. (2014) *LEGAL
			CTGA_M_10190						
			CTGA_M_10191						
			CTGA_M_10192						
			CTGA_M_10193						
			CTGA_M_10194						
			CTGA_M_10195						
			CTGA_M_10196						
			CTGA_M_10197						
			CTGA_M_10198						
CTGA_M_10199									
CTGA_M_10200									
30. Fazenda São Paulo, Itacaiú (Rio Araguaia)	Goiás/Brasil	<i>Inia araguaiaensis</i>	CTGA_M_10187	1	1	1	15°01'52.42" S	51°17'37.88"W	Hrbek et al. (2014) *LEGAL
31. Lago Jurumim (Rio Araguaia)	Goiás/Brasil	<i>Inia araguaiaensis</i>	CTGA_M_10184 <sup>§</sup>	3	3	2	15°03'22.03" S	51°30'36.79"	Hrbek et al. (2014) *LEGAL
			CTGA_M_10185						
			CTGA_M_10186 <sup>‡</sup>						
32. Barra do Garças (Rio Araguaia)	Mato Grosso/Brasil	<i>Inia araguaiaensis</i>	CTGA_M_10183	1	1	1	15°53'33.19"S	52°15'12.16"W	Hrbek et al. (2014) *LEGAL
<b>TOTAL</b>			143	108	122	129			

SSR (Simple Sequence Repets): microssatélites; <sup>¶</sup>Dados de microssatélites; <sup>¶¶</sup>Dados de sequências; <sup>¶¶¶</sup>Depósito das sequências da região controle; <sup>¶¶¶¶</sup>indivíduo que representa a localidade tipo para a espécie; <sup>§</sup>amostra utilizada somente nas análises dos dados de sequências, devido a ausência de informação para microssatélites; <sup>\*</sup>coordenada aproximada.

**Tabela 2-A.** Localidades/rios, região geopolítica, taxon, número de tombo do tecido (CTGA), número amostral por marcador, coordenadas geográficas (em graus, minutos e segundos) e referência do material analisado, para os indivíduos cujas análises estão apresentadas no capítulo II desta dissertação.

Localidade (rio)	Região geopolítica	Taxon	CTGA	Número amostral por marcador			Latitude	Longitude	Referência
				Dloop	Cytb	SSR			
1. Rio Arauca	Colômbia	<i>Inia geoffrensis humboldtiana</i>	CTGA_M_10393 CTGA_M_10394 CTGA_M_10395 CTGA_M_10396 CTGA_M_10397	5	5	5	6°59'30.38"N*	71°7'18.32"W*	Este estudo
2. Puerto Carreño (Rio Meta)	Colômbia	<i>Inia geoffrensis humboldtiana</i>	CTGA_M_10392	1	1	1	6°9'35.00"N*	67°30'15.00"W*	Este estudo
3. Confluência Rio Bitá	Colômbia	<i>Inia geoffrensis humboldtiana</i>	CTGA_M_10390 CTGA_M_10391#	2	1	2	6°15'58.21"N*	67°32'47.74"W*	Este estudo
4. Cucuí (Rio Negro)	Cucuí - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10413 CTGA_M_10414 CTGA_M_10415 CTGA_M_10416 CTGA_M_10417 CTGA_M_10418 CTGA_M_10419 CTGA_M_10420 CTGA_M_10421 CTGA_M_10422 CTGA_M_10425 CTGA_M_10426	12	12	12	1°10'46.4"N	66°50'16.7"W	Este estudo
5. Lago Mabi (Rio	Cucuí -	<i>Inia geoffrensis</i>	CTGA_M_10423	2	2	2	0°52'31.7"N	66°51'28.3W	Este estudo

Negro)	Amazonas/Brasil	<i>geoffrensis</i>	CTGA_M_10424							
6. Igapó Japú/Comunidade Trovão (Rio Uaupés)	São Gabriel da Cachoeira - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10239 CTGA_M_10240 CTGA_M_10241 CTGA_M_10242	4	4	4	0°06'19.0"N	67°31'19.7"W	LEGAL	
7. Comunidade Açaí (Rio Uaupés)	São Gabriel da Cachoeira - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10243 CTGA_M_10244# CTGA_M_10245	2	2	3	0°08'36.1"N	67°04'36.1"W	LEGAL	
8. Ilha da Juíza/São Gabriel da Cachoeira (Rio Negro)	São Gabriel da Cachoeira - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10235 CTGA_M_10236 CTGA_M_10237 CTGA_M_10238	4	4	4	0°08'53.9"N	67°04'36.1"W	LEGAL	
9. Comunidade Vila Nova (Rio Negro)	São Gabriel da Cachoeira - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10427 CTGA_M_10428 CTGA_M_10429 CTGA_M_10430	4	4	4	0°19'00.2"S	66°13'39.6"W	Este estudo	
10. Sítio Cristino (Rio Negro)	São Gabriel da Cachoeira - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10431 CTGA_M_10432 CTGA_M_10433 CTGA_M_10434	4	4	4	0°19'15.8"S	66°00'15.6"W	Este estudo	
11. Castanheira (Rio Negro)	São Gabriel da Cachoeira - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10435	1	1	1	0°17'44.7"S	65°41'08.9"W	Este estudo	
12. Marauíá (Rio Negro)	Santa Izabel do Rio Negro - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10436	1	1	1	0°23'30.9"S	65°12'18.1"W	Este estudo	

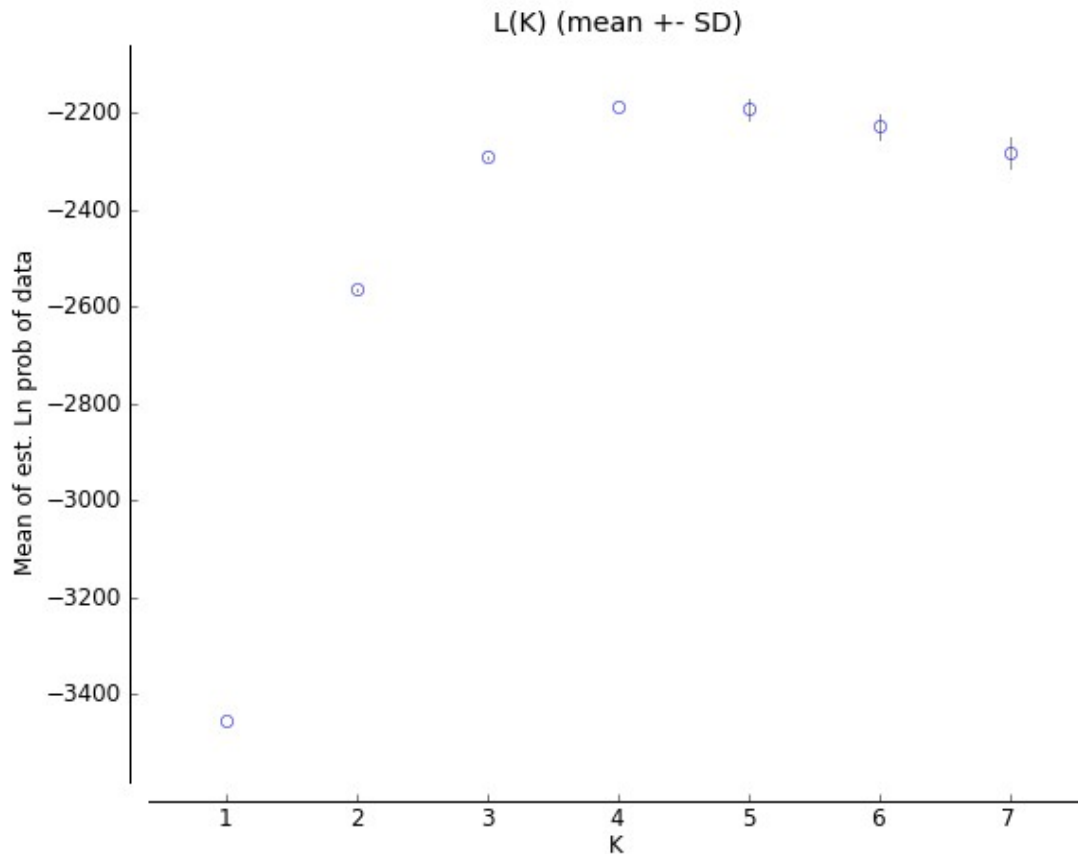
13. Tapuruquara (Rio Negro)	Santa Izabel do Rio Negro - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10437 CTGA_M_10438	2	2	2	0°32'09.1"S	64°55'27.3"W	Este estudo
14. Darará (Rio Negro)	Santa Izabel do Rio Negro - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10439 CTGA_M_10440	2	2	2	0°27'17.0"S	64°45'36.4"W	Este estudo
15. Comunidade Nova Vida (Paraná do Açaí/Rio Negro)	Santa Izabel do Rio Negro - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10441 CTGA_M_10442 CTGA_M_10443 CTGA_M_10444 CTGA_M_10445	5	5	5	0°19'34.2"S	64°08'03.0"W	Este estudo
16. Darauacá (Rio Negro)	Barcelos - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10446 CTGA_M_10447# CTGA_M_10448 CTGA_M_10449 CTGA_M_10450 CTGA_M_10451 CTGA_M_10452	7	6	7	0°36'18.9"S	63°21'25.2"W	Este estudo
17. Baixo rio Branco (Rio Branco)	Roraima/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10375 CTGA_M_10376 CTGA_M_10377 CTGA_M_10378 CTGA_M_10379 CTGA_M_10380 CTGA_M_10381 CTGA_M_10382 CTGA_M_10383 CTGA_M_10384 CTGA_M_10385 CTGA_M_10386	15	15	15	0°57'52.7"S	61°53'58.5"W	Este estudo

			CTGA_M_10387 CTGA_M_10388 CTGA_M_10389							
18. Vista Alegre/ Caracará (Rio Branco)	Caracará - Roraima/Brasil	<i>Inia geoffrensis</i> <i>geoffrensis</i>	CTGA_M_10407 CTGA_M_10408 CTGA_M_10409 CTGA_M_10410	4	4	4	1°38'57.4"N	61°13'13.2"W	Este estudo	
19. Boa Vista (Rio Branco)	Boa Vista - Roraima/Brasil	<i>Inia geoffrensis</i> <i>geoffrensis</i>	CTGA_M_10402 CTGA_M_10403 CTGA_M_10404 CTGA_M_10405 CTGA_M_10406	5	5	5	2°47'58.3"N	60°40'00.1"W	Este estudo	
20. Novo Airão (Rio Negro)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis</i> <i>geoffrensis</i>	CTGA_M_10002	1	1	-	2°37'15.80"S	60°56'25.02"W	LEGAL	
21. Lago do Acajatuba (Rio Negro)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis</i> <i>geoffrensis</i>	CTGA_M_10112 CTGA_M_10113 CTGA_M_10114 CTGA_M_10115 CTGA_M_10180#	4	4	5	3°7'27.17"S	60°29'44.01"W	LEGAL	
22. Furo do Ariaú (Rio Negro)	Ariaú - Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis</i> <i>geoffrensis</i>	CTGA_M_10116 CTGA_M_10117# CTGA_M_10120# CTGA_M_10122# CTGA_M_10124# CTGA_M_10125# CTGA_M_10126# CTGA_M_10127# CTGA_M_10128#	5	5	18	3°4'7.14"S	60°27'30.03"W	LEGAL	

			CTGA_M_10129# CTGA_M_10130# CTGA_M_10131# CTGA_M_10132 CTGA_M_10133 CTGA_M_10134# CTGA_M_10162 <sup>s</sup> CTGA_M_10368 CTGA_M_10369# CTGA_M_10370#						
23. Igarapé Tarumã (Rio Negro)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10012 CTGA_M_10013	2	2	-	3°0'8.64"S	60°5'26.05"W	LEGAL
24. Paraná do Mamurí (Rio Mamurí)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10411	1	1	1	3°38'50.19"S	59°53'53.51"W	Este estudo
25. Boca do Rio Madeira - AM	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10350 CTGA_M_10351	2	2	2	3°24'29.6"S	58°46'19"W	† <sup>ψ</sup> Hrbek et al. (2014) †Gravena et al. (2014)
26. Foz do Rio Canumã	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10334 CTGA_M_10335 CTGA_M_10336 CTGA_M_10337 CTGA_M_10338 CTGA_M_10339 CTGA_M_10340 CTGA_M_10341 CTGA_M_10342 CTGA_M_10343 CTGA_M_10344	16	16	16	3°59'32.9"S	59°06'3.8"W	† <sup>ψ</sup> Hrbek et al. (2014) †Gravena et al. (2014)

			CTGA_M_10345 CTGA_M_10346 CTGA_M_10347 CTGA_M_10348 CTGA_M_10349							
27. Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (Rio Solimões)	Amazonas/Brasil	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10353 CTGA_M_10354 CTGA_M_10355 CTGA_M_10356 CTGA_M_10357 CTGA_M_10358 CTGA_M_10359 CTGA_M_10360# CTGA_M_10361 CTGA_M_10362 CTGA_M_10363 CTGA_M_10364 CTGA_M_10365 CTGA_M_10366 CTGA_M_10367	15	14	15	2°11'37.39"S	65°42'30.86"W	<sup>¶</sup> <sup>ψ</sup> Hrbek et al. (2014) <sup>¶</sup> Gravena et al. (2014)	
28. Amazonas Colombiano (Rio Putumayo)	Colômbia	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10398 CTGA_M_10399#	2	1	2	2°21'36.29"S*	73°4'38.72"W*	Este estudo	
29. Rio Ucayali	Peru	<i>Inia geoffrensis geoffrensis</i>	CTGA_M_10400	1	1	1	4°35'21.42"S*	73°29'51.93"W*	Este estudo	
<b>TOTAL</b>			147	131	127	143				

SSR (*Simple Sequence Repets*): microssatélites; #amostra utilizada apenas nas análises dos dados de microssatélites, devido a ausência de informação para o citocromo *b* e/ou região controle; <sup>§</sup>amostra utilizada somente nas análises dos dados de sequências, devido a ausência de informação para microssatélites; <sup>ψ</sup>Dados de microssatélites; <sup>¶</sup>Dados de sequências; \*coordenada aproximada.



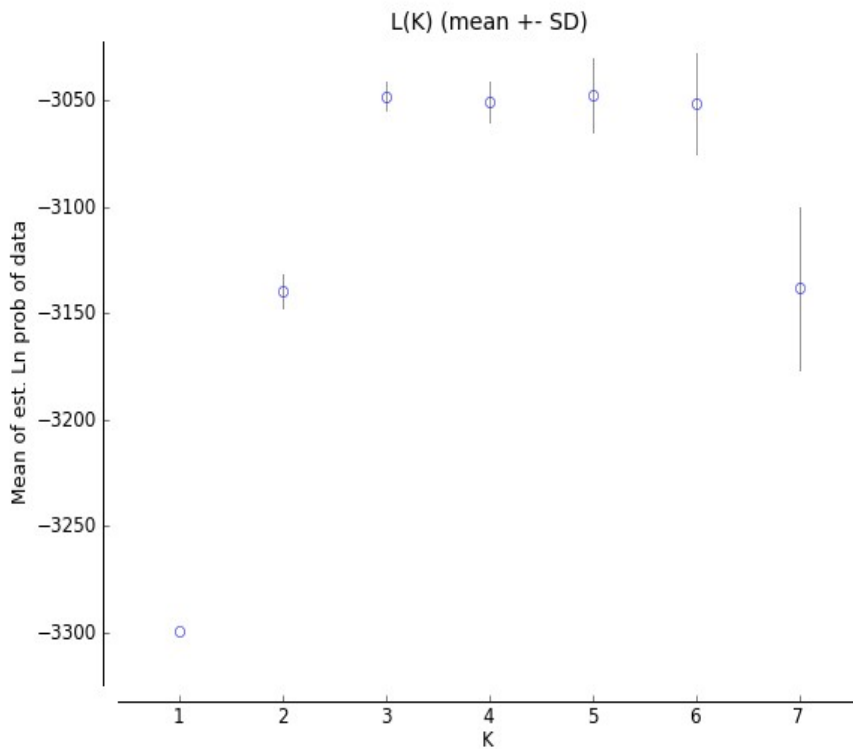
**Figura 1-A.** Melhor probabilidade posterior para explicar os dados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). Análise realizada sob 10 *loci* microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia geoffrensis humboldtiana*, 44 de *I. geoffrensis*, 45 de *I. boliviensis* e 32 de *I. araguaiaensis*. A análise por máxima probabilidade posterior sugere quatro grupos biológicos ( $K=4$ ) como a melhor probabilidade para explicar os dados; na vertical a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados, e na horizontal o número de *clusters* testados ( $K$ ).

**Tabela 1-B.** Média da probabilidade posterior de cada número a *priori* dos grupos biológicos ( $K$ ) de *Inia* analisados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). Análise realizada sob 10 *loci* microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia geoffrensis humboldtiana*, 44 de *I. geoffrensis*, 45 de *I. boliviensis* e 32 de *I. araguaiaensis*.

K	Repetições	Média LnP(K)	Desvio padrão LnP(K)
1	10	-3453.470000	0.380205
2	10	-2564.330000	0.951081
3	10	-2289.930000	1.833667



<b>4</b>	<b>10</b>	<b>-2186.380000</b>	<b>1.519357</b>
5	10	-2191.540000	20.698910
6	10	-2227.660000	26.157268
7	10	-2280.930000	30.576391



**Figura 2-A.** Melhor probabilidade posterior para explicar os dados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). Análise realizada sob 10 *loci* microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco; 74 do Rio Negro; 24 do Rio Branco; 19 do baixo Rio Madeira e 18 do médio Solimões. A análise por máxima probabilidade posterior sugere três grupos biológicos ( $K = 3$ ) como a melhor probabilidade para explicar os dados; na vertical a média da estimativa da distribuição das probabilidades dos dados, e na horizontal o número de *clusters* testados ( $K$ ).

**Tabela 2-B.** Média da probabilidade posterior de cada número estabelecido a *priori* para os grupos biológicos de *I. geoffrensis geoffrensis* e *I. g. humboldtiana* (K) analisados. Inferência Bayesiana de estrutura populacional usando *STRUCTURE* v. 2.3.4 (Pritchard et al. 2000; Falush et al. 2003). Análise realizada sob 10 *loci* microssatélites, para 8 indivíduos de *Inia* da bacia do Orinoco; 74 do Rio Negro; 24 do Rio Branco; 19 do baixo Rio Madeira e 18 do médio Solimões.

K	Repetições	Média LnP(K)	Desvio padrão LnP(K)
1	10	-3299.4600	0.0699
2	10	-3139.6200	7.7501
<b>3</b>	<b>10</b>	<b>-3048.0800</b>	<b>6.6292</b>
4	10	-3050.5500	9.5342
5	10	-3047.4700	17.2587
6	10	-3051.2000	23.5040
7	10	-3138.4400	38.0386

**Tabela 2-C.** Índices de diversidade genética resultantes para cada *locus* de microssatélite analisados para as subpopulações de *Inia geoffrensis geoffrensis* dos rios Negro, Branco, baixo Madeira e Solimões.

Locos	$N_A$	$H_o$	$H_E$
Ig2B1	11	0.573	0.547
Ig11B1	7	0.359	0.443
Ig8H1	9	0.260	0.323
Ig10E	9	0.712	0.719
Ig11D2	5	0.333	0.451
Ig3A1	7	0.433	0.556
Ig7F2	5	0.464	0.583
Ttr11	16	0.771	0.799
Ttr48	7	0.386	0.423
TtruAAT40	7	0.709	0.641
<b>Média</b>	<b>8.3</b>	<b>0.500</b>	<b>0.549</b>

$N_A$ : número de alelos;  $H_o$ : heterozigiosidade observada;  $H_E$ : heterozigiosidade esperada

**Tabela 2-D.** Índices de diversidade genética resultantes dos 10 *loci* microssatélites analisados para as subpopulações de *Inia geoffrensis geoffrensis*, consideradas de acordo com o resultado observado pela análise do *STRUCTURE*.

Localidades		Ig2B1	Ig11B1	Ig8H1	Ig10E	Ig11D2	Ig3A1	Ig7F2	Ttr11	Ttr48	TtruAAT40
Alto e médio Negro	$N_A$	6	5	6	6	3	5	3	11	3	4
	$H_O$	0.52941	0.29412	0.31373	0.64706	0.33333	0.45098	0.45098	0.76471	0.05882	0.86275
	$H_E$	0.51272	0.28325	0.31411	0.71986	0.31547	0.57950	0.56591	0.81343	0.05805	0.59173
	$P$	0.26228	0.75342	0.52492	0.33876	0.02187	0.00653	0.24728	0.25135	1.00000	0.00000
Rio Branco	$N_A$	7	5	3	6	4	3	3	6	4	4
	$H_O$	0.62500	0.33333	0.16667	0.70833	0.41667	0.50000	0.45833	0.83333	0.75000	0.66667
	$H_E$	0.56560	0.45301	0.19415	0.68972	0.52039	0.56294	0.56649	0.77305	0.67819	0.69415
	$P$	0.90023	0.00434	0.08576	0.73879	0.04672	0.51235	0.48012	0.40231	0.80121	0.00000
Baixo Negro, baixo Madeira e Solimões	$N_A$	10	6	8	8	5	5	5	12	7	7
	$H_O$	0.56667	0.45000	0.30000	0.78333	0.25000	0.35000	0.48333	0.71667	0.35000	0.60000
	$H_E$	0.56527	0.59398	0.46345	0.74762	0.51779	0.52787	0.61919	0.81232	0.53305	0.63922
	$P$	0.94344	0.00017	0.00000	0.15908	0.00000	0.00000	0.01200	0.00000	0.00024	0.00000

$N_A$ : número de alelos;  $H_O$ : heterozigosidade observada;  $H_E$ : heterozigosidade esperada;  $P$ : significância para o equilíbrio de Hardy-Weinberg.