

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

**DESVENDANDO PROCESSOS ATUAIS E HISTÓRICOS DOS
PEIXES MIGRADORES E SEDENTÁRIOS: UMA ABORDAGEM
GENÔMICA, FILOGEOGRÁFICA E GENÉTICO-
POPULACIONAL ENTRE AS BACIAS DO ORINOCO E
AMAZONAS**

JOSÉ GREGORIO MARTÍNEZ

MANAUS
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOSÉ GREGORIO MARTÍNEZ

DESVENDANDO PROCESSOS ATUAIS E HISTÓRICOS DOS
PEIXES MIGRADORES E SEDENTÁRIOS: UMA ABORDAGEM
GENÔMICA, FILOGEOGRÁFICA E GENÉTICO-
POPULACIONAL ENTRE AS BACIAS DO ORINOCO E
AMAZONAS.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia da Universidade Federal do
Amazonas, como requisito parcial para a obtenção
do título de Doutor em Biotecnologia, área de
concentração agroflorestal.

Orientadora: Dra. Izeni Pires Farias
Co-Orientador: Dr. Tomas Hrbek

MANAUS
2015

Ficha Catalográfica

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

M385d Martinez, José Gregório
Desvendando processos atuais e históricos dos peixes migradores e sedentários: uma abordagem genômica, filogeográfica e genético-populacional entre as Bacias do Orinoco e Amazonas / José Gregório Martinez. 2015
211 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Izeni Pires Farias
Coorientador: Tomas Hrbek
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Amazonas/Orinoco. 2. Conectividade. 3. Filogeografia. 4. Genômica/genética da conservação. 5. Ictiofauna. I. Farias, Izeni Pires II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

À minha mãe, irmãs,
sobrinhos e noiva pela
motivação que representaram
para nunca desistir e sempre
persistir, apesar da distância.

AGRADECIMENTOS

À evolução, por ter mi permitido estar aqui e fazer de mim um instrumento para se entender um pouco mais a si mesma.

À minha família pelo seu apoio incondicional, especialmente à minha doce irmã Alexandra e à minha adorável noiva Erika; nunca estive só.

À minha orientadora Izeni Pires Farias por acreditar em mim e nas minhas capacidades desde o primeiro dia. Ainda sem me ter conhecido, me aceitou como seu estudante e colocou em minhas mãos sua confiança para desenvolver este maravilhoso projeto.

Ao meu orientador Tomas Hrbek pela sua confiança e sua ortodoxa forma de dizer para mim “você pode fazer melhor”, sem dúvida suas exigências foram desafios que fizeram de mim hoje uma pessoa mais crítica e perfeccionista em cada coisa que faço.

Aos meus colegas do Laboratório de Evolução e Genética Animal - LEGAL pelo seu suporte técnico e moral durante o desenvolvimento desta tese; graças a vocês a estância e o caminho se tornou mais fácil.

Ao Laboratório de Tecnologias do DNA (UFAM) pela ajuda técnica oferecida durante o desenvolvimento de alguns experimentos de sequenciamento.

Ao Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – COLCIENCIAS da Colômbia pela bolsa de estudos durante o meu doutorado e por fornecer parte do financiamento desta tese.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa – CNPq do Brasil pelo financiamento da maior parte desta tese.

RESUMO

Os rios Amazonas e Orinoco possuem a maior diversidade de ictiofauna do planeta, a qual é estimada entre 1300 - 3000 espécies de peixes. Grande parte desta diversidade é compartilhada entre elas, mas à respeito não existem estudos robustos que sustentem os limites espaciais, temporais e nem o modo de interação desta ictiofauna entre os dois sistemas fluviais, impedindo assim definir as bases científicas que permitam orientar políticas para seu correto uso pesqueiro e priorização de áreas de conservação. Com o objetivo de conhecer a história evolutiva e relações populacionais atuais e históricas entre a ictiofauna compartilhada para as bacias, bem como a configuração espacial das suas unidades de conservação, foi realizada uma abordagem filogeográfica e genômico/genético-populacional utilizando oito espécies de peixes altamente explorados como modelo: cinco migradores (*Brachyplatystoma rousseauxii*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma metaense*/*P. tigrinum*, *Pseudoplatystoma orinocoense*/*P. punctifer*) e três sedentários (*Nannostomus unifasciatus*, *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum altum*). Para tanto, o estudo foi realizado em quatro etapas, duas de criação de algumas ferramentas genômicas para as análises, e duas de aplicação de ferramentas genéticas e/ou genômicas para responder as perguntas iniciais. Primeiro, foi padronizada e caracterizada uma metodologia para o desenvolvimento de bibliotecas genômicas para a descoberta e genotipagem *de novo* de SNPs em espécies não-modelo. Segundo, para verificar a reprodutibilidade e eficiência do método na descoberta de *tags* de sequência, genotipagem *de novo* e desenho de *primers* em regiões flangeadoras de SNPs, foi aplicado dito método utilizando como modelo às espécies *B. rousseauxii* e *C. macropomum*. Terceiro, foram utilizadas sequências de ADNmt (Citocromo oxidase I e Região controle) e ADNnu (Glicosiltransferase e Cadeia pesada 6 alfa da miosina do músculo cardíaco) para análises genético-populacionais e filogeográficos com o objetivo de testar a hipótese de conectividade atual e histórica entre bacias. Quarto, foram delimitadas as unidades de conservação (Unidades Evolutivas Significantes - ESUs, Unidades Adaptativas - AUs e Unidades de Manejo - MUs) incluindo novas evidências como análises multilocus (*Species trees*), dados ecológicos (pH e pluviosidade) e dados genômicos. Como resultado, obteve-se um método de desenvolvimento totalmente compatível e eficiente na produção de leituras em IonTorrent PGM. O método demonstrou eficácia na descoberta de *tags* de sequência (18772 – 22476), genotipagem *de novo* (268 – 398 SNPs) e desenho de *primers* em regiões flangeadoras de SNPs (23 – 39 SNPs). As análises populacionais mostraram uma forte estrutura para todas as espécies entre bacias, mas não dentro destas (exceto para os peixes sedentários). Das oito espécies avaliadas, apenas *P. orinocoense*/*P. punctifer* apresentou evidências de fluxo gênico recente entre bacias, sendo através do Casiquiare. Apesar disso, para todas as espécies, o ADNnu mostrou um forte compartilhamento de grupos biológicos entre bacias, sugerindo que a divergência entre estas é recente. As análises de coalescência mostraram que apenas as populações de *N. unifasciatus* do Orinoco e Amazonas divergiram no Plioceno, enquanto que o resto das espécies divergiu no Pleistoceno. Em qualquer caso, não coincidindo com a hipótese de vicariância entre bacias, gerada pelo Arco do Vaupés no Médio Mioceno. As evidências genéticas, genômicas e ecológicas permitiram delimitar ESUs e MUs,

mas não AUs para nenhuma espécie. Na maior parte dos migradores as bacias constituíram uma única ESU com MUs independentes (*C. macropomum*, *P. metaense*/*P. tigrinum*, *P. orinocoense*/*P. punctifer*), mas só para *B. rousseauxii* e *P. brachypomus* cada bacia constituiu uma ESU independente. Para os peixes sedentários foi observado um maior número de ESUs comparado com os migradores, sendo que pelo menos uma destas unidades foi compartilhada entre bacias, enquanto que outras foram exclusivas. Este estudo demonstra que as bacias do Orinoco e Amazonas possuíram uma conectividade histórica até um passado muito recente, ao ponto de hoje se manter esta condição de conexão para parte da sua ictiofauna.

Palavras chave: Amazonas/Orinoco, conectividade, filogeografia, genômica/genética da conservação, ictiofauna.

ABSTRACT

The Amazon and Orinoco rivers have the greatest diversity of fish fauna of the planet, which is estimated between 1300 - 3000 species. Much of this diversity is shared between them, but to respect there are no solid studies to support the spatial boundaries, time nor the mode of interaction of the ichthyofauna between the two river systems, preventing lay the scientific justification for its correct use for fishing and prioritization of conservation areas. In order to know the evolutionary history and current and historical population relationship between the shared fish fauna for the basins, in addition to the spatial configuration of its conservation units, a phylogeographic and population genomic/genetic approach was performed using eight species of highly exploited fish as model: Five migratory species (*Brachyplatystoma rousseauxii*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma metaense/P. tigrinum*, *Pseudoplatystoma orinocoense/P. punctifer*) and three sedentary species (*Nannostomus unifasciatus*, *Paracheirodon axelrodi*, *Pterophyllum altum*). For that, the study was conducted in four stages, two for create some genomics tools for the analysis, and two in which was applied genetic and/or genomic tools to answer the initial population questions. First, it was standardized and characterized a methodology for genomic libraries construction for SNPs discovery and *de novo* genotyping in non-model species. Second, in order to verify the reproducibility and efficiency of the method in sequence tags discovery, genotyping, and utility for SNPs primer design, was used individuals of *B. rousseauxii* and *C. macropomum* as model. Third, mtDNA (Cytochrome oxidase I and Region control) and nuDNA (Glycosyltransferase and 6 alpha heavy chain of cardiac myosin) sequences were used to population genetic and phylogeographic analyzes in order to test the hypothesis of current and historical connectivity between basins. Fourth, the conservation units were defined (Evolutionary Significantly Units - ESUs, Adaptive Units - AUs and Management Units - MUs) including new evidence as multilocus analysis (Species trees), ecological data (pH and pluviosity) and genomic data. As a result, we obtained a compatible and efficient method for sequence reads production in IonTorrent PGM. The method was effective for tags discovery (18772-22476), *de novo* SNPs genotyping (268-398 SNPs) and for primer design in flanking regions of SNPs (23-39 SNPs). Population analysis showed a strong structure for all species between basins, but not within theme (except for sedentary fish). Of the eight species studied, only *P. orinocoense/P. punctifer* showed evidence of recent gene flow between basins, through the Casiquiare. Nevertheless, for all species, the nuDNA showed strong biological groups sharing between basins, suggesting that the divergence between these is recent. Coalescent analysis showed that only *N. unifasciatus* populations of Orinoco and Amazon diverged in the Pliocene, while the rest of the species diverged in the Pleistocene. In any case, there was not concordance with the vicariance hypothesis between basins generated by the Vaupés Arch in the Middle Miocene. The genetic, genomic and ecological evidence permitted to determine ESUs and MUs, but not AUs to any species. In most migratory fishes, the basins constituted a single ESU with independents MUs (*C. macropomum*, *P. metaense/P. tigrinum*, *P. orinocoense/P. punctifer*), but only to *B. rousseauxii* and *P. brachypomus* each basin were independents ESUs. For sedentary fish, was observed a greater number of ESUs compared with migratory fishes, wherein at least one of these units is shared between

basins, while others were exclusives. This study demonstrates that the basins of the Orinoco and Amazon possessed a historical connectivity until the very recent past, and even today keeps this connection condition for part of their fish fauna.

Key words: Amazon/Orinoco, connectivity, phylogeography, conservation genomics/genetics, ichthyofauna.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Paleo-geografia do noroeste de América do Sul durante o Oligoceno (33 – 24 M.a.)	20
Figura 2 – Mapa paleo-geográfico do norte de América do Sul durante: A) Mioceno Cedo, B) Médio Mioceno e C) Mioceno tardio até o presente. Destaca-se o levantamento dos Andes e as mudanças de direção e drenagem dos Rios Orinoco e Amazonas	21
Figura 3 – Mapa mostrando a drenagem atual do norte de América do Sul e divisões geológicas separando as bacias do Amazonas e Orinoco	22
Figura 4 – Mapa de América do Sul mostrando os locais de barreiras hidrogeográficas atuais podendo ser permeáveis ou semipermeáveis	23
Figura 5 – Relação entre Migração reprodutiva “ <i>spawning migration</i> ” dos peixes teleósteos brasileiros de água doce (iteróparos e ovíparos) e o Logaritmo natural do tamanho corporal máximo “ <i>maximum body size</i> ”	26
Figura 6 – <i>The process of simplified library construction for sequencing in IonTorrent PGM</i>	44
Figura 7 – Locais de amostragem e possíveis rotas de conexão para as espécies de peixes migradores e sedentários entre bacias	69
Figura 8 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas para <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	78
Figura 9 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas para <i>Colossoma macropomum</i>	79
Figura 10 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas para <i>Piaractus brachypomus</i>	80
Figura 11 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas para <i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i>	81
Figura 12 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões	

mitocondriais concatenadas para <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i>	82
Figura 13 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas para <i>Nannostomus unifasciatus</i>	83
Figura 14 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas para <i>Paracheirodon axelrodi</i>	84
Figura 15 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de haplótipos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas para <i>Pterophyllum altum</i>	85
Figura 16 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões nucleares concatenadas para <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	97
Figura 17 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões nucleares concatenadas para <i>Colossoma macropomum</i>	98
Figura 18 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões nucleares concatenadas para <i>Piaractus brachypomus</i>	99
Figura 19 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões nucleares concatenadas para <i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i>	100
Figura 20 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões nucleares concatenadas para <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i>	101
Figura 21 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões nucleares concatenadas para <i>Nannostomus unifasciatus</i>	102
Figura 22 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões nucleares concatenadas para <i>Paracheirodon axelrodi</i>	103
Figura 23 – Formação de grupos biológicos e análise de relação filogenética e distribuição de alelos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões	

nucleares concatenadas para <i>Pterophyllum altum</i>	104
Figura 24 – Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (<i>species tree</i>) implementado no programa <i>Star Beast</i> (do pacote BEAST) para a espécie <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	130
Figura 25 – Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (<i>species tree</i>) implementado no programa <i>Star Beast</i> (do pacote BEAST) para a espécie <i>Piaractus brachypomus</i>	131
Figura 26 – Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (<i>species tree</i>) implementado no programa <i>Star Beast</i> (do pacote BEAST) para a espécie <i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i>	132
Figura 27 – Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (<i>species tree</i>) implementado no programa <i>Star Beast</i> (do pacote BEAST) para a espécie <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i>	133
Figura 28 – Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (<i>species tree</i>) implementado no programa <i>Star Beast</i> (do pacote BEAST) para a espécie <i>Nannostomus unifasciatus</i>	134
Figura 29 – Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (<i>species tree</i>) implementado no programa <i>Star Beast</i> (do pacote BEAST) para a espécie <i>Paracheirodon axelrodi</i>	135
Figura 30 – Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (<i>species tree</i>) implementado no programa <i>Star Beast</i> (do pacote BEAST) para a espécie <i>Pterophyllum altum</i>	136
Figura 31 – Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e o Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs para <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	137
Figura 32 – Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e o Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs para <i>Colossoma macropomum</i>	138
Figura 33 – Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e o Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando	

marcadores SNPs para <i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i>	139
Figura 34 – Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e o Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs para <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i>	139
Figura 35 – Árvore de Máxima Verossimilhança para <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> baseado em 148946 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e o Amazonas	140
Figura 36 – Árvore de Máxima Verossimilhança para <i>Colossoma macropomum</i> baseado em 102716 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e o Amazonas	141
Figura 37 – Árvore de Máxima Verossimilhança para <i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i> baseado em 207294 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e o Amazonas	142
Figura 38 – Árvore de Máxima Verossimilhança para <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i> baseado em 191913 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e o Amazonas	143
Figura 39 – Análise Bayesiana do genoma de <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> para a descoberta de loci sob seleção entre o Orinoco VS. Amazonas	144
Figura 40 – Análise Bayesiana do genoma de <i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i> para a descoberta de loci sob seleção entre o Orinoco VS. Amazonas	145
Figura 41 – Análise Bayesiana do genoma de <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i> para a descoberta de loci sob seleção entre o Orinoco VS. Rio Negro	145
Figura 42 – Análise Bayesiana do genoma de <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i> para a descoberta de loci sob seleção entre o Rio Negro VS. Solimões	146
Figura 43 – Análise estatística de comparação de médias (Tukey test) para a variável pH da água das áreas de coleta de peixes migradores nos rios Orinoco, Solimões, Branco e Negro	147
Figura 44 – Análise estatística de comparação de médias (“t” test) para a variável pH da água das áreas de coleta de peixes sedentários nos rios Orinoco e Negro	147

Figura 45 – Análise de similaridade de padrões de pluviosidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas	149
Figura 46 – Unidades de Conservação para <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	150
Figura 47 – Unidades de Conservação para <i>Colossoma macropomum</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	151
Figura 48 – Unidades de Conservação para <i>Piaractus brachypomus</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	152
Figura 49 – Unidades de Conservação para <i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	153
Figura 50 – Unidades de Conservação para <i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	155
Figura 51 – Unidades de Conservação para <i>Nannostomus unifasciatus</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	156
Figura 52 – Unidades de Conservação para <i>Paracheirodon axelrodi</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	158
Figura 53 – Unidades de Conservação para <i>Pterophyllum altum</i> nas bacias do Orinoco e Amazonas	159

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	Estado da arte e revisão de literatura	21
2.1	História geológica que sustenta as bases da hipótese de compartilhamento de espécies entre as bacias do Orinoco e Amazonas.....	21
2.2	Aspectos biológicos e ecológicos dos peixes objeto de estudo que poderiam afetar a estrutura genética entre bacias.....	25
2.2.1	Migração	25
2.2.2	Tamanho corporal.....	26
2.3	Marcadores moleculares, estrutura genética e conservação.	27
2.3.1	Genes e regiões mitocondriais e nucleares: COI, Região Controle, Glyt e myh6.	27
2.3.2	SNPs como ferramenta molecular para estudos genético-populacionais e de conservação.....	28
2.3.3	SNPs para espécies de peixes não-modelo	30
2.3.4	Genômica e Conservação	31
2.3.5	Caracterização de ESUs, AUs e MUs.....	32
2.4	Aspectos gerais da importância econômica dos recursos pesqueiros.	33
2.5	Antecedentes de estudos genéticos.....	34
2.5.1	Amazonas-Orinoco	34
2.5.2	Amazonas.....	35
2.5.3	Orinoco	36
3	JUSTIFICATIVA.....	37
4	HIPÓTESE (H ₀).....	38
5	OBJETIVOS.....	38
5.1	Geral:.....	38
5.2	Específicos:.....	38
CAPÍTULO I: SIMPLIFICANDO A CONSTRUÇÃO DE LIVRARIAS GENÔMICAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE SEGUNDA GERAÇÃO: UMA ADAPTAÇÃO DA GENOTIPAGEM BASEADA EM ddRADs PARA IONTORRENT PGM EM ESPÉCIES NÃO MODELO		
6	INTRODUÇÃO.....	42
7	MATERIAL E MÉTODOS.....	44

8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
CAPÍTULO II: APLICAÇÕES DO NOVO MÉTODO SIMPLIFICADO DE ddRADs PARA A DESCOBERTA DE SNPs EM ESPÉCIES DE PEIXE NÃO MODELO: ESTUDO DE CASO PARA DOURADA <i>Brachyplatystoma rousseauxii</i> e O TAMBAQUÍ <i>Colossoma macropomum</i>.....		
		52
CAPÍTULO III: CONECTIVIDADE ATUAL E HISTÓRICA DA ICTIOFAUNA DO ORINOCO E O AMAZONAS: ABORDAGEM GENÉTICO-POPULACIONAL E FILOGEOGRÁFICA USANDO UM MODELO DE PEIXES MIGRADORES E SEDENTÁRIOS		
9	INTRODUÇÃO.....	64
10	MATERIAL E MÉTODOS	67
10.1	Amostragem e obtenção de sequências mitocondriais e nucleares	67
10.2	Análises de dados	72
10.2.1	ADN mitocondrial.....	72
10.2.2	ADN nuclear: regiões exônicas dos genes Glyt e myh6	74
11	RESULTADOS	75
11.1	ADN mitocondrial.....	75
11.2	ADN nuclear: regiões exônicas dos genes Glyt e myh6.....	96
12	DISCUSSÃO.....	106
CAPÍTULO IV: DELIMITANDO UNIDADES DE CONSERVAÇÃO PARA A ICTIOFAUNA COMPARTILHADA ENTRE O AMAZONAS E O ORINOCO: UMA ANÁLISE INTEGRADA DE DADOS GENÔMICOS, GENÉTICOS E ECOLÓGICOS		
13	INTRODUÇÃO.....	123
14	MATERIAL E MÉTODOS	124
14.1	Obtenção de sequências, SNPs e dados ecológicos	124
14.2	Análise de dados.....	125
14.2.1	Análise conjugada do ADN mitocondrial (COI e RC) e nuclear (regiões exônicas dos genes Glyt e myh6)	125
14.2.2	ADN Nuclear: SNPs.....	126
14.2.3	Análise de dados ambientais: Pluviosidade e pH	128
14.2.4	Interpretação de dados e definição de Unidades de Conservação.....	129
15	RESULTADOS	130
15.1	Análise filogenética integrada de ADN mitocondrial (COI e RC) e nuclear (regiões exônicas dos genes Glyt e myh6)	130
15.2	ADN Nuclear: SNPs	138

15.3	Dados ambientais: Pluviosidade e pH.....	147
15.4	Análise interpretativa dos dados e definição de Unidades de Conservação. .	151
16	DISCUSSÃO.....	161
17	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	169
APÊNDICE 1	192
APÊNDICE 2	193
APÊNDICE 3	195
APÊNDICE 4	197
APÊNDICE 5	199
APÊNDICE 6	201
APÊNDICE 7	203
APÊNDICE 8	205
APÊNDICE 9	207
APÊNDICE 10	209

1 INTRODUÇÃO

Com uma rede de bacias hidrográficas inigualáveis e a ictiofauna mais rica do planeta, as bacias dos rios Amazonas e Orinoco têm na pesca uma das atividades econômicas mais importantes para a região, como fonte de proteína de fácil acesso para as populações locais e os moradores das grandes cidades, e como fonte de renda gerada pela venda de peixes para o consumo e pela exportação de peixes ornamentais. As duas bacias estão caracterizadas pela sua alta diversidade de ictiofauna, estimada entre 1300 a 3000 espécies de peixes (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003), sendo que os Caraciformes e Siluriformes representam 83% desse total (LOWE-MCCONNELL, 1999). Os peixes dessas duas ordens são os mais explorados pela pesca comercial e também de subsistência nas bacias do Amazonas e Orinoco, sendo que apenas 30 espécies representam 80% dos desembarques comerciais em ambas às bacias (BARTHEM; FABRÉ, 2004; BARTHEM; GOULDING, 1997; NOVOA, 2002; TAPHORN, 2003). Dentro dos peixes ornamentais, onde 25 espécies representam a maioria de peixes exportados, a família Cichlidae também tem um papel significativo (CHAO, 2001; FERNANDEZ-ACOSTA et al., 2008).

Um número significativo das espécies de importância econômica é compartilhado entre as bacias do Amazonas e Orinoco (p. e. *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Paracheirodon axelrodi*, *Carnegiella marthae*, *Nannostomus unifasciatus*, *Pterophyllum altum*, *Fluviphylax obscurum* e *Osteoglossum ferreirae*). Em relação aos peixes ornamentais, o desconhecimento sobre a distribuição da diversidade genética destas espécies pode nos estar levando a uma subestimação da diversidade entre bacias, impedindo a priorização dos esforços de conservação das mesmas. Devido à condição sedentária da maior parte destas espécies, a sua estruturação, adaptação local e posterior especiação se dão em níveis mais elevados (BEHEREGARAY et al., 2015). Por outro lado, em alguns casos de peixes migradores como em *Pseudoplatystoma orinocoense* (*P. punctifer*) e *P. metaense* (*P. tigrinum*), ainda não é claro se as bacias realmente contêm as duas espécies diferentes. Por exemplo, só recentemente as espécies *P. orinocoense* e *P. metaense* da bacia do Orinoco, foram descritas para diferencia-las respectivamente das espécies *P. punctifer* e *P. tigrinum* da bacia Amazônica (BUIRAGO-SUÁREZ; BURR, 2007). Embora, recentes estudos em sistemática molecular têm demonstrado um forte compartilhamento de alelos nucleares e mitocondriais entre as espécies (CARVALHO-COSTA et al., 2011), sugerindo que podem ser as mesmas. Adicionalmente, as diferenças morfológicas entre estes pares (*P. orinocoense*/*P. punctifer* e *P. metaense*/*P. tigrinum*) são mínimas, e a possibilidade de compartilhar iguais espécies entre bacias não é descartado (BARTHEM; GOULDING, 1997); mais ainda quando conexões fluviais facilitadoras do intercâmbio de indivíduos como o Canal do Casiquiare (ligação vigente entre o Orinoco-Amazonas) se mostram como possíveis corredores zoo-geográficos e de dispersão desta ictiofauna compartilhada (WINEMILLER et al., 2008). Portanto, se faz necessária a determinação do grau de relação demográfica e conectividade da ictiofauna compartilhada entre bacias, com o objetivo de definir os limites geográficos e distribuição das unidades de conservação como base para o seu uso sustentável.

Os peixes citados são capturados para fins alimentícios, comerciais e para a exportação na Amazônia e Orinoco, movimentando milhões de reais e pesos através de vários personagens da pesca envolvida na cadeia produtiva nas duas bacias. A

necessidade de usar conhecimento científico para manejar e garantir a recuperação e a sustentabilidade destes recursos é fundamental para que o mesmo continue a gerar renda, emprego e seja fonte de alimento para as populações (USMA et al., 2009). Garantir a melhoria do benefício socioeconômico gerado pela atividade da pesca na Amazônia e Orinoco, bem como a sua continuidade, dependem diretamente de políticas que garantam o uso sustentável destes recursos, mas preservando a diversidade genética das espécies.

Hoje, com o desenvolvimento e aprimoramento de métodos biotecnológicos, os quais incluem marcadores genéticos moleculares, é possível obter e elucidar informações fundamentais sobre a estrutura genética e populacional, principalmente das espécies da ictiofauna de alto valor comercial para a região Amazônica e do Orinoco. De posse dessas informações, setores da administração pública, não só como tomadores de decisões mais também de fiscalização, poderão implementar e melhorar as estratégias de monitoramento, conservação e manejo em várias escalas temporais e espaciais.

Embora alguns estudos tenham sido realizados, nenhum envolveu integralmente a determinação dos níveis de distribuição da diversidade genética, fluxo gênico, entendimento da história e estrutura populacional, que finalmente permitissem a delimitação das unidades de conservação para as espécies compartilhadas entre as duas bacias. ESUs (Unidades Evolutivas Significantes), MUs (Unidades de Manejo) e AUs (Unidades Adaptativas), são Unidades de Conservação imprescindíveis, as quais juntas permitem ter o maior grau de resolução espacial possível para efeitos de orientar ações concretas e operacionais (reintroduções, defesos, áreas de captura, etc.) na busca de conservar ao longo prazo o recurso pesqueiro (DE GUIA; SAITOH, 2006; FRANKHAM, 2003; HOLDEREGGER; KAMM; GUGERLI, 2006).

A filogeografia é a estratégia moderna da biogeografia histórica que associa os métodos e conceitos da filogenia, a genética populacional e a biogeografia (Avisé 2004). Marcadores moleculares mitocondriais (Citocromo Oxidase I - COI, Região controle - D-loop, ATP-ase, Citocromo b - Cytb, entre outros) têm sido utilizados com sucesso para a delimitação de espécies, determinação de áreas de ocupação, distribuição de populações, existência de barreiras ao fluxo gênico, fluxo gênico, ocorrência de zonas híbridas, taxas de migração e variabilidade genética (AVISE, 2000, 2009). Este tipo de marcador, junto com aqueles de tipo nuclear como os microssatélites, têm sido propostos por Moritz (1994) para obter, a partir de dados filogenéticos e genético-populacionais, os estimadores para ajudar na delimitação de unidades de conservação como ESUs. Dessa forma, os marcadores mitocondriais permitiriam observar o componente histórico de divergência, enquanto que as frequências alélicas de marcadores nucleares permitiriam desvendar a variação neutra, eventos atuais como o fluxo gênico, e ajudar a delimitar portanto as MUs dentro das ESUs.

Embora o uso desses marcadores têm possibilitado a delimitação de ESUs, ocasionalmente muitas limitações foram observadas no uso exclusivo destes, especialmente no seu poder resolutivo para resolver aspectos genético-populacionais ou filogenéticos, assim como na delimitação de Unidades de Conservação. Uma delas foi a retenção do polimorfismo ancestral dos genes mitocondriais, o que resulta na ausência de monofilia recíproca entre estes genes dentro de populações analisadas, sobretudo aquelas fragmentadas recentemente ou em processo de divergência

(MORAN; KORNFIELD, 1993), limitando assim a definição das ESUs ou estrutura populacional. Uma segunda limitação achada consistiu em que ao utilizar microssatélites (teoricamente neutros), a delimitação da ESU não faz suficiente ênfase no potencial das espécies para maximizar o seu sucesso evolutivo através da manutenção da diversidade adaptativa (LYNCH et al., 1999).

Assim o uso de novos marcadores se faz necessário na tentativa de solucionar os problemas associados ao uso do ADN mitocondrial ou de microssatélites. A genômica populacional e genômica da conservação têm permitido o uso de marcadores amplamente distribuídos no genoma como SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e RAD-tags, os quais podem apresentar o poder estatístico suficiente para desvendar informações simultâneas que antes ofereciam separadamente os marcadores mitocondriais e os nucleares, em muitos casos com maior eficácia e exatidão (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; KELLER et al., 2013). Esta nova geração de marcadores anônimos tem sido objeto de estudo para a determinação e delimitação de Unidades de Conservação em todos os níveis anteriormente mencionados (ESUs e MUs), além de um novo nível que leva em conta as adaptações locais: Unidades Adaptativas (AUs) (FUNK et al., 2012).

Recentemente, as pesquisas em genética da conservação têm colocado maior atenção na análise da variação não só neutral, mas também na variação adaptativa, ou seja, nas adaptações ecológicas das populações, as quais estão determinadas pela seleção, muitas vezes divergente (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2012b). Deriva genética, endogamia e migração têm um amplo efeito no genoma, em quanto que a seleção deixa marcas somente em aqueles loci que são adaptativos a uma condição particular (LUIKART; ENGLAND; TALLMON, 2003). Assim, forças seletivas determinam então as Unidades Adaptativas (AUs), as quais na sua vez constituem-se no segundo nível hierárquico de organização dentro das ESUs e que contem as MUs. Marcadores como os microssatélites não possuem a capacidade de informar sobre adaptações ecológicas, pois são teoricamente neutros (REED; FRANKHAM, 2001), informando só sobre a variação neutral (Deriva e fluxo gênico).

Abordagens genômicas baseadas em Marcadores Anônimos como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), possuem a capacidade de detectar não só a variação neutra, mas também a variação adaptativa e informações históricas (LUIKART; ENGLAND; TALLMON, 2003; NOSIL; FUNK; ORTIZ-BARRIENTOS, 2009; VIA; WEST, 2008; VIA, 2009), pelo qual a determinação de unidades de conservação em todos os seus níveis hierárquicos (ESUs, AUs e MUs), assim como fluxo gênico, demografia histórica e recente, podem ser determinados a partir deste tipo de marcadores genômicos.

Ao contrário das abordagens tradicionais, os SNPs permitem comparações de mais de um locus, com o qual, em caso de existir congruência nas histórias filogeográficas e populacionais tratadas, se incrementa a probabilidade de que a história que se obtiver seja da espécie ou grupo populacional e não de um gene (AVISE, 2000). Na sua vez, a realização de comparações filogeográficas entre várias espécies ou populações codistribuídas (como no presente trabalho), com histórias de vida diferentes (migradores e sedentários) e aspectos morfológicos relacionados com sua ecologia reprodutiva que podem afetar a sua estrutura (Tamanhos corporais) (ARARIPE; RÊGO; QUEIROZ, 2013; HUGHES et al., 2012; NORTHCOTE; HINCH, 2004), permitiriam a avaliação da existência de padrões filogeográficos e populacionais

concordantes (ARBOGAST; KENAGY, 2008; AVISE, 2000, 2009; ZINK, 2002), permitindo testar hipóteses sobre possíveis eventos comuns, por exemplo, de vicariância ou dispersão, e identificar as causas geológicas, ecológicas ou etológicas que exerceram alguma influência sobre os mesmos (ARBOGAST; KENAGY, 2008; LANTERI; CONFALONIERI, 2003; ZINK, 2002).

Assim, a diversidade de ambientes, variações ecológicas, histórias geológicas e fatores antrópicos comuns modelando a dinâmica populacional da ictiofauna compartilhada entre as bacias do Amazonas e Orinoco, tornam este estudo num modelo interessante para desvendar o modo e processos atuais e históricos que permitem ou permitiram a interação dos dois sistemas fluviais e os limites espaciais em que se dão. Isto facilitará a disponibilização de informação de base científica que servirá de base para criação de estratégias orientadas ao correto manejo e conservação destes recursos pesqueiros.

2 ESTADO DA ARTE E REVISÃO DE LITERATURA

2.1 História geológica que sustenta as bases da hipótese de compartilhamento de espécies entre as bacias do Orinoco e Amazonas.

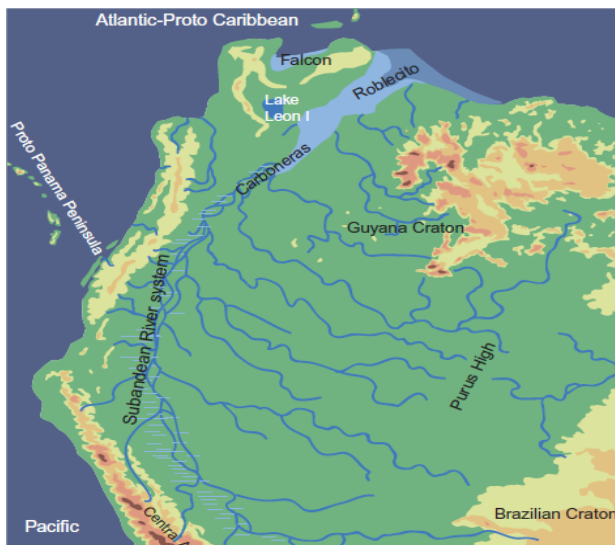


Figura 1. Paleogeografia do noroeste de América do Sul durante o Oligoceno (33 – 24 M.a.). Montanhas, cursos dos rios, e litorais aproximados, com detalhes de conjectura. *Fonte:* Wesselingh e Hoorn (2012).

Hubert e Renno (2006) sugerem, assim como Lundberg (1998), que a riqueza, compartilhamento e distribuição passada e presente de peixes continentais é sumamente complexa e que pelo menos pode se explicar através de várias hipóteses entre as quais se encontram: 1) A hipótese Paleográfica e, 2) As mudanças hidromorfológicas ou hidrogeológicas em rios.

Em relação à hipótese Paleográfica, esta sugere processos de isolamento devido ao efeito dos arcos (paleo-arcos) sobre o controle e perturbação fluvial durante o Mioceno Tardio ao Recente (~ 9 - 8 milhões de anos), como por exemplo, para este caso específico, o soerguimento do arco do Vaupés, que seria o responsável pelo

“isolamento” das bacias do Orinoco e Amazonas, que uma vez estiveram unidas.

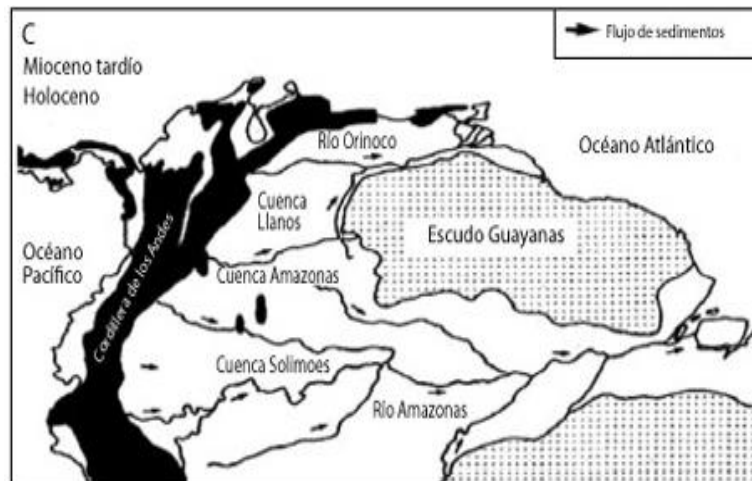
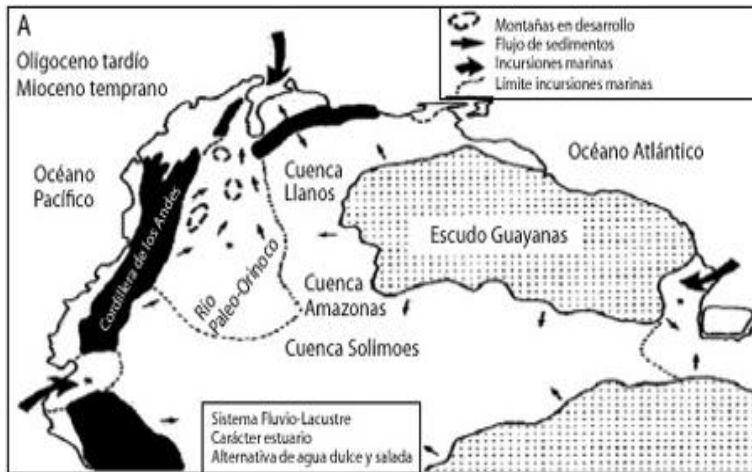


Figura 2. Mapa paleogeográfico do norte de América do Sul durante: A) Mioceno Cedo, B) Médio Mioceno e C) Mioceno tardio até o presente. Destaca-se o levantamento dos Andes e as mudanças de direção e drenagem dos Rios Orinoco e Amazonas. *Fonte:* Hernández et al. (2008).

À respeito deste evento vicariante, Hoorn et al. (1995) e Lundberg et al. (1998) têm apresentado evidência de que o Rio Amazonas esteve conectado ao Orinoco, formando o que foi conhecido como Paleo-Orinoco-Amazonas, alguma vez entre o Oligoceno tardio e Mioceno cedo (~27 - 23 milhões de anos) (Figura 1, Figura 2a), o que pode explicar por que o Amazonas e Orinoco possuem uma grande quantidade de espécies modernas compartilhadas, como aquelas que são objeto deste estudo.

Tempo depois, durante o Médio Mioceno (~16 - 11 milhões de anos) e até o Mioceno tardio (~11 - 5 milhões de anos) os processos orogênicos como o levantamento dos Andes, especialmente o acelerado paleo-levantamento da sua cordilheira oriental, fluxo de sedimentos, aumento das precipitações, entre outros fatores, geraram mudanças na orientação de fluxo das águas do Orinoco para o Caribe, e do Amazonas para o Atlântico (MORA et al., 2011) (Figura 2b-c); fazendo com que já processos vicariantes e de dispersão começassem a acontecer. Aproximadamente cinco milhões de anos atrás, no Mioceno tardio, culminou o levantamento do Arco do Vaupés, estendendo-se entre a base da cordilheira oriental dos Andes e a base do escudo Guianês na cabeceira do Rio Negro, “separando totalmente” as duas

bacias, e, portanto configurando o que hoje conhecemos como as bacias do Orinoco e Amazonas (DÍAZ DE GAMERO, 1996; HOORN, 1993; HOORN et al., 1995; WESSELINGH; HOORN, 2006). Embora este evento orogênico tenha acontecido, hoje

em dia pode se observar evidência de que esta separação não foi total, pois conexões fluviais ainda continuam vigentes entre as duas bacias, como no caso do canal do Casiquiare (Figura 3), evidenciando a conexão física entre bacias.

Em relação à hipótese de mudanças hidromorfológicas ou eventos de “captura” de cabeceira de rios (conexões entre nascentes), pode-se dizer que ditos eventos são tanto antigos quanto recentes. Assim por exemplo, Lundberg et al. (1998) sugeriram que a captura de cabeceira é um fenômeno usual para estas duas bacias, o qual há mais de 40 milhões de anos foi responsável pela origem de grande parte da diversidade de peixes continentais a partir de mudanças paleo-hidrológicas que permitiram a dispersão de biotas ancestrais e a posterior divergência alopátrica.

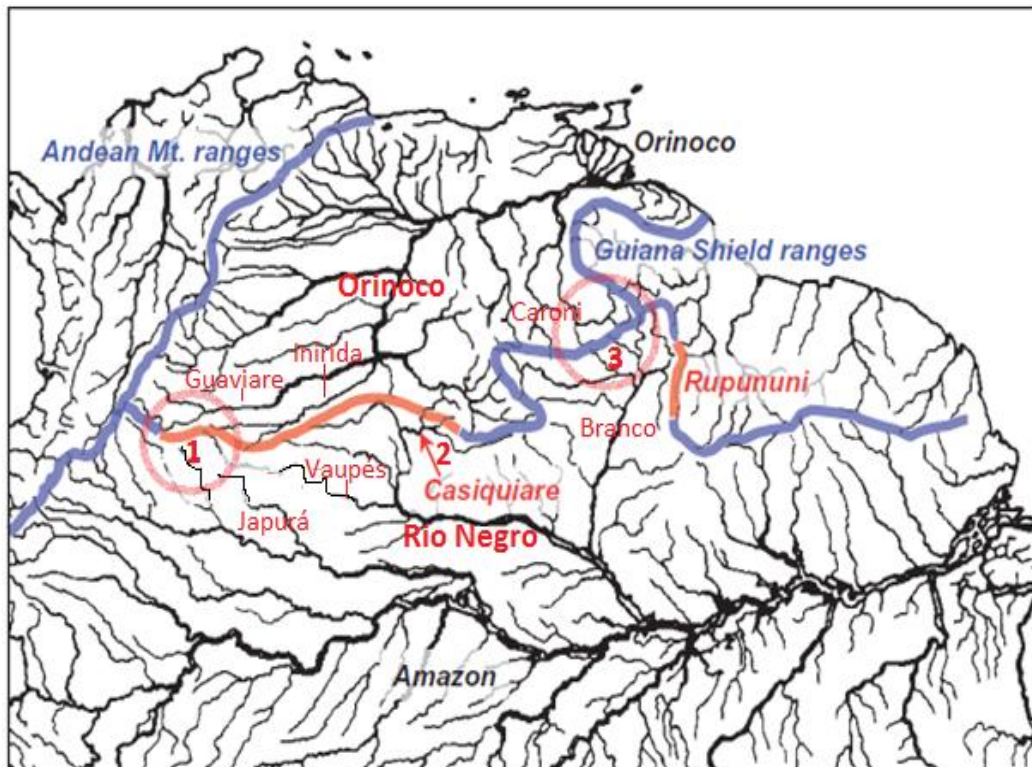


Figura 3. Mapa mostrando a drenagem atual do norte de América do Sul e divisões geológicas separando as bacias do Amazonas e Orinoco: linhas azuis são divisões hidrográficas associadas com grandes cordilheiras ou montanhas; linhas vermelhas são divisões hidrológicas associadas com paleoarcos de muito menor relevo. O rio Casiquiare une o Alto Orinoco e o Alto Rio Negro através do Arco do Vaupés. Destaca-se os ponto de possível atual conexão da ictiofauna Orinoco-Amazonas através das cabeceiras dos rios: 1) Guaviare-Uapés (Vaupés)-Japurá, 2) Negro-Orinoco (Casiquiare), e 3) Branco-Caroní. *Fonte:* Winemiller e Willis (2011).

A manifestação de captura de cabeceiras já tem sido reportada previamente no Paraná (HUBERT; RENNO, 2006; LUNDBERG et al., 1998; MONTOYA-BURGOS, 2003). Assim, evidências mostradas por alguns autores (HUBERT; RENNO, 2006; LASSO; MACHADO-ALLISON; HERNÁNDEZ, 1990; MACHADO-ALLISON, 1994) sugerem similares explicações para a distribuição de espécies através do sistema dos rios Orinoco Superior -Casiquiare - Rio Negro (Brasil-Venezuela), Caroní - Orinoco

Inferior – Cuyuní – Essequibo - Rio Branco (Brasil-Guiana-Venezuela) (Figura 3), Paraguay-Guaporé (Bolívia).

Do conjunto das anteriores hipóteses de conectividade fluvial, a única vigente até hoje é aquela onde as águas do alto Rio Negro da bacia do Amazonas estão conectadas com a cabeceira do Orinoco através do Canal do Casiquiare, única conexão evidente entre as bacias depois de terem sido separadas definitivamente pelo levantamento da cordilheira oriental dos Andes e o Arco do Vaupés (como já foi mencionado) no Médio Mioceno; se tornando em outra possível rota de dispersão moderna das espécies de peixes migratórias entre as duas bacias (BARTHEM; GOULDING, 1997; LUNDBERG et al., 1998; MACHADO-ALLISON, 2008), levando em conta que toda essa região sobre o Arco do Vaupés é considerada ainda uma das poucas barreiras semipermeáveis e de baixo relevo em América do Sul (Figura 4).

Willis et al. (2007) sugerem que os intercâmbios entre tributários de cabeceiras entre estas duas bacias têm sido relativamente comuns ao longo de todo o período de levantamento do Arco, sendo que seu erguimento paulatino permitiu ir gerando uma restrição gradual da migração até hoje e não instantânea de forma abrupta. Assim, os autores afirmam que distribuições das linhagens de peixes através da divisão Amazonas - Orinoco puderam ter sido o resultado de eventos mais recentes do que uma vicariância total abrupta há 11 milhões de anos com a origem do Arco. Inclusive, alguns autores advertem sobre a precaução que se deve ter quando se deseja calibrar utilizando este evento como ponto de datação (HUBERT et al., 2007a), pois pode não refletir o momento de separação das espécies ou linhagens entre as bacias, sendo que ainda hoje existe conectividade.



Figura 4. Mapa de América do Sul mostrando os locais de barreiras hidrogeográficas atuais podendo ser permeáveis ou semipermeáveis. Os números referem-se ao tempo mínimo de divergência em milhões de anos. *Fonte:* Lovejoy et al. (2010).

2.2 Aspectos biológicos e ecológicos dos peixes objeto de estudo que poderiam afetar a estrutura genética entre bacias.

2.2.1 Migração

Estudos recentes têm demonstrado de maneira crescente a existência de uma ampla dispersão e variações espaço-temporais da abundância e distribuição das espécies de peixes de água doce, previamente assumidas como espécies sem movimentos entre habitats. Estes movimentos são frequentemente relacionados com a sazonalidade dos níveis de água, chuva ou de base ontogênica para a reprodução, alimentação ou refugio; e em muitos casos são fundamentais para completar sucessivamente o ciclo de vida (LUCAS et al., 2001).

As migrações de peixes são tipicamente agrupadas em categorias baseadas nas fronteiras onde se desenvolvem as suas histórias de vida segundo o tipo de água: água doce e água salgada. Assim, aqueles peixes cuja migração acontece completamente em águas marinhas são denominados de oceanódromos, como aquelas realizadas por atuns e tubarões brancos. Os peixes potamódromos, são aqueles cuja migração se desenvolve completamente em água doce, enquanto que aqueles que realizam suas migrações entre água doce e salgada são denominados de diádromos (BINDER; COOKEE; HINCH, 2011).

No Neotrópico, muitas espécies de peixes de água doce são migratórias. Estas espécies migram durante todas as etapas da sua vida ao longo dos seus rios, usando habitats essenciais para o seu ciclo de vida. A maioria de peixes migratórios são potamódromos, localmente conhecidos como peixes 'piracema', e apenas alguns são diádromos. Os peixes potamódromos normalmente crescem até atingir um grande tamanho, são mais abundantes nos rios e são os mais importantes comercialmente. Algumas espécies como pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), tambaqui (*Colossoma macropomum*), surubim ou caparari (*Pseudoplatystoma* spp) e dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) são um pequeno exemplo de um grande grupo de peixes potamodromos (GODINHO; KYNARD, 2009) tanto na bacia Amazônica quanto no Orinoco.

Durante a migração os peixes são estimulados pela chuva, a correnteza e o aumento nos níveis de água para atingir seu ponto reprodutivo. As migrações são inicialmente ascendentes (em direção à cabeceira) por parte dos parentais adultos, cuja capacidade migratória permite alcançar cada um dos habitats espacialmente separados e que são adequados para os seus diferentes estágios ontogênicos de vida (Cabeceira: reprodução; estuário ou delta: berçário; Parte meia: crescimento de juvenis e pre-adultos) em alguns casos. Uma vez acontece a reprodução, ovos são dispersos e levados em direção ao delta do rio como ictioplâncton, e então uma segunda migração descendente acontece para os adultos, retornando à região média do rio (BARTHEM; GOULDING, 1997; GODINHO; KYNARD, 2009; GOULDING; BARTHEM, 2003).

De acordo à capacidade de deslocamento durante o processo reprodutivo, os peixes poderiam se classificar como: migradores, semi-migradores e sedentários (CHAPMAN et al., 2012). Assim, os peixes migradores poderiam se definir como aqueles com capacidade de migração ascendente de distâncias relativamente maiores do que os semi-migradores, ou seja, superiores aos 2500 km. Tal é o caso dos grandes bagres como *B. rousseauxii* e *Pseudoplatystoma* spp., os quais podem atingir

distancias em direção à cabeceira de 3100 até 3300 km em aproximadamente 5 meses, a uma velocidade de entre 15-19 km/dia. Em relação aos semi-migradores, este grupo inclui a maior parte dos Caraciformes (p. e. *Piaractus* spp., *Colossoma macropomum* e Prochilontidae) com uma capacidade de deslocamentos ascendentes de até 650 km a uma velocidade entre 5-8,7 km/dia (BARTHEM; GOULDING, 1997; BAYLEY, 1973; BONETTO; PIGNALBERI, 1964; BONETTO et al., 1971).

Finalmente, os peixes sedentários (p. e. *Paracheirodon axelrodi*, *Pterophyllum altum* e *Nannostomus unifasciatus*) podem se definir como aqueles cuja história de vida é restrita a uma área particular, com deslocamentos mínimos, só laterais, entre os habitats próximos às calhas principais dos rios e as planícies de inundação destes no período de chuvas, movimentos dependentes das mudanças dos níveis de água (LATRUBESSE; FRANZINELLI, 2005; MARSHALL; FORSBERG; THOMÉ-SOUZA, 2007), embora, sua reprodução não esta restrita só aos períodos de chuvas.

Estes eventos migratórios em direção às cabeceiras dos rios, com períodos e espaços longos de deslocamentos, são a base para inferir sobre possíveis trocas de indivíduos migrantes, reprodução entre parentais trans-bacias, ou dispersão de ictioplancton entre bacias, tudo através das planícies de inundação temporais entre cabeceiras ou através dos canais permanentes como o Casiquiare, supondo então um fluxo gênico entre subpopulações das bacias; aspecto que excluiria aos peixes sedentários, uma vez que as suas histórias de vida são contrarias às observadas em peixes migradores.

2.2.2 Tamanho corporal

Os organismos têm evoluído através de intrincadas combinações de características das suas histórias de vida, uma alta relação de complexidade entre aquelas características são esperadas para acontecerem, inclusive com outras de tipo fenotípico (STEARNS, 1992). Dados provenientes de estudos de reprodução de peixes demonstram a orientação atual das pesquisas para grupos de espécies que compartilham fenótipos comuns (p. e. BREDER; ROSEN, 1966; KOLM et al., 2006). Azevedo (1953) foi provavelmente o primeiro a sugerir associações entre características reprodutivas em peixes brasileiros de água doce. O autor propôs que a reprodução em grandes rios (sistemas lóticos) está associada com a **migração**, alta fecundidade, e ausência de cuidado parental, e que a reprodução em ambientes lénticos está associada com a **ausência de migração**, baixa fecundidade e cuidado parental. Lowe-McConnel (1969, 1975) e Welcomme (1979, 1985) reportaram similares associações para outras espécies de peixes.

Godinho et al. (2010) usaram metadados sobre nove características reprodutivas de 67 espécies brasileiras de peixes teleósteos de água doce (iteróparos e ovíparos) para testar associações de fenótipos para discriminar espécies que somente se reproduzem em grandes rios (peixes lóticos - migradores) daqueles que se reproduziam em habitats lénticos (peixes lénticos - sedentários). Assim, testaram a hipótese de que os peixes de sistemas lóticos apresentavam, entre outras variáveis, migração reprodutiva e grande tamanho corporal, enquanto que os peixes de sistemas lénticos não apresentavam migração reprodutiva e possuíam pequeno tamanho corporal. Como resultado, a

hipótese foi confirmada, obtendo-se que ditas associações eram aplicáveis para os peixes estudados (Figura 5).

A relação de tamanho corporal e capacidade migradora das espécies objeto do presente estudo parecem evidenciar esta hipótese. Espécies de siluriformes altamente migradoras como *B. rousseauxii* e *Pseudoplatystoma* spp., podem atingir tamanhos médios de até 192 cm (BARLETTA, 1995; ZUANON, 1990), enquanto que espécies semi-migradoras como *Piaractus macropomum* e *Colossoma macropomum* podem alcançar tamanhos médios de 46 cm (CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL – INCODER, 2007). Finalmente, os peixes sedentários como *Paracheirodon axelrodi*, *Nannostomus unifasciatus* e *Pterophyllum altum*, apresentam tamanhos que podem variar entre 18 e 2,5 cm dependendo da espécie (LIMA et al., 2003; RIEHL; BAENSCH, 1996; WEITZMAN; PALMER, 2003).

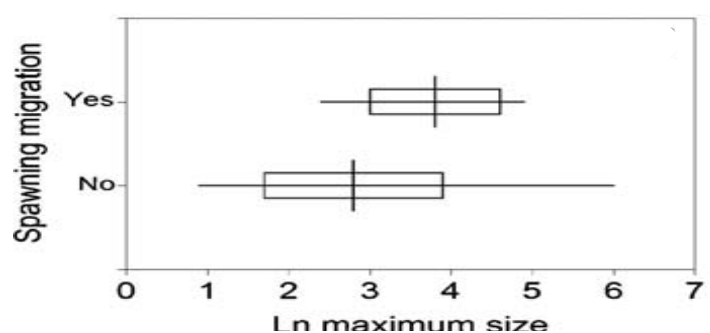


Figura 5. Relação entre Migração reprodutiva “*spawning migration*” dos peixes teleósteos brasileiros de água doce (iteróparos e ovíparos) e o Logaritmo natural do tamanho corporal máximo “*maximum body size*”. Fonte: Godinho et al. (2010).

Apesar disto, estudos das associações entre tamanho corporal, capacidade de migração e o efeito no fluxo gênico e a estrutura genética, não tem sido testadas através do uso de ferramentas moleculares nas espécies compartilhadas entre as bacias do Orinoco e do Amazonas, nem dentro das bacias; resultados que permitiriam desvendar como a dinâmica reprodutiva das espécies compartilhadas e seus fenótipos influenciam em maior o menor grau sobre a troca de indivíduos e fluxo gênico entre e dentro das bacias.

2.3 Marcadores moleculares, estrutura genética e conservação.

2.3.1 Genes e regiões mitocondriais e nucleares: COI, Região Controle, Glyt e myh6.

Em animais, o ADN mitocondrial é uma molécula circular covalentemente fechada, com aproximadamente 16 - 20 kb de extensão, possui 37 genes dos quais 13 codificam para proteínas da fosforilação oxidativa, como por exemplo a sub-unidade I da Citocromo Oxidase (COI). Adicionalmente a estes 37 genes, encontra-se uma região não codificante de proteína, a Região Controle, cuja função é exercer controle sobre a replicação do ADN mitocondrial e a transcrição de ARN transferência, o que lhe permite

evoluir mais rapidamente (liberdade de substituição nucleotídica) do que o resto dos genes, uma vez que não está sob seleção, apresentando assim uma alta variabilidade intraespecífica, permitindo detectar diferenças genéticas no nível populacional (AVISE et al., 1987). No caso do COI, pela sua baixa liberdade mutacional, apresenta-se como um gene conservado intraespecificamente, o que o tem tornado um valioso marcador na identificação de espécies ou delimitação de ESUs (CARVALHO; OLIVEIRA, 2012; ROE; SPERLING, 2007).

Os estudos filogeográficos em espécies animais baseiam-se principalmente em sequências de ADN mitocondrial (ADNmt), dado que apresentam uma alta taxa de mutação, não recombina e sua herança é quase exclusivamente materna (LANTERI; CONFALONIERI, 2003). As variantes (sequências) de ADNmt, conhecidas como haplótipos, registram a história matrilinear de eventos mutacionais, os quais são diferenciados quando uma população é fragmentada no passado e se mantém geneticamente isoladas (interrupção ao fluxo gênico), o que inevitavelmente leva a uma divergência proporcional ao tempo de separação devido à deriva genética e mutação. Pelo contrário, a presença de fluxo gênico homogeniza as frequências alélicas e haplotípicas, inibindo a especiação e alcance da monofilia recíproca (SLATKIN, 1985). De qualquer maneira, o uso deste tipo de ferramentas oferece uma visão de um genoma alternativo importante em relação à história demográfica, genética populacional e filogeografia das espécies de peixes objeto deste estudo.

Apesar do auge do ADN mitocondrial para a observação de eventos mais recentes como fluxo gênico e delimitação de unidades de conservação, outras moléculas de origem nuclear têm surgido para auxiliar na confirmação destas hipóteses. Assim, em relação ao genoma nuclear, é sabido que este possui uma taxa de substituição até dez vezes menor do que o genoma mitocondrial (BROWN; GEORGE; WILSON, 1979), e portanto, uma alta retenção do polimorfismo ancestral, razão pela qual atingir a monofilia recíproca em moléculas pertencentes a este tipo de genoma é uma forte evidência de isolamento reprodutivo por um longo período de tempo. Pelo contrário, uma falta de monofilia recíproca causada pelo compartilhamento de alelos ou *sorting* incompleto de linhagens, indicaria divergência recente. De fato, este tipo de moléculas tem sido amplamente utilizadas e testadas para filogenias profundas entre espécies plenas de vários gêneros e famílias (SPRINGER et al., 2001; THOMPSON et al., 2014). Dentre dos 10 genes nucleares mais usados para abordagens filogenéticas em peixes (Li et al. 2007), encontram-se regiões exônicas que codificam para proteínas conservadas como Glycosiltransferase (glyt) e a cadeia pesada 6 alfa da miosina do músculo cardíaco (Myh6), as quais apresentam um bom poder resolutivo para delimitar espécies de peixes e estabelecer as suas relações de ancestralidade (THOMPSON et al., 2014), o que permitirá confirmar hipóteses atingidas com os dados mitocondriais e robustecer conclusões de uma maneira mais integral sobre as espécies.

2.3.2 SNPs como ferramenta molecular para estudos genético-populacionais e de conservação.

Loci nucleares anônimos representam fragmentos de ADN selecionados aleatoriamente, os quais são provenientes, na maioria das vezes, de regiões não

codificadoras do genoma, considerando que uma grande porcentagem do genoma eucariota compreende regiões não codificantes (THOMSON; WANG; JOHNSON, 2010). Dentro de suas vantagens temos sua tendência a ser independente; sem viés a uma área particular do genoma, e, ocasionalmente sob seleção, além de ser altamente livre para acumular mutações em taxas variáveis (BERTOZZI et al., 2012). Pelo seu alto rendimento, fácil transferibilidade entre laboratórios e baixo erro de genotipagem, se torna um marcador de evolução rápida de suficiente poder estatístico para filogenética (THOMSON et al., 2008), filogeografia (LEE; EDWARDS, 2008; ROSENBLUM; NOVEMBRE, 2007), genética populacional (CAMPBELL; NARUM, 2011), ecologia (THOMAS; KLAPER, 2004; UNGERER; JOHNSON; HERMAN, 2008) e conservação (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; KOHN et al., 2006; PRIMMER, 2009). Um marcador SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) é um tipo de marcador anônimo nuclear de uma única mudança de base em uma sequência de ADN, com uma alternativa usual de dois possíveis nucleotídeos em uma posição determinada (marcador bialélico), possuindo um modelo de evolução simples baseado em transições e transversões (VIGNAL et al., 2002).

A abordagem genômica para resolver problemas na delimitação de unidades de conservação já havia sido revisado por diversos autores como Kohn et al. (2006), Primmer (2009) e Allendorf et al. (2010). Só recentemente, Funk et al. (2012) propõem bases metodológicas concretas no uso de dados genômicos para obter iguais ou mais exatos resultados na determinação de Unidades de Conservação (UCs) que as propostas por Moritz (1994), o qual se baseia no uso de dois tipos de marcadores para alcançá-lo (nucleares e mitocondriais). Deste modo, Funk et al. (2012) sugerem a abordagem genômica como uma ferramenta que integra simultaneamente informações históricas e recentes, permitindo superar a limitação tradicional imposta pela natureza predominantemente neutral da variação que tem sido testada com os marcadores moleculares tradicionais e, oferecer acesso à base genética da variação adaptativa (GODOY, 2009).

Os SNPs geram um poder estatístico equiparável aos microssatélites ou ADN mitocondrial, uma vez que proporcionam uma cobertura mais ampla do genoma e uma geração de dados de maior qualidade, tornando-os uma ferramenta genética eficiente e rentável para efeitos de conservação das espécies (MORIN; LUIKART; WAYNE, 2004). Sabe-se que 42-100 SNPs neutrais possuem o poder estatístico de 10-22 loci de microssatélite para revelar diferenciação genética entre populações naturais (KALINOWSKI, 2002; MORIN; MARTIEN; TAYLOR, 2009), o qual pode ser menor de acordo com o táxon analisado, além de um alto poder de atribuição de indivíduos (HAUSER et al., 2011) e reduzida ou nula convergência de alelos (homoplasia) entre subpopulações quando comparados com microssatélites (COATES et al., 2009).

Talvez uma das vantagens metodológicas mais importantes dos SNPs é o rápido desenvolvimento em espécies não-modelo, a obtenção de dados a partir de tecnologias avançadas como os sequenciadores de segunda geração, e não menos importante, o oferecimento de informações integradas de loci neutros e adaptativos, diretamente relacionados com respostas a processos como mudanças ambientais, de grande importância para a conservação (FUNK et al., 2012).

Marcadores neutros e adaptativos proporcionam diferentes tipos de informação que podem ser combinados para otimizar as decisões de manejo. Os padrões genéticos em marcadores neutros refletem a interação do fluxo gênico e deriva genética

que afeta a variação do genoma completo dentro e entre populações. Esta estrutura genética da população é onde a seleção natural opera para causar divergências adaptativas (FUNK et al., 2012). Daí que se considera que a atual distribuição e estrutura da biodiversidade Orinoco-Amazonas é o produto de ambos os processos, os estocásticos e deterministas, ou seja, variações neutras e adaptativas. Portanto, seu uso deve ser conjugado para interpreta-la e conservá-la corretamente.

2.3.3 SNPs para espécies de peixes não-modelo

Os SNPs têm se tornado no tipo de marcador ideal para estudos em conservação, genética populacional e ecologia em várias espécies de peixes, a maior parte delas salmonídeos como *Oncorhynchus tshawytscha*, *Oncorhynchus nerka*, *Oncorhynchus keta* (SMITH et al., 2011), *Salmo salar* (Boulding et al. 2008), *Oncorhynchus mykiss* (ABADÍA-CARDOSO; CLEMENTO; GARZA, 2011), e *Oncorhynchus kisutch* (CAMPBELL; NARUM, 2011) de maneira sucessiva, demonstrando suas propriedades como uma poderosa ferramenta no cumprimento deste tipo de objetivos. Muitas destas espécies são conhecidas como modelos: com disponibilidade de sequências genômicas em bases de dados ou com sequências de referência, dada sua ampla distribuição e importância econômica na aquicultura e pesca de países do hemisfério norte; o que facilita o desenvolvimento *in silico* deste tipo de marcadores genômicos.

Estima-se que o número total de espécies de peixes ao redor do mundo é de 32400 (FishBase 2012), no entanto, até hoje só aproximadamente 0,26% (86) destas espécies, possuem seu genoma ou transcriptoma sequenciado totalmente (p. e. *Oryzias latipes*, *Danio rerio*, *Oreochromis niloticus*) ou parcialmente (p. e. *Carassius auratus*, *Ictalurus punctatus*, *Anguilla anguilla*), inclusive, em outras espécies apenas em processo de sequenciamento (p. e. *Astyanax mexicanus*) (NCBI 2012). O restante 99,74% das espécies são consideradas não-modelo; limitando em consequência o uso de SNPs com o objeto de conserva-las. Este é o caso da ictiofauna neotropical, onde a abordagem genômica para genética populacional, filogeografia ou delimitação de unidades de conservação é nula, sem contar com que a perda de diversidade por atividades antrópicas como a poluição dos rios, a construção de hidrelétricas e a sobrepesca (AGOSTINHO et al., 2003; HATANAKA; HENRIQUE-SILVA; GALETTI, 2006; VRIJENHOEK, 1998) continuam aumentando exponencialmente.

Tem sido amplamente estudado que para organismos não-modelo as novas tecnologias de sequenciamento de segunda geração proporcionam acesso a grandes informações de sequências (TAUTZ; ELLEGREN; WEIGEL, 2010), sendo que para aqueles organismos sem um genoma de referência, passos de redução do genoma são requeridos para um profundo “assembly” de *contigs* redundantes e eficiente sequenciamento, aspectos fundamentais para a descoberta de SNPs (SLATE et al., 2009). Os anteriores princípios são utilizados para a descoberta de SNPs, sequenciando fragmentos aleatórios de ADN genômico gerados, partindo do princípio da técnica AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) (VOS et al., 1995), já amplamente usada com sucesso em outros organismos (BENSCH; ÅKESSON; IRWIN, 2002; KARL; AVISE, 1993; NICOD; LARGIADER, 2003; RODEN; DUTTON; MORIN, 2009). Este processo tem se tornado relativamente eficiente para a obtenção das

sequências (RAD tags), genotipagem *de novo* de SNPs (sem genoma de referência) ou desenho de *primers* para genotipagem por sequenciamento Sanger. No entanto, essa metodologia precisa ser adaptada e padronizado para tecnologias de sequenciamento de segunda geração como IonTorrent PGM, levando em conta conceitos de praticidade e reprodutibilidade entre laboratórios, ainda ausentes. A ausência de processos de clonagem e complexas construções de livrarias (OLSEN et al., 2011), isolamentos e purificações (THOMSON et al., 2008), reduzem indiscutivelmente o tempo de obtenção dos marcadores SNPs, o que torna essa técnica atrativa e inovadora.

2.3.4 Genômica e Conservação

As mudanças genéticas que as populações sofrem como resultado da fragmentação e o declive têm confirmado as consequências negativas que estes podem ter para a viabilidade populacional e a evolução adaptativa. Afortunadamente, a aplicação de marcadores moleculares e a rica teoria evolutiva, aportam informação sobre a história evolutiva, a demografia, a ecologia e o comportamento das espécies, o que pode ajudar na avaliação de riscos, a atribuição de prioridades, a delimitação de unidades e o delineamento de estratégias de conservação eficazes (ALLENDORF; LUIKART, 2007; THOMSON; WANG; JOHNSON, 2010).

Neste sentido, a genética da conservação tem colocado as bases para a solução de problemas na conservação de espécies a partir de uma abordagem baseada em dados genéticos. Inicialmente, define as bases para a delimitação de unidades de conservação, se destacando aquelas denominadas como Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) e as Unidades de Manejo (MUs) que a compõem. A delimitação e conceito de ESUs e MUs têm sido temas de discussão de diversos autores, entre eles Crandall et al. (2000), quem consideram as primeiras como populações que carecem de: (i) habilidade de intercâmbio ecológico (possuem diferentes adaptações ou pressões seletivas [p. e. histórias de vida, morfologia, variação em loci de características quantitativas (QTL), habitat, predadores, etc.] e diferentes papéis ecológicos dentro da comunidade); e (ii) 'intercâmbio genético' (p. e. ausência de fluxo gênico recente, e mostram concordância na descontinuidade filogenética e geográfica).

Em 1994, Moritz aborda a filosofia do conceito de ESU e inclui as MUs, definindo a primeira como um conjunto de populações historicamente isoladas e que em consequência, é provável que tenham um potencial evolutivo diferente, arranjo que deve se manter intacto, considerando as variantes geográficas adaptadas diferencialmente dentro de uma espécie. Assim também, define as segundas como populações locais incluídas dentro das ESUs (menor escala), as quais estão conectadas entre si por um baixo fluxo gênico recente e que portanto faz elas funcionalmente independentes. Da mesma maneira, menciona que as ESUs têm relação com a estrutura populacional histórica, monofilia recíproca de ADNmt e portanto com requerimentos de conservação de longo prazo; enquanto as MUs fazem referência à estrutura populacional devido ao fluxo gênico recente e deriva, diferenças estatisticamente significantes nas frequências alélicas (ADNnu) e portanto, necessidades de manejo em curto prazo, levando em conta que estas são as unidades lógicas para o monitoramento populacional e de estudos demográficos. Apesar disso, a variação adaptativa não era levada em conta nesta abordagem.

Recentemente, Funk et al. (2012) propõem uma nova abordagem na delimitação de Unidades de Conservação, baseado em duas premissas a partir de dados genômicos como os SNPs: a primeira é que diferentes classes de marcadores devem ser usados para definir diferentes UCs. Especificamente, argumentam que todos os loci, tanto neutrais quanto os adaptativos, devem ser usados para delimitar ESUs. Isto porque as ESUs são maiores, unidades intraespecíficas que têm estado historicamente isoladas e que provavelmente têm diferenças adaptativas importantes entre elas. Pelo contrário, as MUs devem ser demarcadas usando unicamente loci neutrais, levando em conta que as MUs são unidades demograficamente independentes que estão definidas pelo fluxo gênico restrito. Adicionalmente, considera a delimitação de uma nova UC de segunda ordem depois das ESUs: Unidades Adaptativas (AUs), as quais estão compostas por MUs caracterizadas pelas adaptações genéticas aos ambientes ecológicos diferenciados dentro das ESUs; delimitando-se pelos loci adaptativos, relacionados com o *fitness* (CRANDALL et al., 2000).

A aplicação desta metodologia poderia ser ideal para as espécies compartilhadas entre o Amazonas e Orinoco, onde existe um evento histórico de possível separação entre as bacias (~11 - 9 milhões de anos), tempo desde o qual possíveis adaptações e pressões de seleção têm acontecido diferencialmente ou não, considerando que o fluxo gênico ainda exista por ligações hídricas. Motivo pelo qual o verdadeiro padrão de distribuição da diversidade genética deve ser elucidado.

Entender ditos padrões de diferenciação adaptativa é crucial quando se quer priorizar populações para conservação e assim focar os esforços de manejo (DE GUIA; SAITOH, 2006), ou quando precisamos decidir quais populações devem ser escolhidas para serem usadas como fontes para translocações, suplementações, e esforços de migração assistida (MORITZ, 1999). Suplementar uma população declinada com indivíduos de uma população fonte já adaptada a um ambiente muito diferente; pode levar à depressão exogâmica (FRANKHAM et al., 2011). De igual forma, a identificação de MUs é de grande utilidade para objetivos de manejo em curto prazo como a delimitação de áreas de pesca e caça, estabelecimento de cotas de captura local, e monitoramento de habitats e o estado das populações (PALSBØLL; BERUBE; ALLENDORF, 2007).

2.3.5 Caracterização de ESUs, AUs e MUs.

Marcadores sob seleção refletem as variações adaptativas, portanto se direcionam à determinação de estrutura populacional na escala ecológica das espécies (WAPLES; GAGGIOTTI, 2006) e a atribuição de indivíduos às populações de origem (NIELSEN et al., 2009), enquanto que marcadores neutros se direcionam a elucidar processos evolutivos neutrais como a deriva e o fluxo gênico (p. e. baseado no F_{st}) (HELYAR et al., 2011), além de tamanhos efetivos populacionais e taxas de migração.

Segundo Funk et al. (2012), considerando que as ESUs são o resultado de processos neutros e adaptativos, sua caracterização deverá conjugar ambos os tipos de loci, enquanto que as MUs deverão ser delimitadas unicamente a partir de loci neutros. Alternativamente, aqueles loci sob seleção (“*outlier loci*”) poderão ser usados para identificar os grupos mais adaptadamente divergentes dentro de cada ESU: AUs.

Deste modo, dado que marcadores SNPs oferecem informações integradas de loci neutros e sob seleção (FUNK et al., 2012), para a realização de ditas análises e outros como os genético-populacionais que permitam rejeitar ou não a hipótese de conectividade ictiofaunística Orinoco-Amazonas, será necessário que loci neutros e sob seleção sejam identificados e diferenciados para posteriormente serem usados de forma independente (BEAUMONT; NICHOLS, 1996), principalmente a partir de métodos baseados no índice *Fst* (NARUM; HESS, 2011) através de escâner genômico (FOLL; GAGGIOTTI, 2008).

2.4 Aspectos gerais da importância econômica dos recursos pesqueiros.

Um grande número de peixes economicamente importantes compartilhado entre países e bacias da região norte da América do Sul têm sofrido, ou estão sofrendo, uma intensa exploração comercial ao longo da calha e dos principais tributários do rio Amazonas e Orinoco (ISAAC; RUFFINO, 1996; NOVOA, 2002). Os peixes ornamentais também sofrem uma intensa exploração (CHAO, 2001). No Amazonas, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma orinocoense* (*P. punctifer*), e *Pseudoplatystoma metaense* (*P. tigrinum*) formam parte das 10 principais espécies que representam mais de 80% da produção dos mercados regionais (SANTOS; SANTOS, 2005), enquanto que no Orinoco, podem representar até o 60% ou mais (CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL – INCODER, 2007).

De igual forma, peixes ornamentais como *Paracheirodon axelrodi*, *Nannostomus unifasciatus* e *Pterophyllum altum*, fazem parte das quatro famílias (de 25 exploradas) sobre as que recaem o 85% das extrações no Amazonas, sendo que *Paracheirodon axelrodi* chega a atingir o 67,5% das espécies capturadas (ANJOS et al., 2009). No Orinoco, estas quatro espécies perfazem quase 54% das extrações (dentro de um grupo de 25 espécies mais pescadas) e 46% do grupo de espécies totais capturadas, sendo que só *Paracheirodon axelrodi* atinge 48% e 42% de cada grupo de peixes respectivamente.

Adicionalmente, considerando que a biodiversidade aquática é integrada à cultura tradicional dos ribeirinhos da bacia amazônica e do Orinoco, estratégias de manejo e conservação para estas espécies devem levar em consideração as necessidades econômicas locais (das comunidades) para que elas tenham sucesso garantido.

As pesquisas que visam fornecer elementos para o manejo e conservação de recursos pesqueiros na bacia Amazônica e do Orinoco devem considerar sua distribuição, abundância, dinâmica populacional, níveis de variabilidade genética das populações exploradas, pesca, formas de organização dos pescadores e suas relações com o mercado, e as tecnologias apropriadas para um melhor aproveitamento do recurso. Outro aspecto vital é o conhecimento da estrutura populacional dentro e entre as bacias, uma vez que diferentes tipos de estrutura populacional ou falta dela sugerem radicalmente diferentes sistemas de manejo, e tem graves implicações para a necessidade de ter ou não uma legislação pesqueira concordante entre os países que compartilham estes recursos pesqueiros.

Por exemplo, no caso da pirapitinga (*Piaractus brachypomus*), como também todas as outras espécies a serem estudadas, os regulamentos pesqueiros variam muito entre os países (Tabela 1).

Tabela 1. Variações trans-fronteiriísticas da legislação pesqueira durante a temporada de defeso para a espécie pirapitinga *Piaractus brachypomus*.

Bacia	Medida	Venezuela	Colômbia	Peru	Brasil
Orinoco	Tamanho de captura	55 cm LT	51 cm LS		
	Época de defeso	Domingo de ressurreição – 31 de julho	1 maio – 30 junho		
Amazonas	Tamanho de captura		51 cm LS	40 cm LF	Ausência de legislação
	Época de defeso		Ausência de legislação	Ausência de legislação	15 de novembro a 15 de março

LT: Comprimento Total; LS: Comprimento padrão; LF: Comprimento de Forquilha.

Hoje pode se dizer que não existe nenhum plano de manejo do recurso pesqueiro trans-fronteiriístico (ou dentro dos países que compartilham as espécies) baseados em dados genéticos unificados dos táxons mais explorados comercialmente, o qual permita o correto tratamento das espécies de acordo aos seus limites espaciais (estrutura) e a sua capacidade de suporte das pressões de pesca de acordo ao estado da sua diversidade genética.

2.5 Antecedentes de estudos genéticos

2.5.1 Amazonas-Orinoco

Vários estudos em taxas de peixes Amazônicos demonstram a ausência destes na bacia do Orinoco. Por exemplo, inclui-se dentre este grupo espécies de *Lepidosiren paradoxa*, e ciclídeos (*Symphysodon* spp.). Além disso, há evidência de que um número de taxa irmãos demonstraram um mercado padrão de vicariância, por exemplo, uma espécie amplamente distribuída, mas limitada à bacia do Amazonas, e a outra espécie também amplamente distribuída, mas limitada à bacia do Orinoco (p. e. piranhas *Pygocentrus nattereri* no Amazonas, e *P. cariba* no Orinoco). Recentes estudos têm revelado também uma grande diferenciação entre populações de espécies de peixes que ocorrem ao longo do Casiquiare, sugerindo que este canal é uma barreira ao fluxo gênico (LOVEJOY; ARAUJO, 2000; TURNER et al., 2004; WILLIS et al., 2007).

Em trabalhos mais recentes, Winemiller et al. (2008) encontram que muitas espécies estiveram amplamente distribuídas ao longo da região, com capturas de indivíduos da mesma espécie em habitats de águas claras do Alto Orinoco e alto Casiquiare e em habitats de águas pretas no Baixo Casiquiare e Rio Negro. Assim, peixes destes trabalhos incluem a piranha *Serrasalmus rhombeus*, todas as espécies conhecidas gênero *Boulengerella*, os ciclídeos *Cichla temensis* e *Mesonauta insignis*, o bagre *Pimelodus blochii* e *Scorpiodoras heckelii*. Frequentemente pequenas espécies com distribuição restrita têm sido encontradas em localidades dentro de ambas as bacias: Alto Orinoco e Alto Rio Negro (FERRARIS; MAGO-LECCIA, 1989). Da mesma maneira, outros estudos mais recentes demonstram também que espécies parecem estar distribuídas dentro de ambas as bacias (CRAMPTON; ALBERT, 2003; FREEMAN et al., 2007; LITTMANN, 2007). Espécies como a piranha *Serrasalmus rhombeus*, o bagre *Phractocephalus hemiliopterus*, e o golfinho do Rio Amazonas *Inia geoffrensis*, possuem uma distribuição que inclui o Orinoco, Casiquiare e o Amazonas (Winemiller et al. 2008). Willis et al. (2010), usando sequências da região controle da mitocôndria de três espécies do mesmo gênero (*Cichla temensis*, *C. monoculus*, e *C. orinocensis*) cuja distribuição inclui o Amazonas, Orinoco, e Casiquiare, construiu filogramas de haplótipos por máxima verossimilhança e analisou as populações sobre um modelo coalescente de isolamento com migração; sugerindo que as populações das três espécies tiveram experimentado algum grau de fluxo gênico via Casiquiare; suportando a ideia que o Casiquiare é uma conexão importante através da escala temporal, facilitando tanto o fluxo gênico quanto a dispersão de espécies. Finalmente, Winemiller et al. (2008) conclui que o Casiquiare é um filtro zoo-geográfico, chegando a permitir só a algumas espécies se movimentar livremente entre as duas bacias.

Embora estes resultados interessantes, todos têm sido abordados exclusivamente desde o ponto de vista distributivo e ecológico, enquanto que apenas um possui abordagem genético-populacional. Adicionalmente, nenhum deles é orientado à conservação do recurso pesqueiro mais explorado, foram restritos ao Casiquiare e não incluíram as calhas principais das bacias envolvidas propriamente, nem as espécies objeto do presente estudo. A pesquisa focou principalmente em peixes sedentários na sua maioria, o que impede conhecer informação importante sobre o comportamento de todas as histórias de vida possíveis na ictiofauna existente e suas respostas evolutivas frente um mesmo evento vicariante ou não (p. e. o Arco do Vaupés – Casiquiare), fluxo gênico, estrutura, diversidade genética e relações populacionais atuais e históricas que modelaram o presente padrão de distribuição.

2.5.2 Amazonas

Das duas bacias, provavelmente a do Amazonas é a mais estudada desde o ponto de vista genético-populacional, sendo que grande parte destes estudos são feitos em espécies altamente exploradas, incluindo aquelas que são foco do presente estudo. Assim, existem vários trabalhos realizados com peixes de importância econômica da bacia Amazônica (p. e. BATISTA; ALVES-GOMES, 2006; BATISTA et al., 2004, 2005; FARIAS; HRBEK, 2008; FARIAS, 2003; FARIAS et al., 2006, 2005, 2010; HRBEK; CROSSA; FARIAS, 2006; HRBEK; FARIAS; CROSSA, 2005; HRBEK; SECKINGER; MEYER, 2007; MACHADO, 2009; PASSOS, 2009; SANTOS; RUFFINO; FARIAS, 2007;

SCHNEIDER et al., 2012; TERCENIO; SCHNEIDER; PORTO, 2012; TOFFOLI, 2006; TOFFOLI et al., 2008). Na maioria dos trabalhos citados foi encontrada estrutura populacional tipo isolamento por distância, ou ausência de estrutura (panmixia). Em ambos os casos, os padrões da distribuição da diversidade genética entre as localidades analisadas foram resultados de dois processos: o fluxo gênico que homogeniza as diferenças gênicas entre as localidades, e o compartilhamento histórico da diversidade gênica devido à ancestralidade comum.

Apesar dos avanços, nenhuma abordagem tem contemplado o esclarecimento dos efeitos da variação adaptativa na modelagem dos padrões evolutivos destas espécies. Adicionalmente, o foco destes estudos apenas se consistiu numa primeira fase de caracterização do estado da diversidade, o que se torna numa aproximação válida para definir certas bases que permitam a sua proteção, mas ainda com possibilidade de ser robustecida por novas abordagens que permitam a delimitação de Unidades de Conservação de uma maneira mais acurada para algumas destas espécies.

2.5.3 Orinoco

Atualmente são poucos os trabalhos científicos em peixes do Orinoco que envolvem ferramentas moleculares para o entendimento dos padrões de distribuição espacial, estado da diversidade e conservação: Turner et al. (2004), Moyer et al. (2005) e Collins et al. (2013). Os dois primeiros estudos foram focados ao entendimento dos padrões de diversificação de três espécies do gênero *Prochilodus*, baseados em análises filogenéticas de COI e um gene nuclear (Calmodulina), concluindo que a seleção, migração, dispersão e adaptação, são responsáveis pelos padrões de variação genética neste grupo, embora, sem contribuições substanciais que permitam definir a estrutura populacional de cada espécie, o modo de interação demográfica e comportamento dos padrões genéticos dentro da bacia ou suportes de base genética suficientemente acurados para sugerir que aquelas forças evolutivas os modelam. Ao mesmo tempo, sem nenhuma orientação à delimitação de unidades de conservação para contribuir ao manejo pesqueiro. Collins et al. (2013) elaboram o mais recente estudo de genética populacional em *Prochilodus mariae* utilizando marcadores microssatélites. Embora, o estudo foi apenas limitado ao delta do Orinoco para a caracterização da estrutura genética regional das populações, sendo evidenciado um estado de panmixia que sugeriu a existência de um único stock pesqueiro para aquela área. No entanto, não foi estimado o modo de interação demográfica com o resto do Orinoco, nem o modo em que esta população se encaixava dentro deste sistema fluvial, o que oferece informações pertinentes para a conservação das espécies e o entendimento da sua dinâmica populacional, mas ainda incompletas para tomadas de decisões que visem a sua proteção integral dentro do sistema Orinoco.

Apesar da existência atual de um trabalho governamental que delimita as áreas de priorização para a conservação de espécies de peixes no Orinoco (LASSO et al., 2010), estes tipos de trabalhos estão baseadas unicamente em dados ecológicos e não genéticos; o que diminui a abrangência das unidades de conservação, e exclui os processos evolutivos neutros e dinâmica demográfica, ao quais mantém os atuais padrões de distribuição da diversidade genética das populações, o que limita e coloca

em risco a efetividade das ações de proteção do recurso, como por exemplo as translocações e reintroduções; uma vez que fatores como o fluxo gênico e seus limites não são elucidados. Atualmente não existem estudos genético-populacionais publicados de nenhum tipo focados na conservação ou determinação da estrutura genética das populações envolvendo os peixes altamente explorados no Orinoco, sendo este a primeira abordagem que as envolve.

3 JUSTIFICATIVA

Os países que compartilham as bacias do Amazonas e Orinoco também compartilham seus peixes e seus recursos pesqueiros, embora, muitas vezes, as legislações que governam o uso destes recursos pesqueiros nos diferentes países sejam muito divergentes.

Neste sentido, não é claro se as espécies compartilhadas representam espécies biológicas (com intercâmbio da informação genética atual através da reprodução). Apesar de serem duas bacias diferentes, as duas não são completamente isoladas. A conexão mais óbvia é pelo canal do Casiquiare, mas também as áreas entre os afluentes dos rios Japurá e Uaupes (bacia Amazônica) e os dos rios Inírida e Guaviare (bacia do Orinoco) sofrem inundações no período de enchente e podem possibilitar o intercâmbio de fauna aquática entre as bacias.

A bacia Amazônica e a do Orinoco formam aparentemente unidades independentes de drenagem estruturalmente bem definidas, mas compartilhando espécies de peixes que se encontram sob jurisdição de vários países. Mesmo admitindo que cada um deles pode e deve implementar suas próprias políticas de acordo com suas particularidades e interesses, é evidente que deve haver uma pauta mínima para ações comuns, capazes de otimizar o uso e viabilizar a proteção dos recursos naturais transfronteiriços. Isso é particularmente válido para os peixes migradores, como os grandes siluriformes e alguns caraciformes que normalmente se deslocam entre o estuário e as nascentes dos Rios e seus principais afluentes. Torna-se evidente que os planos de manejo devem abranger toda sua área de distribuição e não apenas espaços delimitados politicamente, sobretudo estratégias protecionistas de estoques e áreas de endemismo (SANTOS; SANTOS, 2005). De fato, os princípios gerais contidos no código de conduta para a pesca responsável, editado pela FAO em 1995, já apontam exatamente nessa direção ao afirmar que “os estados e os usuários dos recursos aquáticos deveriam conservar os ecossistemas dos quais eles dependem. O direito de pescar traz consigo a obrigação de fazê-lo de forma responsável, a fim de assegurar a conservação e a gestão efetiva dos recursos aquáticos vivos”. Neste sentido, a determinação da estrutura populacional, os processos responsáveis pelos padrões atuais observados e a delimitação das Unidades de Conservação para as nossas espécies compartilhadas historicamente e/ou atualmente (entre e dentro das bacias), permitirá identificar populações ameaçadas, monitorar o grau de exploração e os limites espaciais destes estoques pesqueiros para a sua conservação e uso sustentável.

Assim, este estudo permitirá a formação de um banco de dados de conhecimento sobre os recursos pesqueiros divididos entre os países e bacias, com a finalidade de propor planos de manejo e conservação em comum. Os detalhes

específicos destes planos dependerão dos padrões observados e processos inferidos, da mesma maneira como os outros dados biológicos, mas sem este banco de dados de conhecimento não existem bases nem justificativas em se propor uma legislação “trans-fronteirística” para os recursos pesqueiros compartilhados.

4 HIPÓTESE (H₀)

1. Não existe estrutura genética e populacional das espécies entre e dentro das bacias, e, em caso de existir, será do tipo isolamento por distância seguindo os padrões da variação neutra.
2. Existe fluxo gênico recente entre as populações, sendo que este é estatisticamente igual entre e dentro das bacias.
3. Não existem deferências no padrão de fluxo gênico ou estrutura entre os grupos de peixes com histórias de vida contrárias (Migradores/sedentários) e tamanhos corporais opostos (Grandes/pequenos).
4. As bacias do Orinoco e Amazonas se comportam como uma única Unidade Evolutiva Significante (ESU), sem Unidades de Manejo (MUs) ou Unidades Adaptativas (AUs) diferenciadas em seu interior.

5 OBJETIVOS

5.1 Geral:

Avaliar a diversidade genética e sua distribuição espacial nas espécies *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma orinocoense* (*P. punctifer*), *P. metaense* (*P. tigrinum*), *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Paracheirodon axelrodi*, *Nannostomus unifasciatus* e *Pterophyllum altum*, as quais são compartilhadas entre as bacias do Amazonas e Orinoco, como base para o seu manejo pesqueiro e conservação.

5.2 Específicos:

1. Desenvolver uma metodologia simplificada de construção de bibliotecas genômicas para descoberta ou genotipagem *de novo* de SNPs com aplicações em genômica populacional ou filogenômica para a plataforma IonTorrent PGM.
2. Testar a existência de estrutura populacional das espécies migratórias *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma orinocoense* (*P. punctifer*), *P. metaense* (*P. tigrinum*), *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*, e as espécies sedentárias ornamentais *Paracheirodon axelrodi*, *Nannostomus unifasciatus* e *Pterophyllum altum* dentro e entre as bacias do Amazonas e Orinoco.
3. Testar a existência de conectividade atual e histórica entre bacias e seus possíveis locais de ocorrência nas espécies migratórias *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma punctifer* (*P. orinocoense*), *P. tigrinum* (*P. metaense*), *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*, e as espécies

sedentárias ornamentais *Paracheirodon axelrodi*, *Nannostomus unifasciatus* e *Pterophyllum altum*.

4. Verificar a existência de um padrão de conectividade associado exclusivamente a uma história de vida (migratória ou sedentária) ou a um tamanho corporal (grande ou pequeno) entre as bacias do Amazonas e Orinoco.
5. Delimitar a distribuição espacial da diversidade genética em termos de unidades de conservação: Unidades Evolutivas Significativas (ESUs – *Evolutionarily Significant Units*), Unidades de Manejo (MUs – *Management Units*) e Unidades Adaptativas (AUs – *Adaptive Units*) para cada espécie.

CAPÍTULO I

SIMPLIFICANDO A CONSTRUÇÃO DE LIVRARIAS GENÔMICAS PARA O SEQUENCIAMENTO DE SEGUNDA GERAÇÃO: UMA ADAPTAÇÃO DA GENOTIPAGEM BASEADA EM ddRADs PARA IONTORRENT PGM EM ESPÉCIES NÃO-MODELO.

RESUMO

Aqui apresentamos a caracterização de um método simplificado de ddRADs para genotipagem *de novo* de SNPs em IonTorrent PGM em só três passos. Este oferece digestão de ADN e ligação de adaptadores simultaneamente sem uso de sondas de hibridação para enriquecimentos. O método permite uma redução de até 80% do tempo de preparo e diminui consideravelmente os custos de produzir uma livraria. Peixes, primatas e crocodilianos encontram-se dentro dos taxa animais com maior pressão e ameaça antrópica nos ecossistemas Amazônicos, pelo que urge caracterizar as suas populações e definir as suas unidades de conservação através de abordagens robustas baseadas em marcadores genômicos (SNPs), inexistentes até hoje para estas espécies. Amostras de ADN genômico de quatro espécies de peixes, 17 espécies de primata, e uma espécie de crocodiliano, foram utilizadas como modelo para a aplicação do método em três experimentos de sequenciamento independentes. O ADN de cada indivíduo foi colocado de forma separada numa reação simultânea de digestão-ligação de adaptadores (com um único *barcode* por indivíduo e uma modificação nucleotídica para o não reconhecimento enzimático após a ligação com fragmentos de ADN alvos) durante 2 horas, reduzindo de 5 à 3 passos a metodologia de desenvolvimento das livrarias em relação ao método tradicional de ddRAD. As livrarias foram amplificadas, purificadas, quantificadas, misturadas equimolarmente, e levada para seleção de fragmentos de forma automatizada, de acordo ao sugerido pela simulação *in silico* (~ 300 - ~ 400 pb). Finalmente, esta foi submetida ao sequenciamento no IonTorrent. Obtiveram-se 9063, 9207 e 12758 loci de SNPs intraespecíficos para o grupo de peixes, primata e crocodiliano, respectivamente; tendo correlação com o número de loci esperado na simulação *in silico* ($r = 0.999$), mas diferenças entre esses valores ($\chi^2 = 2883.296$; d.f. = 2; $P < 0.05$), além de um baixo poder estatístico para as populações com maior número de indivíduos dentro da corrida ($F_{st} = 0.0390$ e 0.0404 , respectivamente para peixes e primatas), mas com um alto poder estatístico para a espécie com menos indivíduos dentro da corrida ($F_{st} = 0.1265$ para o crocodiliano). A cobertura final real média por loci foi de ~ 5x (peixes), ~ 8x (primatas) e ~ 6x (crocodiliano); apenas 14%, 17% e 23%, respectivamente, do esperado na simulação *in silico*. Embora, uma alta eficiência foi observada no número de leituras observados após do sequenciamento utilizando este método (96.85%, 90.4% e 94.24%, respectivamente para peixes, primatas e crocodiliano) respeito do empiricamente esperado para IonTorrent PGM. Apesar da falta de um modelo preditivo matematicamente mais robusto que utiliza genomas de referência para a determinação do número de loci a ser sequenciado, a utilização deste método como ferramenta biotecnológica para o desenvolvimento de livrarias genômicas fica comprovada, além da sua factibilidade na adaptação ddRADs para genotipagem *de novo* de SNPs em plataformas de baixa produção de leituras como IonTorrent para espécies não-modelo.

Palavras chave: Digestão-ligação enzimática, IonTorrent PGM, genômica populacional, SNPs.

6 INTRODUÇÃO

As novas tecnologias de sequenciamento de segunda geração para genotipagem de SNPs exigem a construção de livrarias com métodos mais simplificados, de baixo custo e com alta reprodutibilidade entre laboratórios, especialmente em plataformas de menor capacidade na produção de leituras.

Pelo seu alto rendimento, fácil transferibilidade entre laboratórios e baixo erro de genotipagem, os SNPs se tornam num marcador de evolução rápida de suficiente poder estatístico para filogenética (THOMSON et al., 2008), filogeografia (LEE; EDWARDS, 2008; ROSENBLUM; NOVEMBRE, 2007), genética populacional (CAMPBELL; NARUM, 2011), ecologia (THOMAS; KLAPER, 2004; UNGERER; JOHNSON; HERMAN, 2008) e principalmente para conservação (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; KOHN et al., 2006; PRIMMER, 2009).

Peixes, primatas e crocodilianos, encontram-se dentro das taxa animais com maior pressão e ameaça antrópica nos ecossistemas Amazônicos, sendo submetidos desde há décadas à caça ilegal e indiscriminada para consumo humano, ou superexploração quando a caça é permitida (BARTHEM; FABRÉ, 2004; CHAO, 2001; CHAPMAN, 1989; MARIONI; BOTERO-ARIAS; FONSECA-JUNIOR, 2013; MITTERMEIER, 1987; PERES, 1990). Portanto, urge caracterizar geneticamente às suas populações, observar o estado da sua diversidade e definir as suas unidades de conservação através de abordagens robustas que permitam acessar não só processos evolutivos relacionados com a variação neutra, mas também aqueles relacionados com a variação adaptativa, de grande importância atual na conservação de espécies (FUNK et al., 2012; LYNCH et al., 1999). Dentro das abordagens mais promissórias para fins de conservação, e que integram uma visão holística do genoma e todos os processos evolutivos envolvidos, encontram-se aquelas baseadas em marcadores genômicos (SNPs) (FUNK et al., 2012), inexistentes até hoje para estas espécies não-modelo (sem genoma sequenciado), gerando um grande vazio no conhecimento das populações naturais desses taxa.

Tem sido amplamente revisado que para organismos não-modelo as novas tecnologias de sequenciamento de segunda geração proporcionam acesso a grandes informações de sequências e SNPs (SEEB et al., 2011; TAUTZ; ELLEGREN; WEIGEL, 2010; TOONEN et al., 2013), sendo que para aqueles organismos sem um genoma de referência, passos de redução da complexidade do genoma são requeridos para a construção de suas livrarias genômicas e posterior “*assembly*” de *contigs* redundantes após o sequenciamento, aspectos fundamentais para a descoberta e genotipagem de SNPs (NIELSEN et al., 2011; SLATE et al., 2009). Embora tenha havido grandes avanços, os métodos atuais exigem processos de clonagem e complexas construções de livrarias (OLSEN et al., 2011), isolamentos, purificações e enriquecimentos (PETERSON et al., 2012; RODEN; DUTTON; MORIN, 2009; THOMSON et al., 2008), aumentando os tempos de obtenção e custo das livrarias para a descoberta e genotipagem de marcadores SNPs; obrigando a um refinamento dos métodos atuais para a sua simplificação.

Dentre os mecanismos para obtenção de bibliotecas genômicas para sequenciamento de segunda geração (NGS) pode se encontrar aqueles baseados em fragmentação mecânica através de métodos de sonicação (BAIRD et al., 2008; MILLER et al., 2007), cuja limitante se encontra na grande quantidade de passos para sua

construção e impossibilidade de prever e simular o número de fragmentos exatos a se gerar (ou loci), dada a aleatoriedade absoluta dos cortes, o que introduz incerteza no planejamento de *multiplex* de indivíduos quando se deseja genotipar. A predição matemática dos loci a serem gerados está estreitamente associada à cobertura final alélica por indivíduo, a qual é importante para garantir que todos os indivíduos estarão equitativamente representados por um mínimo de alelos por loci (homólogos), no preparo da livreria e após a corrida.

De forma contrária, os mecanismos enzimáticos permitem uma forma mais precisa que regiões homólogas estejam sendo avaliadas entre indivíduos do *multiplex*. Esse método permite prever probabilisticamente o número de sítios de corte da enzima e o número de fragmentos a se gerar por genoma/indivíduo através de simulações *in silico*. Recentemente, foi desenvolvido um método de fragmentação enzimático, chamado *Double digest Restriction Associated DNA (ddRAD) sequencing* (PETERSON et al., 2012) derivado de outros pré-existentes (BAIRD et al., 2008; BAXTER et al., 2011; HOHENLOHE et al., 2010; POLAND et al., 2012) para gerar livrerias genômicas para genotipagem *de novo* de SNP para descoberta e genotipagem em espécies não modelo.

Este mecanismo tem se tornado a base do desenvolvimento de bibliotecas genômicas para NGS, especificamente para a plataforma Illumina. Apesar da sua eficiência e acurácia na obtenção de livrerias para um ou mais indivíduos, ainda muitos passos como a digestão e ligação são extensos e independentes (> 5 horas por adaptador), e a presença de muitos passos de purificação e enriquecimentos utilizando sondas de hibridização que aumentam os custos, são necessários durante o desenvolvimento da livreria, fazendo com que a sua reprodutibilidade entre laboratórios que contam com pouca infraestrutura seja difícil ainda. Adicionalmente, pelo fato de ddRAD ter sido desenvolvida para plataformas com maior capacidade de produção de leituras como Illumina (~ 100 milhões de leituras), adaptações para plataformas com menor capacidade na produção de leituras (≤10 milhões) devem ser feitas e testadas para garantir a sua aplicabilidade.

Aqui se apresenta uma adaptação simplificada da metodologia ddRAD à plataformas de baixa produção de leituras como IonTorrent para genotipagem *de novo* em *multiplex* e descoberta de SNPs. Esta metodologia oferece um único passo simultâneo de digestão de ADN e ligação de adaptadores, isto por meio de modificações nucleotídicas nos adaptadores que impedem o reconhecimento dos sítios de corte enzimático após a primeira ligação ao ADN alvo. Além disso, contempla a eliminação de passos de enriquecimento por sondas de hibridização e longos métodos de recuperação de fragmentos, presentes no método ddRADs e outros relacionados. O projeto de corrida é planejado na base de um modelo de simulação matemática de tipo empírico para uma aproximação preditiva na determinação do número de fragmentos a serem obtidos segundo a faixa selecionada de corte (loci), tomando como base da simulação genomas de espécies próximas, a cobertura alélica desejada, sítios de reconhecimento de corte das enzimas selecionadas, capacidade do chip de sequenciamento e outros fatores.

Assim, neste estudo foi testado, caracterizado e descrito um método ddRAD simplificado de baixo custo para a produção de livrerias genômicas e a sua adaptação em plataformas de baixa produção como IonTorrent utilizando três taxa Amazônicas não-modelos.

7 MATERIAL E MÉTODOS

ADN genômico (ADNg) foi extraído de tecido muscular de três grupos de espécies para igual número de projetos de corrida no IonTorrent: 60 indivíduos de quatro espécies de peixe (15 de *Pseudoplatystoma punctifer*, 15 de *Pseudoplatystoma orinocoense*, 15 de *Pseudoplatystoma tigrinum*, 15 de *Pseudoplatystoma metaense*), 35 indivíduos de 17 espécies de primates (quatro indivíduos de *Cacajao hosomi*, cinco de *Cacajao ayresi*, oito de *Cacajao melanocephalus*, cinco de *Pithecia* spp., quatro de *Chiropotes* spp. e nove de *Callicebus* spp.) e finalmente de 20 indivíduos de uma espécie de jacaré *Melanosuchus niger* via extração com fenol (SAMBROOK; RUSELL, 2001). A qualidade do ADNg foi testada por eletroforese de 3 µl extraídos da amostra misturada com Gel Red™ em gel de agarose 1%. A concentração aproximada de ADNg das amostras foram quantificadas por espectrofotometria (Nanodrop 2000, Thermo Scientific, USA). Posteriormente, procedeu-se ao preparo das bibliotecas genômicas partindo da essência do protocolo para ddRAD-seqs de Peterson et al. (2012) com várias modificações, as quais permitiram a simplificação e adaptação do mesmo para IonTorrent.

Para tanto, foram sintetizados adaptadores específicos para o sequenciamento das livrarias em IonTorrent, para o qual existem adaptadores P1 e A. Os adaptadores A foram construídos com *barcodes* (*Molecular IDs - MIDs*) de 10 pares de bases (60 adaptadores A no total com igual número de barcodes) e uma estrutura de cauda “Y” divergente (DAVEY; BLAXTER, 2010) (Apêndice 1A). IonTorrent usa somente adaptadores P1 para o sequenciamento de modo que não existe forma direta de realizar sequenciamento *pair-ended*. O adaptador P1 possui uma ponta adesiva TGCA que é compatível com as pontas adesivas geradas pela digestão da enzima SdaI no ADN genômico, enquanto que o adaptador A tem uma ponta adesiva TA que é compatível com as pontas adesivas geradas pela digestão da enzima Csp6I no ADN genômico alvo (Figura 6).

Deste modo, foi realizada simultaneamente uma digestão de ADN e ligação de adaptadores. Para tanto, de forma independente, 200 ng de ADNg de cada indivíduo foram colocados em tubos de 250 µL junto com 0,1 µl (1 U) da enzima SdaI (5'-CCTGCA[^]GG-3'), 0,1 µl (1 U) da enzima Csp6I (5'-G[^]TAC-3'), 0,5 µl (5 U) de T4 ADN-ligase, 5 µl de 10x Buffer Tango, 0,5 µl de ATP (5mmol), 2 µl do adaptador A (~ 5 µM) com estrutura divergente “Y” contendo um único *barcode* por indivíduo, e 2 µl do adaptador P1 (~ 0,09 µM) e foi adicionada ddH₂O para completar um volume de reação total de 50 µl. Finalmente, a mistura foi incubada a 37 °C em termociclador Veritti® Applied Biosystems® por duas horas, 68 °C por 15 minutos para desativação das enzimas e finalmente 4 °C. Os detalhes do princípio para garantir uma digestão-ligação completa em forma simultânea, podem ser observados na Figura 6.

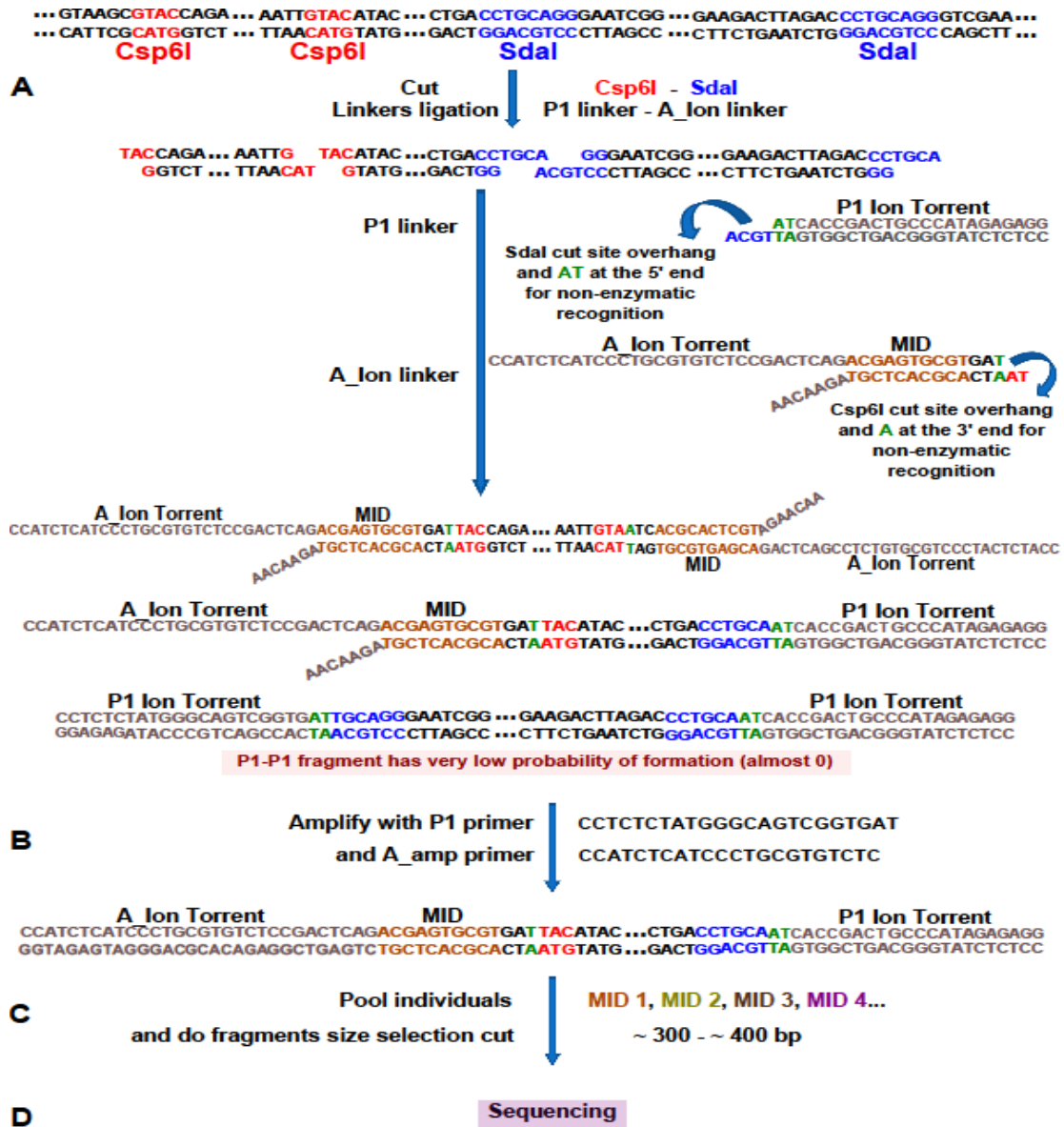


Figura 6. O processo de simplificação de construção de livrarias para o sequenciamento em IonTorrent PGM. **(A)** O ADN genômico é cortado com enzimas de restrição (Csp6I e SdaI neste exemplo) e os adaptadores “P1” e “A” são ligados simultaneamente aos fragmentos cortados por SdaI- e Csp6I. O adaptador “P1” e “A” são próprios da plataforma IonTorrent PGM. O adaptador “P1” tem uma ponta cohesiva TGCA-3' compatível com o corte de SdaI, mas devido à presença de AT no extremo 5' da ponta cohesiva do adaptador, uma vez ligado, o novo constructo fragmento/adaptador possuirá uma sequência CCTGCAAT a qual já não será reconhecida pela enzima SdaI. O adaptador “A” tem um identificador molecular (MID; ACGAGTGCGT neste exemplo), e uma uma ponta cohesiva AT-5' compatível com o corte Csp6I, mas devido à presença de A no extremo 3' da ponta cohesiva do adaptador, uma vez ligado, o novo constructo fragmento/adaptador possuirá uma sequência TTAC a qual já não será reconhecida pela enzima Csp6I. Teoricamente as frequências dos fragmentos A-A, A-P1 e P1-P1 são 253, 2 and 1, respectivamente. O adaptador “A” tem uma cauda divergente. **(B)** A amplificação por PCR com os primers P1 e A_amp. O adaptador “A” somente será completado nos fragmentos que estão ligados com o adaptador P1, e portanto, **(C)** somente aqueles fragmentos (A-P1) serão completamente amplificados. **(D)** Amostras de múltiplos indivíduos são equimolarmente juntados e então os fragments são selecionados. **(F)** A livreria pode portanto der sequenciada no IonTorrent PGM.

No final da digestão, a formação de fragmentos será do tipo A-A, P1-P1, e P1-A; sendo estes últimos os do nosso interesse para sequenciamento. Para a seleção de ditos fragmentos, foi realizada uma PCR de enriquecimento de alta fidelidade de 25 µL totais após a digestão/ligação (5 réplicas por indivíduo). As condições de amplificação incluíram 12,4 µl ddH₂O, 2,5 µl (NH₄)₂SO₄ 10x buffer (Fermentas), 2 µl MgCl₂ (25 mM) (Fermentas), 2 µl dNTPs (10 mM), 2,5 µl *primer* P1 (2 µM), 2,5 µl *primer* A_amp (2 µM), 0,1 µl Taq (0,5 U) (Klentaq, ADN Polymerase Technology) e 1 µl da livraria genômica sem diluir. Os parâmetros de ciclagem incluíram um ciclo de *preheating* de 94 °C por 60 segundos, 18 ciclos de amplificação de 94 °C por 10 segundos, 55 °C por 35 segundos e uma extensão 68 °C por 90 segundos. Por último, um ciclo de 4 °C infinito. O objetivo dos 18 ciclos foi diminuir a variância na representatividade de alelos gerada pelo viés de amplificação em uma reação por causa da saturação. Os *primers* de amplificação podem ser consultados no Apêndice 1B.

A formação de fragmentos do tipo P1-P1 é irrisória, devido à baixa frequência do corte da enzima SdaI (1 a cada 65536 pares de bases), e portanto uma probabilidade muito baixa que este permaneça intacto e que não ocorra um corte no meio pela enzima de alta frequência Csp6I (1 a cada 256 pares de bases) que gere então fragmentos do tipo P1-A. Por outro lado, após a PCR, a amplificação de fragmentos do tipo A-A não é possível, devido à presença de cauda “Y”, a qual carece de região de anelamento compatível com o *primer* A_amp (próprio do adaptador A), precisando da formação de um *template* no primeiro ciclo de PCR (só gerado a partir do anelamento do *primer* P1_amp na fita molde de um adaptador P1) para gerar *amplicons* nos ciclos seguintes (DAVEY; BLAXTER, 2010) (Figura 6).

O volume total das cinco réplicas para cada indivíduo foi juntado e posteriormente purificado por coluna (Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit, GE Healthcare Life Sciences, USA). Uma vez purificada, cada biblioteca por indivíduo foi quantificada através de fluorometria (Qubit® 2.0 Fluorometer, Life Science, USA) seguindo as instruções do fabricante. Posteriormente, as bibliotecas individuais foram misturadas equimolarmente (200 ng por indivíduo) e levadas para seleção da faixa de tamanho dos fragmentos a serem sequenciados por corte automatizado (Pippin Prep, Sage Science, USA) seguindo as instruções do fabricante.

Para a escolha da faixa de tamanhos dos fragmentos a serem selecionados para o sequenciamento, foi realizada uma simulação de corte enzimático de genomas de taxa filogeneticamente próximos via programação de algoritmo em linguagem Python. Nesta simulação em Python foram obtidos inicialmente o número de fragmentos (alelos/loci) após o corte simultâneo das enzimas Csp6I e SdaI em genomas já sequenciados (publicados) filogeneticamente próximos dos nossos taxa (*Brachydanio rerio*, *Saimiri boliviensis* e *Alligator mississippiensis*, respectivamente para peixes, primatas e crocodilianos) seguindo as recomendações estabelecidas no método ddRADs (PETERSON et al., 2012) (Tabela 2). Uma vez gerada esta informação, a mesma foi tomada como base pelo mesmo algoritmo para determinar a distribuição hierárquica dos tamanhos dos fragmentos gerados após do corte enzimático simulado. A simulação permitiu escolher por tentativa (após vários testes em cadeia) um intervalo de corte tal que os fragmentos estivessem numa faixa entre ~ 300 pb - ~ 400 pb (para manter o maior aproveitamento do chip), e que ao mesmo tempo esta faixa possuísse alelos ou loci (NL) suficientes para permitir cumprir com o critério de cobertura por loci (LC) maior do que 20x em cada indivíduo do total multiplexado (NI), considerando uma

produção empírica de leituras por chip de ~ 4,8 milhões (RP). Este exercício matemático de ajuste foi executado através da equação $LC = RP/(NI \cdot NL)$, onde LC se tornou a variável dependente $f(x)$, enquanto que NL foi a variável independente x , a qual tomou vários valores (provenientes da simulação) até obter por ajuste o máximo de LC. Uma vez que a simulação foi feita e a melhor faixa de corte determinada, procedeu-se à sua seleção por corte automatizado desde a biblioteca genômica no Pippin Prep (Sage Science, USA), seguido do sequenciamento no IonTorrent PGM (Life Technologies) utilizando o kit 400 bp no chip 318 Ion PGM. Em ambos os casos, seguindo as recomendações do fabricante.

Uma vez feitas as três corridas de sequenciamento de forma independente para cada grupo animal, os dados de leituras foram analisados no programa *pipeline STACKS* 1.2 (CATCHEN et al., 2011) para genotipagem *de novo* (sem genoma de referência) de SNPs com fins genômico-populacionais. Para tanto, foram corridos os componentes *Row reads* (Process_radtags) e *Execution control* (de novo_map.pl, o qual executa em cascata os programas Ustacks, pstacks, cstacks, sstacks e population). Os dados obtidos do componente *Row reads* (Process_radtags) foram a base para a obtenção de cálculos para a caracterização do método. Assim, foi determinado o número médio de leituras observadas por indivíduo após o sequenciamento, número médio de leituras observadas por indivíduo na faixa de corte após o sequenciamento, e número médio de leituras observadas por indivíduo na faixa de corte após o sequenciamento e filtro de qualidade.

No caso do número de loci intraespecíficos observados e esperados, foram obtidos, respectivamente, através da plataforma MySQL do *Pipeline STACKS* (produto da análise do software de novo_map.pl) e a partir da simulação elaborada pelo nosso algoritmo de programação em Python. Finalmente, para a determinação de evidência do poder estatístico dos SNPs na detecção da diferenciação genética intraespecífica (Fst), foram utilizadas as análises elaboradas pelo software Population.pl do *Pipeline STACKS*.

Para a determinação do número de loci e Fst intraespecíficos observados, procedeu-se da seguinte maneira para cada grupo animal analisado.

Peixes: foram tomados como modelo duas populações (alto e baixo Orinoco) de uma única espécie (*Pseudoplatystoma metaense*) devido à sua ampla distribuição no Orinoco e ausência de evidência de variação adaptativa por ambientes heterogêneos dentro da bacia que podem afetar bruscamente as métricas.

Primatas: Foram tomados como modelo duas populações (leste e oeste da sua distribuição numa área próxima ao Rio Negro) de *Cacajao melanocephalus*, devido ao seu número elevado de indivíduos dentro da corrida, garantindo frequências alélicas e, portanto o cálculo do Fst.

Crocodiliano: no caso da espécie do crocodiliano *Melanosuchus niger*, foram selecionados indivíduos de duas populações com ambientes aquáticos homogêneos sobre o Rio Solimões com o objetivo de não afetar bruscamente as métricas de Fst por efeito de loci adaptativos.

Finalmente, para determinar a existência de relação do processo *in vitro* (número de loci intraespecíficos observados) com modelações por simulação *in silico* da digestão (número de loci esperados), foi realizado um teste de correlação de Pearson e um teste de Chi-quadrado no software MINITAB (Minitab 17, Inc., USA), com significância de 5% e confiança de 95%, considerando as três corridas de sequenciamento.

8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

IonTorrent PGM é uma plataforma geralmente usada para sequenciamento e montagem de genomas (QUAIL et al., 2012), descoberta de SNPs com genomas de referência (STOLLE; MORITZ, 2013) e descoberta de loci de microssatélite (COSER et al., 2014), sendo que pouca informação existe em relação ao seu uso para genotipagem *de novo* de SNPs em espécies não-modelo, principalmente pela sua baixa produção de leituras (~5 milhões) quando comparado com outras plataformas como Illumina (~100 milhões). Deste modo, nosso trabalho se constitui em uma das primeiras tentativas para a demonstração do seu uso com fins genômico-populacionais em plataformas de baixa produção de leituras.

Aqui se avaliou um método para a simplificação e adaptação da metodologia ddRADseqs no desenvolvimento de bibliotecas genômicas e genotipagem *de novo* de SNPs em espécies não-modelo para a plataforma IonTorrent PGM. O melhoramento do método incluiu a digestão de ADN e ligação de adaptadores num mesmo passo, e a ausência de enriquecimentos com sondas de hibridização. Foram utilizados três grupos taxonômicos como modelo: crocodilianos, primatas e peixes em três corridas independentes. Após do sequenciamento foi determinado um número de loci intraespecíficos para as populações de peixes, primatas e crocodiliano de 9063, 9207 e 12758, respectivamente; representando um número significativamente alto para a determinação de estrutura (COATES et al., 2009; KALINOWSKI, 2002; MORIN; MARTIEN; TAYLOR, 2009), mas com um baixo poder estatístico para as populações com maior número de indivíduos dentro da corrida ($F_{st} = 0.0390, 0.0404$, respectivamente para peixes e primatas, com 60 e 35 indivíduos), mas com um alto poder estatístico para a espécie com menos indivíduos dentro da corrida ($F_{st} = 0.1265$ para o crocodiliano, com 20 indivíduos). O limite inferior para o alelo de menor frequência durante o cálculo dos F_{st} foi 0.01. Este baixo poder estatístico achado pode-se dever à dois fatores: um comportamento natural das espécies ou realmente um sobrecarregamento de indivíduos por cada corrida que gerou um a diminuição na cobertura alélica.

A cobertura alélica joga um papel importante na hora de decidir quantos indivíduos podem ser multiplexados numa mesma corrida, o qual dependerá da capacidade de produção de leituras do sequenciador e o número de loci na janela de seleção de tamanho dos fragmentos a serem sequenciados, o qual por sua vez deriva do conhecimento correto do genoma a ser sequenciado e o seu tamanho (PETERSON et al., 2012). Neste último aspecto, no presente trabalho, após varias simulações de corte com genomas de referência que permitissem a maximização do número de indivíduos por corrida com um máximo de leituras por loci, foi calculada uma cobertura de 36x, 45x e 26x por loci (respectivamente para 60 peixes, 35 primatas e 20 crocodilianos por corrida de sequenciamento), utilizando genomas de referência de espécies próximas (*Brachydanio rerio*, *Saimiri boliviensis*, *Alligator mississippiensis*, respectivamente). Deste modo, as janelas de seleção de fragmentos brutos (sem adaptadores) foram determinadas em 260 – 340 bp (60 peixes), 280 – 380 bp (35 primatas) e 304 – 386 bp (20 crocodilianos) (Tabela 2). Apesar disso, os efeitos da saturação de indivíduos numa mesma corrida de sequenciamento foram evidentes, pois foi observada uma cobertura final real média por loci de ~ 5x (peixes), ~ 8x (primatas) e

~ 6x (crocodilianos), apenas 14%, 17% e 23%, respectivamente, do esperado na simulação *in silico*.

O anterior pode ter uma relação com as grandes discordâncias achadas entre o número de loci esperados e o número de loci observados. Neste trabalho foi demonstrada a existência de uma grande relação positiva entre o número de loci observados com aqueles esperados na simulação *in silico* para cada espécie de referência (Tabela 2), apesar disso, foram achadas diferenças estatísticas entre os valores esperados e observados ($\chi^2 = 2883.296$; d.f. = 2; $P < 0,05$), onde as diferenças conseguiram atingir 413% (peixes), 278% (primatas) e 39% (crocodilianos) de loci observados a mais, com relação aos esperados na simulação. Provavelmente isto aconteça pela entrada de novos loci produto da contaminação durante o processo de corte dos fragmentos no Pippin Prep. Assim, um aumento desta quantidade de fragmentos também aumenta o número de loci, levando, portanto, a uma diminuição da cobertura final por loci.

É importante destacar que nenhum genoma de referência existente atualmente (Tabela 2), utilizando o nosso algoritmo de simulação *in silico*, conseguiu prever com acurácia o número de fragmentos e loci que poderiam ser achados para as espécies não-modelo utilizadas dentro deste trabalho, sugerindo mais uma vez que um excesso de loci após o corte da biblioteca podem estar causando um desvio dos loci observados com respeito ao esperado na simulação *in silico*. Deste modo, cabe salientar que existe ainda a necessidade de ajustar os algoritmos para cada caso particular levando em conta fatores como o excesso de fragmentos por artefatos da técnica e qualidade. Apesar disso, os valores de cobertura estiveram dentro do sugerido para genotipagem confiável (5 – 20x) utilizando sequenciamento de segunda geração (NIELSEN et al., 2011).

Por outro lado, uma das principais limitações dos protocolos de desenvolvimento de bibliotecas genômicas é o excessivo tempo e passos de manipulação do ADN, onde este podem perder qualidade, além dos custos que isto implica no uso de equipamentos e material. É por isso que a tendência na construção de bibliotecas genômicas é a redução do número de passos dentro do processo (PURITZ et al., 2014). Protocolos de desenvolvimento de bibliotecas genômicas como mbRAD (BAIRD et al., 2008; MILLER et al., 2007), ddRAD (PETERSON et al., 2012), ezRAD (TOONEN et al., 2013) e 2bRAD (WANG; NIELSEN, 2012), apresentam entre quatro e seis passos independentes (onde a digestão e ligação sempre são passos separados), todos eles adaptados para plataformas diferentes de IonTorrent PGM.

Apesar de que Stolle e Moritz (2013) propõem pela primeira vez uma metodologia para descoberta de SNPs para genômica populacional em plataformas de baixa produção de leituras como IonTorrent ou 454 (*restriction fragment sequencing*, RESTseq), esta, como todas as outras metodologias para desenvolvimento de bibliotecas baseadas em RADs, investem aproximadamente 10 horas só na digestão e ligação de adaptadores, por exemplo, 5 horas para cada um dos adaptadores.

No presente trabalho, foi demonstrada a viabilidade técnica de realizar o desenvolvimento das bibliotecas genômicas pela primeira vez para genotipagem *de novo* de SNPs em sequenciador IonTorrent para espécies não modelo; tudo isso em só três passos (digestão/ligação, enriquecimento e sequenciamento). O processo de digestão e ligação dos dois adaptadores se dá simultaneamente, levando um tempo total de apenas 2 horas, uma diminuição de 80% do tempo gasto por outros métodos. A

presença de adaptadores não autoligáveis e a mudança de uma base nucleotídica nestes, a qual muda o sítio de reconhecimento da enzima para impedir um novo corte depois de ligado às moléculas de ADN alvo, são os principais aportes deste trabalho; além de demonstrar que é possível, apesar das modificações, conservar a compatibilidade do método com a estrutura de sequenciamento na plataforma IonTorrent PGM. Apesar de algumas imprecisões preditivas desde o ponto de vista genômico, o método de construção de livrarias genômicas como ferramenta biotecnológica desenvolvido no presente estudo, mostrou ter uma eficiência e compatibilidade considerável no processo de sequenciamento na plataforma IonTorrent PGM, pois o número médio de leituras observadas por indivíduo após o sequenciamento, com respeito aquelas esperadas empiricamente para este sequenciador (ver Tabela 2), representou o 96,85%, 90,4% e 94,24%, respectivamente para peixes, primatas e crocodiliano.

Assim, estes resultados mostram pela primeira vez a factibilidade da adaptação do método ddRADs para genotipagem *de novo de* SNPs em plataformas de baixa produção de leituras como IonTorrent e suas aplicações exitosas na busca de ferramentas genômicas para a conservação de espécies não modelos.

Table 2. Análise comparativa entre a recuperação de loci por simulação *in silico* e por sequenciamento *in vitro* para IonTorrent PGM

Taxa	Genome size (MB)†	Empiric number of expected reads per individual after sequencing‡	Width of library fragments cut range (bp)‡	Expected number of fragments in cut range	Number of expected loci in out range	Expected coverage per loci (x)	Mean number of observed reads per individual after sequencing	Mean number of observed reads per individual in cut range after sequencing	Mean number of observed reads per individual in cut range after quality filtering	Number of observed loci in cut range	Observed mean coverage per loci	Pearson correlation index (r) between expected and observed loci	X ² test between expected and observed loci	
Fishes	<i>Pseudoplatystoma metaense</i>	-	80000	260 - 340	4351	2175	36x	77485	51411	49409	9063	5x	0.997	P = 0.000
	<i>Brachydanio rerio</i>	2769.14	80000	260 - 340	4351	2175	36x							
	<i>Poecilia reticulata</i>	1428.28	80000	260 - 340	3376	1688	47x							
	<i>Oryzias latipes</i>	2239.11	80000	260 - 340	3883	1941	41x							
	<i>Oreochromis niloticus</i>	1576.63	80000	260 - 340	4687	2343	34x							
	<i>Maylandia zebra</i>	849.60	80000	260 - 340	4034	2017	39x							
	<i>Cynoglossus semilaevis</i>	915.17	80000	260 - 340	2896	1448	55x							
	<i>Takifugu rubripes</i>	673.03	80000	260 - 340	2748	1374	58x							
	<i>Gadus morhua</i>	792.87	80000	260 - 340	1943	971	82x							
	<i>Sebastes rubrivinctus</i>	736.89	80000	260 - 340	3937	1968	40x							
	<i>Stegastes partitus</i>	800.44	80000	260 - 340	4531	2265	35x							
<i>Astyanax mexicanus</i>	1191.24	80000	260 - 340	3546	1773	45x								
Primates	<i>Cacajao melanocephalus</i>	-	137142	280 - 380	6051	3025	45x	124099	78098	73241	9207	8x		
	<i>Saimiri boliviensis</i>	2605.18	137142	280 - 380	6051	3025	45x							
	<i>Callithrix jacchus</i>	2860.59	137142	280 - 380	4110	2055	66x							
	<i>Homo sapiens</i>	3209.29	137142	280 - 380	4615	2307	59x							
Crocodilians	<i>Melanosuchus niger</i>	-	240000	304 - 386	18110	9055	26x	226180	127441	74134	12758	6x		
	<i>Alligator m. mississippiensis</i>	2174.26	240000	304 - 386	18110	9055	26x							
	<i>Alligator sinensis</i>	2270.57	240000	304 - 386	18581	9290	25x							

Notas: Dados da simulação *in silico* para a predição da amplitude da faixa de corte dos fragmentos em três livrarias (peixes, primatas e crocodilianos) e o número de loci contidos nelas, utilizando genomas de taxas filogeneticamente próximos com genomas sequenciados e reportados em bases públicas do GenBank. Em **negrito** se encontram os nomes das espécies não-modelo selecionadas para serem utilizadas como exemplo nos cálculos para o sequenciamento genômico. Em underline se encontram as espécies filogeneticamente mais próximas às não modelo, cujos genomas foram utilizados como referência na simulação *in silico* para sua aplicação na otimização da faixa de corte mais adequada para o sequenciamento das espécies não modelo. † As informações foram consultadas em bases de dados públicas do GenBank, tomando como referência cromossomos ou genomas completos, segundo a forma de disponibilização dos dados. ‡ 318 Ion PGM chip possui uma capacidade teórica máxima de 5 milhões de leituras, do qual, considerando alguns erros após o sequenciamento, pode atingir empiricamente 4,8 milhões de leituras por chip em circunstâncias conservadoras para cada corrida. Neste caso, os dados de leitura são calculados por indivíduo, considerando o número presente na corrida por chip (60, 35 e 20 indivíduos para cada corrida, respectivamente para peixes, primatas e crocodilianos). * A amplitude da faixa de corte dos fragmentos da livraria se ajusta aos critérios de maximização do número de indivíduos por corrida (NI), número de loci esperados na faixa de corte (NL), cobertura esperada por loci (LC) e capacidade de produção de leituras pelo chip de sequenciamento 318 IonTorrent PGM (RP); todos relacionados na equação $NI = RP/(LC*NL)$. As coberturas foram selecionadas tendo como limite inferior um valor conservador empírico de 20x, o qual garantiria um mínimo de loci por indivíduos após a corrida de sequenciamento. A faixa de corte não inclui os adaptadores.

CAPITULO II

**APLICAÇÕES DO NOVO MÉTODO SIMPLIFICADO DE ddRADs PARA
A DESCOBERTA DE SNPs EM ESPÉCIES DE PEIXE NÃO MODELO:
ESTUDO DE CASO PARA DOURADA *Brachyplatystoma rousseauxii* e
O TAMBAQUÍ *Colossoma macropomum***

RESUMO

Neste estudo, foi gerado pela primeira vez um grande número de loci de SNPs candidatos para os peixes não modelo e altamente explorados, dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) e tambaqui (*Colossoma macropomum*), usando sequenciamento de segunda geração. Para tanto, foi usado um novo método para a construção de livrarias genômicas. Primeiro, foi criada uma livraria representativa reduzida por digestão do ADN genômico de 30 indivíduos por cada espécie (15 do Orinoco e 15 do Amazonas) usando as enzimas de restrição SdaI e Csp6I, ligando simultaneamente adaptadores com Identificadores Moleculares (MIDs), e posteriormente juntando os fragmentos entre ~ 300 – 400 pares de bases previamente enriquecidos. Não foram usadas sondas de hibridização. Posteriormente, o pool de fragmentos foi sequenciado usando o IonTorrent PGM. Finalmente, as leituras de sequencias foram analisadas usando o software Stacks. Foram detectados 18772 *tags* com 6170 sítios polimórficos para *B. rousseauxii*, e 22476 *tags* com 7181 sítios polimórficos em *C. macropomum*. Para *B. rousseauxii*, daqueles *tags*, 398 loci (849 SNPs) ocorreram em pelo menos 90% dos indivíduos em pelo menos uma das bacias, sendo que 70 loci (92 SNPs) foram recuperados para ambas as bacias, dos quais 23 mostraram a uma região flanqueadora > 80 pares de bases, e então foram úteis para o desenho de *primers*. Em relação a *C. macropomum*, dos 22476 *tags*, apenas 601 loci (1530 SNPs) foram compartilhados no mínimo entre 75% dos indivíduos pelo menos em uma das bacias, e 177 loci (268 SNPs) recuperados para ambas as bacias, dos quais 39 SNPs putativos mostraram uma região flanqueadora > 80 pares de bases para o desenho de *primers*. Finalmente, é possível concluir que o uso deste novo método de construção de livrarias genômicas para a plataforma tecnológica IonTorrent PGM, junto com ferramentas bioinformáticas apropriadas, podem fornecer um método rápido e de baixo custo para a identificação de SNPs em espécies não-modelo. Estes marcadores constituem uma importante ferramenta molecular para aquicultura, conservação, genômica populacional e monitoramento destas espécies.

Palavras chave: SNPs; Dourada; Tambaqui, IonTorrent PGM; Genômica da conservação

O peixe Neotropical dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) (Castelnau, 1855), é um dos maiores peixes da América do Sul e é considerada a espécie de bagre comercialmente mais importante da bacia Amazônica nas pescarias (BARTHEM; FABRÉ, 2004). Por sua vez, o tambaqui (*Colossoma macropomum*) (Cuvier, 1818), é o maior caracádeo de América do Sul, e o segundo maior peixe Neotropical, atingindo até um metro comprimento total e 30 kg de peso (GOULDING; CARVALHO, 1982). Ambas as espécies são também consideradas entre as de maior potencial e uso atual para aquicultura em grande escala. Ditas espécies estão amplamente distribuídas ao longo dos canais principais e tributários de água branca das bacias do Amazonas e Orinoco com raros registros de ocorrência em tributários de água clara (ARAUJO-LIMA; RUFFINO, 2003; ARAUJO-LIMA; GOULDING, 1997; BARTHEM; GOULDING, 1997; GOULDING, 1980; ISAAC; RUFFINO, 1996). Ambas as espécies são altamente exploradas, mas no caso do tambaqui, a pressão tem tido consequências graves para a espécie, se tornando essa uma das dez espécies mais capturadas no Amazonas (Ruffino e Isaac 1994), levando a uma diminuição do tamanho de captura em um século (de 60 para 45 cm) e uma redução dos desembarques comerciais, especialmente na Amazônia central, onde sua contribuição era de 40% no final da década de 70, chegando a incríveis 2,8% na década passada (RUFFINO et al., 2005; SÁNCHEZ-BOTERO; GARCEZ; CHAVES CORTEZÃO, 2006).

A União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) categorizou a espécie *B. rousseauxii* como *Least Concern* (preocupação menor). No entanto, a mesma instituição também alerta que a espécie deve ser monitorada devido a sua alta pressão de pesca, e em consequência, levar a uma possível ameaça futura (REIS; LIMA, 2009). Para o tambaqui, IUCN não possui informação em relação ao estado de risco, embora, a Lista Vermelha de Peixes de Água Doce da Colômbia (válida para Venezuela), categorizou o tambaqui como uma espécie *Near Threatened* (quase ameaçada) devido à sobrepesca e destruição do bosque chuvoso na Amazônia e Orinoco (MOJICA, 2012).

Existem apenas poucos estudos moleculares sobre *B. rousseauxii* e *C. macropomum* que estejam direcionados à conservação e que tenham sido publicados até hoje (BATISTA; ALVES-GOMES, 2006; BATISTA et al., 2009; CARVAJAL-VALLEJOS et al., 2014; FARIAS et al., 2010; HAMOY; SANTOS, 2012; SANTOS; RUFFINO; FARIAS, 2007; SANTOS; HRBEK; FARIAS, 2009); bem como poucas informações das populações de ambas as espécies para a bacia do Orinoco. SNPs específicos para as espécies ou outros marcadores genômicos não têm sido reportados para a dourada ou tambaqui.

Devido à sua alta frequência no genoma, fácil transferabilidade entre laboratórios e baixa taxa de erros de genotipagem, os SNPs têm se tornado os marcadores de preferência para estudos em genômica da conservação (ALLENDORF; HOHENLOHE; LUIKART, 2010; KOHN et al., 2006; PRIMMER, 2009). Para peixes, os SNPs têm mostrado, comparados com outros marcadores, um alto poder de resolução para detectar limites populacionais e interespecíficos, inclusive quando a divergência é recente (WAGNER et al., 2013).

As tecnologias de sequenciamento de segunda geração, as quais são capazes de gerar milhões de leituras de sequências a baixo custo, permitem uma fácil descoberta e identificação de grandes quantidades de SNPs candidatos para espécies não modelo, para as quais não existe informação genômica (SEEB et al., 2011; TAUTZ;

ELLEGREN; WEIGEL, 2010; TOONEN et al., 2013), como no caso de dourada e tambaqui.

Portanto, é imperante determinar SNPs putativos de *B. rousseauxii* e *C. macropomum* como ferramenta para o seu uso em estudos focados à proteção das espécies.

Nesse estudo, foram desenvolvidos e identificados loci putativos de SNPs para *B. rousseauxii* e *C. macropomum* usando IonTorrent PGM e programas bioinformáticos. Usando o protocolo padrão de extração de ADN: fenol-clorofórmio (SAMBROOK; FRITSCH; MANIATIS, 1989), foi extraído ADN genômico de tecido muscular de 30 indivíduos por espécie, e que representaram grande parte da distribuição geográfica conhecida para as mesmas (15 do Orinoco: Ciudad Guayana, Puerto Carreño, Puerto López, San José del Guaviare e Puerto Inírida; e 15 do Amazonas: La Pedrera, Tefé, Manaus e Boa Vista), e portanto assegurando que toda a variação genômica potencial fosse amostrada (BRADBURY et al., 2011). Antes do sequenciamento foi gerada uma livraria de representação reduzida. Primeiro, foram digeridos 200 ng de ADN de cada indivíduo com as enzimas de restrição SdaI e Csp6I (Thermo Scientific) e ligados simultaneamente aos adaptadores, os quais incluíam o adaptador P do IonTorrent (ponta adesiva compatível com restrições geradas com SdaI) e o adaptador A com identificador molecular de 10 pares de base - MID (com ponta adesiva compatível com restrições geradas por Csp6I, e uma estrutura divergente “Y” que permite que somente fragmentos do tipo P-A possam ser amplificados durante passos subsequentes de PCR) (DAVEY; BLAXTER, 2010). A reação de restrição/ligação foi realizada durante 2 horas a 37 °C. Para garantir simultaneamente a digestão completa e ligação eficiente de adaptadores, os adaptadores A e P foram desenhados de tal maneira que, após da ligação ao fragmento de ADN alvo, os sítios de restrição não foram mais reconhecidos pelas enzimas de corte (para mais detalhes ver o Capítulo I desta Tese). Este novo método requer só três passos e reduz o tempo de desenvolvimento da livraria genômica para uma quinta parte do tempo convencional requerido pelos métodos atuais como Peterson et al. (2012) ou Stolle e Moritz (2013).

A digestão foi amplificada via PCR de alta fidelidade para o seu enriquecimento (obtenção de fragmentos do tipo A-P, descartando fragmentos do tipo P-P ou A-A), verificada em gel de agarose 1%, purificada por coluna usando Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification kit (GE Healthcare Life Sciences™), e posteriormente quantificando por fluorometria em Qubit® 2.0 (Life Technologies™).

As amostras foram juntadas em concentrações equimolares (200 ng) e a fração de fragmentos entre 300 e 400 pares de bases foi coletado utilizando Pippin Prep (Sage Science, Inc.). Posteriormente, a amplificação clonal foi realizada com o kit de reação Ion PGM OT2 400 (Life Technologies™), e o sequenciamento foi realizado com kit de reação Ion PGM Sequencing 400 no chip 318 Ion PGM (Life Technologies™).

Foram obtidas 3145592 e 3210716 sequências de alta qualidade com uma média de tamanho de leitura de 268 e 276 pares de bases, respectivamente para *B. rousseauxii* e *C. macropomum*. Os dados de leituras foram importados no software Geneious 7.0.6 (KEARSE et al., 2012) e removidos todos os fragmentos < 100 pares de bases, os quais são pouco úteis para uso na descoberta de SNPs e desenho de *primers*, restando 2153035 e 2210716 leituras respectivamente para cada espécie. Os dados de leituras selecionados foram importados no *pipeline* Stacks 1.2 (CATCHEN et al., 2011). Posteriormente, as leituras foram filtradas usando o programa

process_radtags.pl, o qual separou os dados por MID e removeu leituras com Phred score < 10. Subsequentemente, foi executado o denovo_map.pl para genotipagem *de novo* de SNPs, o qual gerou o catalogo de todos os loci de SNPs, *tags* e consensos de todas as amostras de acordo a parâmetros como cobertura mínima de 4x para a construção do alelo (ustacks) e permitindo até dois *mismatches* para a construção de um locus.

Finalmente, foi executado o software population.pl, permitindo calcular dados estatísticos inter e intragrupos para as amostras das bacias do Orinoco e Amazonas, especificando a ocorrência de cada locus em pelo menos 90% dos indivíduos em cada população para *B. rousseauxii*, e 75% para *C. macropomum*, além de um limite inferior para o Alelo de Menor Frequência - MAF (*Minor Allele Frequency*, pela suas siglas em inglês) de 0,01, e gerando o arquivo VCF (*Variant Call Format*) file com o conjunto de dados de loci finais.

Foram encontradas 1910211 e 2080382 leituras de alta qualidade, 18772 e 22476 *tags* com cobertura igual ou maior que 4x, totalizando 6170 e 7181 sítios polimórficos, respectivamente para *B. rousseauxii* e *C. macropomum*. Para *B. rousseauxii*, aqueles 18772 *tags* representaram 398 loci (849 SNPs) ocorrendo em pelo menos 90% dos indivíduos no mínimo em uma das bacias, e 70 loci (92 SNPs) recuperados para as duas bacias, dos quais 23 mostraram uma região flanqueadora > 80 pares de bases, e portanto foram úteis para o desenho de *primers* (Tabela 3). Para *C. macropomum*, aqueles 22476 *tags* representaram 601 loci (1530 SNPs) os quais ocorreram minimamente entre 75% dos indivíduos em pelo menos uma das bacias, e 177 loci (268 SNPs) recuperados para as duas bacias, dos quais 39 loci possuíam uma região flanqueadora do SNP putativo > 80 pares de bases, e então úteis para o desenho de *primers* (Tabela 4).

Os *primers* foram desenhados a partir das sequências *tag* consenso no *software* Geneious 7.0.6 (KEARSE et al., 2012) através da sua ferramenta *plugin* Batchprimer3 (YOU et al., 2008).

Em conclusão, o uso deste novo método de construção de livrarias genômicas para IonTorrent PGM, junto com ferramentas bioinformáticas apropriadas, podem fornecer um método rápido e de baixo custo para a identificação de SNPs em espécies não modelo. Espera-se que estes marcadores se tornem numa importante e útil ferramenta genética para aquicultura, estudos de conservação, genômica populacional e monitoramento das espécies *B. rousseauxii* e *C. macropomum*.

Tabela 3. SNPs putativos em *Brachyplatystoma rousseauxii* das bacias do Orinoco e Amazonas.

	Primer (5' – 3')	ID tag	SNP position in the tag (bp)	SNP
Br79	F-ACATCGAGGGAACGGATTAGT R-TCAGGTGAGGAGACAGGGTT	79	94	G/A
Br 238	F-CCTTTCCTACTGGCTAAGCTGC R-GTCTCCCATCTGCCTCACAC	238	86	T/C
Br 261	F-TGCATGCTGAAGCTCAAAGG R-TGTGGAGTATGCAGATGGTGA	261	91	A/G
Br 292	F-AAAACATGGCAACCTGCTGC R-GCCTCACCAGGGTACTGTT	292	97	T/C
Br 328	F-TCTTTTACATAAATGGTTGGAAGTGT R-TTGCAAACGGTCCCCAGTAA	328	82	T/A
Br 528	F-ATGGAACCCATATGTGCCGG R-AAAGGCCCTCCAAAACAGCC	528	106	A/G
Br 612	F-AGCTGGCTATGTCAAAGCCT R-AAGTATGCCAGGCGAGTGTC	612	83	A/T
Br 846	F-TGCTCTGGCAAAGACTCCA R-ACAGCTCACACCATTGTTAAAACA	846	91	A/T
Br 871	F-GCTGCACGCTTGTGATCTC R-TGCAGGTTCTCATTGACGACT	871	103	T/A
Br 904	F-TGCCATTATCTGTTGTGCGA R-GGATGACGGACATGAGGAATGA	904	92	C/G
Br 1040	F-ACCCAGAAACCACTGAGCAG R-GCCTCAGACCACACGTTACA	1040	95	C/A
Br 1234	F-TGTATTGTATTGCTGACATTTTCACA R-TGTTACACCAGTCCACCAGT	1234	81	T/G
Br 1236	F-CACAACTGTGCAATTTCTTCT R-TGCACCCTCTCAGACTCTCT	1236	117	A/G
Br 1326	F-TGCGTGATCACACACTAGGG R-GAGCCCTGCAACTGACAAGA	1326	88	C/T
Br 1347	F-ACACTGCTGAATGGTAATGAATTTCT R-CCCCACTTCTGACCTTCTGC	1347	96	G/A
Br 1364	F-CCTGCAATTAATTTGGAGCCA R-GAGGGTGAGTGTTTGGTGCT	1364	119	A/T
Br 1620	F-TGGTTCCATAGTTGATGTTCTACA R-TGACTAGTGTACTGAAAATGGCT	1620	88	T/C
Br 1908	F-TCAGTGATGGAGAAAGAATGTGGT R-GGGGAAGGTGATTGTCTGCT	1908	103	C/T
Br 2296	F-GGTGCCTTTATAATGTGACAGCT R-CAGCACATCTGCACCAGGTA	2296	105	C/T
Br 2545	F-ACACACCTCTTGGCTAATGCA R-CAGGCAATTCCTCTCCGTT	2545	84	A/T
Br 2553	F-CTGACATCCGTCTGGCTCTC R-AAGCCCTCACGCAGTAGATG	2553	119	G/A
Br 2668	F-ACTGAGGTGCTGCAGATTCC R-CTGTGGCTGCTTTCACACAC	2668	109	A/G
Br 2979	F-CTGTTCCACTGCACCATTGT R-CAACACTGATAGCGGCTCCA	2979	105	C/G

Nota: Os 23 SNPs foram escolhidos baseados nos seguintes critérios: loci de SNPs estão presentes em pelo menos 90% dos indivíduos em cada população (30 indivíduos, 15 por bacias), sem desequilíbrio de ligação com outros loci, cobertura mínima de 4x por alelo, um limite inferior para o MAF (minor allele frequency) de 0.01, e uma região flanqueadora a cada lado do SNP > 80 bp.

Tabela 4. SNPs Putativos em *Colossoma macropomum* das bacias do Amazonas e Orinoco.

	Primer (5' – 3')	ID tag	SNP position in the tag (bp)	SNP
Cm45	F-ACACACCCCTATTATGGCAGC R-ACATTCCTCAAGCAAGCCCT	45	91	G/A
Cm54	F-AAGTTACTGGAGCAGGAGGC R-CGCCTCAAGGAGCCATACTC	54	101	A/T
Cm199	F-CCTACTGCACAAGCTCACTCA R-ACACATCAGACACGTTTTAGCA	199	107	T/C
Cm200	F-AACATTCAGCGATATGGCAAC R-TCCAACCTGTTTGTAAACCACAGA	200	85	A/G
Cm410	F-CACTCCACACCATCTCAGCA R-TGCGACATGAAAGTAGCGGT	410	108	A/G
Cm420	F-GAGGAAAGGACAGGCTTGCA R-TGACGTGTAAAGGAACCAGACA	420	109	C/A
Cm608	F-TGCAACACCTACATCACCCG R-GGAAGGACCTTGAATGGGCA	608	80	C/T
Cm609	F-GGAACTGCAGCTGTTTTGCT R-GTTCCTTGAACCTGAACCCA	609	116	A/G
Cm728	F-TCATGAAGCACAGAGGTTGGT R-ACCACCAACAATAACTGCAGTC	728	105	A/G
Cm740	F-ACAGCACAAACAAGATGTCACT R-CACATGGAGTGCTCAGCTGA	740	91	C/T
Cm747	F-TCCCTGACAGTCATTGCTGC R-CCCCTCATTCTAGCACTGC	747	82	C/T
Cm852	F-CCCATCGCTTGCTACTAGGG R-CCTCCCTTTGAGTGCAACCT	852	111	A/G
Cm959	F-TGCACTTCCACAGAATTTTCCAC R-ACCTAGTAACCATATCAAAGCTGT	959	102	C/T
Cm970	F-CATCTCTGCAGCTCTGATCCA R-CTGGCAGTGGAACATCTGGT	970	110	T/C
Cm1062	F-TGTTTGTAAAGCTGTCGTTTAAACAG R-GCATGCGCTTGTATCACAGC	1062	94	T/C
Cm1076	F-ACACACCCCTATTATGGCAGC R-TGCAGTCAGACGTCAAGGTC	1076	91	A/G
Cm1154	F-AGCGACGTATCAGTTTGGGT R-CGAAGAGGGTTTGAGCCAGT	1154	89	G/A
Cm1196	F-AGTCACAGACTGGGTGAAATATGT R-CCTTAGGGAGCAGGTGTCTG	1196	102	G/A
Cm1248	F-TAGCGTGGGTGCAGTATGAC R-TGCATCCCCTCAAAGTGCT	1248	94	A/G
Cm1253	F-ACATGACCGCGTATAACGTCA R-CTGAAGGTCTGCAGGTTCGAG	1253	116	C/T
Cm1420	F-TGTAGTGTGAAGAAAGAGCTTGA R-GCAGCAGAGAGACCACTCAC	1420	97	G/A

Tabela 4. Continuação

	Primer (5' – 3')	ID tag	Posição do SNP no tag (bp)	SNP tag
Cm1546	F-ACAGTGCTGTGTTTCATATGTTCA R-TTGCCAAGCAACAATGGACC	1546	115	G/A
Cm1562	F-AGCGACGCTATCAGTGCATT R-CCCTTGAAACCACCGTTTGC	1562	111	T/C
Cm1677	F-TGCAGACTTCACCCAGTTGA R-GCCTCTGAGCTGGGCTATTA	1677	99	T/C
Cm1768	F-CCACTGTCTGTTTGTGAGC R-AGTGTTTCACAGATGTTAGGGGA	1768	112	G/A
Cm1951	F-GCTCTCTGCCCTACGAAGAC R-ACAAGGTCCAGTGATTGTCATGA	1951	110	G/A
Cm2294	F-TCGGTGAAATTTGTGTGCGC R-TGTTTGGGTGTGATTCTACATGT	2294	91	T/C
Cm2322	F-TCATCCTTTTGTTCATAGCT R-ACACTCATAAGCATGCTCAGT	2322	115	G/A
Cm2474	F-TGTGGGTGGAGCATGGATTG R-CGGATTGGATTCCGGTTGTGC	2474	82	A/G
Cm2482	F-CACCAAATGCTCTACGAATGTT R-GGTCTTCAAATTTGCCTACGCA	2482	119	C/T
Cm2569	F-TGAGATTCCATGATGCCCTGA R-GTGCCACAGAGACACCTGAA	2569	95	A/T
Cm2579	F-ATTAGCCTTGCAGTCCCAGC R-AGCTGACACAACCATTCCCA	2579	82	A/C
Cm2599	F-GTGACTCGCTTGTGTGTTCT R-GCCTCATTAATCTTCAACAATCGC	2599	119	T/C
Cm2631	F-ACCTGGAATGTGTAGCTGTGG R-CAGGTGAGAGGGGGTCCTAA	2631	82	A/G
Cm2842	F-ACAGAACAGTGTATCGTGACCT R-GCCAACAGAATGAGACGCAG	2842	93	G/A
Cm2847	F-TCGGTGAAATTTGTGTGCGC R-TGTTTGGGTGTGATTCTACATGT	2847	92	C/T
Cm2867	F-TCCTCCAGGACTGCTGCTAA R-TCCAGGACTGAAGCTCCTCC	2867	116	G/T
Cm2894	F-AGCAAACACATGGTATTAAATTCCT R-GACCTGTCTATGCCTGCCAG	2894	102	A/T
Cm2949	F-ACGATTGTTTCAGGATGAGCA R-TGCAAGCACATATGTTTCAATTAAGT	2949	85	A/G

Notes: Os 39 SNPs foram escolhidos baseados nos seguintes critérios: loci de SNPs estão presentes em pelo menos 90% dos indivíduos em cada população (30 indivíduos, 15 por bacias), sem desequilíbrio de ligação com outros loci, cobertura mínima de 4x por alelo, um limite inferior para o MAF (minor allele frequency) de 0.01, e uma região flanqueadora a cada lado do SNP > 80 bp.

CAPÍTULO III

CONECTIVIDADE ATUAL E HISTÓRICA DA ICTIOFAUNA DO ORINOCO E O AMAZONAS: ABORDAGEM GENÉTICO- POPULACIONAL E FILOGEOGRÁFICA USANDO UM MODELO DE PEIXES MIGRADORES E SEDENTÁRIOS

RESUMO

Os rios Amazonas e Orinoco se constituem nos dois principais sistemas hídricos no Neotrópico, caracterizados pela sua alta diversidade de ictiofauna, a qual é estimada entre 1300 a 3000 espécies de peixes, sendo que cerca de 65% de toda a ictiofauna Neotropical está concentrada na área alagada das suas bacias. Grande parte desta diversidade é compartilhada entre elas, mas a respeito não existem estudos robustos que sustentem os limites espaciais, temporais e nem o modo de interação desta ictiofauna entre os dois sistemas fluviais, impedindo definir as bases para a tomada de medidas que permitam o uso sustentável desse recurso pesqueiro e sua conservação. Deste modo, no presente estudo se visou determinar a existência de conectividade atual e histórica da ictiofauna compartilhada entre as bacias do Amazonas e Orinoco através da avaliação de duas diferentes hipóteses sobre mecanismos de dispersão e distribuição de indivíduos das espécies entre elas: 1) através de corredores zoogeográficos permanentes (Casiquiare) ou 2) através de planícies de inundação temporais entre cabeceiras do Amazonas e Orinoco (Rio Japurá – Rio Guaviare; e Rio Branco – Rio Caroní), utilizando como sistema modelo oito espécies de peixes com histórias de vida diferenciadas (Migradores e sedentários). Para tanto foi realizado uma abordagem filogeográfica e genético populacional utilizando sequências de ADNmt e ADNnu para inferir as relações atuais e históricas entre as bacias. Sequências de Citocromo Oxidase I (COI) e Região Controle (RC) foram concatenadas (até 1140 pb totais) após serem obtidas de 82, 83, 96, 81, 141, 68, 51 e 94 indivíduos das duas bacias para as espécies *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum*, *Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer*, *Nannostomus unifasciatus*, *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum altum*, respectivamente. Assim também, sequências de regiões exônicas nucleares como Glycosiltransferase (Glyt) e a cadeia pesada 6 alfa da miosina do músculo cardíaco (myh6) foram concatenadas (até 1357 pb totais) após serem obtidas de 17, 29, 19, 21, 24, 19, 17 e 24 indivíduos, respectivamente, para as mesmas espécies mencionadas. As análises do ADNmt mostraram uma forte estrutura populacional em termos de formação de grupos biológicos diferenciados, distribuição não aleatória de haplótipos e altos níveis de Fst (0,18 - 0,99) para todas as espécies entre bacias, mas não dentro destas (exceto para os peixes sedentários). Das oito espécies avaliadas, apenas *P. orinocoense/P. punctifer* apresentou evidências de fluxo gênico recente entre bacias, sendo através do Casiquiare, mas com o ponto de encontro reprodutivo entre populações limitado à área abrangendo parte do Alto Orinoco, passando pelo Casiquiare e até Santa Isabel no Rio Negro. As análises de neutralidade do teste D de Tajima e rede de haplótipos sugeriram uma expansão significativa recente para *C. macropomum* e *P. orinocoense/P. punctifer* exclusivamente para a bacia do Orinoco, sendo que no primeiro caso se deu provavelmente após de uma dispersão recente (< ~108 mil anos) a partir do Amazonas (posterior a uma possível extinção da espécie no Orinoco), enquanto que para a segunda espécie, trata-se de uma população isolada do Amazonas desde há ~1,052 milhões de anos, possivelmente com uma drástica redução demográfica no passado recente, gerando uma população fundadora que está se expandindo. Em ambos os casos, tal evento (extinção ou redução populacional) estaria associado a mudanças do habitat por catástrofes características do vulcanismo gerado pelo erguimento final da

cordilheira Oriental dos Andes e/ou possíveis mudanças climáticas do Pleistoceno. Para todas as espécies, o ADNnu mostrou um forte compartilhamento de grupos biológicos entre bacias, sugerindo que a divergência entre estas é mais recente do que se pensava. Isto foi confirmado pela análise de coalescência para estabelecer os tempos de divergências entre bacias, mostrando que apenas as populações de *N. unifasciatus* do Orinoco e Amazonas divergiram no Plioceno (~4,9 milhões de anos), enquanto que o resto das espécies divergiu no Pleistoceno (~1,5 – 0,042 milhões de anos). Em qualquer caso, não coincidindo com a hipótese de vicariância entre bacias gerada pelo Arco do Vaupés no Médio Mioceno (~11 milhões de anos). Finalmente, é possível concluir que as bacias não são sistemas completamente independentes, inclusive com interações demográficas atuais, pelo que é válido afirmar que sua ictiofauna, ainda em processo de diversificação, deve ser regida por critérios de conservação unificados de curto prazo entre países que compõem as bacias, os quais permitam manter os processos evolutivos intactos para este recurso e sem prejudicar seu aproveitamento.

Palavras chave: Amazonas, estrutura populacional, filogeografia, Orinoco, peixes migradores, peixes sedentários.

9 INTRODUÇÃO

No Neotrópico, os rios Amazonas e Orinoco são respectivamente o segundo e terceiro rio mais longo do mundo, com aproximadamente 6437 km e 2140 km de longitude e uma área de drenagem de 7050000 e 830000 km² respectivamente (STALLARD; KOEHNKEN; JOHNSON, 1991; ZEISLER; ARDIZZONE, 1979). As duas bacias estão caracterizadas pela sua alta diversidade da ictiofauna, estimada entre 1300 a 3000 espécies de peixes (REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003), sendo que cerca de 65% de toda a ictiofauna Neotropical está concentrada na área alagada das suas bacias (ALBERT; REIS, 2011) e grande parte é compartilhada por ter uma origem ancestral comum. Dentre estas espécies, os Caraciformes e Siluriformes representam cerca de 83% do total da diversidade de espécies existentes (LOWE-MCCONNELL, 1999), quem junto com a família Cichlidae sofrem pressão de pesca significativa (CHAO, 2001; FERNANDEZ-ACOSTA et al., 2008), levando a uma deterioração deste recurso compartilhado, sobre o qual não se conhece muito.

A formação destes sistemas fluviais se deu após processos geológicos e orogênicos complexos que permitiram seu desenvolvimento através de uma história de origem comum para ambas as bacias. A história evolutiva da América do Sul tem sido associada a um conjunto de grandes eventos geológicos progressivos que modificaram tanto o continente quanto os oceanos e sistemas fluviais (CAVALLOTTO; VIOLANTE; HERNÁNDEZ-MOLINA, 2011; FOLGUERA et al., 2011; LAVINA; FAUTH, 2010). A ictiofauna Sul-americana moderna se diversificou e distribuiu através de uma ampla variedade de ambientes ecológicos durante o Mioceno Tardio (11 a 5 milhões de anos) (WEITZMAN; WEITZMAN, 1982), principalmente através do fenômeno de captura de cabeceira, evento usual para estas duas bacias desde o Médio Mioceno, que se tornou o responsável pela origem de grande parte da diversidade de peixes continentais, a partir de mudanças paleo-hidrológicas que permitiram a dispersão de biotas ancestrais e a posterior divergência alopátrica devido a eventos orogênicos (LUNDBERG et al., 1998).

Apesar de que estes eventos facilitaram a distribuição, a explicação ao compartilhamento atual de espécies possui suas bases na evidência da formação do rio Paleo-Orinoco-Amazonas (HOORN et al., 1995; LUNDBERG et al., 1998), uma única bacia transcontinental em direção ao caribe entre o Oligoceno tardio e Mioceno Cedo (~27 - 15 milhões de anos), se desintegrando para constituir as bacias que hoje conhecemos. Isto, gerado pelo levantamento do Arco do Vaupés, o qual se estende entre a base da cordilheira oriental dos Andes e a base do escudo Guianense na cabeceira do Rio Negro (DÍAZ DE GAMERO, 1996; HOORN, 1993; HOORN et al., 1995; WESSELINGH; HOORN, 2006).

Apesar disto, conexões fluviais ainda continuam vigentes entre as duas bacias, como no caso do canal do Casiquiare, deixando aberta a possibilidade de conectividade da ictiofauna, ao considerar esta como uma possível rota de dispersão de espécies de peixes entre as duas bacias (BARTHEM; GOULDING, 1997; LUNDBERG et al., 1998; MACHADO-ALLISON, 2008; WILLIS et al., 2010; WINEMILLER; WILLIS, 2011; WINEMILLER et al., 2008).

As águas do alto Rio Negro da bacia do Amazonas estão conectadas com a cabeceira do Orinoco através do Canal do Casiquiare, única conexão evidente entre as bacias depois de terem sido separadas definitivamente pelo levantamento da cordilheira

oriental dos Andes e o Arco do Vaupés. O Casiquiare é um canal de mais de 300 km, que comunica o alto Rio Orinoco com o alto Rio Negro, correndo nessa mesma direção e possuindo uma descarga média de 2100 m³/s (WINEMILLER et al., 2008). O Casiquiare flui próximo ao limite sul ocidental do escudo das Guianas e a porção leste dos Llanos (savanas) do Rio Orinoco na sua zona de contacto com a Amazônia ocidental. O Casiquiare se unta com o Rio Guainía dando origem ao Rio Negro, o maior tributário do Amazonas (WINEMILLER et al., 2008). Até hoje, não se conhece uma idade certa da origem desse canal.

Apesar de o Casiquiare ser a forma mais evidente de conexão entre o Orinoco e o Amazonas, existe a possibilidade de outras duas rotas de dispersão atual de peixes e conectividade entre as bacias. Uma delas ocorreria através das cabeceiras dos rios Guaviare e Inírida (Orinoco) com os rios Vaupés (Rio Negro) e Japurá (Amazonas) (Figura 1), cujas cabeceiras são altamente ramificadas, próximas (< 20 km) e extremamente baixas em relação ao nível do mar (< 200 m) ao longo do Arco do Vaupés (MORA et al., 2011), o que torna essa área uma das poucas barreiras semipermeáveis entre bacias sul-americanas para a ictiofauna até hoje (LOVEJOY; WILLIS; ALBERT, 2011); aspecto que poderia se repetir também para outra possível rota de dispersão: Rio Branco (Amazonas) com o Rio Caroní (Orinoco) (Figura 1). Estas duas últimas rotas permitiriam a troca de espécies nos períodos de cheia onde podem acontecer alagamentos sazonais que conectam estas cabeceiras nos períodos de chuva, sendo através do ictioplancton bem como de adultos e juvenis nas áreas alagadas comuns (MACHADO-ALLISON, 2008), como já é conhecido para os sistemas Rio Branco-Rupununi-Essequibo (ARBOUR; FERNÁNDEZ, 2011; LOVEJOY; ARAUJO, 2000; LOWE-MCCONNELL, 1969; SABAJ; TAPHORN; CASTILLO, 2008).

Apesar dos estudos genéticos realizados até agora para desvendar o grau de conectividade entre as bacias do Orinoco e Amazonas, as abordagens utilizadas só levam em conta apenas uma ou poucas espécies muito relacionadas como sistema de modelo biológico para responder a hipótese, o que leva a um viés filogenético das respostas (falta de independência estatística dos dados). Assim também, levam em conta uma única história de vida (geralmente peixes de vida sedentária) (p. e. WILLIS et al., 2010), ignorando as informações que possam fornecer outras espécies coexistentes (espacial e temporalmente) com histórias de vida diferenciadas e não filogeneticamente relacionadas entre si. Este tipo de abordagem, no caso do Orinoco e Amazonas, permitiria uma visão holística sobre a dinâmica evolutiva que envolveu e envolve atualmente às bacias contada desde vários ângulos taxonômicos (BERMINGHAM; MARTIN, 1998).

A realização de comparações filogeográficas e genético-populacionais entre várias espécies ou populações codistribuídas (filogeografia comparada), com histórias de vida diferentes (migradores e sedentários) que podem afetar a sua estrutura (HUGHES et al., 2012; NORTHCOTE; HINCH, 2004), permitiriam a avaliação da existência de padrões filogeográficos e populacionais concordantes (ARBOGAST; KENAGY, 2008; AVISE, 2000, 2009; ZINK, 2002), facilitando testar hipóteses sobre possíveis eventos históricos comuns que influenciaram sobre várias espécies e que podem indicar respostas bióticas comuns frente a eles (BERMINGHAM; MARTIN, 1998), por exemplo, eventos de vicariância ou dispersão, mudanças climáticas históricas e processos geomorfológicos. Adicionalmente, isto permitiria identificar as causas ecológicas e etológicas que exerceram e exercem alguma influência sobre os mesmos (ARBOGAST;

KENAGY, 2008; LANTERI; CONFALONIERI, 2003; ZINK, 2002), detectar padrões de biodiversidade no nível regional e de paisagem que são importantes para o entendimento da macroecologia, os impactos externos dos eventos geológicos e áreas de grande prioridade para conservação (BERMINGHAM; MARTIN, 1998; MORITZ, 2002). Deste modo, a aplicação de análises filogeográficas e genético-populacionais no presente estudo proporcionariam informação útil de processos envolvidos na origem e distribuição da biodiversidade, sua microevolução em termos de mutação, fluxo gênico, deriva e seleção, mecanismos que criaram e que ainda mantêm a diversidade destas espécies da ictiofauna mais rica do planeta: Orinoco e Amazonas.

Um número significativo de espécies de importância econômica é compartilhado entre as bacias do Orinoco e Amazonas (BARTHEM; GOULDING, 1997; MALDONADO-OCAMPO; VARI; USMA, 2008; REIS; KULLANDER; FERRARIS, 2003; WINEMILLER; WILLIS, 2011; WINEMILLER et al., 2008), entre elas podemos citar grandes bagres migradores como *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma orinocoense* (*P. punctifer*) e *Pseudoplatystoma metaense* (*P. tigrinum*); espécies semi-migradoras como *Colossoma macropomum* e *Piaractus brachypomus*, além de espécies de peixes ornamentais de história de vida sedentária como *Paracheirodon axelrodi*, *Nannostomus unifasciatus* e *Pterophyllum altum*), no entanto, ainda não é claro o grau de relação demográfica e limites da distribuição destas espécies entre bacias, inclusive, se realmente estes sistemas hídricos contêm espécies diferentes ou não.

Alguns trabalhos de distribuição de espécies de peixes realizados até a atualidade entre bacias têm demonstrado diversos resultados: endemismo (p. e. espécies do gênero *Retroculus*), vicariância (p. e. ciclídeos do gênero *Uaru*: *Uaru amphiacantoides* e *Uaru fernandezyepezi*) e dispersão ou distribuição de espécies dentro de ambas as bacias (CRAMPTON; ALBERT, 2003; FREEMAN et al., 2007; LITTMANN, 2007; WINEMILLER et al., 2008). Apesar dos esforços de ecólogos e sistematas em analisar a distribuição biogeográfica para algumas espécies de peixes nessas bacias neotropicais (HUBERT et al., 2007b; LOVEJOY; ARAUJO, 2000; TURNER et al., 2004; WILLIS et al., 2007), existem ainda poucos estudos de base genética com seu foco orientado a testar a hipótese de fluxo gênico e conectividade no nível populacional entre o Amazonas e Orinoco. Por exemplo, só um trabalho, utilizando modelos de análises de coalescência, estimou que indivíduos das espécies de peixes de ciclídeos como *Cichla temensis*, *C. monoculus*, e *C. orinocensis* experimentam algum grau de fluxo gênico entre as bacias do Orinoco e Amazonas, além de possíveis mecanismos de dispersão atuais e históricos (WILLIS et al., 2010). Mesmo assim, nenhum desses estudos envolveu espécies altamente exploradas compartilhadas entre bacias, nem foram integradas nas análises as histórias de vida diferenciadas dos peixes como possível fator determinante da conectividade e fluxo gênico.

No presente trabalho objetivou-se determinar a existência de conectividade da ictiofauna compartilhada entre as bacias do Amazonas e Orinoco através da avaliação de duas diferentes hipóteses sobre áreas de dispersão de indivíduos entre ditas bacias: 1) através de corredores zoo-geográficos permanentes como o Casiquiare ou 2) através de planícies de inundação temporais entre cabeceiras do Amazonas e Orinoco como o Rio Japurá/Rio Guaviare e Rio Branco/Rio Caroní, utilizando como sistema modelo oito espécies de peixes com histórias de vida diferenciadas (migradores e sedentários). Conhecer a história evolutiva das bacias não só gerará conhecimento relacionado com

a genética básica das espécies, mas também com grandes impactos sobre a ecologia, conservação e biogeografia histórica e recente.

As espécies migradoras como *B. rousseauxii*, *P. orinocoense* (*P. punctifer*), *P. metaense* (*P. tigrinum*), *C. macropomum* e *P. brachypomus*, além de espécies de peixes sedentárias como *P. axelrodi*, *N. unifasciatus* e *P. altum*, possuem uma ampla distribuição dentro das duas bacias, estando entre as 20 espécies mais exploradas comercialmente no Orinoco e Amazonas com alto valor para consumo humano e ornamentação (BARTHEM; FABRÉ, 2004; BARTHEM; GOULDING, 1997; CHAO, 2001; FERNANDEZ-ACOSTA et al., 2008; NOVOA, 2002; SANTOS; SANTOS, 2005; TAPHORN, 2003), e para as quais a informação filogeográfica e antecedentes sobre a distribuição dos seus grupos biológicos, unidades de conservação e demografia histórica e recente entre as duas bacias é inexistente. Assim, a execução deste capítulo responderá as perguntas: a) Existe ou existiu fluxo gênico entre as bacias do Amazonas e Orinoco? b) O grau de conectividade genética e padrão espacial da sua variação entre e dentro de bacias possui relação com a história de vida das espécies?

10 MATERIAL E MÉTODOS

10.1 Amostragem e obtenção de sequências mitocondriais e nucleares

Para este estudo, foram coletadas amostras de tecido muscular de 82, 83, 96, 81, 141, 68, 51 e 94 indivíduos de *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense*/*P. tigrinum*, *P. orinocoense*/*P. punctifer*, *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*, respectivamente. No caso dos peixes sedentários, as amostras foram obtidas de três localidades do Orinoco (Puerto Gaitán, San José del Guaviare e Puerto Inírida), e de três localidades do Rio Negro (Cucui, Santa Isabel e Barcelos), compreendendo a área de distribuição geográfica das espécies. Em relação aos peixes migradores, foram obtidas amostras de 17 localidades amostradas, sendo que nove (9) locais corresponderam à bacia do Orinoco, e oito (8) à bacia do Amazonas, sempre flanqueando as regiões de possível conectividade da ictiofauna entre o Orinoco e Amazonas pelas rotas previamente propostas como hipótese (Tabela 5, Figura 7).

No caso das espécies do gênero *Pseudoplatystoma*, apesar da sua complexa discussão em torno da diferença na classificação taxonômica para as espécies do Orinoco e Amazonas, os nomes das espécies dos indivíduos coletados foram atribuídos com base na sua distribuição geográfica elaborada por Buitrago-Suárez e Burr (2007), trabalho no qual a taxonomia é geralmente concordante com a distribuição das espécies (rios).

As amostras de tecido dos peixes migradores foram coletadas a partir de indivíduos pescados por mecanismos artesanais e desde indivíduos já capturados nos portos de pesca das localidades de coleta. No caso dos peixes ornamentais, os tecidos foram obtidos de indivíduos capturados por pecadores artesanais em campo ou intermediários de venda tanto na Colômbia quanto no Brasil. Amostras foram preservadas em álcool 95% e posteriormente depositadas na Coleção de Tecidos de Genética Animal – CTGA da UFAM (CGEN, deliberação nº75 de 26/08/04).

A extração de ADN total foi realizada seguindo o protocolo fenol/clorofórmio modificado de Sambrook et al. (1989).

Para todos os indivíduos, foram amplificadas regiões mitocondriais correspondentes à Região Controle (RC) e Citocromo Oxidase Subunidade I (COI). A reação de mix para as PCRs da RC foi realizada em um volume final de 15 µL contendo: 5,1 µL de água estéril deionizada, 1,5 µL de BSA (10 mg/mL), 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM, Fermentas), 1,5 µL de *buffer* (NH₄)₂SO₄ 10X (Fermentas), 1,2 µL de dNTPs (10 mM), 1,5 µL do *primer reverse* (2 µM), 1,5 µL de *primer forward* (2 uM), 0,5 µL de *Taq* ADN polimerase (1 U/µL, Fermentas) e 1,0 µL de DNA (~ 50 ng/µL). Assim também, para COI, a reação de mix teve um volume final de 15 µL contendo: 8,3 µL de água estéril deionizada, 1,2 µL de MgCl₂ (25 mM, Fermentas), 1,5 µL de *buffer* (NH₄)₂SO₄ 10x (Fermentas), 1,2 µL de dNTP (10 mM), 1,5 µL do *cocktail primers (forwards + reverses)* (2 uM), 0,3 µL de *Taq* ADN polimerase (1 U/µL, Fermentas) e 1,0 µL de DNA (~ 50 ng/µL). Todas as reações foram conduzidas, tanto para COI quanto para a RC, no termociclador Veriti® (Applied Biosystems), seguindo o programa de amplificação de um ciclo de 72 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 94 °C por 10 segundos, temperatura de anelamento de 50 °C por 35 segundos e 72 °C por 90 segundos. Por ultimo, um passo de extensão final de 72 por 5 minutos. *Primers* de PCR para COI foram disponíveis da literatura, enquanto que aqueles para a RC foram desenhados para este estudo (Tabela 6).

Adicionalmente, foram amplificadas sequencias do genoma nuclear correspondentes a regiões exônicas que codificam para proteínas conservadas como Glycosiltransferase (Glyt) e a cadeia pesada 6 alfa da miosina do músculo cardíaco (*myh6*) (Tabela 6). Para tanto, foram utilizados apenas 17, 29, 19, 21, 24, 19, 17 e 24 indivíduos das espécies *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense* / *P. tigrinum*, *P. orinocoense* / *P. punctifer*, *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*, respectivamente. Isto, compreendendo a distribuição geográfica já descrita anteriormente.

Table 5. Localidades e coordenadas geográficas de amostragem de indivíduos nas bacias do Orinoco e Amazonas

Localidade ^a	Espécies ^b	Coordenadas geográficas
1. San Félix (Ven)	Migradores	8°17'11.05"N; 62°40'6.25"W
2. Castillos (Ven)	Migradores	8°31'37.25"N; 62°22'42.04"W
3. Ciudad Guayana (Ven)	Migradores	8°23'37.32"N; 62°39'27.63"W
4. Caicara del Orinoco (Ven)	Migradores	7°39'11.20"N; 66°10'37.66"W
5. Puerto Carreño (Col)	Migradores	6°9'37.94"N; 67°31'12.47"W
	Sedentários	6°9'28.69"N; 67°33'0.94"W
6. Puerto López (Col)	Migradores	4°6'13.12"N; 72°56'21.82"W
7. Puerto Gaitán (Col)	Sedentários	4°18'23.75"N; 72°4'17.21"W
8. Puerto Inírida (Col)	Migradores	3°51'58.09"N; 67°56'54.68"W
	Sedentários	3°50'35.54"N; 67°58'37.72"W
9. San José del Guaviare (Col)	Migradores	2°34'21.99"N; 72°38'49.11"W
	Sedentários	2°33'48.35"N; 72°40'49.85"W
10. Cucui (Bra)	Sedentários	1°1'20.71"N; 66°47'32.78"W
	<i>P. punctifer</i>	0°52'31.7"N; 66°51'28.3"W
11. São Gabriel da Cachoeira (Bra)	<i>P. punctifer</i>	8°17'11.05"N; 62°40'6.25"W
12. Santa Isabel (Bra)	Sedentários	0°24'39.28"S; 65°1'30.93"W
	<i>P. punctifer</i>	0°23'30.9"S; 65°12'18.1"W
13. Barcelos (Bra)	Sedentários	0°58'0.88"S; 62°53'48.72"W
14. Boa Vista (Bra)	Migradores	2°48'50.10"N; 60°39'53.08"W
15. La Pedrera (Col)	Migradores	1°19'0.36"S; 69°35'6.33"W
16. Tefé (Bra)	Migradores	3°21'33.33"S; 64°39'19.98"W
17. Manaus (Bra)	Migradores	3°8'1.81"S; 60°2'37.78"W

^a Países de origem mostrados em parêntese: Ven: Venezuela, Col: Colômbia, Bra: Brasil.

^b Nome das espécies agrupadas como: Migradores: *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Pseudoplatystoma orinocoense*/*P. punctifer*, *Pseudoplatystoma metaense*/*P. tigrinum*, *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum*; e Sedentários: *Pterophyllum altum*, *Paracheirodon axelrodi* e *Nannostomus unifasciatus*.

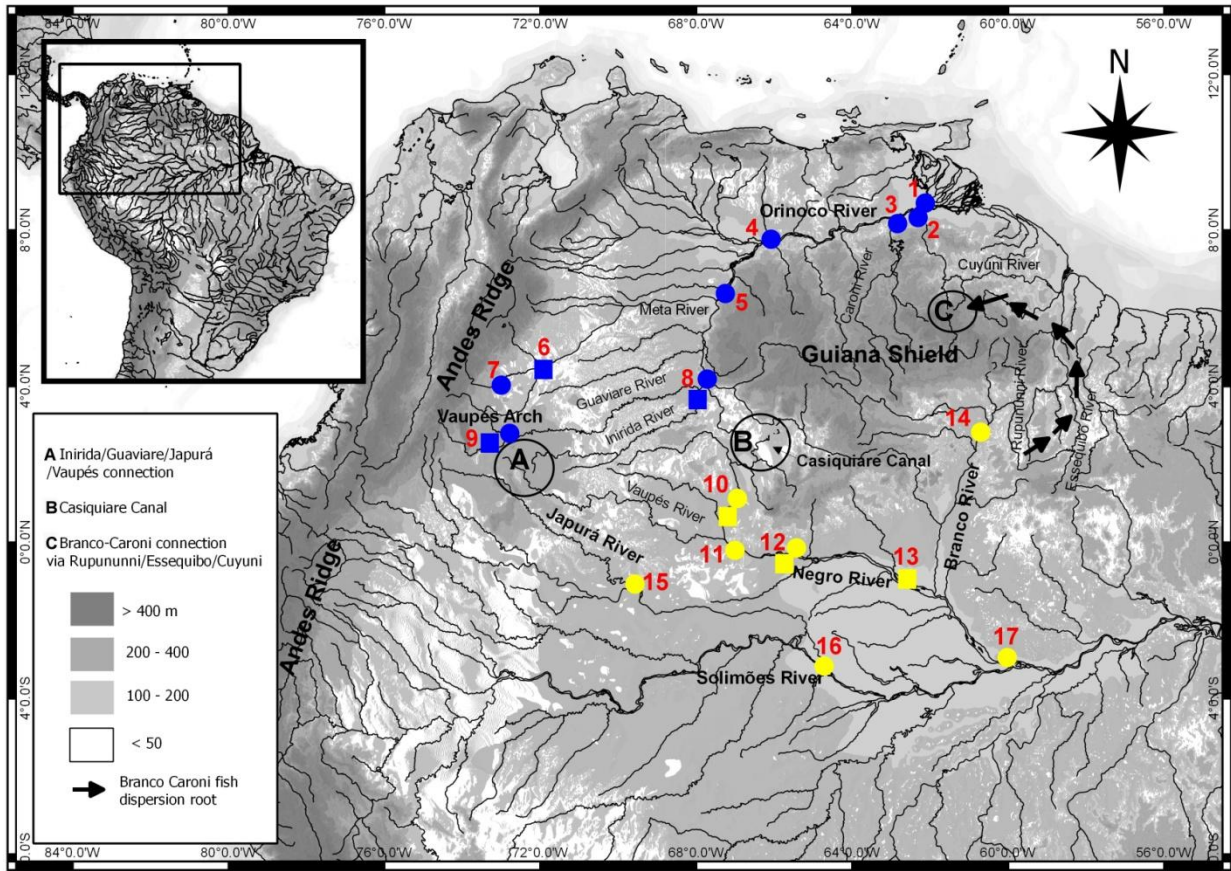


Figura 7. Locais de amostragem e possíveis rotas de conexão para as espécies de peixes migradores e sedentários entre bacias. Círculos amarelos e azuis representam locais de coleta para as espécies de peixes migradores nas bacias do Orinoco e Amazonas, respectivamente. Os quadros azuis e amarelos correspondem aos locais de coleta de amostras de peixes sedentários das bacias do Orinoco e Amazonas, respectivamente. A, B e C correspondem às hipotéticas conexões da ictiofauna entre bacias a serem testadas neste estudo. 1: San Félix, 2: Castillos, 3: Ciudad Guayana, 4: Caicara del Orinoco, 5: Puerto Carreño, 6: Puerto Gaitán, 7: Puerto López, 8: Puerto Inirida, 9: San José del Guaviare, 10: Cucui, 11: São Gabriel da Cachoeira, 12: Santa Isabel, 13: Barcelos, 14: Boa Vista, 15: La Pedrera, 16: Tefé e 17: Manaus.

Tabela 6. Sequências de *primers* usadas nas reações de PCR para ampliações de regiões mitocôndrias como Citocromo Oxidase I - COI e Região Controle - RC, e regiões de genes nucleares como Glycosiltransferase (glyt) e a cadeia pesada 6 alfa da miosina do músculo cardíaco (myh6).

Região	<i>Forward</i> (5' – 3')	<i>Reverse</i> (5' – 3')	Referência
COI (FishF2_t1, VF2_t1, FishR2_t1, FR1d_t1)	(1) GTAAAACGACGGCCAG TCGACTAATC	(1) CAGGAAACAGCTAT GACTTCAGGGTG	Ivanova et al. (2007)
	(2) GTAAAAGGACGGCCAG TCAACCAACC	(2) CAGGAAACAGCTAT GACTTAGACTTCT	
RC (LProF, DLOstariR.1)	AACYCCCRCCCCTAAC YCCCAAAG	GTAAAACGACGGCC AGTCCTGGTTTH	Presente estudo
myh6 (myh6_F459, myh6_R1325) - 1 ^a PCR	(1) CATMTTYTCCATCTCAG ATAATGC	(1) ATTCTCACCACCATC CAGTTGAA	Li et al. (2007)
myh6 (myh6_F507, myh6_R1322) - 2 ^a PCR	(2) GGAGAATCARTCKGTG CTCATCA	(2) CTCACCACCATCCAG TTGAACAT	
Gylt (Glyt_F559, Glyt_R1562) – 1 ^a PCR	(1) GGACTGTCMAAGATGA CCACMT	(1) CCCAAGAGGTTCTTG TTRAAGAT	Li et al. (2007)
Gylt (Glyt_F577, Glyt_R1464) – 2 ^a PCR	(2) ACATGGTACCAGTATG GCTTTGT	(2) GTAAGGCATATASGT GTTCTCTCC	

Nota: *primers forwards* e *reverse* para COI são utilizados na forma de *cocktail* numa única reação PCR, como indicado por Ivanova et al. (2007). No caso dos genes nucleares, a 1^a PCR e 2^a PCR correspondem a um método de PCR aninhada para a amplificação de cada gene de acordo ao indicado por Li et al. (2007). Nos casos de PCR aninhada, os *primers forward* e *reverse* de cada passo de PCR são previamente misturados equimolarmente para a obtenção de uma única alíquota de trabalho com uma concentração final de 2 µM de *primers* no total da solução.

As reações de PCR para a amplificação de Glyt e myh6 foram levadas a cabo simultaneamente para o primeiro passo da PCR aninhada (pré-amplificação - 1^a PCR) para cada amostra, e de forma independente para o segundo passo de PCR (amplificação - 2^a PCR), de acordo a Li et al. (2007). Para tanto, as condições da reação de mix de PCR para a pré-amplificação foram equivalentes às da RC; enquanto que

para a reação de PCR de amplificação, seguiram-se as condições equivalentes para a amplificação de COI, exceto que em vez da adição de 1 µL de ADN como *template*, é realizada a adição de 1 µL da PCR da pré-amplificação. Em todos os casos, os *primers* utilizados estiveram nas condições já explicadas na Tabela 6 deste capítulo.

Todas as reações foram conduzidas, para Glyt ou myh6, em termociclador Veriti® (*Applied Biosystems*) seguindo o programa de amplificação: 1ª PCR - um ciclo de 68 °C por 1 minuto, 30 ciclos de 93 °C por 10 segundos, temperatura de anelamento de 48 °C por 35 segundos e 68 °C por 90 segundos. Por ultimo, um passo de extensão final de 68 °C por 7 minutos. 2ª PCR - um ciclo de 68 °C por 1 minuto, 35 ciclos de 93 °C por 10 segundos, temperatura de anelamento de 55 °C por 35 segundos e 68 °C por 90 segundos. Por ultimo, um passo de extensão final de 68 °C por 7 minutos.

Todos os produtos de PCR gerados foram sequenciados em sequenciador automatizado ABI-3500 (*Applied Biosystems*) usando kit de *BigDye Terminator Cycle Sequencing* (*Applied Biosystems*), de acordo às instruções do fabricante (WERLE et al., 1994). A montagem, alinhamento e verificação da qualidade das sequências nucleotídicas foram realizados usando o programa Geneious: (<http://www.geneious.com/>, KEARSE et al., 2012) e a ferramenta incorporada ao mesmo: CLUSTAL W (www.clustal.org).

10.2 Análises de dados

10.2.1 ADN mitocondrial

Para todas as análises, foram utilizadas sequências de COI e RC de forma concatenada para cada um dos indivíduos. A concatenação das sequências destas regiões é adequada considerando que o ADN mitocondrial é herdado como uma única molécula, sem recombinação e todas as sub-regiões experimentam a mesma história evolutiva devido ao seu padrão de mutação (MEYER, 1993).

Para inferir a estrutura genética e grupos biológicos, foi utilizado o programa BAPS (*Bayesian Analysis of Genetics Population Structure*) (CORANDER et al., 2008). Dentro dos *priors* escolhidos para os parâmetros de partição e atribuição de indivíduos em BAPS, foi selecionado o modelo de agrupamento por indivíduos (*Clustering of individuals*), apropriado para cenários biológicos onde os indivíduos têm sido amostrados desde um número determinado de áreas geográficas específicas, o que é mais apropriado para genética populacional. BAPS permite a especificação *a priori* do limite superior de grupos (*k*) a serem testados pelo algoritmo, onde este tenta identificar a probabilidade posterior da partição em subpopulações na faixa de 1 até o *k* dado *a priori*. Assim o *k* mínimo testado dependerá do número de localidades amostradas dentro do delineamento experimental, assumindo que cada uma poderia se comportar como uma população biológica, no entanto, este valor *k* pode ser maior para não subestimar a possível existência de mais grupos biológicos. Neste caso particular, foi testado um *k* = 10 para as espécies de peixes sedentários, e um *k* = 20 para os migradores.

Uma das mais fortes evidências para detectar fluxo gênico entre populações é o compartilhamento de haplótipos entre estas, acompanhado de uma falta clara de monofilia recíproca entre os haplótipos associados às áreas comparadas (WILLIS et al.,

2010). Para testar esta hipótese entre o Orinoco e Amazonas, foi realizada uma análise para estabelecer relações filogenéticas entre haplótipos inferida através de uma abordagem estatística de máxima verossimilhança (1000 iterações e 10000 réplicas) no programa Treefinder (JOBBER; VON HAESLER; STRIMMER, 2004) sob um modelo evolutivo HKY+G (*B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense/P. tigrinum* e *P. altum*), TrN+G (*P. orinocoense/P. punctifer* e *P. axelrodi*), e TPM3uf+G (*N. unifasciatus*) previamente determinados no programa jModelTest (POSADA, 2008). Para a seleção do modelo evolutivo mais apropriado foi considerado o AICc. Posteriormente, para visualizar a relação e distribuição dos haplótipos obtida entre as bacias do Orinoco e o Amazonas, foi utilizado o programa HaploViewer (SALZBURGER; EWING; VON HAESLER, 2011).

Para a determinação do fluxo gênico indireto e grau de estruturação das populações, foi realizada uma Análise de Variância Molecular (AMOVA) utilizando o programa Arlequin 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Na AMOVA, a variação genética contida dentro e entre as populações foi estimada através do índice Φ_{st} , homólogo do F_{st} (WEIR; COCKERHAM, 1984), registrando o seu valor e significância estatística (P) para a rejeição ou não da hipótese nula de panmixia ($F_{st} = 0$) entre as populações comparadas. Este método também permitiu ajudar na determinação de Unidades de Manejo dentro de cada bacia, considerando que a configuração destas unidades está determinada pela restrição ao fluxo gênico (CRANDALL et al., 2000). No mesmo programa foi realizado o teste D de Tajima (TAJIMA, 1989) para avaliar quais populações das duas diferentes bacias estão em equilíbrio de distribuição aleatória dos polimorfismos com respeito ao ADNmt, considerando que um desvio significativo deste equilíbrio genético no ADNmt é possivelmente o resultado de uma expansão populacional recente. Assim, espera-se que a evidência de expansão populacional em uma bacia indique também uma provável colonização ou dispersão em direção a esta de forma mais recente, ou uma recuperação após algum evento climático ou ambiental.

Adicionalmente, para determinar se a distância geográfica está modelando a estrutura genética destes grupos dentro e entre as bacias, foi realizado um Teste de Mantel. O teste de Mantel (MANTEL, 1967) foi implementado para determinar a significância da associação entre a distância genética (F_{st}) e geográfica, testando a hipótese de Isolamento por Distância (*Isolation By Distance*, IBD). Um desvio na covariação e associação destas variáveis (P -value do coeficiente de correlação de Pearson $> 0,05$) permitirá inferir que outros fatores diferentes à distância geográfica (p. e. barreiras) estão envolvidas na explicação dos atuais padrões de formação de estrutura entre bacias, em caso de existir. Para tanto foi criada uma matriz de dados de distância geográfica (calculada através de *Google Earth*) e distância genética (F_{st}) entre localidades dentro do Orinoco, localidades dentro do Amazonas, e de localidades entre o Orinoco VS. Amazonas. As estimativas do coeficiente de correlação de Pearson e significância da análise foram elaboradas no programa estatístico MINITAB (Minitab 17, Inc., USA).

Adicionalmente, foi usado o programa BEAST (DRUMMOND et al., 2012) para a determinação do tempo de divergência entre as bacias (DRUMMOND et al., 2006). Assim, foram utilizadas de forma concatenada regiões mitocôndrias de COI e RC de todos os indivíduos de cada localidade.

Os parâmetros escolhidos para as análises dos dados em BEAST incluíram a seleção de modelos de substituição para COI+RC em cada espécie, um relógio

molecular relaxado não correlacionado, adequado para análises no nível populacional. Foi utilizada uma taxa de substituição média de $1,7 \times 10^{-8}$ mutações por sítio por ano para as espécies onde COI+RC foram usados (p. e. NAKANO et al., 2006). Esta taxa surge como a média geométrica das estimativas achadas na literatura para COI e RC em peixes teleósteos. Assim, a taxa de substituição de COI foi definida para este trabalho em $1,4 \times 10^{-8}$ mutações por sítio por ano, derivada de um estudo de peixes teleósteos de Eytan e Hellbery (2010), onde estimavam entre $1,03 - 1,77 \times 10^{-8}$ mutações por sítio por ano. Em relação à RC, foi considerada uma taxa de substituição neutral de $2,0 \times 10^{-8}$ mutações por sítio por ano, estimada para peixes teleósteos por Farias et al. (2010). No caso de *P. altum*, para quem só COI foi utilizado na estimativa dos tempos de divergência (pela impossibilidade de amplificação da RC, ver seção 11.1), foi utilizada a taxa de $1,03 \times 10^{-8}$ mutações por sítio por ano. Para a geração das árvores prévias, foi selecionado um modelo coalescente de Expansão – Crescimento, o qual se adapta às análises intraespecíficas que utilizam modelos biológicos com mudanças no tamanho populacional e ambientes variáveis (GRIFFITHS; TAVARÉ, 1994). Os demais *priors* foram *defaults* sugeridos pelo mesmo programa. A corrida das análises foi feita considerando 200 milhões MCMC. A robustez e validação da corrida foram conferidas através dos valores de ESS (> 300) e autocorrelação dos parâmetros. A convergência das cadeias foi conferida através do programa Tracer dentro do mesmo pacote do BEAST. As informações relacionadas com as árvores obtidas (probabilidade posterior, número de mutações, limites da densidade da probabilidade, etc.), foram sumarizadas pelo programa *TreeAnnotator* assumindo um *burn-in* de 20 milhões, sendo que a árvore foi visualizada e editada no programa *Figtree*, ambos dentro do pacote BEAST.

10.2.2 ADN nuclear: regiões exônicas dos genes Glyt e myh6

Com o objetivo de avaliar a hipótese de que as quebras de conexão populacional e de grupos biológicos (observados no ADNmt) foram no passado recente e não no passado distante das bacias, foi realizada uma análise de determinação de grupos biológicos em BAPS (*Bayesian Analysis of Population Structure*) (CORANDER et al., 2008) utilizando as regiões exônicas dos genes nucleares Glyt e myh6, com reconhecida aplicação em peixes na resolução de reconstruções filogenéticas profundas (THOMPSON et al., 2014). Se tratando de uma análise apenas populacional e não para reconstruções de árvores de espécies, as sequências de Glyt e myh6 foram concatenadas (MOORE, 1995; TOLLIS et al., 2012). Considerando que BAPS realiza análises apenas de haplótipos ou alelos, o banco de dados concatenado foi submetido ao algoritmo PHASE (STEPHENS; SMITH; DONNELLY, 2001) incorporado ao programa DnaSP 5.1 (LIBRADO; ROZAS, 2009) para a obtenção dos alelos de cada um dos indivíduos, e finalmente analisado em BAPS. Os parâmetros de corrida no BAPS foram iguais aos utilizados com ADN mitocondrial (ver seção 10.2.1).

Adicionalmente, foi realizada uma análise de relação filogenética para inferir a distribuição de haplótipos e compartilhamento destes entre bacias, seguindo a metodologia proposta na seção 10.2.1 (ADN mitocondrial) através dos programas Treefinder e posteriormente a visualização destes no programa HaploViewer. Neste caso, as análises filogenéticas foram realizadas sobre os modelos evolutivos HKY+G (B.

rousseauxii), HKY (*C. macropomum*), TVM+G (*P. brachypomus*), TrN+G (*P. metaense/P. tigrinum* e *P. orinocoense/P. punctifer* e *P. axelrodí*), e JC (*N. unifasciatus*) previamente determinados através do programa jModelTest (POSADA, 2008). Espera-se que uma evidência de compartilhamento de alelos entre bacias sugira que estas tiveram conexão até recentemente. Pelo contrário, a ausência de compartilhamento de alelos entre localidades das bacias, sugeriria um isolamento reprodutivo dos indivíduos desde um passado muito distante.

11 RESULTADOS

11.1 ADN mitocondrial

Foram analisados dados de sequências concatenadas (COI+RC) em cada um dos indivíduos das espécies *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense/P. tigrinum*, *P. orinocoense/P. punctifer*, *N. unifasciatus* e *P. axelrodí* nas bacias do Orinoco e Amazonas, obtendo-se um total de 1140, 1116, 1119, 1052, 1059, 1092 e 734 pares de bases, respectivamente. No caso de *P. altum*, foi possível apenas analisar sequências de COI, pois em todas as localidades, exceto Santa Isabel, a espécie apresentou um padrão de duplicação da RC onde pelo menos dois haplótipos eram observados sistematicamente nessa região no eletroferograma, tornando indistinguível o padrão de sequência verdadeiro para esta, inclusive após vários experimentos de amplificação onde se incluíram tentativas com diferentes *primers* e temperaturas de anelamento (dados não mostrados). Portanto, foi apenas analisado COI para esta espécie, se obtendo 471 pares de bases. As características dos dados mitocondriais são mostradas na Tabela 7. A distribuição geográfica de dados mitocôndrias obtidos por espécie pode ser acessada na Tabela 8.

P. axelrodí foi a única espécie mostrando um padrão particular de deleção de bases entre localidades para a RC. Para dita espécie foi obtido um tamanho total bruto da RC correspondente a 350, 230 e 290 pares de bases, respectivamente para as localidades de Santa Isabel/Barcelos (Amazonas), Cucui/Inírida/Puerto Gaitán (Amazonas-Orinoco) e Guaviare (Orinoco); permitindo obter sequências editadas de 259, 190 e 238 pares de bases respectivamente.

Tabela 7. Características do tamanho das sequências de ADN mitocondrial (Citocromo oxidase I - COI e Região controle - RC) para os estudos populacionais e filogeográficos das espécies de peixe das bacias do Orinoco e Amazonas.

Espécie	Tamanho do COI (pb)	Tamanho da RC (pb)	Tamanho total do banco de dados concatenado (pb)**
<i>B. rousseauxii</i>	530	610	1140
<i>C. macropomum</i>	535	581	1116
<i>P. brachypomus</i>	539	580	1119
<i>P. metaense/P. tigrinum</i>	509	543	1052
<i>P. orinocoense/P. punctifer</i>	519	540	1059
<i>N. unifasciatus</i>	515	577	1092
<i>P. axelrodi</i>	470	259* (Santa Isabel/Barcelos) 190* (Cucui/Inírida/Puerto Gaitán) 238* (Guaviare)	734
<i>P. altum</i>	471	-	471

Nota: Todos os tamanhos referem-se a fragmentos após edição e alinhamentos para o conjunto de indivíduos de ambas as bacias. *As diferenças do tamanho dos fragmentos estão associadas a um evento natural de deleção de bases da RC observados entre indivíduos das localidades amostradas. Os tamanhos totais dos dados brutos da RC para *P. axelrodi* só atingiram até 350, 230, e 290 pares de bases respectivamente para Santa Isabel/Barcelos, Cucui/Inírida/Puerto Gaitán e Guaviare. **Refere-se ao tamanho total das sequências do banco de dados após o alinhamento. Isto inclui *gaps*, inserções ou deleções.

Tabela 8. Número de amostras para os dados mitocondriais (Citocromo Oxidase I + Região controle) obtidos por cada localidade e espécie para as bacias do Orinoco e Amazonas.

Espécie	Orinoco								Amazonas									
	SF	CAS	CG	CO	CAR	PL	PG	IN	GV	CUC	SG	SI	BAR	PED	TEF	MAO	BV	
<i>B. rousseauxii</i>	1	2	7	3	11	10		2	9					10	8	9	10	
<i>C. macropomum</i>	1	1	4	11	10	3		10	4					15	12	11		
<i>P. brachypomus</i>	1	1	8	7	5	15		10	15					8	15	8	2	
<i>P. metaense/P. tigrinum</i>	2	2	4	4	9	12		17	9					1	11	7	3	
<i>P. orinocoense/P. punctifer</i>	4	5	10	2	10	12		15	10	5	4	2		16	22	14	10	
<i>N. unifasciatus</i>								10	9	9	11		13	16				
<i>P. axelrodi</i>								8	10	5	7		8	13				
<i>P. altum</i>								8	12	8	12		26					

Nota: A distribuição espacial das amostras para os dados mitocondriais seguiu o critério de maior cobertura possível das áreas de ocorrência natural das espécies dentro das bacias do Orinoco e Amazonas, sempre tentando flanquear as áreas de provável conectividade demográfica entre estas. SF: San Félix, CAS: Castillos, CG: Ciudad Guayana, CO: Caicara del Orinoco, CAR: Puerto Carreño, PL: Puerto López, PG: Puerto Gaitán, IN: Puerto Inírida, GV: San José del Guaviare, CUC: Cucui, SG: São Gabriel da Cachoeira, SI: Santa Isabel, BAR: Barcelos, PED: La Pedrera, TEF: Tefé, MAO: Manaus, BV: Boa Vista.

Para determinar os padrões de estruturação atuais, um dos programas utilizados foi o BAPS, que buscou a determinação de grupos biológicos. Para os peixes migradores como *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense/P. tigrinum*, *P. orinocoense/P. punctifer*, foram determinados respectivamente 4 (log Pr X|K = -872.653), 4 (log Pr X|K = -817.569), 3 (log Pr X|K = -1726,794), 4 (log Pr X|K = 363.967) e 4 (log Pr X|K = -970.185) grupos biológicos (Figura 8A – 12A). Em todos os casos, alguma das duas bacias (nunca as duas simultaneamente) contou com pelo menos um grupo biológico exclusivo, o que já evidencia uma estruturação genética entre elas. Apesar disso, só para o caso de *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. metaense/P. tigrinum* e *P. orinocoense/P. punctifer*, se mostra também o compartilhamento de pelo menos um grupo biológico entre bacias, sugerindo algum tipo de relação reprodutiva de indivíduos atualmente ou num passado recente. No entanto, *P. brachypomus* foi a única espécie que não mostrou compartilhamento de grupos biológicos entre bacias, possuindo um marcado padrão diferencial entre o Orinoco e o Amazonas com 2 e 1 grupos biológicos bem definidos para cada uma respectivamente, sugerindo ausência de fluxo gênico recente ou um isolamento reprodutivo mais histórico entre bacias do que no resto das espécies. BAPS também permitiu observar as localidades no Orinoco cujos indivíduos pertencem a grupos biológicos compartilhados com o Amazonas: Guaviare (GV), Carreño (CAR), Puerto López (PL) e Inírida (IN), assim como as localidades no Amazonas cujos indivíduos pertencem a grupos biológicos compartilhados com o Orinoco: Cucui (CUC), São Gabriel (SG), Santa Isabel (SI), Pedrera (PED), Tefé (TEF), Manaus (MAO) e Boa Vista (BV) (Figura 8 – 12).

Em relação aos peixes sedentários *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*, foram determinados 3 grupos biológicos para cada espécie, com log Pr X|K = -2777.669, -2173.225 e -274,492, respectivamente. Particularmente para as espécies sedentárias, ao contrário das migradoras, cada bacia mostrou possuir, entre 1 e 2 grupos biológicos exclusivos. Exceto *P. altum*, todas as espécies sedentárias mostraram ter um grupo biológico compartilhado entre ambas as bacias. A região de compartilhamento de um mesmo grupo biológico para ditas espécies sempre foi na área de contato mais evidente entre as duas bacias: Alto Rio Negro - Alto Orinoco. Especificamente, este contato é observado com mais força entre as localidades de Cucui (CUC) e Inírida (IN) (Figura 13 – 14).

Para as espécies sedentárias foram observados grupos biológicos exclusivos de localidades geográficas específicas: Guaviare (*P. axelrodi*), Cucui (*P. altum*) e Santa Isabel (*N. unifasciatus* e *P. altum*) (Figura 13A – 15A). Este comportamento não foi observado para peixes migradores, onde os grupos biológicos possuíam indivíduos distribuídos em pelo menos dois locais dentro o entre bacias.

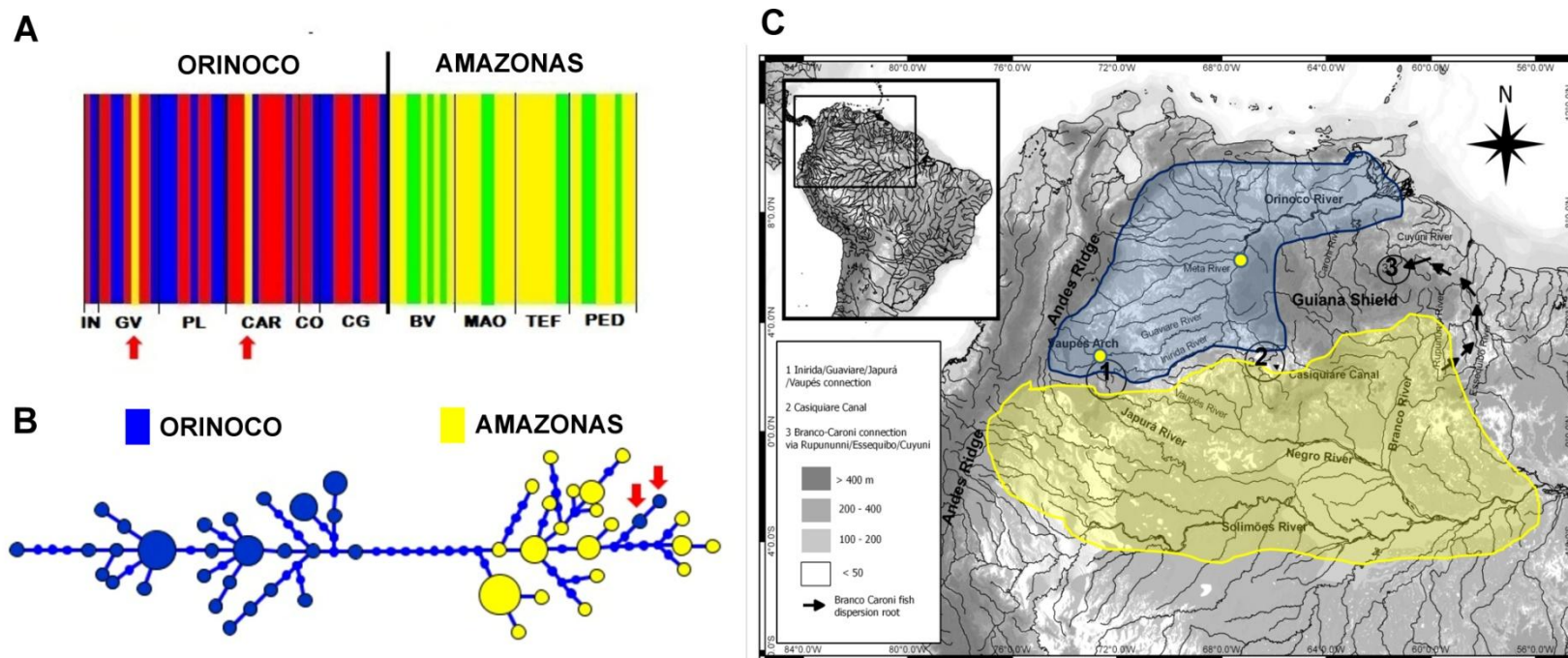


Figura 8. *Brachyplatystoma rousseauxii*: “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). IN: Puerto Inírida; GV: San José del Guaviare; PL: Puerto López; CAR: Puerto Carreño; CO: Caicara del Orinoco; CG: Ciudad Guayana; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. As setas de uma mesma cor permitem relacionar um haplótipo de um grupo biológico na Figura 8A com o mesmo haplótipo na figura 8B. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias determinados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

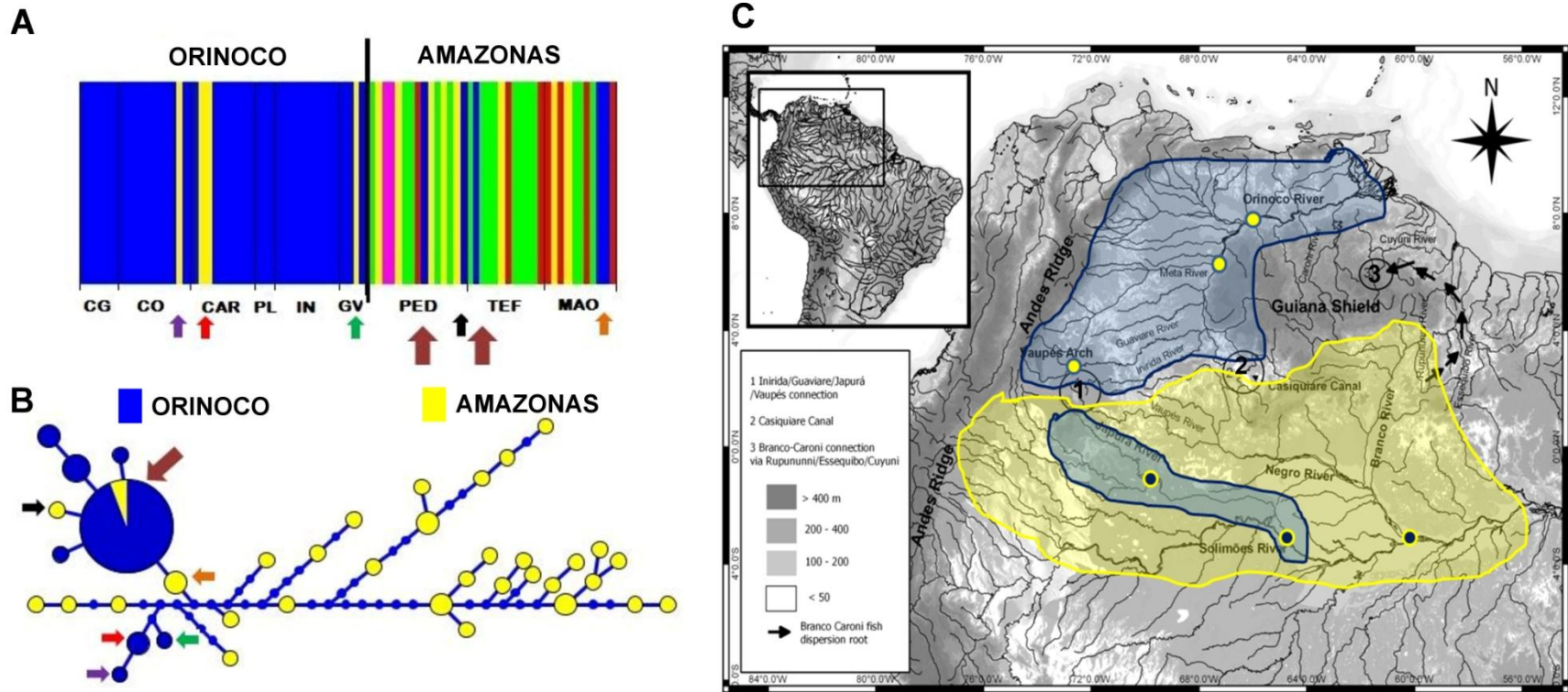


Figura 9. *Colossoma macropomum*. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; CAR: Puerto Carreño; PL: Puerto López; IN: Puerto Inírida; GV: San José del Guaviare; PED: La Pedrera; TEF: Tefé; MAO: Manaus. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. As setas de uma mesma cor permitem relacionar um haplótipo de um grupo biológico na Figura 9A com o mesmo haplótipo na figura 9B. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias mostrados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

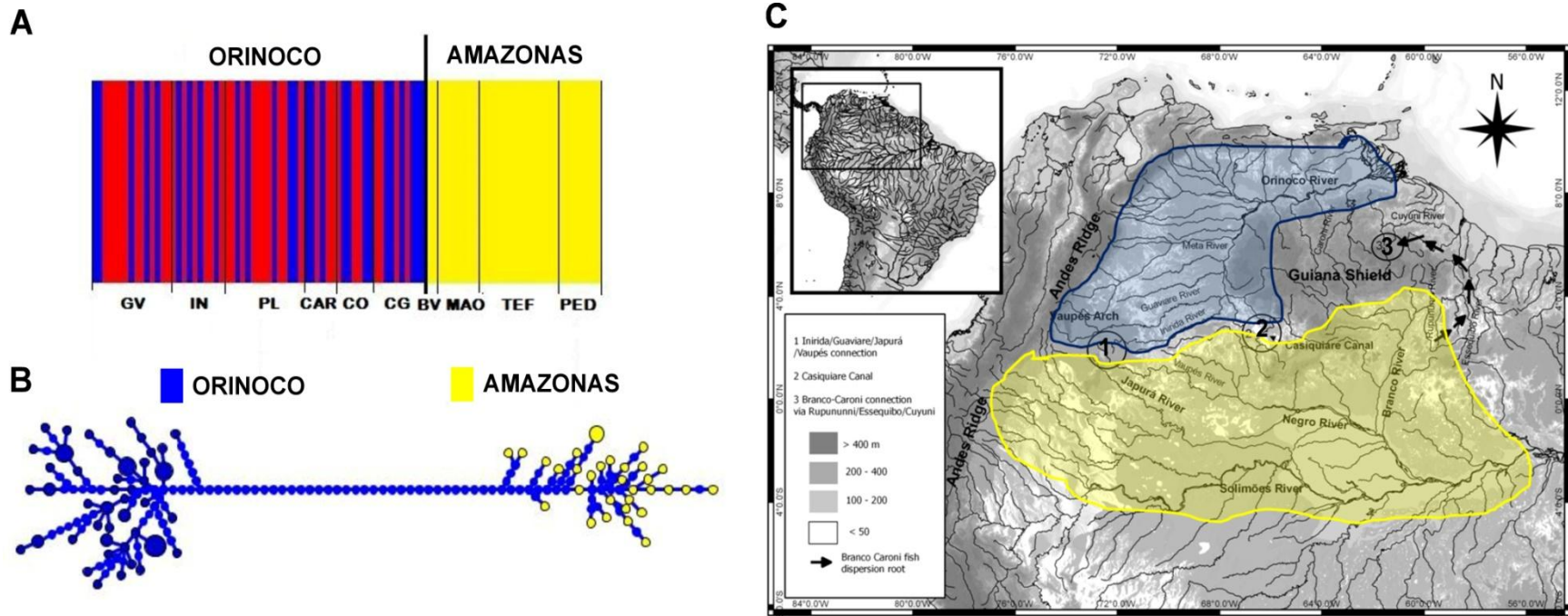


Figura 10. *Piaractus brachypomus*: “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; PL: Puerto López; CAR: Puerto Carreño; CO: Caicara del Orinoco; CG: Ciudad Guayana; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias mostrados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no HaploViewer.

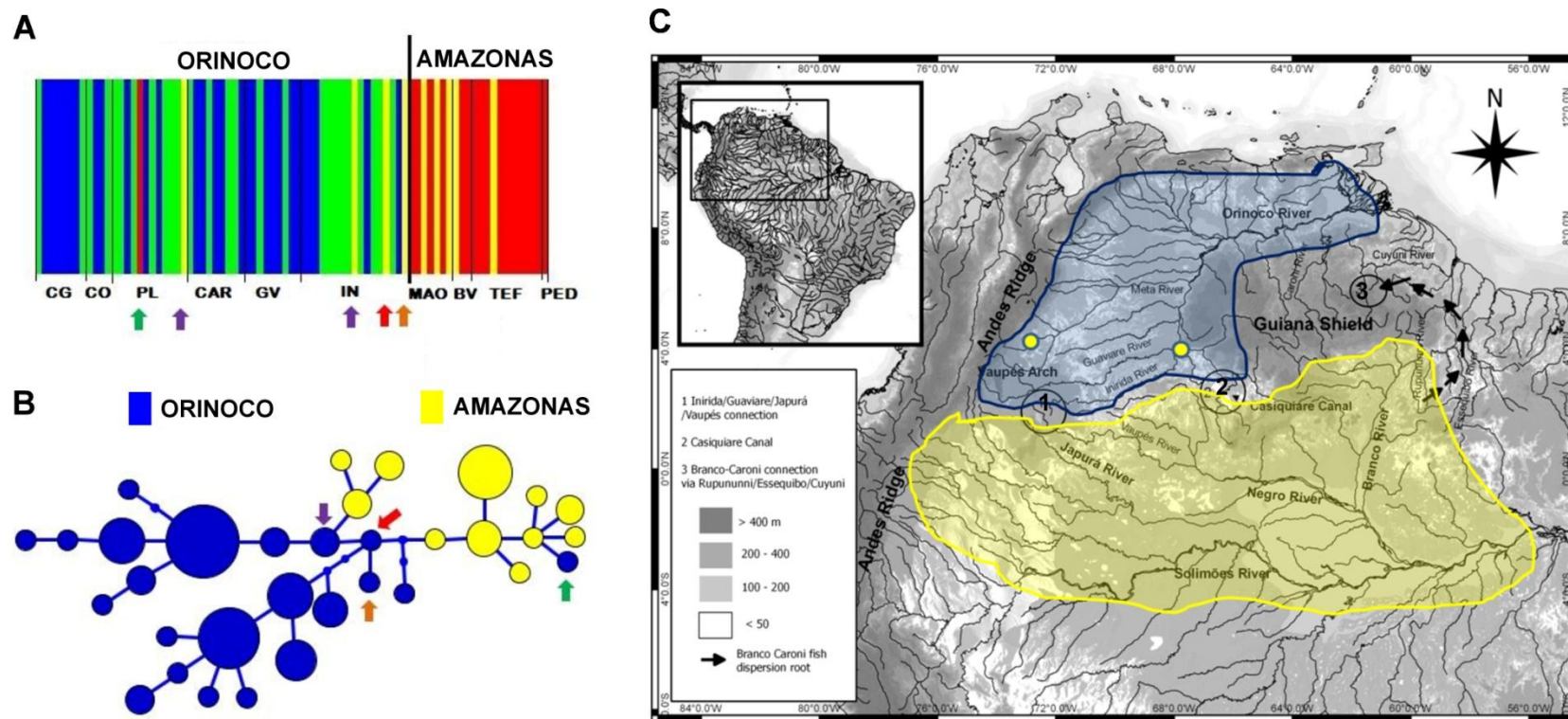


Figura 11. *Pseudoplatystoma metaense*/*Pseudoplatystoma tigrinum*: “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; PL: Puerto López; CAR: Puerto Carreño; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; MAO: Manaus; BV: Boa Vista; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. As setas de uma mesma cor permitem relacionar um haplótipo de um grupo biológico na Figura 11A com o mesmo haplótipo na figura 11B. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias mostrados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

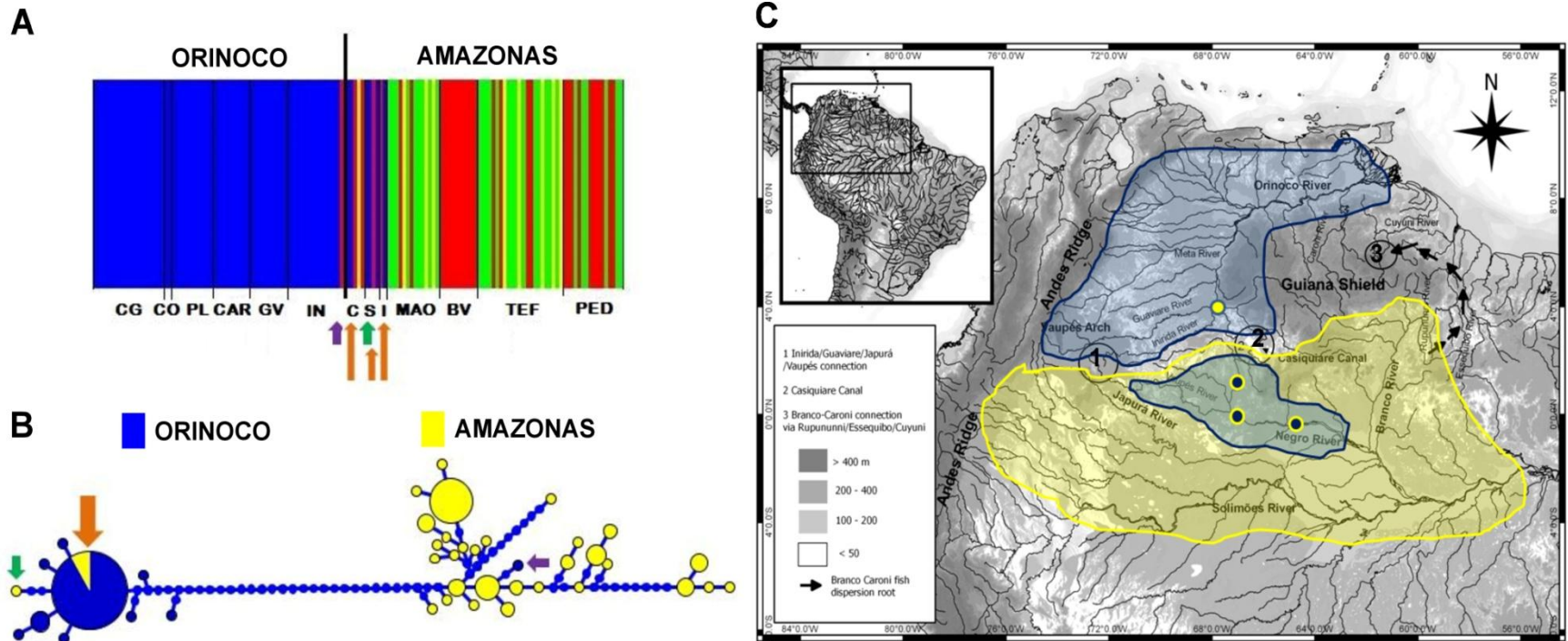


Figura 12. *Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer*. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; PL: Puerto López; CAR: Puerto Carreño; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inirida; C: Cucui; S: São Gabriel da Cachoeira; I: Santa Isabel; MAO: Manaus; BV: Boa Vista; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. As setas de uma mesma cor permitem relacionar um haplótipo de um grupo biológico na Figura 12A com o mesmo haplótipo na figura 12B. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias mostrados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

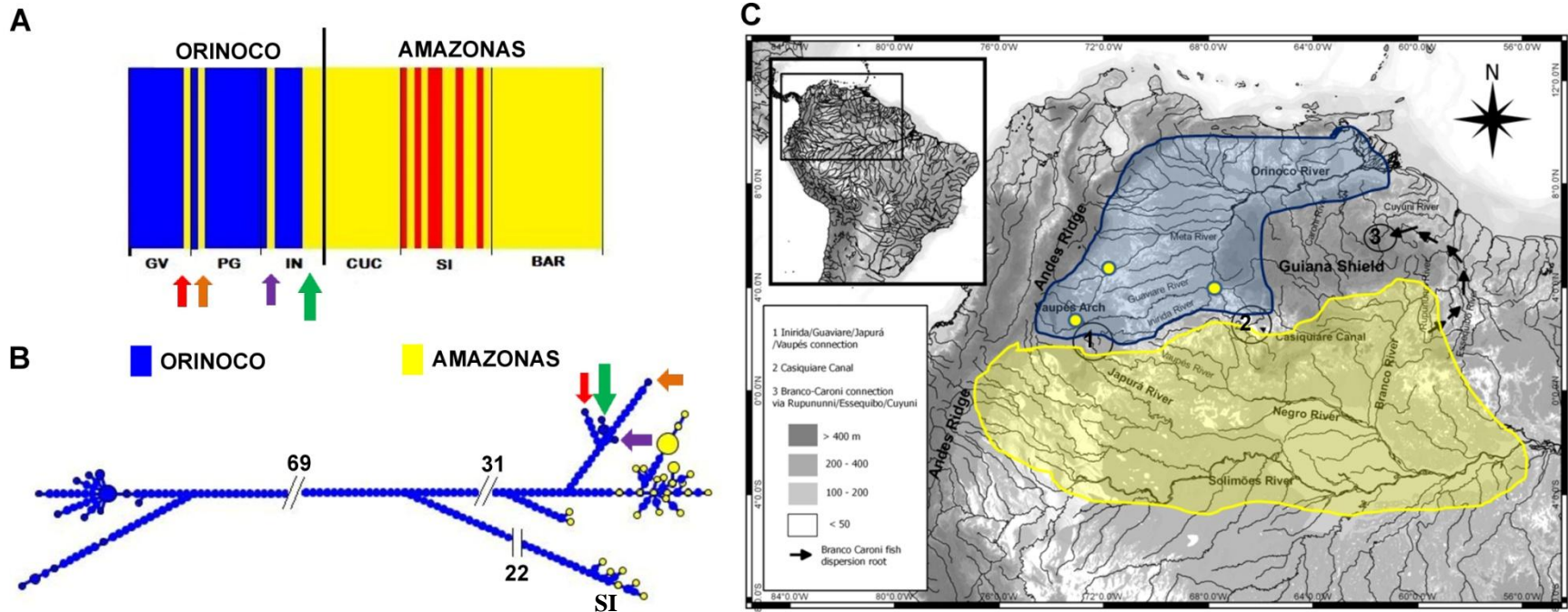


Figura 13. *Nannostomus unifasciatus*: “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). GV: San José del Guaviare; PG: Puerto Gaitán; IN: Puerto Inírida; CUC: Cucui; SI: Santa Isabel; BAR: Barcelos. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. As setas de uma mesma cor permitem relacionar um haplótipo de um grupo biológico na Figura 13A com o mesmo haplótipo na figura 13B. As barras paralelas e os números contíguos indicam apenas uma supressão de um número de passos mutacionais para efeitos estéticos da figura. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias mostrados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

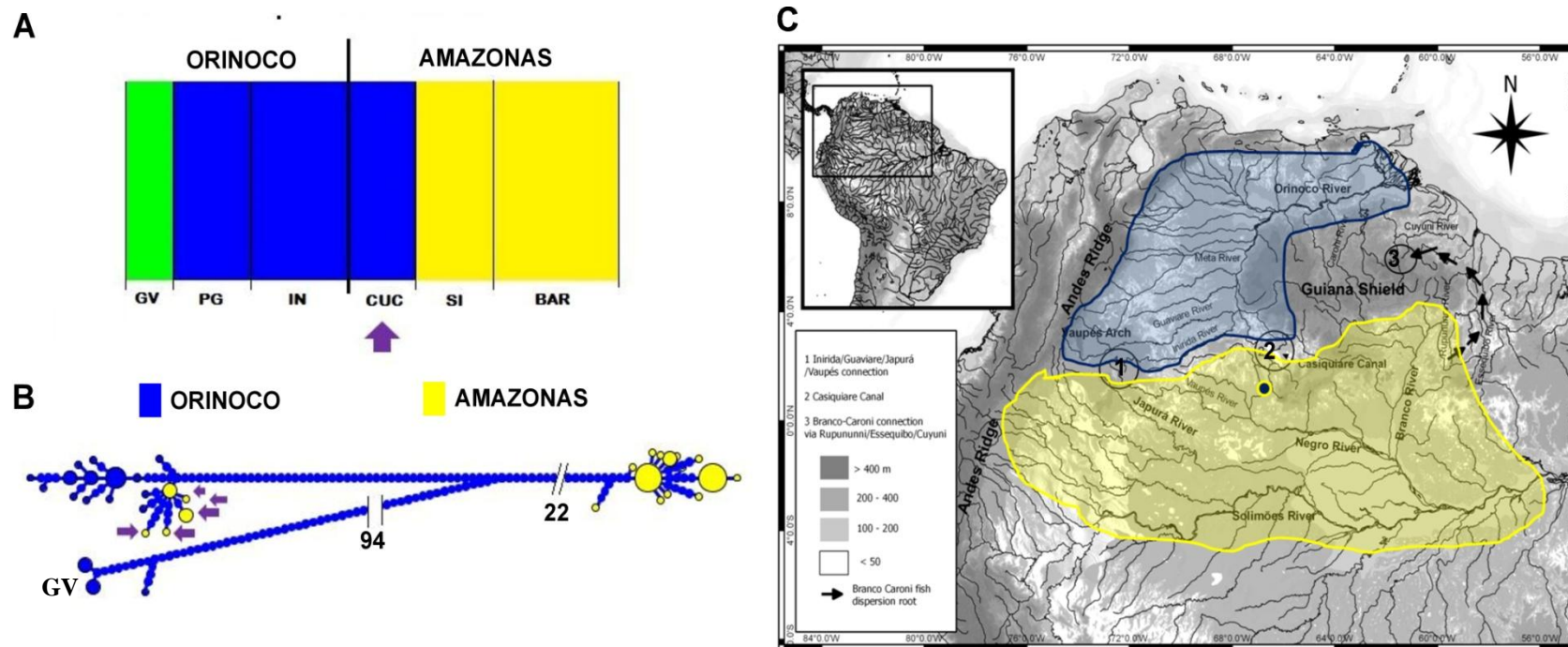


Figura 14. *Paracheirodon axelrodi*: “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). GV: San José del Guaviare; PG: Puerto Gaitán; IN: Puerto Inírida; CUC: Cucui; SI: Santa Isabel; BAR: Barcelos. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. As setas de uma mesma cor permitem relacionar um haplótipo de um grupo biológico na Figura 14A com o mesmo haplótipo na figura 14B. As barras paralelas e os números contíguos indicam apenas uma supressão de um número de passos mutacionais para efeitos estéticos da figura. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias mostrados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

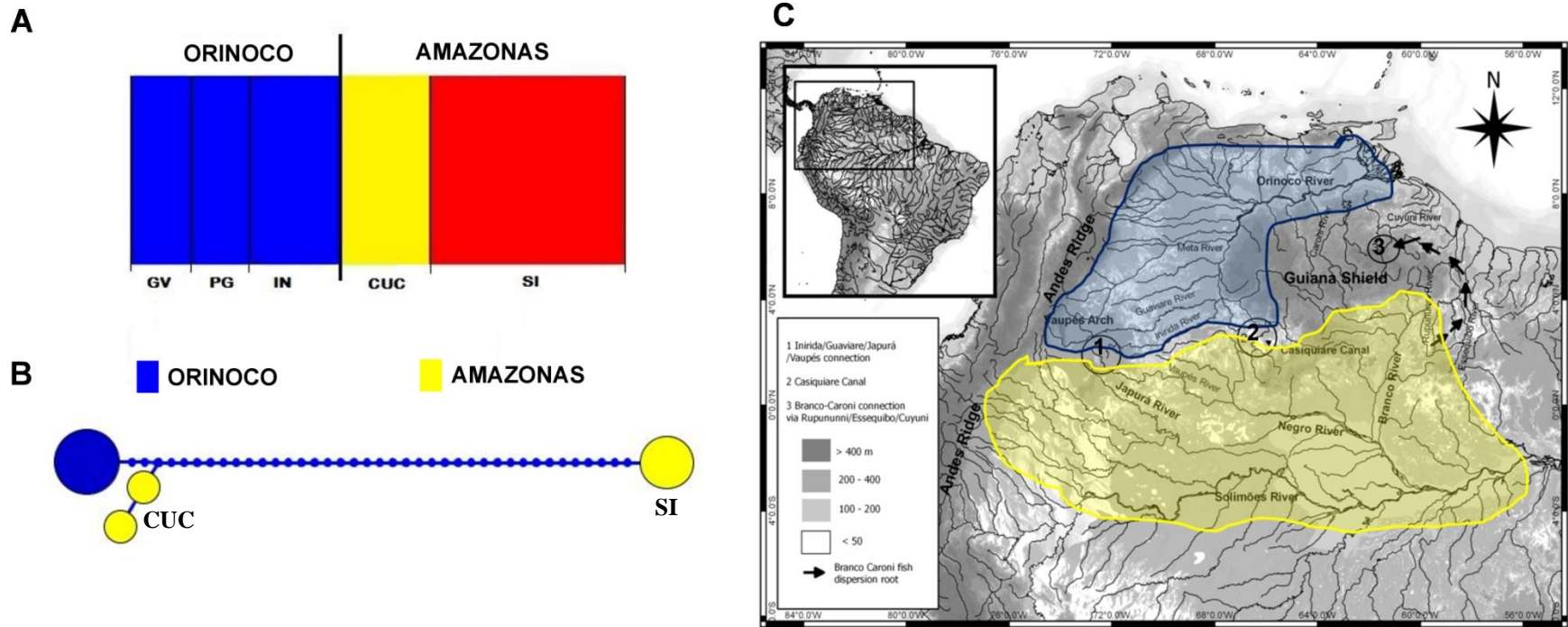


Figura 15. *Pterophyllum altum*: “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando regiões mitocondriais concatenadas (COI e Região Controle) gerado no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. Na figura são ressaltados os indivíduos que pertencem a grupos biológicos compartilhados entre bacias (setas). GV: San José del Guaviare; PG: Puerto Gaitán; IN: Puerto Inirida; CUC: Cucui; SI: Santa Isabel; BAR: Barcelos. “B”, Relação filogenética e distribuição de haplótipos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento atual de haplótipos entre bacias. As setas de uma mesma cor permitem relacionar um haplótipo de um grupo biológico na Figura 15A com o mesmo haplótipo na figura 15B. As barras paralelas e os números contíguos indicam apenas uma supressão de um número de passos mutacionais para efeitos estéticos da figura. “C”, Localização geográfica de haplótipos pertencentes a grupos biológicos comuns entre bacias mostrados pelo BAPS (a cor do círculo indica a origem ancestral do haplótipo: Amarelo se é do Amazonas e Azul se é do Orinoco). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de haplótipos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

O programa HaploViewer, que permitiu a determinação da distribuição espacial e compartilhamento atual de haplótipos entre as bacias do Orinoco e Amazonas (tomando como base uma árvore filogenética), mostrou que para as espécies migradoras *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense/P. tigrinum* e *P. orinocoense/P. punctifer*, existem 50, 40, 75, 33 e 41 haplótipos totais, respectivamente. Em relação aos peixes sedentários *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*, foram determinados 48, 36 e 4 haplótipos totais, respectivamente para cada espécie.

No caso das espécies *B. rousseauxii*, *P. brachypomus* e *P. metaense/P. tigrinum*, não existe nenhum compartilhamento de haplótipos atualmente entre as bacias do Orinoco e o Amazonas. Apesar disso, das três espécies, só *P. brachypomus* mostrou monofilia recíproca completa entre bacias, com até 32 passos mutacionais entre grupos de haplótipos. Situação contrária ocorre para as espécies *C. macropomum* e *P. orinocoense/P. punctifer*, as quais mostram compartilhamento de um haplótipo entre bacias (Figura 8B – 12B; Figura 8C – 12C). No caso de *C. macropomum*, o haplótipo compartilhado tem uma origem ancestral no Amazonas, enquanto que em *P. orinocoense/P. punctifer*, o haplótipo parece ter uma origem no Orinoco, sendo achado em indivíduos coletados no Amazonas. La Pedrera e Tefé (Amazonas) foram os únicos locais onde foi achado o haplótipo compartilhado com o Orinoco para *C. macropomum*; enquanto que Cucui (Alto Rio Negro – Amazonas) foi o único local onde foi achado o haplótipo compartilhado com o Orinoco para a espécie *P. orinocoense/P. punctifer*.

Contrário a alguns migradores, os peixes sedentários não apresentaram compartilhamento de haplótipos entre bacias (Figura 13B – 15B; Figura 13C – 15C). De fato, foi o grupo de peixes onde mais se evidenciou um número de passos mutacionais elevado, inclusive dentro das próprias bacias. Para *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*, existem 97, 83 e 39 passos mutacionais entre o ancestral comum para a maior parte dos haplótipos do Orinoco e o ancestral comum para a maior parte dos haplótipos do Amazonas. Dentro de uma mesma bacia, *P. altum*, por exemplo, mostrou 39 passos mutacionais entre CUC e SI. Dentro de uma mesma localidade, podemos encontrar diferenças de 170 passos mutacionais (*N. unifasciatus*: p. e. em GV - Orinoco), 181 (*P. axelrodi*: p. e. em GV - Orinoco) e 109 passos mutacionais (*N. unifasciatus*: p. e. em SI - Amazonas). *N. unifasciatus*, na localidade de Puerto Inírida (IN) no Orinoco, apresentou alguns haplótipos filogeneticamente mais relacionados com o Amazonas do que com haplótipos da sua própria localidade ou bacia. No caso de *P. axelrodi* e *P. altum*, na localidade de Cucui (CUC) no Amazonas, apresentaram haplótipos filogeneticamente mais relacionados ao Orinoco do que aos haplótipos da sua própria bacia (Figura 13B – 15B; Figura 13C – 15C).

Por outro lado, foi determinada a estrutura genética entre localidades do Orinoco utilizando o índice Φ_{st} , que é análogo ao F_{st} , e usado para genes do ADNmt (WEIR; COCKERHAM, 1984). Cabe aclarar que para todas as espécies migradoras, as localidades de Ciudad Guayana (CG), San Félix (SF) e Castillos (CAS), foram agrupadas para estas análises (daqui em diante, denominada como CG), pois nenhuma delas atingiu por si só um “n” amostral representativo. O mesmo princípio foi aplicado às localidades de Puerto Inírida (IN) + San José del Guaviare (GV) para *B. rousseauxii*; Manaus (MAO) + Boa Vista (BV) para *P. brachypomus*; Tefé (TEF) + La Pedrera (PED) e Manaus (MAO) + Boa Vista (BV) para *P. tigrinum*; Caicara del Orinoco (CO) + Ciudad Guayana (CG) + San Félix (SF) + Castillos (CAS) para *P. orinocoense*; e São Gabriel da Cachoeira (SG) + Santa Isabel (SI) para *P. punctifer*.

Para as espécies *B. rousseauxii* e *C. macropomum* foi possível observar que tanto para as localidades do Orinoco quanto do Amazonas, as mesmas possuem um alto grau de fluxo gênico, constatando-se que cada bacia se comporta como uma unidade panmítica (Tabela 8 - 9). Dentro do Orinoco, por exemplo, podemos observar $F_{st} = 0,0$ ($P > 0,05$) para *B. rousseauxii* entre todas as localidades comparadas, o que não permite rejeitar a hipótese nula de panmixia. Para a mesma bacia, em relação a *C. macropomum*, as variações foram maiores entre localidades, apresentando F_{st} entre 0 e 0,33; embora, com valores de significância que não permitem rejeitar a hipótese nula de panmixia ($P > 0,05$) (Tabela 8 – 9). Quando observamos as comparações entre localidades do Orinoco Vs. Amazonas para estas duas espécies, podemos observar que os valores de F_{st} se elevam: 0,53 a 0,71 (para *B. rousseauxii*) e 0,22 a 0,58 (para *C. macropomum*), com valores significativos ($P < 0,0001$ e $P < 0,05$, respectivamente para cada espécie) (Tabela 8 – 9).

Em relação a *P. brachypomus* e *P. metaense/P. tigrinum*, estas foram as únicas espécies migradoras a apresentar estrutura de forma simultânea dentro das duas bacias (Tabela 10 – 11). Dentro do Orinoco, por exemplo, *P. brachypomus* mostrou-se estruturada na localidade de Puerto López (PL) com relação ao resto das localidades desse rio, onde foram observados valores de F_{st} variando de 0,07 a 0,17 ($P < 0,05$). Ciudad Guayana (CG), a população do delta do Orinoco, se mostrou panmítica unicamente com Caicara do Orinoco (CO), Puerto Carreño (CAR) e Puerto Inírida (IN), com F_{st} variando de 0,0 a 0,08 ($P > 0,05$). Outras localidades que mostraram estar em panmixia foram CO, CAR, Guaviare (GV) e IN, apresentando F_{st} variando de 0,0 a 0,093 ($P > 0,05$) (Tabela 10). Em relação ao Amazonas, *P. brachypomus* mostrou que Boa Vista (BV) forma uma unidade panmítica com a população de Manaus (MAO) ($P > 0,05$), embora, apresenta uma estruturação significativa com o resto do Amazonas: Tefé (TEF) e La Pedrera (PED), com F_{st} de 0,16 e 0,19 respectivamente ($P < 0,05$). Contrário a isso, MAO, TEF e PED se mostraram com uma unidade panmítica, apresentando F_{st} variando de 0,0 a 0,011 ($P > 0,05$) (Tabela 10).

Quando comparamos as populações entre bacias para *P. brachypomus*, encontramos que o Orinoco é completamente estruturado em relação ao Amazonas, com valores de F_{st} que vão desde 0,82 até 0,86 ($P < 0,05$), o que permite rejeitar a hipótese nula de panmixia entre ambas as bacias para esta espécie.

Tabela 8. Estimativas de F_{st} dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Brachyplatystoma rousseauxii*.

	CG	CAR	PL	GV	BV	MAO	TEF	PED
CG	-	0,0000	0,0000	0,0000	0,6089	0,6606	0,6321	0,6429
CAR		-	0,0197	0,0000	0,5424	0,5935	0,5594	0,5757
PL			-	0,0000	0,6496	0,7100	0,6819	0,6897
GV				-	0,5339	0,5908	0,5573	0,5740
BV					-	0,0000	0,0000	0,0000
MAO						-	0,0000	0,0000
TEF							-	0,0000
PED								-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0,05$. CG: Ciudad Guayana; CAR: Puerto Carreño; PL: Puerto López; GV: San José del Guaviare; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera.

Tabela 9. Estimativas de Fst dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Colossoma macropomum*.

	CG	CO	CAR	PL	GV	IN	MAO	TEF	PED
CG	-	0,0000	0,1180	0,3359	0,1111	0,0000	0,4025	0,5251	0,3396
CO		-	0,0176	0,0355	0,0000	0,0000	0,4236	0,5473	0,3620
CAR			-	0,0000	0,0000	0,1336	0,3188	0,4556	0,2789
PL				-	0,0000	0,1177	0,2984	0,4477	0,2672
GV					-	0,0909	0,2599	0,4061	0,2229
IN						-	0,4592	0,5782	0,3922
MAO							-	0,0533	0,0113
TEF								-	0,0401
PED									-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0.05$.
CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; CAR: Puerto Carreño; PL: Puerto López; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera.

Tabela 10. Estimativas de Fst dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Piaractus brachypomus*.

	CG	CO	CAR	PL	GV	IN	BV	MAO	TEF	PED
CG	-	0,0000	0,0000	0,1716	0,1358	0,0838	0,8362	0,8411	0,8408	0,8334
CO		-	0,0000	0,0777	0,0660	0,0000	0,8575	0,8537	0,8491	0,8441
CAR			-	0,1378	0,0934	0,0631	0,8253	0,8320	0,8340	0,8217
PL				-	0,1378	0,1059	0,8542	0,8544	0,8496	0,8485
GV					-	0,0000	0,8559	0,8557	0,8503	0,8495
IN						-	0,8483	0,8485	0,8449	0,8408
BV							-	0,1266	0,1608	0,1942
MAO								-	0,0000	0,0000
TEF									-	0,0115
PED										-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0.05$.
CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; CAR: Puerto Carreño; PL: Puerto López; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera.

Com relação a *P. metaense/P. tigrinum*, pode se observar que dentro do Orinoco, CG forma uma unidade panmítica só com CO, CAR e GV, se obtendo Fst entre 0,02 e 0,09 ($P > 0,05$). Ao mesmo tempo, PL não se encontra isolada do resto do Orinoco, pois se observa formando uma população panmítica com CO, CAR e IN, mostrando valores de Fst desde 0,0 até 0,07 ($P > 0,05$). Também foi determinado que CO, CAR, GV e IN formam uma unidade panmítica, atingindo valores de Fst que vão de 0,0 até 0,06 ($P > 0,05$) (Tabela 11). Por outro lado, quando observamos o interior da bacia Amazônica, podemos encontrar que BV possui um comportamento de estruturação similar ao achado em *P. brachypomus*. Os indivíduos desta localidade possuem uma forte estrutura em relação a TEF+PED (Fst = 0,34; $P < 0,05$), no entanto, se acharam em panmixia com os indivíduos de MAO (Fst = 0,0; $P > 0,05$). Por sua vez, MAO, a exemplo de BV, demonstrou estar estruturado em relação a TEF+PED (Fst = 0,25; $P < 0,05$) (Tabela 11).

Realizando as comparações entre as diferentes populações da bacia do Orinoco e do Amazonas para esta espécie, foi possível observar que quase todas as localidades

do Orinoco possuem uma alta estruturação com respeito às localidades do Amazonas, com valores de F_{st} variando desde 0,19 até 0,62 ($P < 0,05$). Apesar disso, este comportamento não foi geral, pois para localidades como CO e BV, não foi possível rejeitar a hipótese nula de panmixia ($P > 0,05$).

As análises de F_{st} para *P. orinocoense*/*P. punctifer* no interior do Orinoco, demonstraram que esta bacia se comporta como uma unidade panmítica, registrando valores de F_{st} que vão de 0,0 até 0,045 ($P > 0,05$) (Tabela 12). Caso contrário acontece para o Amazonas. Ali, BV possui uma grande estrutura com respeito ao resto das localidades desta bacia: Cucui (CUC), São Gabriel da Cachoeira (SG)+Santa Isabel (SI), MAO, TEF e PED, alcançando valores de F_{st} entre 0,41 até 0,98 ($P < 0,05$). Da mesma maneira, tanto CUC quanto SG+SI (as quais formaram uma unidade panmítica: $F_{st} = 0,0$; $P > 0,05$) mostraram uma forte estrutura com respeito do resto das localidades da bacia Amazônica. Ditos valores de F_{st} oscilaram entre 0,35 e 0,65 ($P < 0,05$). TEF e MAO se comportaram como uma unidade panmítica ($F_{st} = 0,0$; $P > 0,05$). Apesar de que PED apresentou baixos valores de estruturação só com relação a TEF e MAO ($F_{st} = 0,10$ e $0,11$ respectivamente), estes foram significativos ($P < 0,05$), sendo possível rejeitar a hipótese nula de panmixia entre elas, assim como com o resto das localidades da mesma bacia, apresentando valores de F_{st} maiores, oscilando entre 0,43 até 0,63 ($P < 0,05$) (Tabela 12).

Quando comparamos as bacias para *P. orinocoense*/*P. punctifer*, podemos encontrar alto nível de estruturação, evidenciados em valores de F_{st} entre localidades de 0,26 até 0,97, todos significativos ($P < 0,05$). Embora, quando retiradas da análise às localidades de CUC e SG+SI, ou seja, tirando o Rio Negro, podemos observar um grau de estruturação ainda maior entre bacias, atingindo valores de F_{st} de 0,87 até 0,97, altamente significativos ($P < 0,0001$) (Tabela 12).

Tabela 11. Estimativas de F_{st} dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Pseudoplatystoma metaense*/*Pseudoplatystoma tigrinum*.

	CG	CO	CAR	PL	GV	IN	BV	MAO	TEF+PED
CG	-	0,0880	0,0747	0,2466	0,0190	0,3872	0,4001	0,3914	0,6100
CO		-	0,0000	0,0000	0,0000	0,0580	0,2610	0,2386	0,5950
CAR			-	0,0671	0,0000	0,1095	0,3920	0,3528	0,6177
PL				-	0,1718	0,0000	0,2422	0,1886	0,4942
GV					-	0,3001	0,4055	0,3725	0,5964
IN						-	0,3257	0,2572	0,5738
BV							-	0,0000	0,3443
MAO								-	0,2501
TEF									-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0,05$. CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; CAR: Puerto Carreño; PL: Puerto López; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF+PED: Tefé + La Pedrera.

Tabela 12. Estimativas de F_{st} dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer*.

	CG	CAR	PL	GV	IN	CUC	SG+SI	BV	MAO	TEF	PED
CG	-	0,0479	0,0000	0,0000	0,0000	0,6865	0,4164	0,9778	0,9134	0,9012	0,9329
CAR		-	0,0178	0,0333	0,0450	0,5417	0,2573	0,9470	0,8705	0,8670	0,8988
PL			-	0,0000	0,0000	0,5978	0,3216	0,9815	0,8963	0,8865	0,9228
GV				-	0,0000	0,6441	0,3719	0,9813	0,9054	0,8941	0,9286
IN					-	0,5854	0,3103	0,9838	0,8948	0,8853	0,9224
CUC						-	0,0000	0,4153	0,3495	0,4213	0,4349
SG+SI							-	0,6659	0,6002	0,6490	0,6638
BV								-	0,4141	0,4154	0,4467
MAO									-	0,0000	0,1142
TEF										-	0,1040
PED											-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0.05$. CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; CAR: Puerto Carreño; PL: Puerto López; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; CUC: Cucui; SG+SI: Sao Gabriel da Cachoeira + Santa Isabel; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera.

Em relação aos peixes sedentários, foi observado na maior parte deles um alto grau de estruturação genética, sendo que quase todas as localidades amostradas estavam isoladas reprodutivamente das outras em níveis altamente significativos. Por exemplo, para *N. unifasciatus*, foi observado que dentro do Orinoco a localidade de IN está estruturada com respeito à GV ($F_{st} = 0,28$) e PG ($F_{st} = 0,31$), em ambos os casos de forma altamente significativa ($P < 0,0001$). Apesar disso, foi observada panmixia entre GV e Puerto Gaitán (PG) ($F_{st} = 0,0$; $P > 0,05$). Contrário ao Orinoco, quando analisamos o Amazonas, foi observado que não existe ligação entre nenhuma das localidades (F_{st} entre 0,40 até 0,50; $P < 0,0001$) e sim uma significativamente alta estrutura entre todas elas (Tabela 13). Do mesmo modo, quando comparamos as localidades do Orinoco e o Amazonas, é possível observar também uma estrutura altamente significativa, com valores de F_{st} variando de 0,39 até 0,89 ($P < 0,0001$) (Tabela 13).

Por outro lado, ao examinar a estrutura genética de *P. axelrodi* no interior do Orinoco, foi visível que as únicas duas populações em panmixia foram PG e IN ($F_{st} = 0,06$; $P > 0,05$), mas pôde-se observar ao mesmo tempo um alto grau de isolamento de GV em relação a estas duas primeiras localidades, com as quais GV atingiu um F_{st} de 0,98 e 0,96 ($P < 0.05$), respectivamente (Tabela 14). Dentro do Amazonas, ao contrário do Orinoco, cada localidade resultou altamente estruturada, se observando um F_{st} entre 0,39 e 0,98 ($P < 0,0001$). Assim também, quando foi analisado o F_{st} entre bacias, conseguimos observar uma variação entre localidades de 0,38 até 0,98, indicando uma estrutura altamente significativa ($P < 0,0001$). Estes níveis de estruturação, apesar de menores em áreas próximas entre bacias (CUC e IN), atingindo valores de 0,38 ($P < 0,0001$), continuam demonstrando uma falta de conexão para esta espécie entre o Orinoco e o Amazonas (Tabela 14).

Tabela 13. Estimativas de Fst dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Nannostomus unifasciatus*.

	BAR	SI	CUC	IN	PG	GV
BAR	-	0,3674	0,4977	0,5542	0,8715	0,8610
SI		-	0,3978	0,3917	0,6946	0,6741
CUC			-	0,5552	0,8904	0,8795
IN				-	0,3109	0,2758
PG					-	0,0000
GV						-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0.05$.
 BAR: Barcelos; SI: Santa Isabel; CUC: Cucui; IN: Puerto Inírida; PG: Puerto Gaitán; GV: San José del Guaviare.

Tabela 14. Estimativas de Fst dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Paracheirodon axelrodi*.

	BAR	SI	CUC	IN	PG	GV
BAR	-	0,3860	0,9802	0,9722	0,9838	0,9780
SI		-	0,9761	0,9665	0,9812	0,9721
CUC			-	0,3784	0,7128	0,9715
IN				-	0,0577	0,9573
PG					-	0,9778
GV						-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0.05$.
 BAR: Barcelos; SI: Santa Isabel; CUC: Cucui; IN: Puerto Inírida; PG: Puerto Gaitán; GV: San José del Guaviare.

Para *P. altum*, apesar de utilizar apenas a região parcial do gene COI, foi possível estabelecer grandes diferenças entre as diferentes localidades. Por exemplo, dentro do Amazonas, as localidades de Santa Isabel (SI) e Barcelos (BAR) mostraram um alto grau de estruturação genética ($F_{st} = 0,99$; $P < 0,0001$). Ao contrario, dentro do Orinoco observou-se completa panmixia entre as localidades, com um $F_{st} = 0,0$ entre todas as comparações para a par ($P < 0,05$) (Tabela 15). Do mesmo modo, quando comparamos o Orinoco (uma unidade panmítica) com o Amazonas, é evidente o alto grau de estruturação entre localidades pertencentes a estas duas bacias. Assim, puderam ser observados valores de F_{st} variando de 0,91 até 1,00 ($P < 0,0001$), deixando clara a ausência de conexão entre estes dois grandes sistemas aquáticos para a espécie *P. altum* (Tabela 15).

Para determinar a existência de expansão populacional recente dentro das bacias, foi realizado o teste de neutralidade de Tajima no programa Arlequin. Como resultado, observou-se que apenas para *C. macropomum*, *P. orinocoense*/*P. punctifer* e *N. unifasciatus* houve expansão populacional recente, em todos os casos só para a bacia ou locais do Orinoco. Para os migradores como *C. macropomum*, o estimador “D” de Tajima foi igual a -1,93406 ($P < 0,05$), enquanto que no caso de *P. orinocoense*/*P. punctifer* foi de -1,96578 ($P < 0,05$). Em relação ao sedentário *N. unifasciatus*, as expansões recentes se deram nas localidades de Puerto Gaitán (PG) (-2,11425; $P < 0,05$) e San José del Guaviare (GV) (-1,90283; $P < 0,05$).

Tabela 14. Estimativas de Fst dentro e entre as localidades do Orinoco e Amazonas para a espécie *Pterophyllum altum*.

	SI	CUC	IN	PG	GV
SI	-	0,9943	0,9999	0,9999	0,9999
CUC		-	0,9354	0,9233	0,9153
IN			-	0,0000	0,0000
PG				-	0,0000
GV					-

Nota: Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0.05$. BAR: Barcelos; SI: Santa Isabel; CUC: Cucui; IN: Puerto Inírida; PG: Puerto Gaitán; GV: San José del Guaviare.

Por outro lado, no intuito de observar se a distância geográfica era a responsável por estar modelando a estrutura genética destas espécies dentro e entre as bacias, foi realizado um Teste de Mantel. Quando foram comparadas as localidades do Orinoco VS. as localidades do Amazonas para os peixes migradores, foi possível observar que a distancia geográfica não era a responsável da estrutura entre bacias para as espécies *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. metaense/P. tigrinum* e *P. brachypomus*, mas sim para *P. orinocoense/P. punctifer* (Tabela 16). Dentro da bacia do Amazonas, não foi possível testar a hipótese de Isolamento por Distância (IBD) para *B. rousseauxii* e *C. macropomum*, devido ao seu estado de panmixia dentro desta bacia. No entanto, para *P. metaense/P. tigrinum* e *P. brachypomus* a distância não explica a estruturação genética, enquanto que para *P. orinocoense/P. punctifer* sim, embora, com um muito baixo valor de correlação entre as variáveis ($< 0,6$) (Tabela 16). Com respeito ao Orinoco, não foi possível testar a hipótese de IBD para *B. rousseauxii*, *C. macropomum* e *P. orinocoense/P. punctifer* devido ao seu estado de panmixia dentro desta bacia. No entanto, para *P. metaense/P. tigrinum* foi possível evidenciar que a distância geográfica não é a responsável pela estrutura genética observada, mas sim para *P. brachypomus* dentro desta mesma bacia (Tabela 16).

Em relação aos peixes sedentários, a hipótese de IBD entre o Amazonas e o Orinoco não foi rejeitada para *P. axelrodi*, mas sim para *N. unifasciatus* e *P. altum* (Tabela 16). Quando observamos dentro do Amazonas, *N. unifasciatus* apresenta uma distância genética entre localidades explicada pela distância geográfica, embora, não aconteceu o mesmo para *P. axelrodi*, sendo que o IBD não existe no seu caso. Para *P. altum* não foi possível testar dita hipótese pelo baixo número de localidades amostradas no Amazonas ($n = 2$). Em relação ao Orinoco, a distância geográfica não explicou as distâncias genéticas observadas entre as diferentes localidades para nenhuma das espécies sedentárias (*N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*) (Tabela 16).

Tabela 16. Teste de isolamento por distância (IBD) para as espécies de peixes migradores e sedentários das bacias do Orinoco e Amazonas.

		Amazonas	Orinoco	Amazonas VS. Orinoco
Espécies sedentárias	<i>N. unifasciatus</i>	0,980	0,916	0,477
	<i>P. axelrodi</i>	0,522	0,304	0,782
	<i>P. altum</i>	-	0,330	0,548
Espécies migradoras	<i>B. rousseauxii</i>	Panmítica	Panmítica	0,394
	<i>C. macropomum</i>	Panmítica	Panmítica	0,284
	<i>P. brachypomus</i>	0,655	0,715	0,101
	<i>P. metaense/P. tigrinum</i>	0,539	0,111	0,487
	<i>P. orinocoense/P. punctifer</i>	0,590	Panmítica	0,734

Nota: Os valores dentro da tabela se referem ao coeficiente de correlação de Pearson para as variáveis: distância genética (Fst) e distância geográfica. Os valores ressaltados em negrito indicam um valor de significância estatística $P < 0.05$ para o teste de IBD. O traço (-) indica que o coeficiente não pôde ser calculado por causa do baixo “n” amostral (< 3).

Em outro sentido, quando foi avaliado o tempo de divergência para as espécies migradoras entre as bacias do Orinoco e o Amazonas, foi determinado que para ditas espécies os tempos de divergência foram desde 1,529 milhões de anos até aproximadamente 47 mil anos. Divergências que incluíram contatos secundários posteriores, e inclusive até a impossibilidade de detectar tempo de divergência algum entre bacias por causa de divergência num passado muito recente (p. e. *C. macropomum*) (Tabela 17).

Assim, por exemplo, a espécie migradora com maior tempo de divergência entre o Orinoco e o Amazonas foi *P. brachypomus* (1,529 milhões de anos) (Apêndice 2), seguido de *P. orinocoense/P. punctifer* (sem incluir os “híbridos” do Rio Negro) com 1,053 milhões de anos (Apêndice 3).

Tabela 17. Tempos de divergência (baseados no ADNmt) entre populações de peixes migradoras para as bacias do Orinoco e Amazonas.

Espécie	Tempos de divergência (milhões de anos)			Fluxo gênico atual entre bacias?
	Orinoco VS. Amazonas			
	1 ^a divergência	2 ^a divergência	3 ^a divergência	
<i>B. rousseauxii</i>	0,511			Não
<i>C. macropomum</i>	N/C			Não
<i>P. brachypomus</i>	1,529			Não
<i>P. metaense/P. tigrinum</i>	0,188	0,088	0,047	Não
<i>P. orinocoense/P. punctifer</i>	1,053			Sim

Nota: 1^a, 2^a, e 3^a divergências fazem referência a diferentes momentos de quebra ou isolamento populacional entre bacias com possíveis contatos secundários (incursões) entre estes períodos de tempo. N/C: Não calculável, devido ao curto tempo de divergência entre o Amazonas e o Orinoco (retenção de um polimorfismo ancestral). As árvores de coalescência com os tempos de divergência podem ser observadas nos Apêndices 9 – 12. O intervalo de confiança (95% hpd) para o tempo de divergência foi de 0,282 - 0,853 milhões de anos (*B. rousseauxii*), 0,882 – 2,24 milhões de anos (*P. brachypomus*), 0,1 – 0,317 milhões de anos (1^a divergência, *P. metaense/P. tigrinum*), 0,044 – 0,140 milhões de anos (2^a

divergência, *P. metaense/P. tigrinum*), 0,0197 – 0,078 milhões de anos (3ª divergência, *P. metaense/P. tigrinum*) e 0,576 – 1,582 (*P. orinocoense/P. punctifer*).

Para *B. rousseauxii* foi obtido um tempo de divergência de aproximadamente 0,511 milhões de anos (Apêndice 4), a terceira mais alta das divergências entre bacias para os peixes migradores. Em relação a *C. macropomum*, a análise de coalescência populacional (Apêndice 5) não conseguiu detectar acuradamente o tempo de divergência entre as bacias devido ao curto tempo transcorrido após a divergência entre o Amazonas e o Orinoco (ainda existe uma alta taxa de retenção do polimorfismo ancestral dentro da população do Orinoco). Apesar disso, é possível sugerir que o haplótipo presente na maior parte dos indivíduos do Orinoco (presente no Japurá), divergiu do resto dos haplótipos do Amazonas há ~ 0,105 milhões de anos (Apêndice 5). No caso de *P. metaense/P. tigrinum* (Apêndice 6), se observou uma primeira e grande quebra populacional entre bacias aproximadamente há 0,188 milhões de anos, embora, com migrações posteriores durante algum período. Após este tempo, se observa um segundo e terceiro momento de divergência populacional, que ocorreram respectivamente há 0,088 e 0,0471 milhões de anos. No entanto, para esta espécie não existe evidência de fluxo gênico na atualidade.

Observando os resultados para os peixes sedentários (Tabela 18), pode se evidenciar que, por exemplo, para *N. unifasciatus* o tempo de divergência entre o Orinoco (PG+GV+IN) e o Amazonas (CUC+SI+BAR) foi de 4,97 milhões de anos, seguido de uma provável incursão recente até parte de Inírida (Orinoco) a partir do Amazonas (Apêndice 7). Em relação a *P. axelrodi*, puderam se observar dois momentos de divergência importantes. O primeiro foi entre o grupo formado por CUC+IN+PG e o grupo formado por SI+BAR, datando uma clara divergência há 4,558 milhões de anos. A segunda divergência importante se deu mais recentemente entre IN+PG e CUC (Orinoco VS. Amazonas), há aproximadamente 1 milhão de anos (Apêndice 8).

Por outro lado, em *P. altum* foi determinada o tempo de divergência entre o grupo formado por CUC+IN+PG+GV e a população de SI foi de 1,009 milhões de anos, enquanto que uma segunda divergência mais recente foi observada entre o grupo formado por IN+PG+GV e a população de CUC (Orinoco VS. Amazonas) há 0,368 milhões de anos (Apêndice 9).

Tabela 18. Tempos de divergência (baseados no ADNmt) entre populações de peixes sedentários para as bacias do Orinoco e Amazonas.

Espécie	Tempos de divergência (milhões de anos)		Fluxo gênico atual entre bacias?
	Amazonas VS. Orinoco	Cucui VS. Santa Isabel	
<i>N. unifasciatus</i>	4,970		Não
<i>P. axelrodi</i>	1	4,558	Não
<i>P. altum</i>	0,368	1,009	Não

Nota: as árvores de coalescência com os tempos de divergência podem ser observadas nos Apêndices 13, 14 e 15, respectivamente, para *Nannostomus unifasciatus*, *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum altum*. Os intervalos de confiança (95% hpd) para cada tempo de divergência foram 1,971 – 10,305 milhões de anos (*N. unifasciatus*), 0,440 – 1,530 milhões de anos (Amazonas VS. Orinoco, *P. axelrodi*), 1,914 – 7,294 milhões de anos (Cucui VS. Santa Isabel, *P. axelrodi*), 0,136 – 0,583 milhões de

anos (Amazonas VS. Orinoco, *P. altum*) e 0,281 – 2,766 milhões de anos (Cucui VS. Santa Isabel, *P. altum*). *N. unifasciatus* demonstra ter uma incursão Amazonas → Orinoco há 1,72 milhões de anos.

11.2 ADN nuclear: regiões exônicas dos genes *Glyt* e *myh6*

Para avaliar a hipótese de que as quebras de conexão populacional e de grupos biológicos (observados no ADNmt) foram no passado recente e não no passado distante das bacias, foram utilizadas regiões exônicas de genes nucleares das diferentes espécies migradoras e sedentárias (de forma concatenada) e avaliado o compartilhamento de grupos biológicos e alelos. Como resultado, foram obtidos 1070, 1087, 1115, 854, 997, 766, 1078 e 1357 pares de base para as duas regiões concatenadas, respectivamente para *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense/P. tigrinum*, *P. orinocoense/P. punctifer*, *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*. Deste modo, para os peixes migradores foram determinados 5 ($\log Pr X|K = -1178,078$), 2 ($\log Pr X|K = -584,682$), 3 ($\log Pr X|K = -1454,156$), 4 ($\log Pr X|K = -3500,911$) e 5 ($\log Pr X|K = -970,185$) grupos biológicos, respectivamente para *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus*, *P. metaense/P. tigrinum* e *P. orinocoense/P. punctifer* (Figura 16A – 20A). Em todos os casos, para todas as espécies, houve compartilhamento entre 1 até 3 grupos biológicos entre bacias. A hipótese divisão populacional no passado recente foi confirmada entre as localidades Cucui (CUC) – Puerto Inírida (IN), San José del Guaviare (GV) – La Pedrera (PED) e Boa Vista (BV) – Ciudad Guayana (CG) para todas as espécies migradoras. Assim, por exemplo, para *B. rousseauxii* os dados deram suporte à hipótese de quebra populacional recente, pois foi evidente o compartilhamento de um mesmo grupo biológico entre San José del Guaviare (GV) – Puerto Inírida – La Pedrera (PED) (Figura 16A). Em *C. macropomum*, o qual formou dois grupos biológicos, com um deles compartilhado por 100% das localidades das duas bacias, a hipótese não foi rejeitada (Figura 17A). No caso de *P. brachypomus* e *P. metaense/P. tigrinum*, os locais de compartilhamento dos grupos biológicos foram entre GV - PED e Ciudad Guayana (CG) – Boa Vista (BV) (Figura 18A e 19A). Finalmente, no caso de *P. orinocoense/P. punctifer*, foi evidente a hipótese de uma quebra populacional no passado recente e não distante: entre CG – BV, GV – PED e IN – CUC (Figura 20A).

Dentro da formação de grupos biológicos, também existiram casos de exclusividade da ocorrência destes para uma das duas bacias. Para *B. rousseauxii* foram encontrados 4 grupos biológicos exclusivos para a bacia do Orinoco, enquanto que para *C. macropomum* e *P. brachypomus* foi observado 1 grupo biológico exclusivo para a mesma bacia, nestes dois últimos casos para a localidade de CG. Para *P. orinocoense/P. punctifer* foram achados dos grupos biológicos exclusivos para a bacia do Orinoco, especificamente para a localidade de CAR. Contrário aos anteriores, para *P. metaense/P. tigrinum* foi observado um único grupo biológico, mas dessa vez, restrito ao Amazonas (BV e TEF).

O programa HaploViewer não confirmou o compartilhamento de alelos em todos os casos em que foi compartilhado um grupo biológico entre bacias (Figura 16B – 20B). Deste modo, para *P. brachypomus*, não foi possível observar uma distribuição monofileticamente recíproca dos alelos nucleares entre bacias, nem compartilhamento de algum deles entre as mesmas. O que foi visto, consistiu numa proximidade

filogenética entre alelos nucleares de BV com CAR e CG, formando um grupo separado por mais de 95 passos mutacionais de outro grupo formado por Manaus (MAO), Tefé (TEF), PED, GV, IN e Puerto López (PL).

HaploViewer determinou compartilhamento de alelos nucleares entre as bacias do Orinoco e Amazonas para as espécies *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. metaense*/*P. tigrinum* e *P. orinocoense*/*P. punctifer*. Respectivamente, foram compartilhados 1 (entre MAO - IN), 3 (entre todas as localidades do Orinoco e o Amazonas), 2 (entre GV – TEF e CG – BV) e 2 (entre IN – SI e IN –CUC) alelos para cada espécie (Figura 16B, C – 20B, C).

Em relação aos peixes sedentários, a hipótese de que o evento de fragmentação entre bacias se deu recentemente e não no passado distante, foi também evidente para todas as espécies.

Foram encontrados 2 ($\log Pr X|K = -43,008$), 3 ($\log Pr X|K = -512,494$) e 3 ($\log Pr X|K = -106,296$) grupos biológicos, respectivamente para *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *Pterophyllum altum* (Figura 21A - 23A). Para *N. unifasciatus* foi observado o compartilhamento de um grupo biológico para as bacias, especificamente em indivíduos da localidade de IN com o resto das localidades Amazônicas: CUC, Santa Isabel (SI) e Barcelos (BAR) (Figura 21A). No caso de *P. axelrodi*, o compartilhamento de apenas um grupo biológico entre bacias se deu entre as localidades Amazônicas de CUC e SI com todas as localidades do Orinoco (Figura 22A). Finalmente, para *P. altum*, a exemplo das anteriores, observou-se o compartilhamento apenas de um grupo biológico entre bacias. Isto acontece entre as localidades de CUC (Amazonas) e o resto das localidades do Orinoco: IN, Puerto Gatián (PG) e San José del Guaviare (GV) (Figura 23A).

Dentro das espécies de peixes sedentários que mostraram formação de grupos biológicos exclusivos para uma das duas bacias, temos *N. unifasciatus*, a qual apresentou 1 grupo exclusivo para o Orinoco (IN, PG e GV). No caso de *P. axelrodi*, foi determinado também um grupo exclusivo para a bacia Amazônica, especificamente nas localidades de SI e BAR. Finalmente, em relação a *P. altum*, foram encontrados 2 grupos biológicos exclusivos para o Amazonas, mas limitados (e em simpatria) à localidade de SI.

Observando as análises geradas pelo programa HaploViewer, foi possível evidenciar que para *N. unifasciatus* houve compartilhamento de alelos nucleares entre a localidade de IN (Orinoco) e as localidades de CUC, SI e BAR (Figura 21B). Caso oposto aconteceu para *P. axelrodi*, onde não foi evidenciada a existência de compartilhamento de alelos entre bacias, mas sim uma grande proximidade filogenética entre localidades como CUC e o resto do Orinoco, inclusive com menor quantidade de passos mutacionais entre elas. Apesar disso, SI, contrário a BAR (o qual se observa seguindo uma trajetória evolutiva independente), observou-se como a localidade do Amazonas filogeneticamente mais próxima ao Orinoco depois do CUC, embora com alguns alelos com até 17 passos mutacionais de diferença entre indivíduos da mesma localidade (Figura 22B). Por último, quando foi avaliada a espécie *P. altum*, foi encontrado compartilhamento de alelos nucleares entre bacias para todas as localidades do Orinoco (IN, PG e GV) com CUC (Amazonas), sendo que SI se mostrou filogeneticamente distante deste primeiro grupo com até 6 passos mutacionais entre alelos (Figura 23B).

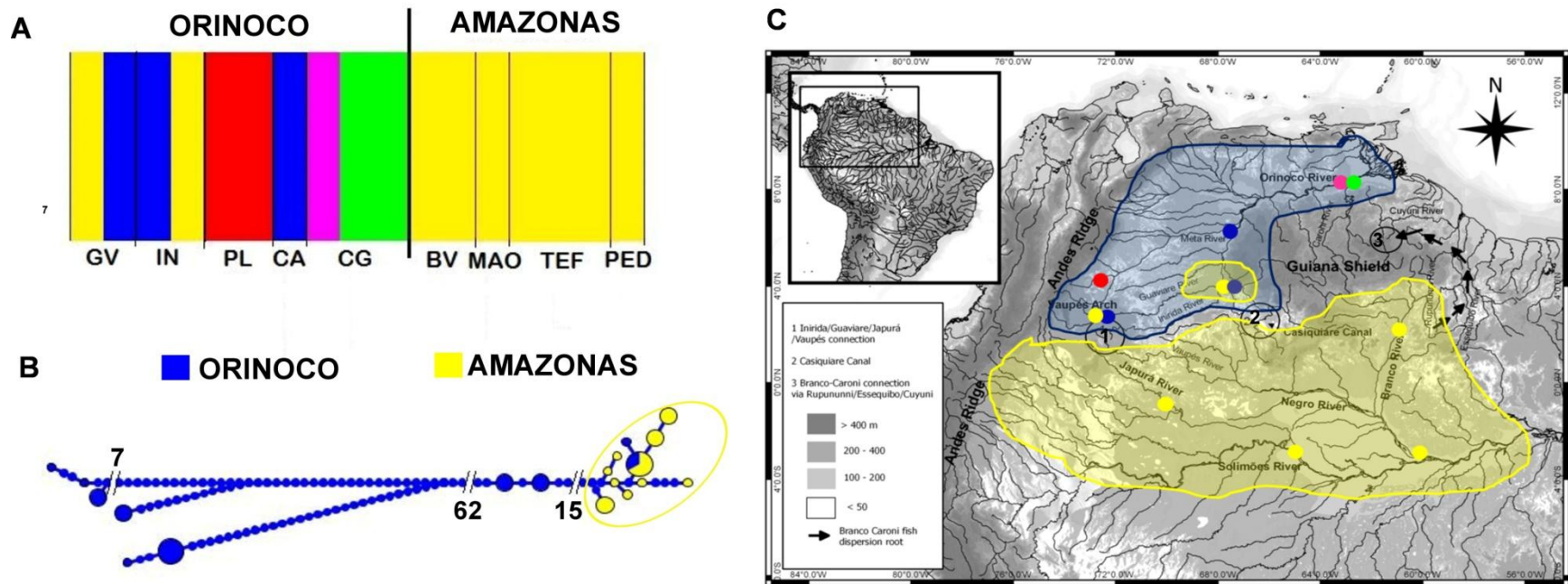


Figura 16. *Brachyplatystoma rousseauxii*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; PL: Puerto López; CA: Puerto Carreño; CG: Ciudad Guayana; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. As circunferências e suas cores permitem relacionar um grupo biológico compartilhado entre bacias na Figura 16A com os alelos que os conformam na figura 16B. As barras paralelas, com números no seu lado, indicam respectivamente a supressão e número de passos suprimidos para efeitos estéticos da imagem. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

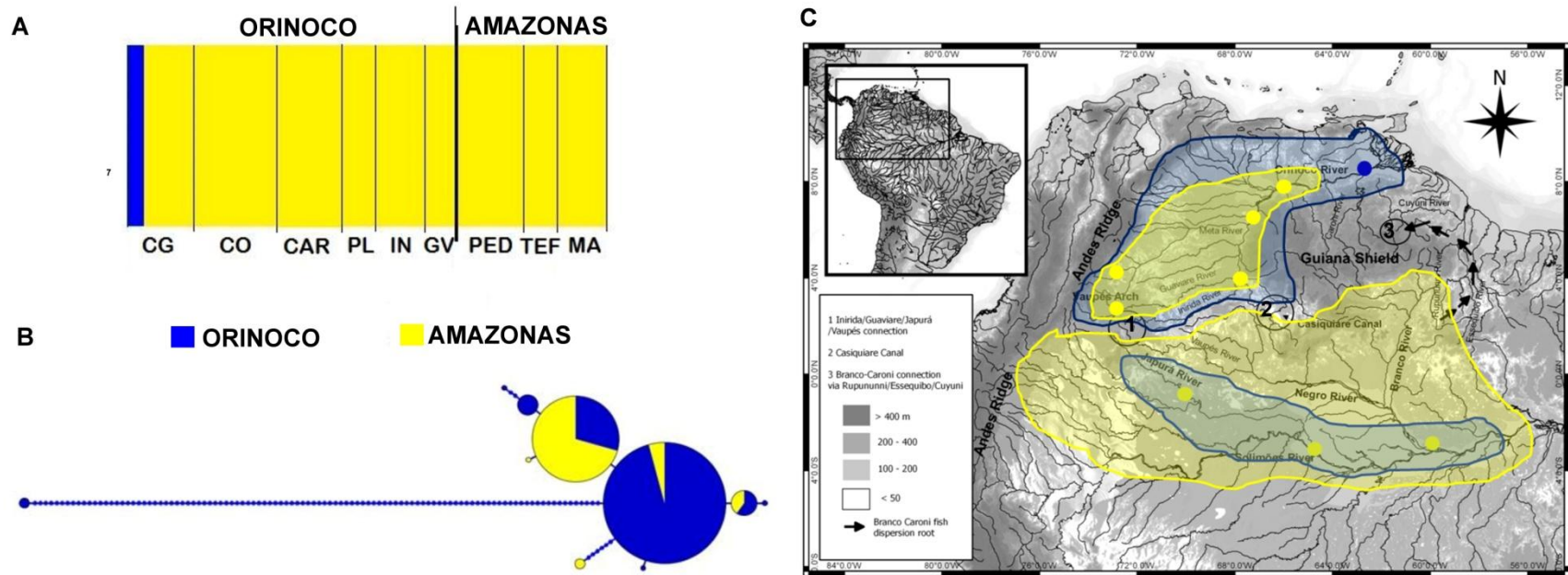


Figura 17. *Colossoma macropomum*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. CG: Ciudad Guayana; CO: Caicara del Orinoco; CAR: Puerto Carreño; PL: Puerto López; IN: Puerto Inírida; GV: San José del Guaviare; PED: La Pedrera; TEF: Tefé; MA: Manaus. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

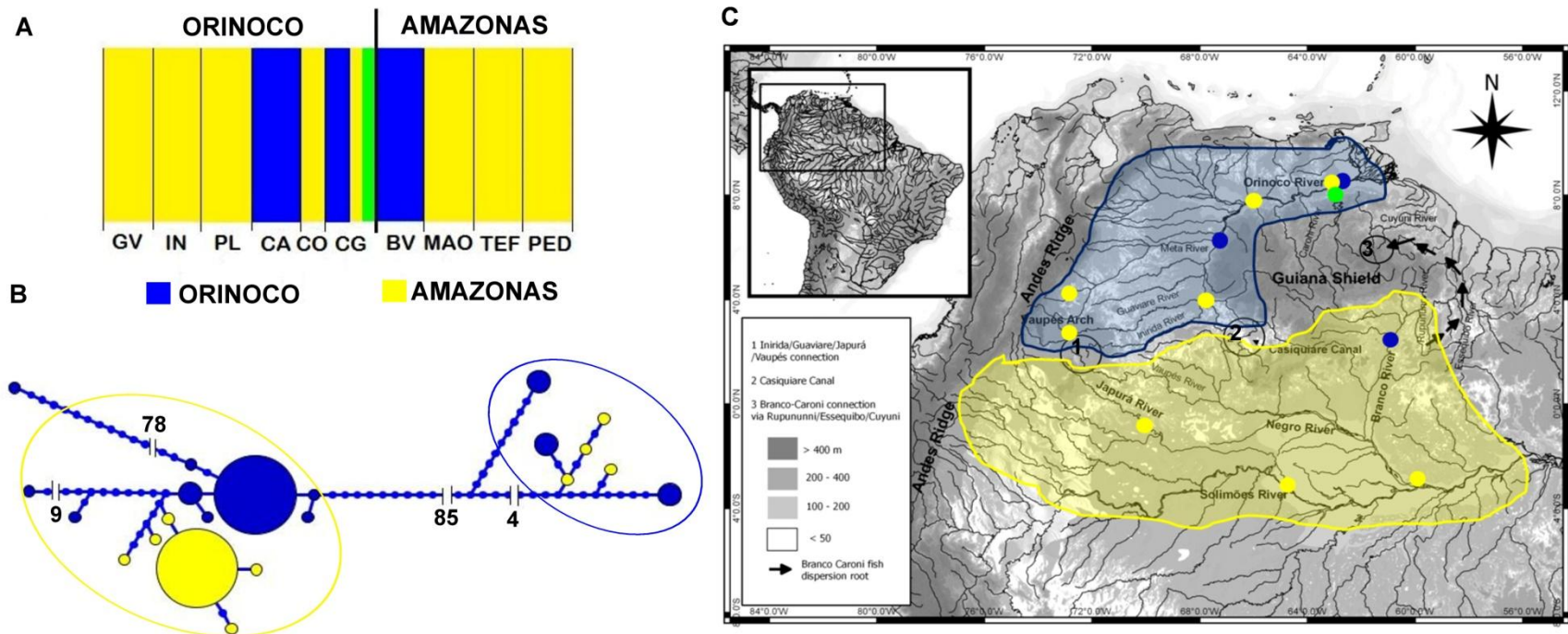


Figura 18. *Piaractus brachypomus*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; PL: Puerto López; CA: Puerto Carreño; CO: Caicara del Orinoco; CG: Ciudad Guayana; BV: Boa Vista; MAO: Manaus; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. As circunferências e suas cores permitem relacionar um grupo biológico compartilhado entre bacias na Figura 18A com os alelos que os conformam na figura 18B. As barras paralelas, com números no seu lado, indicam respectivamente a supressão e número de passos suprimidos para efeitos estéticos da imagem. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

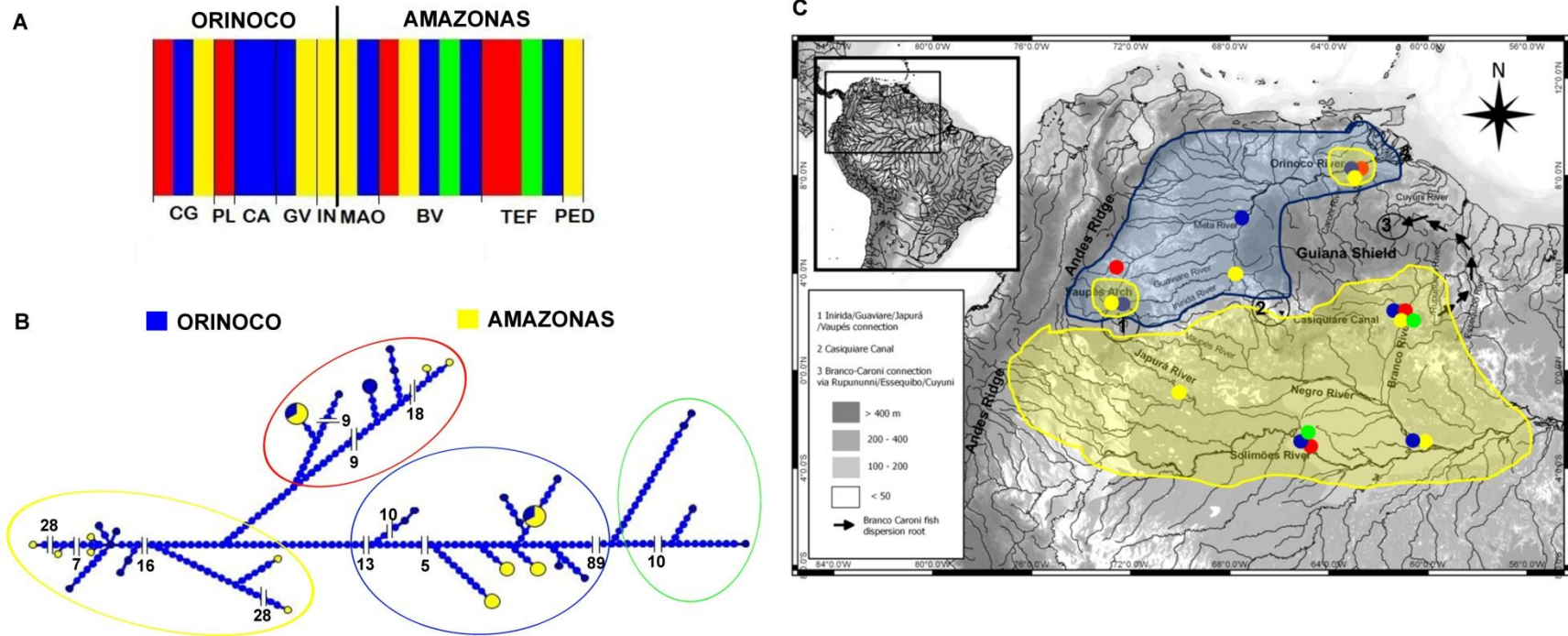


Figura 19. *Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. CG: Ciudad Guayana; PL: Puerto López; CA: Puerto Carreño; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; MAO: Manaus; BV: Boa Vista; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. As circunferências e suas cores permitem relacionar um grupo biológico compartilhado entre bacias na Figura 19A com os alelos que os conformam na figura 19B. As barras paralelas, com números no seu lado, indicam respectivamente a supressão e número de passos suprimidos para efeitos estéticos da imagem. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

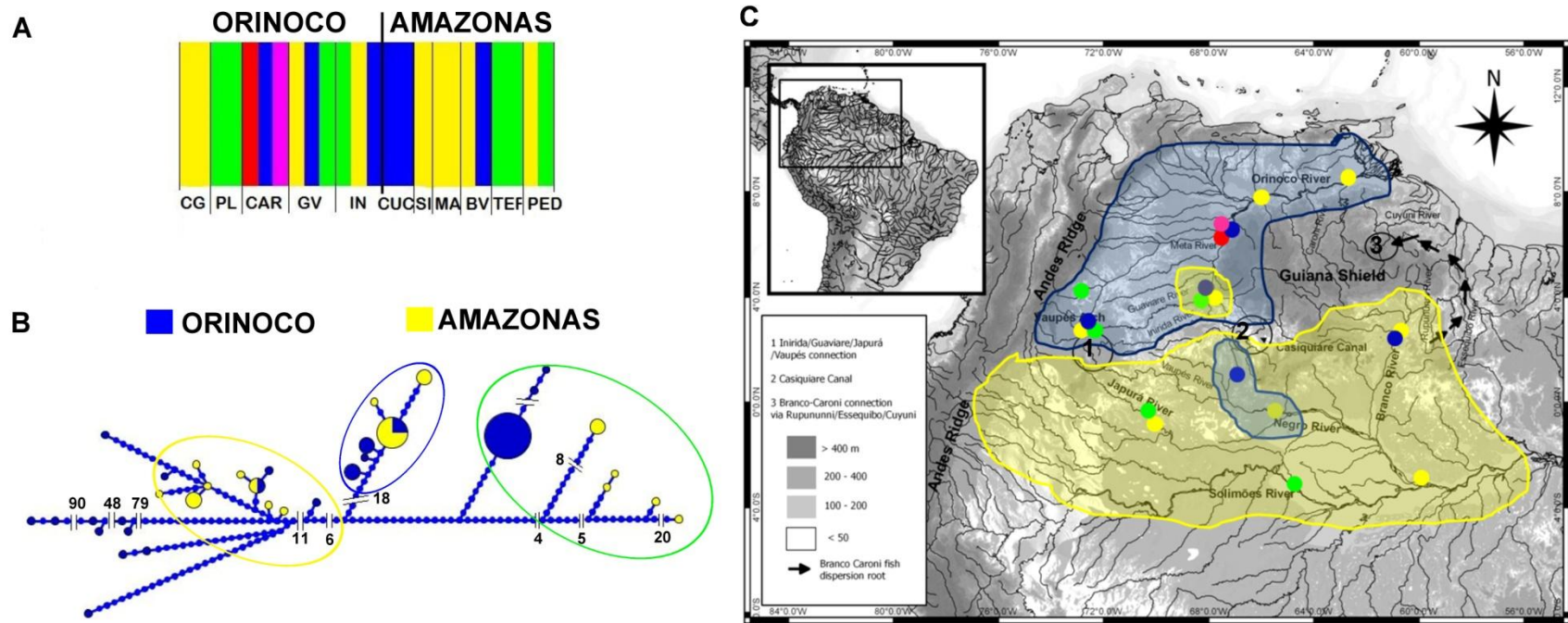


Figura 20. *Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. CG: Ciudad Guayana; PL: Puerto López; CAR: Puerto Carreño; GV: San José del Guaviare; IN: Puerto Inírida; CUC: Cucui; SI: Santa Isabel; MA: Manaus; BV: Boa Vista; TEF: Tefé; PED: La Pedrera. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. As circunferências e suas cores permitem relacionar um grupo biológico compartilhado entre bacias na Figura 20A com os alelos que os conformam na figura 20B. As barras paralelas, com números no seu lado, indicam respectivamente a supressão e número de passos suprimidos para efeitos estéticos da imagem. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

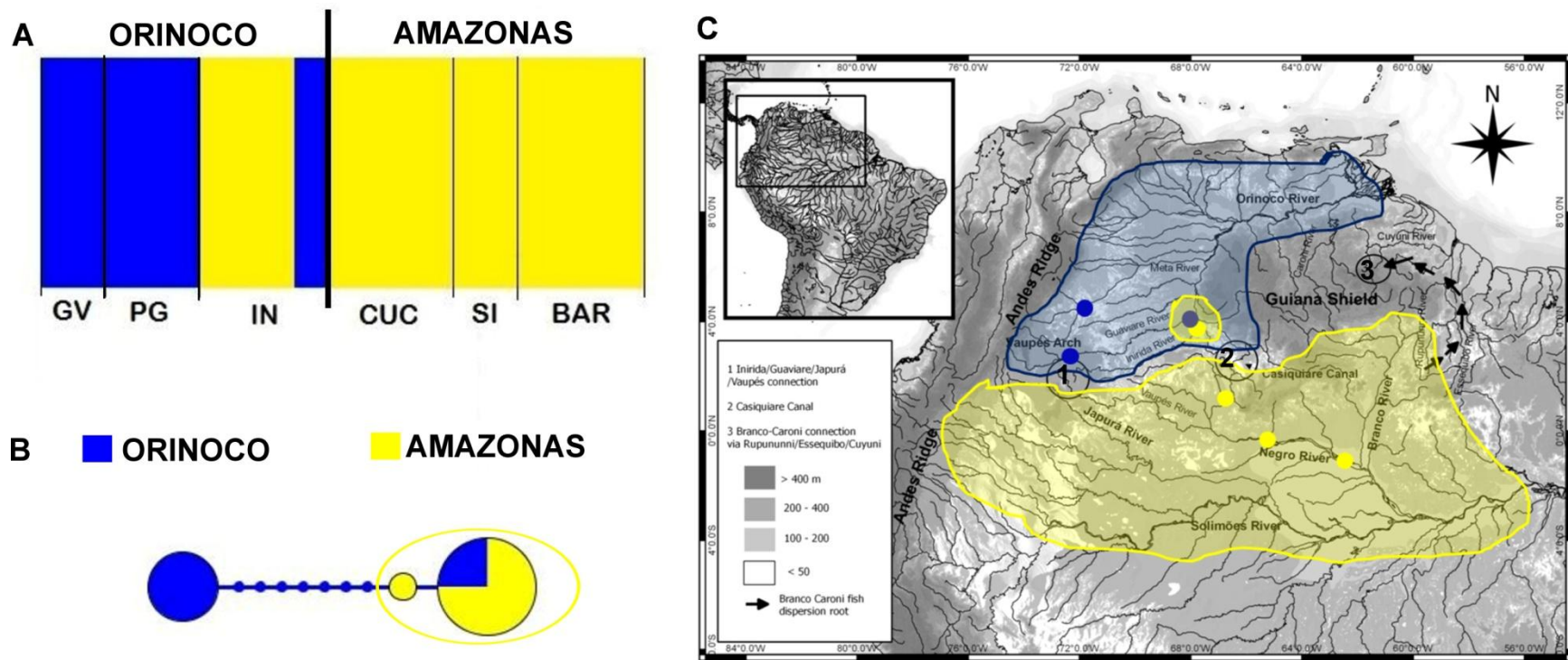


Figura 21. *Nannostomus unifasciatus*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. San José del Guaviare; PG: Puerto Gaitán; IN: Puerto Inírida; CUC: Cucui; SI: Santa Isabel; BAR: Barcelos. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. As circunferências e suas cores permitem relacionar um grupo biológico compartilhado entre bacias na Figura 21A com os alelos que os conformam na figura 21B. As barras paralelas, com números no seu lado, indicam a supressão e número de passos suprimidos para efeitos estéticos da imagem. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

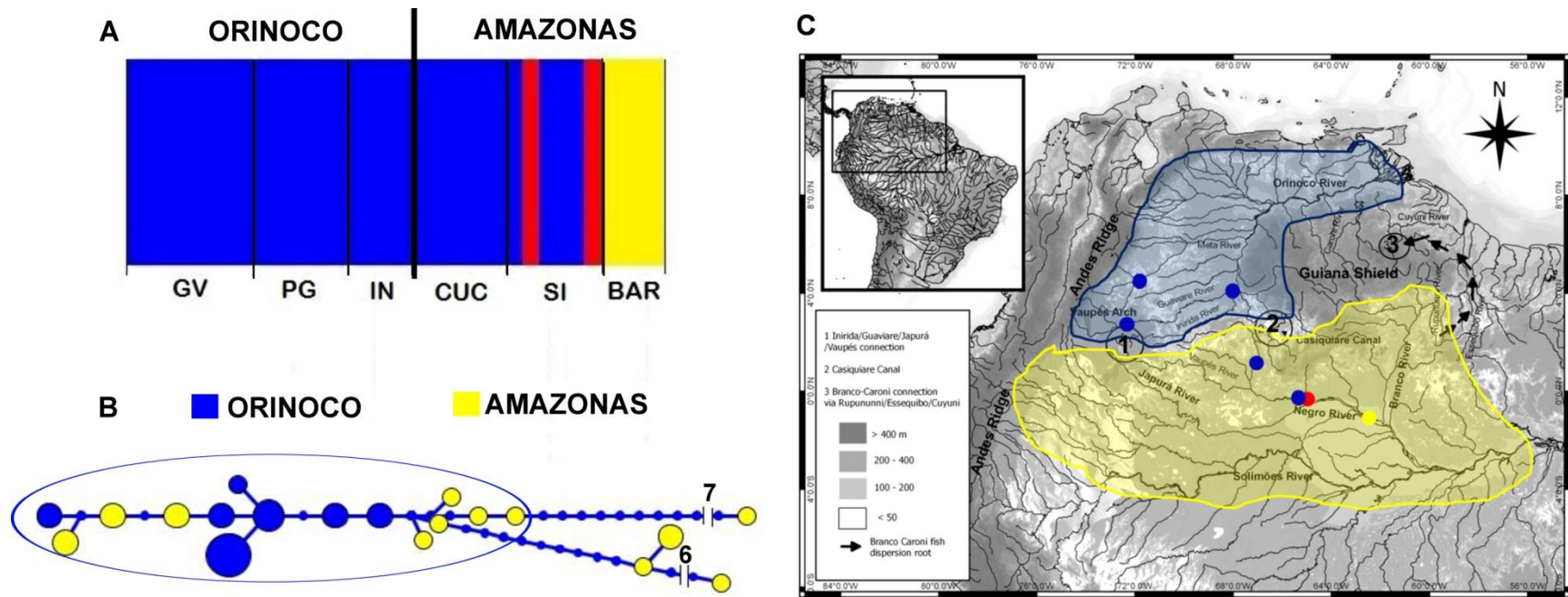


Figura 22. *Paracheirodon axelrodi*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. San José del Guaviare; PG: Puerto Gaitán; IN: Puerto Inírida; CUC: Cucui; SI: Santa Isabel; BAR: Barcelos. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. As circunferências e suas cores permitem relacionar um grupo biológico compartilhado entre bacias na Figura 22A com os alelos que os conformam na figura 22B. As barras paralelas, com números no seu lado, indicam respectivamente a supressão e número de passos suprimidos para efeitos estéticos da imagem. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

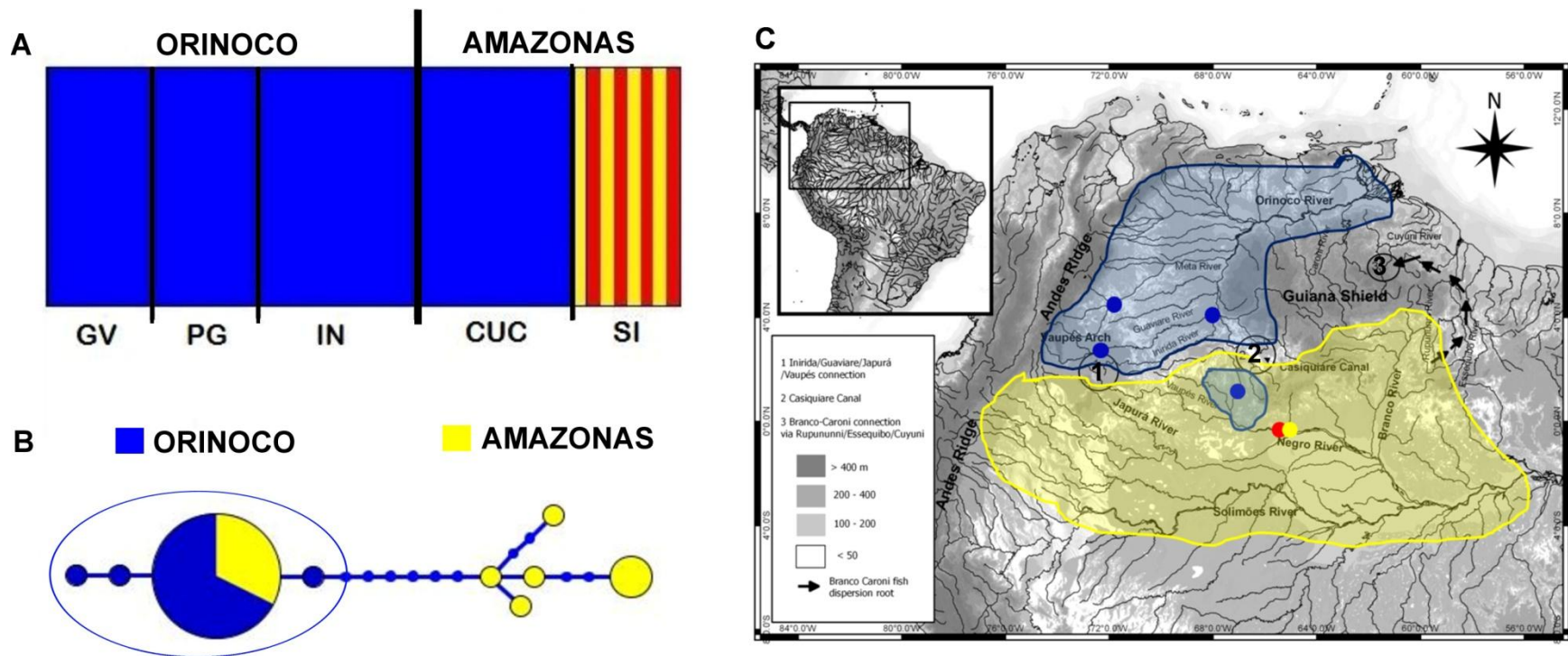


Figura 23. *Pterophyllum altum*: Relações de ancestralidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A”, Formação de grupos biológicos entre as bacias utilizando genes nucleares (Glyt e myh6) no programa BAPS. Barras de uma mesma cor indicam um mesmo grupo biológico. GV: San José del Guaviare; PG: Puerto Gaitán; IN: Puerto Inírida; CUC: Cucui; SI: Santa Isabel. “B”, Relação filogenética e distribuição de alelos entre o Orinoco e o Amazonas para a verificação de compartilhamento dos mesmos. As circunferências e suas cores permitem relacionar um grupo biológico compartilhado entre bacias na Figura 23A com os alelos que os conformam na figura 23B. “C”, Localização geográfica dos alelos dos grupos biológicos gerados pelo BAPS (a cor do círculo indica o grupo biológico ao qual pertence o alelo). O mapa também mostra a delimitação das áreas pertencentes a cada bacia (mancha azul: Orinoco, mancha amarela: Amazonas). A sobreposição de manchas indica compartilhamento de alelos entre bacias considerando a análise gerada no programa HaploViewer.

12 DISCUSSÃO

No presente trabalho foram utilizadas sequências de ADNmt e ADNnu para as análises populacionais de oito espécies de peixes (cinco migradoras e três sedentárias) compartilhadas entre as bacias do Orinoco e Amazonas como modelo para determinar a conectividade atual e histórica entre ditas bacias.

Estrutura atual entre bacias e possíveis fatores que a modelam

Dentro deste estudo, esperava-se observar para todas as espécies de peixes migradoras, considerando os seus grandes tamanhos corporais e capacidade deslocamento para eventos reprodutivos (GODINHO; LAMAS; GODINHO, 2010), conectividade genética atual entre bacias, ao contrário do esperado para peixes sedentários. Isto, no entanto, não foi a regra para 80% destas espécies migradoras examinadas. No caso de *Brachyplatystoma rousseauxii* e *Piaractus brachypomus*, foram as espécies mais contundentes em demonstrar falta de conectividade entre as bacias, evidenciada nos altos índices de fixação (F_{st}), falta de compartilhamento de haplótipos mitocondriais, forte monofilia recíproca, e inclusive uma grande separação por vários passos mutacionais entre grupos de haplótipos entre bacias. Para outras espécies como *Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum* e *Colossoma macropomum*, a contundência da separação não foi tão forte, sendo evidente na falta de monofilia recíproca ou evidência de retenção de polimorfismo ancestral. Porém, a hipótese de conexão e fluxo gênico atual entre o Amazonas e Orinoco não foi rejeitada apenas para *Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer*. Apesar disso, em todos os casos o F_{st} foi até 8x maior entre bacias do que dentro das bacias para todas as espécies analisadas, sugerindo um fator de isolamento.

Uma das justificativas para explicar este gradiente de separação entre espécies e forte restrição ao fluxo gênico entre bacias, é a existência de um evento geológico com ação vicariante comum para todas, cuja ocorrência se deu de forma paulatina, permitindo que cada espécie fosse vencendo dita barreira a partir de suas capacidades ecológicas até sucumbir ante ela e se isolar, ou aproveitar as habilidades intrínsecas (biológico-ecológicas) para se interconectar entre bacias, mesmo por espaços de difícil acesso. Dentro das barreiras recentes ou antigas impostas ao fluxo gênico entre a bacia do Amazonas e Orinoco, podemos encontrar aquelas de ordem ecológica como o canal do Casiquiare (WINEMILLER et al., 2008), e de ordem geológica como o Arco do Vaupés (DÍAZ DE GAMERO, 1996; HOORN, 1993; HOORN et al., 1995).

O Arco do Vaupés, que separou as bacias do Orinoco e Amazonas (DÍAZ DE GAMERO, 1996; HOORN et al., 1995), hoje é a linha divisória entre o Alto Rio Orinoco (Rio Guaviare, Rio Inírida, Rio Ventuari e Rio Atabapo) e as cabeceiras dos Rio Japurá e Negro no Amazonas (WINEMILLER; WILLIS, 2011). Apesar da sua existência, canais como o Casiquiare ainda permitem a conexão, pelo menos evidentemente física, entre as duas bacias (ARMBRUSTER; PROVENZANO, 2000). O Canal do Casiquiare, hoje conecta ao alto Rio Negro com o Alto Rio Orinoco.

O padrão genético de isolamento reprodutivo e de conexão observado para as espécies migradoras entre as bacias, foi concordante com a ausência ou presença de ditas espécies nos ambientes do Rio Negro próximos ao Casiquiare, única conexão direta ao Orinoco. Por exemplo, a única espécie em apresentar fluxo gênico atual entre

o Orinoco e o Amazonas foi *P. orinocoense*/*P. punctifer*, justamente a única, de todas as espécies migradoras avaliadas, com distribuição no Rio Negro.

O Rio Negro, o maior rio de águas pretas do mundo, representa por si só uma barreira ecológica para as espécies que possuem sua distribuição fora destas águas (em águas brancas). Os ácidos húmicos caracterizam o Rio Negro, além da sua extrema pobreza de nutrientes no solo e acidez (pH entre 4,4 – 4,9), levando a uma baixa produção primária (LEWIS et al., 2001; SCHMIDT, 1973; SIOLI, 1967) e pobreza em comunidades de macrófitas, em comparação com zonas inundáveis de rios de águas brancas (GOULDING; CARVALHO, 1982). Essas condições podem estar gerando um ambiente hostil para peixes de grande porte e as suas larvas, geralmente carnívoras, cuja demanda energética é maior, e impossível de ser providenciada por este Rio. Isto poderia explicar a ausência de migração entre as bacias do Orinoco e Amazonas via Casiquiare para espécies como *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Piaractus brachypomus*, *Colossoma macropomum* e *P. metaense*/*P. tigrinum*. Mesmo que estas espécies consigam tolerar as condições de água do Rio Negro, cruzar o Casiquiare implicaria um risco extremo. O Casiquiare possui também um gradiente físico-químico, o qual vai desde um pH de 6,7 e águas claras na sua origem no Orinoco, 5,5 de pH e águas Pretas-claras na parte média, até 4,8 de pH na parte baixa, onde se une ao rio Negro, se tornando um filtro zoo-geográfico mais complexo que atualmente comunica as bacias (WINEMILLER et al., 2008).

Apesar da condição extrema que implica o Casiquiare, interações demográficas entre o Amazonas e Orinoco para a espécie *P. orinocoense*/*P. punctifer* foram observadas, não só próximo ao Casiquiare, mas também abrangendo parte da área correspondente a Puerto Inírida até o médio Rio Negro (localidade de Santa Isabel). Trabalhos realizados por Carvalho-Costa et al. (2011) sugerem também a existência de fluxo gênico entre o Orinoco e Amazonas para *P. orinocoense*/*P. punctifer*, embora, o estudo não detalhe a rota de conexão, pois este foi orientado à sistemática molecular (não populacional), e o Rio Negro não foi levado em conta dentro dos locais de amostragens. Nesse estudo foi evidente o compartilhamento de haplótipos mitocondriais e alelos nucleares entre bacias. Ao contrário, estudos realizados por Buitrago-Suárez e Burr (2007) sugerem, só através de dados morfológicos, a existência de isolamento reprodutivo entre bacias para esta espécie, ao ponto que para cada bacia foi atribuída uma espécie diferente. Deste modo, partindo do conceito biológico de espécie, aqui se demonstra que a hipótese de duas espécies (uma para cada bacia) proposta por Buitrago-Suárez e Burr (2007) é rejeitada.

O uso do Casiquiare como corredor biogeográfico por parte de outras espécies aquáticas para se deslocar entre o Orinoco e Amazonas também tem sido evidente em estudos anteriores. Estudos ecológicos realizados por Winemiller et al. (2008) demonstraram que muitas espécies estão atualmente amplamente distribuídas ao longo da região do Canal do Casiquiare, incluindo Orinoco e Amazonas. As evidências foram sustentadas com capturas de indivíduos da mesma espécie em habitats de águas claras do alto Orinoco e alto Casiquiare, e em habitats de águas pretas no Baixo Casiquiare e Rio Negro. Assim, resultados desse trabalho incluem a piranha *Serrasalmus rhombeus*, todas as espécies conhecidas do gênero *Boulengerella*, os ciclídeos *Cichla temensis* e *Mesonauta insignis*, o bagre *Pimelodus blochii* e *Scorpiodoras heckelii*.

Frequentemente, espécies com distribuição restrita têm sido encontradas em localidades dentro de ambas as bacias: alto Orinoco e alto Rio Negro (peixe elétrico *Gymnotus coropinae* e o bagre *Gladioglanis machadoi*), deixando claro que as espécies parecem estar distribuídas apenas no Canal e alguma parte das bacias (CRAMPTON; ALBERT, 2003; FERRARIS; MAGO-LECCIA, 1989). Apesar disso, recentes estudos baseados em dados genéticos demonstraram que espécies de peixes ciclídeos como *Cichla temensis*, *C. monoculus*, e *C. orinocensis*, experimentaram fluxo gênico entre as bacias do Orinoco e o Amazonas utilizando o canal do Casiquiare (WILLIS et al., 2010), isto é, entre canais principais das bacias e não só entre áreas restritas ao Casiquiare.

Considerando que espécies como *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. brachypomus* e *P. metaense/P. tigrinum* não ocorrem no Alto Rio Negro, e, portanto não utilizam o Casiquiare como estratégia de conexão entre bacias, por que se observam diferenças tão extremas no grau de isolamento reprodutivo entre as populações do Orinoco e Amazonas para estas espécies? Se o Arco do Vaupés foi provavelmente a única barreira entre bacias para elas, por que todas não mostram o mesmo padrão de isolamento?

Espécies como *B. rousseauxii*, *P. brachypomus* e *P. metaense/P. tigrinum* possuem uma codistribuição completa dentro das bacias, isto inclui integralmente o Orinoco, Solimões, Japurá e Branco. Isto representa uma rota a mais de conexão no passado do que para *C. macropomum*, a qual não ocorre no Rio Branco (GOULDING; CARVALHO, 1982; WALLACE, 1853), no entanto, esta última possui um fluxo gênico até um passado mais recente do que o resto de espécies. Isto pode ser explicado em parte pela ecologia das espécies e o tamanho corporal.

No caso de *B. rousseauxii*, apesar do seu grande tamanho corpóreo e capacidade de deslocamento (BATISTA; ALVES-GOMES, 2006), podendo atingir até 3300 km horizontais (BARTHEM; GOULDING, 1997), inclusive com um evidente estado de panmixia neste estudo dentro do Orinoco e Amazonas, a mesma pode não ter tido capacidade de deslocamento nos corpos de água intersticiais nas cabeceiras, tanto de conexões remanescentes que puderam ter existido até um passado recente entre o Branco e Orinoco (através de cabeceiras do Essequibo-Cuyuni-Caroní), quanto entre o Japurá e Guaviare. Isto pode ser suportado quando observamos estudos de sistemas de cabeceiras entre rios, os quais têm demonstrado que na sua maioria se tratam de rios de primeira ordem, caracterizados pelo seu pequeno tamanho e pouca profundidade, além da sua instabilidade ambiental e restrições de deslocamento para as espécies que ali habitam (CIONEK et al., 2012). Assim, possivelmente este tipo de ambientes, junto com cachoeiras e corredeiras como aquelas presentes no Japurá (p. e. Serra Chiribiquete), poderiam ter representado um obstáculo para *B. rousseauxii* desde antes da separação total das bacias.

Carvajal et al. (2014) descobriram que a espécie *B. rousseauxii* possui algum grau de restrição ao fluxo gênico entre a sub-bacia Amazônica Boliviana e o Alto Solimões (Amazonas). Essa restrição pode estar associada à presença de mais de 18 corredeiras no alto curso do Rio Madeira (GRAVENA et al., 2014). Embora, nesse caso, as condições de conexão entre sub-bacias se mantêm até hoje de forma evidente e substancial para que a migração ocorra, contrário ao observado entre Orinoco e Amazonas. Desse modo, é provável que a condição corporal de *B. rousseauxii*, em vez de uma vantagem, poderia ter se tornado num obstáculo para manter a migração entre estas bacias.

No caso de *P. brachypomus*, a espécie com maior grau de isolamento reprodutivo entre bacias, este evento poderia ter tido mais repercussões na sua divergência devido à sua evidente limitação intrínseca (biológica-ecológica) para se manter panmítica, inclusive dentro de uma mesma bacia. Neste estudo foi demonstrada uma sub-estruturação para dita espécie dentro do Orinoco e dentro do Amazonas, sendo que dentro do Orinoco foi explicada pela mera distância geográfica. Nesse caso, o levantamento do Arco do Vaupés poderia ter influenciado na vicariância populacional desta espécie desde muito antes que afetasse às outras. Trabalhos realizados por Escobar-Lizarazo (2013) em *P. brachypomus* utilizando marcadores microsatélites, também mostraram um claro padrão de isolamento alopátrico entre bacias, sem evidência de fluxo gênico no passado recente. Isto deixa claro que a espécie *P. brachypomus* é provavelmente a mais susceptível ao isolamento reprodutivo de todas as migradoras dentro do presente estudo.

No caso de *P. metaense/P. tigrinum*, os sistemas de cabeceiras puderam não ter sido um problema para o intercâmbio de indivíduos entre bacias até o passado recente, pois claramente se observa uma falta de monofilia recíproca no ADNmt e um compartilhamento de dois grupos biológicos entre o Amazonas e o Orinoco (sem compartilhamento de haplótipos), indicando que apesar das possíveis restrições impostas pelo levantamento de barreiras físicas, esta espécie provavelmente conseguiu utilizar, até mais recentemente do que *B. rousseauxii* e *P. brachypomus*, estes sistemas de cabeceiras para manter a migração entre o Orinoco e Amazonas. Isto possivelmente devido a dois fatores que fazem a *P. metaense/P. tigrinum* diferente destas duas espécies: sua boa capacidade migratória (maior do que para *P. brachypomus*), característico dos siluriformes (BARTHEM; GOULDING, 1997), e um tamanho corporal menor que *B. rousseauxii*, o que provavelmente o torne mais ágil, aumentando as possibilidades de aproveitar melhor e por mais tempo estas conexões.

É contraditório observar que esta espécie possuiu capacidade de migração suficiente para manter o fluxo gênico até um passado mais recente do que *B. rousseauxii* e *P. brachypomus*, mas mostra uma tendência à estruturação genética tanto no Orinoco quanto no Amazonas, como foi evidente neste estudo através do índice de fixação. Estudos genético-populacionais de algumas espécies do gênero *Pseudoplatystoma* têm demonstrado que esta tendência à estrutura dentro de uma mesma bacia é comum, mas não é atribuída a um fator relacionado com a deficiência na capacidade de migração entre locais, a qual aparentemente se mantém constante e eficiente, e sim a um comportamento de *homing* criando grupos biológicos independentes afetando a estrutura genética de forma extrema, inclusive entre locais próximos (ABREU et al., 2009; PEREIRA; FORESTI; OLIVEIRA, 2009). De fato, Isaac e Rufino (2000) afirmam que as espécies deste gênero não realizam migrações através de toda a bacia, e sim, que esta é principalmente de forma localizada nos principais rios e em direção a pequenas cabeceiras próximas destes locais. Isto pode explicar o porquê da persistência do fluxo gênico entre o Amazonas e Orinoco para *P. metaense/P. tigrinum* até um passado mais recente, provavelmente entre cabeceiras próximas. Apesar disso, é evidente que alguns fatores de origem geológica como corredeiras ou cachoeiras podem terminar afetando o acasalamento randômico para espécies deste gênero (TELLES et al., 2014). Neste caso, um fechamento definitivo dos sistemas de captura nas cabeceiras do Japurá-Guaviare ou Branco-Essequibo-Cuyuni-Caroni deve ter sido o fator de terminação da migração.

Apesar de que em *P. metaense/P. tigrinum* foi evidente um isolamento reprodutivo entre as bacias do Orinoco e Amazonas num passado mais recente, este mesmo comportamento não foi observado na sua espécie congênere (de similar tamanho corporal) *P. orinocoense/P. punctifer*, a qual, sem levar em conta a evidência de fluxo gênico atual através do Casiquiare, apresenta uma clara mostra de que o isolamento começou antes do que em *P. metaense/P. tigrinum*, mesmo possuindo ambas atualmente uma codistribuição em áreas de possível dispersão e conectividade até o passado recente entre bacias. Estas diferenças são evidentes tanto nas métricas de *F_{st}* quanto na formação de grupos biológicos e número de passos mutacionais separando as populações no ADNmt, sempre demonstrando um maior isolamento entre bacias para *P. orinocoense/P. punctifer*. Isto pode sugerir que a espécie *P. metaense/P. tigrinum* possuiu uma maior capacidade de migração através de áreas ou ambientes aquáticos intersticiais como as de captura de cabeceiras entre bacias, o que provavelmente lhe permitiria ter tido uma maior distribuição geográfica nestas zonas de interação entre sistemas fluviais no passado, e, adicionalmente um maior sucesso na dispersão entre as mesmas. Segundo Lande (1988), em populações pouco distribuídas, as interações sociais necessárias para a reprodução podem ser nulas, ou isto pode dificultar pelo menos as chances de acasalamento dentro da espécie. Este último pôde ter acontecido em *P. orinocoense/P. punctifer*, fazendo com que populações do Orinoco e Amazonas ficassem reprodutivamente isoladas mais rapidamente após o início do aparecimento das barreiras.

No caso de *C. macropomum*, ao contrário de *B. rousseauxii*, *P. brachypomus* e *P. metaense/P. tigrinum*, foi a única espécie em demonstrar capacidade de estabelecer fluxo de migrantes entre bacias num passado muito mais recente da história geológica destas, inclusive, provavelmente quando as outras espécies já tinham sido vencidas pelas barreiras físicas na carreira pelo intercâmbio genético entre o Orinoco e o Amazonas. Baixos valores de *F_{st}*, compartilhamento de grupos biológicos e um haplótipo, além de poucos passos mutacionais entre populações das bacias, podem confirmar isso. É provável que este fluxo de migrantes tenha sido pelas cabeceiras dos rios Japurá e Guaviare, pois a conexão Rio Negro-Orinoco (via Casiquiare) ou Rio Branco-Essequibo-Cuyuni-Caroni são pouco prováveis para esta espécie devido a sua ausência natural na cabeceira desses Rios (WALLACE, 1853). Segundo Goulding e Carvalho (1982) em um extenso estudo realizado sobre a história de vida de Tambaqui no Amazonas, a espécie só é abundantes em rios de água clara e preta dentro dos primeiros 150 km ao interior destes a partir de um rio de água branca (onde naturalmente habitam), mais longe do que isso, a espécie é rara ou desaparece. Assim, eles identificaram dois fatores geográficos importantes que influenciam a distribuição local de *C. macropomum*: a presença de floresta de várzea para a sua alimentação e, no caso de rios de águas claras e pretas, a distância que possua de um rio de água branca (p. e. Solimões) onde a espécie se reproduz.

Nesse caso, entrar em tributários do Rio Negro como o Rio Branco e Casiquiare, cujas desembocaduras nesse Rio estão localizadas a cerca de 270 e 974 km respectivamente de distância do Rio Solimões, é pouco provável para *C. macropomum* e sem nenhuma evidência até hoje para esses pontos geográficos (GOULDING; CARVALHO, 1982).

Deste modo, como já foi mencionado, a conexão mais provável para *C. macropomum* no passado recente poderia ter sido através da cabeceira do Rio Japurá

(águas brancas), afluente do Solimões, estabelecendo dispersão através de alguma captura de cabeceira estabelecida temporariamente com o Rio Guaviare. Este tipo de eventos já acontece para algumas espécies de peixes através de cabeceiras de bacias neotropicais como Essequibo, Rupununi e Rio Branco (LOVEJOY; ARAUJO, 2000; LOWE-MCCONNELL, 1969; SABAJ; TAPHORN; CASTILLO, 2008). Apesar de o Rio Japurá possuir mais de 2100 km e numerosas corredeiras como as de Araracuara (sobre a Serrania Chiribiquete), isso possivelmente não representou obstáculo algum para o grande caracídeo naquele momento. Está demonstrada a enorme capacidade migradora de *Colossoma macropomum* dentro da bacia Amazônica, onde é de fato uma população panmítica apesar da sua vasta extensão (SANTOS; RUFFINO; FARIAS, 2007), além da sua capacidade para ultrapassar corredeiras e cachoeiras sem dificuldades para a sua migração e dispersão (GOULDING; CARVALHO, 1982), inclusive aqueles que representam uma barreira para outras espécies aquáticas (GRAVENA et al., 2014) como as corredeiras de Teotônio e outras ao longo do Madeira, como já foi demonstrado por Farias et al. (2010).

Apesar da condição sedentária e a evidência de um forte isolamento reprodutivo atual entre bacias, alguns peixes ornamentais utilizados neste estudo parecem ter tido uma conexão entre bacias até um passado mais recente do que se esperava, de fato, às vezes mais recente do que em alguns migradores como *B. rousseauxii* e *P. brachypomus*. Isto é evidente quando observamos compartilhamento de grupos biológicos (ADNmt) entre bacias para todas estas espécies, assim como a distribuição de haplótipos sob a base da análise filogenética, onde claramente os passos mutacionais entre localidades limítrofes para as bacias como Puerto Inírida (Orinoco) e Cucui (Rio Negro – Amazonas) são exíguos ou muito reduzidos. Cooke et al. (2009) e Souza (2008) encontraram respectivamente resultados similares para *Paracheirodon axelrodi* e *Fluviphylax obscurus*, observando uma maior relação de ancestralidade entre o Alto Orinoco e Alto Rio Negro do que esta última área com o resto do Rio Negro, sugerindo uma história comum mais recente entre estas áreas, provavelmente via Casiquiare. Por outro lado, Lovejoy e Araujo (2000) encontraram um comportamento contrário a este para espécies sedentárias de pequeno porte do gênero *Potamorhaphis* amostradas no Rio Negro (Barcelos), Alto Orinoco (Atabapo) e Médio Orinoco (Apure). Foi observada uma maior relação filogenética entre indivíduos de populações do Rio Negro e Médio Orinoco, do que entre o Rio Negro e Alto Orinoco, sugerindo uma conexão entre bacias via Branco-Guianas por muito mais tempo do que aquela estabelecida através das cabeceiras das bacias na área do Casiquiare.

Apesar de que este ambiente de cabeceira (Alto Rio Negro – Casiquiare – Alto Orinoco) é também exatamente a mesma área ocupada por *P. orinocoense*/*P. punctifer* para realizar a troca de indivíduos e estabelecer fluxo gênico atual entre bacias, este mesmo evento de intercâmbio não é evidente na atualidade para nenhum dos peixes sedentários. De fato e contrário aos migradores, estas espécies apresentaram uma alta estruturação (às vezes $F_{st} > 0,9$) entre localidades flanqueando esta área limítrofe entre bacias. Esta ausência de fluxo gênico entre bacias é esperada por duas razões principais. A primeira é do tipo extrínseco (barreiras ecológicas) e a segunda é de tipo intrínseco (pequeno porte e história de vida). Nesta área, a formação ecológica mais complexa e evidente é claramente o Canal do Casiquiare, com gradientes de pH extremos e presença de corredeiras (WINEMILLER et al., 2008), já comprovadas como barreira ao trânsito e dispersão de espécies ornamentais entre o Orinoco e Amazonas

(COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2009; LOVEJOY; ARAUJO, 2000; WINEMILLER; WILLIS, 2011). Com respeito às barreiras intrínsecas que afetam o fluxo gênico, na maior parte dos casos, isso poderia se dever à própria história de vida e pequeno tamanho corporal, impedindo grandes migrações ou vencer os desafios que pode representar o fluxo hídrico do próprio Rio Casiquiare. Godinho et al. (2010) demonstraram que a migração reprodutiva em peixes está estreitamente relacionada com um grande tamanho corporal, o qual permitia sua adaptação às condições hostis de ambientes lóticos. Pelo contrário, espécies de ambientes lénticos não apresentaram migração reprodutiva e possuem pequeno tamanho corporal. Assim, este comportamento em sedentários já é esperado para estes ambientes, especialmente entre localidades separadas por grandes distâncias (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2009; LOVEJOY; ARAUJO, 2000).

Apesar disso, algumas evidências de fluxo gênico entre localidades próximas dentro do Orinoco foram observadas para estas espécies ornamentais. Por exemplo, entre PG e GV (*N. unifasciatus*), IN e PG (*P. axelrodi*) e inclusive, entre todas as localidades do Orinoco (*P. altum*). Este tipo de intercâmbio de indivíduos e fluxo gênico entre áreas próximas tinha sido evidenciado para espécies ornamentais de pequeno porte como *Paracheirodon axelrodi*, *Nannostomus unifasciatus*, *Nannostomus eques*, *Carnegiella marthae* e *Carnegiella strigata* dentro do Rio Negro (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2009; PIGGOTT; CHAO; BEHEREGARAY, 2011; SCHNEIDER et al., 2012; SISTROM; CHAO; BEHEREGARAY, 2009; TERCENIO; SCHNEIDER; PORTO, 2012). Alguns autores afirmam que as histórias de vida de espécies sedentárias ornamentais estão restritas a uma área particular, com deslocamentos mínimos e de forma lateral ao longo da floresta e entre os habitats próximos às calhas principais dos rios e as planícies de inundação no período de chuvas. Os movimentos são dependentes das mudanças dos níveis de água, porém, sua reprodução não está restrita só aos períodos de chuvas, mas sim o intercâmbio de indivíduos entre estas áreas próximas, sugerindo que são importantes para inibir a especiação entre e dentro dos sistemas de drenagens (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2009; MARSHALL; FORSBERG; THOMÉ-SOUZA, 2007; PIGGOTT; CHAO; BEHEREGARAY, 2011).

Apesar do anterior, níveis de estruturação genética foram mais fortes no Rio Negro do que dentro do Orinoco. Isto provavelmente é devido à presença de barreiras físicas ou devido ao seguimento de um modelo de isolamento por distância entre estas localidades dentro do Negro, cujas barreiras físicas e distâncias são maiores do que entre as populações dentro do Orinoco. Assim, por exemplo, entre Cucui e Santa Isabel encontramos um sistema de cachoeiras e corredeiras na altura de São Gabriel da Cachoeira, identificada já como uma barreira para a dispersão e fluxo gênico de espécies de médio e pequeno porte entre o Alto Rio Negro e o Médio/Baixo Rio Negro (ALBERT; REIS, 2011; TERCENIO; SCHNEIDER; PORTO, 2012). No Orinoco, as únicas corredeiras afetando a continuidade geológica da bacia (Atures e Maipures) estão fora da área de distribuição das localidades de Puerto Gaitán, San José del Guaviare e Puerto Inírida, sendo localizadas entre o médio e baixo Orinoco (LUJAN; ARMBRUSTER, 2011), portanto sem nenhum efeito sobre ditas populações.

História biogeográfica e dispersão entre bacias

Relações de ancestralidade populacional através de genes nucleares, análises de expansão, além de métodos coalescentes para inferência de tempos de divergência entre linhagens haplotípicas através de regiões mitocondriais, permitiram demonstrar que os eventos de separação, dispersão ou intercâmbio de indivíduos entre as bacias do Orinoco e Amazonas se deram num passado muito mais recente do que se registra na literatura para a história geológica de separação das bacias.

Dentre as espécies migradoras, *B. rousseauxii* e *P. brachypomus* foram as que apresentaram maior grau de isolamento reprodutivo atual, com uma clara monofilia recíproca e nulo compartilhamento de haplótipos, apesar disso, o ADNnu mostrou um claro compartilhamento de grupos biológicos e ausência de monofilia recíproca entre as bacias, sugerindo que o evento de separação entre elas foi recente. Em outras espécies migradoras isto foi ainda mais evidente: *P. metaense/P. tigrinum*, *P. orinocoense/P. punctifer* e *C. macropomum*. No caso dos peixes sedentários, para os quais se esperava uma divergência muito mais proeminente considerando a sua condição de não migrante, demonstraram também compartilhamento de grupos biológicos no ADNnu entre bacias, onde podemos encontrar alguns tão evidentes quanto para os migradores. De fato, as análises coalescentes para inferir o tempo de divergência populacional confirmam esta hipótese.

No caso de *B. rousseauxii*, por exemplo, a divergência entre as populações do Orinoco e Amazonas aconteceu aproximadamente há 0,511 milhões de anos, enquanto que para *P. brachypomus* foi há 1,53 milhões de anos, sendo que para as outras espécies migradoras o tempo de divergência não superou o atingido por *P. brachypomus*. No caso das espécies ornamentais, estas atingiram como máximo 4,97 milhões de ano (*N. unifasciatus*) de divergência entre bacias, mas para o restante não superou 1 milhão de anos. Esta divergência coincide com o Plioceno/Quaternário e não com o Mioceno, onde aconteceram os principais eventos geológicos que deram lugar à forma atual das bacias, entre elas a separação das bacias do Orinoco e Amazonas por causa do levantamento do Arco do Vaupés ~11 milhões de anos atrás (LUNDBERG et al., 1998). Estudos realizados por Willis et al. (2010), analisando populações de espécies do gênero *Cichla*, encontraram que a divergência entre as populações do Orinoco e Amazonas se deram também no Quaternário e não no Mioceno, aproximadamente 1,45 - 1,75 (*C. temensis*), 0,8 (*C. monoculus*) e 1,78 – 1,91 milhões de anos (*C. orinocensis*), sendo que em todos os casos houve fluxo gênico posterior à divergência. É provável que tanto para as espécies do presente estudo quanto para as do gênero *Cichla*, o efeito alopátrico do levantamento do Arco do Vaupés não tenha sido imediato. Possivelmente, no início, a mais forte fratura se deu na calha principal do Paleo Amazonas-Orinoco, situado nesse momento ao ocidente da América do Sul, justo em linha com a base da Cordilheira dos Andes, recebendo o maior efeito de quebra desde o início do paleolevantamento do Arco (Médio Mioceno), embora, deixando ainda conexões como rios de primeira, segunda e terceira ordem que permitiram dar continuidade ao fluxo gênico das espécies durante um longo período de tempo até que estas áreas sofreram fechamento definitivo no final da elevação do Arco, provavelmente num passado recente (Plioceno/Quaternário). Alguns autores sugerem que o Arco do Vaupés não surgiu só como evento orogênico abrupto, produto da ação tectônica dos Andes, mas também que após o início de seu levantamento, uma subsequente sedimentação derivada dos Andes foi se depositando sobre o Arco, forçando paulatinamente o Orinoco a se deslocar para o leste, onde o Rio tomou a sua posição

atual ao longo da borda oeste do escudo das Guianas (BEMERGUY; COSTA, 1991; HOORN, 1994; HOORN et al., 1995).

Um estudo recente, realizado por Aguilera et al. (2013), determinou a presença de espécies fósseis de peixes (de 1,7 – 3,2 milhões de anos de antiguidade) dos gêneros *Brachyplatystoma*, *Doraops* e *Rhinodoraps* no norte da Colômbia (Guajira) entre a cordilheira Central e Oriental dos Andes, oeste do lago de Maracaibo. Sobre as espécies sabe-se que fizeram parte da antiga ictiofauna do Amazonas, sugerindo que a hipótese do antigo rio Paleo-Amazonas-Orinoco drenando para o Caribe é veraz (DÍAZ DE GAMERO, 1996; HOORN, 1993; HOORN et al., 1995; LUNDBERG et al., 1998; SABAJ; AGUILERA; LUNDBERG, 2007), embora, não até o Médio Mioceno (13 – 11 milhões de anos), mas até um passado mais recente. De fato, as evidências litostratigráficas mostram que estas espécies permaneceram nesta área até o final do Plioceno e parte do Quaternário. Portanto, isto pode sugerir que o Arco do Vaupés não fechou abruptamente a conexão entre as bacias (há ~11 milhões de anos) e terminou apenas sua elevação máxima para cortar definitivamente as bacias recentemente, ou, que o soerguimento inicial deste foi mais recente (~2,45 milhões de anos). Em ambos os casos, com conexão da ictiofauna entre o Orinoco e Amazonas até o Plioceno/Quaternário.

Aguilera et al. (2013) sugerem que o levantamento da Cordilheira Oriental dos Andes, que separou o Paleo Amazonas-Orinoco da bacia do Maracaibo, iniciou seu soerguimento há ~5 milhões de anos, terminando com sua máxima elevação há ~2,5 milhões de anos, se evidenciando como o detonante de uma cadeia de eventos orogênicos durante o mesmo período: Perijá, Santa Marta, Lara-Falcón e Guajira (KELLOGG, 1984; MACELLARI, 1995), pelo que provavelmente também possa ser responsável do levantamento do Arco do Vaupés no mesmo período (~5 – 2,5 milhões de anos).

Estes resultados de divergência entre o Amazonas e o Orinoco dentro do nosso trabalho, coincide com estudos realizados por Hubert et al. (HUBERT et al., 2007a), onde determinam que o tempo de vicariância de duas espécies irmãs de piranha (*Serrasalmus eigenmanni* e *Serrasalmus goudingi*), cuja distribuição contempla estas duas bacias, calcula-se em ~2,55 milhões de anos. Assim também, resultados obtidos por Sivasundar et al. (2001) em espécies do gênero *Prochilodus*, determinaram a separação do Magdalena VS. Orinoco tempo antes (~4,1 milhões de anos), e a separação do Orinoco vs. Amazonas/Paraná um pouco depois (~3,9 milhões de anos).

Por outro lado, é evidente que em muitas espécies analisadas neste estudo se observou que a sua presença numa bacia é provavelmente muito mais recente do que não outra, sugerindo dispersão também recente entre estas, contrário ao que se pensaria se consideramos que as duas bacias eram um único sistema hídrico no passado (LUNDBERG et al., 1998). Por exemplo, no caso dos peixes migradores, temos *C. macropomum*. No ADNnu resultou ser a única espécie, de todas as analisadas, em mostrar um único grupo biológico presente completamente em todas as localidades do Orinoco e Amazonas, sugerindo uma divergência muito mais recente do que nas outras. Em uma visão simples, pareceria um caso de fluxo gênico aberto entre bacias, embora, a distribuição de haplótipos mitocondriais demonstra que estes não se apresentam de forma aleatória ente bacias, pelo que é de fato descartado tal comportamento. Em vez disso, obervamos pouca diversidade de haplótipos para o Orinoco, com um haplótipo fundador compartilhado pela maior parte dos indivíduos da

bacia, o qual está concentrado em um ponto da rede, evidentemente derivado do Amazonas.

Esta última bacia, diferentemente do Orinoco, se mostra com uma grande diversidade de haplótipos para *C. macropomum*, característico de populações mais ancestrais e de maior tamanho populacional (ALLENDORF; LUIKART, 2007; KINZIGER et al., 2011), além de uma grande distribuição geográfica que facilita o surgimento de maior variabilidade, o que já foi demonstrado nessa espécie para a bacia Amazônica (SANTOS; RUFFINO; FARIAS, 2007). Este haplótipo central compartilhado pela bacia do Orinoco inteira, a qual inclusive mostra retenção de um polimorfismo ancestral do Amazonas, é característico de uma colonização recente com imediata expansão populacional. Isto é confirmado pelo Teste D de Tajima, o qual mostra um significativo desvio da neutralidade ($D \ll 0$) para haplótipos apenas do Orinoco, reafirmando que uma expansão recente aconteceu (FAY; WU, 1999; TAJIMA, 1989). As expansões rápidas, como a observada para *C. macropomum* dentro do Orinoco, estão relacionadas com condições de habitat úteis e com baixo risco de predação (BROWN; MOYLE, 1997). Este comportamento observado é similar ao Efeito Fundador, com colonização de uma nova área por parte de uma pequena fração de indivíduos da população ancestral seguido de uma separação (MAYR, 1942; TEMPLETON, 1980). Resultados similares foram evidenciados para espécies de peixes Neotropicais como *Astyanax fasciatus* habitando cabeceiras do Rio Tibagi (Brasil) pouco interconectadas (MATOSO et al., 2010), onde uma população se viu derivada e pouco diversa, sugerindo ser uma população fundadora. Assim também, Elmer et al. (2013) determinaram que a distribuição atual de espécies de ciclídeos em lagos Nicaraguenses, é produto de um efeito fundador: colonização recente de habitats (5800 – 5400 anos) com novas condições ambientais para os grupos fundadores.

Este fenômeno tem sido visto de forma mais comum em peixes marinhos por invasão ou introdução (HAMNER; FRESHWATER; WHITFIELD, 2007), mostrando que sempre existe uma baixa variabilidade genética por efeitos da deriva e reduzido tamanho da população fundadora.

Considerando a anterior hipótese de dispersão recente Amazonas→Orinoco, por quê a presença de *C. macropomum* no Orinoco é produto de uma colonização tão recente se as bacias estavam interconectadas formando o Paleo-Amazonas-Orinoco no Médio Mioceno, onde após a separação das mesmas deve ter ficado uma grande e diversa população no Orinoco? A resposta a esta pergunta pode ser uma possível extinção de *C. macropomum* nessa bacia.

Lundberg et al. (1986) demonstram a existência de um fóssil de 15 milhões de anos para *C. macropomum* em La Venta - Colômbia na bacia do Rio Magdalena (entre a cordilheira Central e Ocidental dos Andes) onde a espécie atualmente não ocorre. Segundo o autor, isto sugere que o Paleo-Amazonas-Orinoco existiu, e nele *C. macropomum*; se distribuindo ao longo deste e passando pela região atual do Rio Magdalena até o Caribe. Ao mesmo tempo, menciona que *C. macropomum* e outras espécies (p. e. peixes do gênero *Lepidosiren*), com fósseis também achados nesse local e atualmente habitando o Amazonas e o Orinoco, foram extintos desta área. Lundberg et al. sugerem que as causas se relacionam com eventos catastróficos que caracterizaram a história da ictiofauna do Magdalena e esta área do Norte da América do Sul, por ser a última parte dos Andes em soerguer tectonicamente. De fato, menciona que esta área sofreu grande atividade vulcânica, especialmente durante o

levantamento final da cordilheira Oriental do Andes, a qual hoje sustenta hidricamente a maior parte do Médio e Baixo Orinoco. Deste modo, é provável que possíveis extinções tenham acontecido para *C. macropomum* na população do Orinoco após o levantamento da cordilheira Oriental dos Andes (8,5 – 8 milhões de anos), deixando esta bacia sem indivíduos presentes até um passado muito recente, onde houve um efeito fundador do Amazonas para o Orinoco, posterior separação e imediata expansão, como observado. Aguilera et al. (2013) demonstram, também para espécies do norte da América do Sul, que o resultado de mudanças nos sistemas de drenagem hídrica produziram perdas de hábitat e extinção de fauna regional.

Por outro lado, é possível também atribuir ao clima do Quaternário a provável extinção desta espécie na bacia do Orinoco. Solomon et al. (2008) sugerem que durante o Pleistoceno (~2,5 – 0,012 milhões de anos) houve oscilações climáticas, além de mudanças no nível do mar, o que gerou várias incursões marinhas no continente, eliminando ou reduzindo fortemente os tamanhos das populações de várias espécies restritas ecológica ou espacialmente nas planícies, e com maior força sobre aquelas endêmicas de planícies de inundação. Este último tipo de ambiente é justamente a área de alimentação e reprodução de *C. macropomum* (GOULDING; CARVALHO, 1982). Adicionalmente, dada a diferença de tamanhos entre a bacia do Orinoco (0,88 milhões de km²) e Amazonas (6,2 milhões de km²), a possibilidade de refúgio para *C. macropomum* foi até 7 vezes mais reduzida para a população do Orinoco do que para a do Amazonas. De fato, no caso do Amazonas, os últimos estudos filogeográficos e demográficos em peixes têm demonstrado um crescimento populacional para muitas das espécies no final do Pleistoceno, sugerindo que pode ser o resultado de expansões populacionais após efeitos negativos do clima (p. e. glaciações) e/ou mudanças do habitat por incursões marinhas (HRBEK; SECKINGER; MEYER, 2007; HUBERT; RENNO, 2006; HUBERT et al., 2007b), inclusive para *C. macropomum* (FARIAS et al., 2010).

A respeito da ausência de taxa de peixes no Orinoco, possivelmente extintas no passado, existem vários estudos que poderiam demonstrar esta teoria através da constatação da presença atual de espécies apenas para a bacia Amazônica. Por exemplo, as espécies do gênero *Retroculus* spp., e ciclídeos do gênero *Symphysodon* spp. (WINEMILLER; WILLIS, 2011). Essas espécies provavelmente habitaram o sistema Paleo-Orinoco-Amazonas, mas algum evento poderia ter causado a sua extinção do Sistema Orinoco também.

Por outro lado, este mesmo padrão também foi observado para *P. orinocoense*/*P. punctifer*, onde uma rápida e recente expansão é vista tanto na rede de haplótipos quanto no Teste D de Tajima. Observa-se então uma grande diversidade de haplótipos no Amazonas, enquanto que apenas um grupo muito grande de indivíduos no Orinoco compartilhando um mesmo haplótipo. Neste caso não é possível falar de um efeito fundador por colonização recente de uma fração do Amazonas para o Orinoco, posterior separação e imediata expansão. Ao contrário de *C. macropomum*, este haplótipo fundador possui um tempo de divergência consideravelmente grande em relação ao Amazonas (~1,052 milhões de anos), apesar do evidente contato secundário que sofrem as bacias atualmente. Este tempo deveu ter sido suficiente para ter se gerado no Orinoco uma diversidade maior de haplótipos em condições ecológicas e ambientais favoráveis para o crescimento da população (BROWN; MOYLE, 1997). Embora, não seja isso que observamos hoje. Deste modo, o que as evidências

sugerem é uma provável recuperação (expansão populacional) relativamente recente após de uma drástica redução (não extinção) da população dentro do Orinoco, o que possivelmente a levou a um aumento do endocruzamento e perda de haplótipos por deriva (MAYR, 1942). Esta provável redução do tamanho efetivo populacional no passado, poderia também ser relacionada com mudanças climáticas e de habitat do Quaternário, tal vez sob as mesmas condições que afetaram *C. macropomum*, mas sem levar à população de bagres à extinção.

Por outro lado, analisando o mecanismo pelo qual se dá a conexão demográfica entre as bacias para *P. orinocoense*/*P. punctifer*, é possível observar que se ajusta a um modelo de isolamento por barreiras com posterior contato secundário no presente (NOSIL, 2008). Neste caso, uma captura de cabeceiras (Casiquiare) fez desaparecer a barreira antiga e permitiu a dispersão de indivíduos do Orinoco para o Amazonas, onde se estabeleceu o contato. Considerando o padrão de divergência profunda que parece ter existido entre as populações, antes de dito contato secundário, é possível afirmar que este evento de conexão é recente, mostrando o dinamismo em termos de capturas que possui esta área até o presente (ARMBRUSTER; PROVENZANO, 2000; WINEMILLER; WILLIS, 2011). A formação destes dois grupos diferenciados só pode ser explicada por um longo período de isolamento reprodutivo, possivelmente por barreiras como o Arco do Vaupés sem presença de conexões temporais entre cabeceiras, inclusive nem o próprio Casiquiare. As capturas de cabeceiras como o Casiquiare podem mudar ao longo do tempo, sendo que novas conexões entre cursos de água podem acontecer simultaneamente com as desconexões de outras capturas previamente estabelecidas (ALBERT; REIS, 2011). Isto sugere que provavelmente outras capturas parecidas ao Casiquiare também puderam ter surgido antes e inclusive depois. De fato, Winemiller e Willis (2011) relatam que Humboldt, na sua travessia pelo Rio Negro em 1799, próximo à região do Casiquiare, achou uma segunda conexão entre este Canal e o Rio Negro, através de um braço de rio chamado Itinivini, o qual permitia uma conexão mais rápida e direta entre estas áreas do que através do próprio Canal.

Este provavelmente não é o único exemplo de contato secundário por dinamismo de captura de cabeceiras no Neotrópico. Estudos realizados por Bermingham e Martin (1998), utilizando filogeografia comparada de três espécies de peixes codistribuídas para testar a hipóteses de conectividade e biogeografia histórica ao redor do Istmo de Panamá, demonstraram com sucesso que este evento orogênico causou vicariância das populações do Baixo Centro América e América do Sul, mas de forma gradual, inclusive com três diferentes eventos de dispersão e recolonização entre bacias: dois durante o seu processo de levantamento (Mioceno tardio e Médio Plioceno) e um último evento posterior ao seu erguimento (Pleistoceno), demonstrando o comportamento dinâmico das cabeceiras e da conectividade recente da sua ictiofauna.

Igualmente, os peixes ornamentais também evidenciaram a grande dinâmica que possuiu a área de cabeceira Orinoco-Rio Negro até um passado muito recente. Para *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum* o ADNnu mostrou um compartilhamento de grupos biológicos entre bacias, principalmente entre cabeceiras. Isto sugere que, contrário ao pensado, a conexão do Alto Orinoco com o Alto Rio Negro se manteve até um tempo muito recente.

Deste modo, quando observamos as análises de formação de grupos biológicos no ADNnu e de tempos de divergência entre bacias, é possível observar dois padrões de

separação diferentes entre estas. O primeiro padrão, mostrado por *N. unifasciatus*, evidencia que houve uma divergência entre as populações do Orinoco e o Amazonas no Plioceno (~4,9 milhões de anos), depois um isolamento prolongado entre elas, suficiente para causar divergências no ADNnu, e posteriormente, uma aparente incursão no passado recente desde a cabeceira do Rio Negro para a cabeceira do Orinoco. Ao contrário, no segundo padrão, que corresponde a *P. axelrodi* e *P. altum*, a evidência sugeriu uma provável dispersão muito recente desde a cabeceira do Rio Negro para a cabeceira do Orinoco, com uma posterior divergência entre estas cabeceiras (~1 - 0,37 milhões de anos).

As diferenças entre os tempos e padrões de quebra populacional para *N. unifasciatus* VS. *P. axelrodi*+*P. altum*, podem ter uma explicação hipotética baseada na diferença de distribuição biogeográfica das espécies no momento da sua origem no passado, que poderia ter sido num rio formado pelo atual Inírida que incluía a cabeceira do Rio Negro. Este Paleo-Inírida-Negro possivelmente tinha um menor fluxo de água (dada a baixa precipitação da época comparada com o presente) e cruzava o que hoje é o Arco do Vaupés, antes que a onda de quebra do soerguimento do Arco, a qual vinha paulatinamente no sentido Andes → Escudo das Guianas, atingisse esta área, provavelmente até ~5 milhões de anos atrás. Este rio, possivelmente nascia no escudo das Guianas, numa área próxima de onde nasce atualmente o Rio Orinoco, passava por uma área próxima ao atual Cucui e continuava o percurso sobre o que hoje é o Médio rio Inírida, provavelmente drenando o Paleo-Amazonas-Orinoco ou outro rio que finalmente desembocava neste grande paleo-rio da época.

É provável que o local de origem do ancestral comum das populações atuais de *N. unifasciatus* para o Orinoco e Amazonas tenha sido sobre a parte média-baixa daquele paleo rio, justo onde hoje passa o Arco, enquanto que para *P. axelrodi*+*P. altum* tenha sido na parte média, área próxima a Cucui, hoje cabeceira do atual Rio Negro (ver Apêndice 10).

Assim, no caso de *N. unifasciatus*, dada a localização do ancestral comum para as bacias, e uma vez que esta região está mais a oeste e sobre o caminho vicariante do Arco, é afetado primeiro, dividindo este Paleo-rio, e com ele a população ancestral da espécie. No caso de *P. axelrodi* e *P. altum*, considerando a localização das suas respectivas populações ancestrais, este evento vicariante não as afetou; deixando-as apenas isoladas do Orinoco desde então. Após isso, é provável que durante muito tempo tenham crescido populacionalmente e, posteriormente, aproveitando o dinamismo de captura de cabeceiras dessa área, houve uma dispersão recente que terminou entre 1 (*P. axelrodi*) e 0,37 (*P. altum*) milhões de anos, dependendo da capacidade intrínseca (tamanho corporal) de vencer as barreiras para se dispersar, nesse caso possivelmente com maior vantagem corporal para *P. altum* (≤ 18 cm) do que para *P. axelrodi* (≤ 4 cm) (LIMA et al., 2003; RIEHL; BAENSCH, 1996; WEITZMAN; PALMER, 2003). Da mesma maneira, é provável que nesse mesmo período de dispersões Amazonas → Orinoco por parte de *P. axelrodi* e *P. altum*, também *N. unifasciatus* tenha realizado alguma exígua reincursão ao Orinoco, mas que não resultou em uma dispersão muito forte (apenas para Puerto Inírida), possivelmente, entre outros fatores, por exclusão competitiva por parte da nova “espécie” de *Nannostomus* que já tinha surgido ali no próprio Orinoco após de tantos anos de divergência alopátrica (HARDIN, 1960); fenômeno já observado para peixes Neotropicais (ZARET; RAND, 1971). Isto, considerando que o tempo médio de

especiação para peixes é aproximadamente de 1,7 - 2,3 milhões de anos (AVISE; WALKER; JOHNS, 1998).

Por outro lado, quando observamos os dados de tempo de divergência tanto para *P. axelrodi* quanto para *P. altum*, é possível evidenciar que houve primeiro uma separação entre a cabeceira do Rio Negro e Santa Isabel, sendo que só posteriormente se deu a separação entre esta cabeceira e o Alto Orinoco, sugerindo a hipótese de que o surgimento da população ancestral comum para as populações do Orinoco e Negro (para as duas espécies) originou-se na cabeceira, provavelmente num local próximo a Cucui. Da mesma maneira, é claro que para *N. unifasciatus* também houve uma origem do ancestral nesta área de contato Alto Orinoco-Alto Rio Negro, o que permitiu a sua presença atual entre bacias após tão antiga vicariância.

Estes resultados coincidem com as evidências que apontam à hipótese Neotectônica para explicar a formação do Rio Negro, onde Latrubesse e Franzinelli (2005) propõem que a cabeceira do Rio Negro corresponde a uma formação mais antiga, enquanto que a zona de planície inundável do Médio e Baixo Rio Negro correspondem a uma formação do Quaternário. Dito padrão foi confirmado por Cooke et al. (2009), Terencio et al. (2012) e Siström et al. (2009) em peixes sedentários do Rio Negro como *P. axelrodi*, *Nannostomus eques* e *N. unifasciatus*, respectivamente. Eles demonstraram que linhagens ancestrais para as populações estavam localizadas na cabeceira, enquanto que linhagens derivadas ocupavam o resto do Rio Negro. De todos estes estudos, só o de Cooke et al. (2009) incluiu uma amostra pertencente ao Orinoco, concluindo que era muito mais relacionado com a cabeceira do Rio Negro e que fazia parte da linhagem ancestral.

Finalmente, os resultados atingidos no presente capítulo permitem concluir:

- a. Atualmente existe fluxo gênico entre as bacias do Orinoco e Amazonas, embora, este ocorra apenas para parte da ictiofauna, especificamente para aquela com condição migradora e que possui distribuição no Rio Negro, neste caso *Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer*, que podem utilizar o Casiquiare como rota de conexão.
- b. A desconexão da ictiofauna do Orinoco e o Amazonas no passado não é concomitante com a data de soerguimento do Arco do Vaupés (há ~11 milhões de anos), pois as evidências demonstram uma separação recente (entre 4,9 milhões de anos e o final do Pleistoceno), inclusive com possíveis incursões entre bacias nesta última época.
- c. A conectividade da ictiofauna entre bacias não segue um padrão estrito de associação à história de vida, exceto para os sedentários, para os quais a falta de conectividade atual entre bacias comportou-se de acordo ao esperado para a sua condição não migradora.

CAPÍTULO IV

DELIMITANDO UNIDADES DE CONSERVAÇÃO PARA A ICTIOFAUNA COMPARTILHADA ENTRE O AMAZONAS E O ORINOCO: UMA ANÁLISE INTEGRADA DE DADOS GENÔMICOS, GENÉTICOS E ECOLÓGICOS.

RESUMO

A identificação de unidades de conservação constitui a base para definir operacionalmente o que se pretende conservar, sendo esta uma contribuição na prevenção do risco de extinção das espécies. Os processos de diversificação nem sempre vão acompanhados por mudanças morfológicas, e portanto, uma inadequada identificação da nossa diversidade e seus limites espaciais pode levar a uma falta de proteção e consequências negativas no manejo destes recursos, especialmente aqueles sobre explorados, como é caso das espécies de peixes ornamentais e de consumo compartilhadas entre o Amazonas e o Orinoco. Com o objetivo de delimitar as Unidades de Conservação (UC) de maneira hierárquica (Unidades Evolutivas Significantes, Unidades Adaptativas e Unidades de Manejo) para as espécies de peixes *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum*, *Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer*, *Nannostomus unifasciatus*, *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum altum* das bacias do Orinoco e Amazonas, foram utilizados dados genéticos mitocondriais (Citocromo oxidase I e Região controle) e nucleares (Glycosiltransferase, Cadeia pesada 6 alfa da miosina do músculo cardíaco e SNPs) de indivíduos cobrindo uma área representativa da distribuição de ditas espécies dentro de cada bacia, assim também como dados ecológicos (pH e pluviosidade). Foram realizadas abordagens filogeográficas, genético-populacionais, genômico-populacionais, filogenômicas, *scanning* genômico de variação adaptativa, e análises de estatística clássica univariada e multivariada de dados ecológicos para a determinação de ditas Unidades. A interpretação dos dados genéticos, genômicos e ecológicos para a delimitação das UC, foi feita sob a base de critérios científicos objetivos achados na literatura clássica e atual. Como resultado, se obteve que para *B. rousseauxii* e *P. brachypomus* cada bacia resultou ser uma ESU independente com MUs únicas no seu interior. Para o restante das espécies migradoras (*C. macropomum*, *P. metaense/P. tigrinum* e *P. orinocoense/P. punctifer*), as bacias do Orinoco e Amazonas foram consideradas uma única ESU, embora, cada uma com uma única MU. Em relação aos peixes sedentários, *N. unifasciatus* evidenciou a formação de três ESUs, uma exclusiva para o Orinoco (com três MUs), uma ESU abrangendo o Rio Negro e parte da localidade de Puerto Inírida no Orinoco (com quatro MUs) e uma última ESU menor sobreposta à segunda ESU, limitada à área de Santa Isabel (com MU única). Para *P. axelrodi* e *P. altum* foi determinado um padrão similar de distribuição de ESUs. No caso de *P. axelrodi*, foram achadas três ESUs. A primeira abrange o Orinoco e a localidade de Cucui no Rio Negro (com quatro MUs), a segunda se limita à localidade de Santa Isabel (com MU única), e a terceira se circunscreve à localidade de Barcelos (com MU única). No caso de *P. altum*, uma ESU foi identificada abrangendo a sua distribuição na bacia do Orinoco e incluindo a localidade de Cucui (com duas MUs), enquanto que uma segunda ESU foi inferida para a localidade de Santa Isabel, até onde acaba a sua distribuição natural dentro do Rio Negro (com MU única). O *scanning* genômico e dados ecológicos não provaram a existência, de maneira contundente, de variação adaptativa para as espécies, embora, se discutiu a possível influência da pluviosidade sobre o contato secundário (fluxo gênico atual) observado entre MUs das bacias para *P. orinocoense/P. punctifer* no alto Rio Negro através do Casiquiare, assim como também a influência do Rio Demini e Branco sobre a formação da ESU em Barcelos para *P.*

axelrodi. Estes dados permitiram: a) determinar a presença de diversidade críptica exclusiva e compartilhada entre bacias (múltiplas ESUs), especialmente em sedentários; b) rejeitar a hipótese de ESUs independentes (uma para cada bacia) de *P. orinocoense* (Orinoco) e *P. punctifer* (Amazonas), assim como de *P. metaense* (Orinoco) e *P. tigrinum* (Amazonas); c) rejeitar a hipótese de uma única ESU abrangendo as duas bacias para *B. rousseauxii* e *P. brachypomus*. Este capítulo se constitui na primeira contribuição e mais robusta já realizada para a delimitação de Unidades de Conservação em espécies de peixes altamente exploradas entre as duas maiores bacias subcontinentais: Orinoco e Amazonas.

Palavras chave: Amazonas, genômica/genética da conservação, Orinoco, peixes migradores, peixes sedentários, unidades de conservação.

13 INTRODUÇÃO

A finalidade de qualquer trabalho de caráter genético deve ser a conservação do organismo que se estuda, protegendo a sua diversidade biológica e os processos que a sustentam frente aos danos e ameaças causadas pelas atividades antrópicas (MORITZ, 2002). Apesar da sobre exploração pesqueira que sofrem espécies migradoras e sedentárias como *Brachyplatystoma rousseauxii*, *Colossoma macropomum*, *Piaractus brachypomus*, *Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum*, *Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer*, *Nannostomus unifasciatus*, *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum altum* (BARTHEM; FABRÉ, 2004; CHAO, 2001; FERNANDEZ-ACOSTA et al., 2008; NOVOA, 2002), não existem estudos de delimitação espacial e hierárquica de Unidades de Conservação para estas espécies levando em conta os fatores genéticos e ecológicos para as bacias do Orinoco e Amazonas.

As Unidades de Conservação são definidas como unidades populacionais identificadas dentro de uma espécie, as quais são utilizadas para orientar os esforços de manejo e conservação da mesma (ALLENDORF; LUIKART, 2007; FRASER; BERNATCHEZ, 2001; FUNK et al., 2012). Deste modo, a identificação destas unidades constitui a base para definir operacionalmente o que se pretende conservar.

A genética da conservação surge como uma ferramenta importante para a identificação destas unidades, abrangendo o manejo genético das populações pequenas, resolvendo problemas de incerteza taxonômica e de unidades de manejo, além de melhorar o entendimento da biologia das espécies (FRANKHAM, 2003), especialmente daquelas com uma ampla distribuição geográfica como a observada neste caso, o que as torna mais prováveis em possuir uma maior diversidade, mas ainda sem ser descoberta e portanto não protegida. Os processos de diversificação nem sempre vão acompanhados por mudanças morfológicas, e portanto, uma inadequada identificação da nossa diversidade e seus limites pode levar a uma falta de proteção e consequências negativas no manejo destes recursos (BICKFORD et al., 2007). Apesar de que o papel da genética tem sido exíguo para a adoção de decisões na configuração e execução de planos de conservação em populações naturais, tem sido evidente a sua contribuição na prevenção do risco de extinção de muitas espécies (ALLENDORF; LUIKART, 2007), demonstrando que ignorar este componente tem como consequência um inapropriado manejo (FRANKHAM, 2003).

As forças evolutivas, tanto neutras quanto adaptativas, são as responsáveis de modelar a configuração das unidades de conservação dentro de uma espécie: Unidades Evolutivas Significantes (ESUs), Unidades Adaptativas (AUs) e Unidades de Manejo (MUs) (CRANDALL et al., 2000; FUNK et al., 2012; KOHN et al., 2006), de tal maneira que todas as ferramentas que permitam a inferência destas forças são fundamentais para a delimitação de ditas unidades. Neste sentido, a genética tradicional tem nos permitido apenas observar parte desta variação (neutra) para delimitar as Unidades de Conservação, embora, as novas tecnologias de sequenciamento têm facilitado o acesso a um segundo tipo de variação, a adaptativa (FUNK et al., 2012; KOHN et al., 2006), fazendo mais acurada a tomada de decisões a respeito de como e o que denominar ESU, AU e MU. Apesar destes avanços, ainda resulta importante levar em conta evidências de dados ecológicos e ambientais que permitam apoiar os padrões genéticos observados, pois a descontinuidade espacial

deste fator (ausência de intercâmbio ecológico) é critério fundamental para a diferenciação populacional (MORITZ, 2002).

A aplicação destes métodos não é apenas necessária, mas também fundamental na priorização dos esforços e recursos para manter as trajetórias e processos evolutivos que mantêm as espécies, permitindo prolongar o equilíbrio em longo prazo sem detrimento substancial das economias locais dos povoadores que aproveitam este recurso.

O objetivo deste capítulo foi delimitar as Unidades de Conservação para as bacias do Orinoco e Amazonas, tentando sumarizar todas as informações obtidas em capítulos anteriores e adicionando novas evidências: genômica e dados ecológicos. Isto, sob a base de critérios científicos objetivos para orientar a interpretação destes dados. Assim, este capítulo permitirá, pela primeira vez, ter a contribuição mais robusta já realizada para a delimitação de Unidades de Conservação em espécies de peixes altamente exploradas entre as duas maiores bacias subcontinentais: Orinoco e Amazonas.

14 MATERIAL E MÉTODOS

14.1 Obtenção de sequências, SNPs e dados ecológicos

As sequências mitocondriais (Citocromo Oxidase I - COI / Região Controle - RC) e nucleares (Glycosiltransferase – glyt / cadeia pesada 6 alfa da miosina do músculo cardíaco - myh6) das diferentes espécies de peixes utilizadas dentro deste Capítulo, foram obtidas do banco de dados do trabalho anterior realizado no CAPÍTULO III desta tese.

Para a obtenção de SNPs e RADtags, foram desenvolvidas bibliotecas genômicas para 15 indivíduos de cada espécie por cada bacia, ficando representada toda a distribuição geográfica mencionada das mesmas (entre 2 e 4 indivíduos por localidade) (Figura 7). Para tanto, foi utilizado o protocolo de obtenção de bibliotecas genômicas, descoberta e genotipagem de SNPs desenvolvido no CAPÍTULO I e CAPÍTULO II desta Tese. As espécies que fizeram parte deste processo foram selecionadas sob o critério de possuir uma condição migradora (considerando que esta condição confere maior probabilidade de fluxo gênico atual), algum tipo de evidência de fluxo gênico ou compartilhamento de haplótipos ou grupos biológicos em análises prévias no nível mitocondrial (ver CAPÍTULO III), isto com o objetivo de conferir se estes eventos de conectividade realmente estão acontecendo, e determinar os limites espaciais desde uma visão biparental através do genoma como um todo e numa escala mais refinada, cujos resultados são de grande importância na delimitação de Unidades de Conservação (FUNK et al., 2012).

Em relação à obtenção de dados ecológicos, cabe salientar que foi feita com o objetivo de dar suporte ambiental às explicações para a formação (no caso de existirem) de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) determinadas com dados genéticos. Considerando que a configuração de uma ESU é o produto de forças evolutivas neutras (deriva após vicariância) e seletivas (ecologia e ambiente), foi necessário examinar os segundos fatores, pois permitem determinar quais deles poderiam estar modelando e explicando os padrões genéticos encontrados nas

espécies de peixe de que trata este trabalho. Assim, dentro dos fatores analisados e que podem causar isolamento reprodutivo temporal ou estacionário (barreiras pré-zigóticas) se encontra a precipitação, intimamente ligada aos ciclos reprodutivos de peixes migradores (BARTHEM; GOULDING, 1997; CHELLAPPA et al., 2009; GURGEL; VERANI; CHELLAPPA, 2012). Nós partimos da hipótese de que uma falta de sincronização no ciclo de precipitações afeta drasticamente também a sincronização no comportamento social e reprodutivo dos peixes entre bacias (MUNRO; SCOTT; LAM, 1990), podendo ajudar a explicar o isolamento reprodutivo, em caso de existir. Os segundo fator testado foi o físico-químico (pH), o qual se constitui num fator chave na diferenciação dos tipos de água pretas e brancas, além de estar intimamente ligado às mudanças de alcalinidade, dureza e condutividade de um ambiente aquático (FURCH; JUNK, 1997), com grande importância na especiação divergente, especialmente em peixes sedentários (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2012b).

Para tanto, foi construído um banco de dados a partir de um levantamento bibliográfico (artigos científicos, teses, dissertações e informes de campo) relacionados com variáveis físico-químicas da água para as localidades de ocorrência das espécies de peixes das que trata esta tese, tanto no Orinoco quanto no Amazonas: Depetris e Paolini (1988); Cressa et al. (1993); Furch e Junk (1997); Menezes e Góes (1988); Kuchler et al. (2008); Marmos (2002); Molina (2002); Turcq e Benedetti (2005); Mora et al. (2007); Mireide et al. (2009); Parada-Guevara e Cruz-Casallas (2011); Alvarez et al. (2013). No caso dos dados de pluviosidade, foram obtidos a partir da plataforma CLIMA-DATA.org, registrando a média mensal de precipitação (mm) desde 1982 até 2012 de 44 localidades, incluindo cada um dos pontos de coleta dentro de cada Rio, além de outros pontos ao longo das calhas principais para tornar mais robusto o banco de dados em termos de “n” amostral. CLIMA-DATA.org é um plataforma de dados climáticos com mais de 220 milhões de pontos monitorados ao redor do mundo, com uma resolução de 30 arcos-segundos.

14.2 Análise de dados

14.2.1 Análise conjugada do ADN mitocondrial (COI e RC) e nuclear (regiões exônicas dos genes *Glyt* e *myh6*)

As marcas da evolução de uma população ou espécie estão amplamente distribuídas ao longo dos diferentes genomas (mitocondrial e nuclear) dos indivíduos que as compõem. A visão conjunta e integrada destas informações permite elucidar a trajetória evolutiva que está seguindo dita população de uma maneira holística (AVISE, 2009). Portanto, foi realizada uma análise multilocus para todas as espécies com o objetivo de verificar a existência de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs). Desta análise foi excluída *Colossoma macropomum*, para quem todas as evidências do genoma mitocondrial e nuclear (genômica e genes individuais) apontaram com contundência à formação de uma única ESU para as duas bacias.

Isto foi determinado através da metodologia de “árvore de espécies” sob o método Bayesiano MCMC por “coalescência multiespécies” com o protocolo BEAST de Heled e Drummond (2010) implementado na aplicação *BEAST do programa BEAST 1.8 (DRUMMOND et al., 2012). Para tanto, foram selecionados dados mitocôndrias

(COI e RC) e nucleares (Glyt e myh6) de 14, 19, 19, 24, 18, 17 e 24 indivíduos distribuídos nas duas bacias, respectivamente para *B. rousseauxii*, *P. brachypomus*, *P. metaense/P. tigrinum*, *P. orinocoense/P. punctifer*, *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*.

As diferentes análises foram programadas através da interface gráfica Beauti do pacote BEAST. Inicialmente foram consideradas três partições: ADN mitocondrial (COI+RC), Glyt e myh6; cada um sob um modelo evolutivo independente: respectivamente para cada gene HKY+G, HKY e HKY+G (*B. rousseauxii*); HKY+G, HKY e TN+G (*P. brachypomus*); HKY+G, HKY+G e TN+G (*P. metaense/P. tigrinum*); TN+G, HKY+G e HKY+G (*P. orinocoense/P. punctifer*), TN+G, HKY e HKY+G (*N. unifasciatus*); TN+G, HKY e HKY+G (*P. axelrodi*) e HKY+G, HKY e HKY (*P. altum*). Outros parâmetros utilizados incluíram um modelo de relógio molecular relaxado (ligado entre genes) e a seleção do tipo de gene (mitocondrial ou autossômico nuclear). O modelo de árvore foi definido como seguindo um processo de especiação de Yule, e o tamanho populacional foi assumido como constante (GILL et al., 2012). Para o resto dos *priors* foram usadas condições *defaults* sugeridos pelo programa. Uma vez obtido o arquivo XML foram realizadas duas corridas independentes de 200 milhões MCMC, posteriormente combinadas com o programa *Logcombiner* do mesmo pacote. Para verificar a robustez estatística foi utilizado o programa *Tracer*, onde os valores de ESS > 300, correta distribuição das probabilidades posteriores e gráfico estacionário da corrida (convergência das cadeias), indicaram válida a análise. As informações relacionadas com as árvores de espécies obtidas (probabilidade posterior) foram sumarizadas pelo programa *Annotator* assumindo um *burn-in* de 40 milhões, sendo que a árvore foi visualizada no programa *Figtree*, ambos dentro do pacote BEAST.

Para definir se uma localidade (em peixes sedentários) ou bacia (em migradores) constituíam uma ESU independente, foi levada em conta a probabilidade posterior suportando cada clado na árvore de espécies (HUELSENBECK et al., 2001). Segundo Alfaro e Holder (2006), o limiar de suporte correto para rejeitar a hipótese nula (não existe mais de uma espécie) dentro de uma árvore Bayesiana é 0,95. Isto é, valores de suporte iguais ou superiores indicam que a hipótese nula pode se rejeitada e que o clado observado é correto, e, portanto se ajusta aos *priors* assumidos para a sua construção, podendo ser concluído que o que vemos nos terminais são, com uma alta probabilidade, espécies. Neste caso, foram chamadas de possíveis ESUs.

14.2.2 ADN Nuclear: SNPs

Os dados de matrizes de genotipagem *de novo* de SNPs para as diferentes espécies selecionadas, foram obtidos pelo programa STACKS (CATCHEN et al., 2011), seguindo a metodologia proposta no CAPÍTULO I e II desta Tese. O *pipeline* permitiu gerar um arquivo de saída no formato GENPOP para a matriz de genotipagem dos indivíduos. Uma vez que a matriz foi obtida, a mesma foi convertida ao formato STRUCTURE utilizando o programa PGDSpider (LISCHER; EXCOFFIER, 2012), e posteriormente analisada no programa STRUCTURE (PRITCHARD; STEPHENS; DONNELLY, 2000).

STRUCTURE permitiu a determinação de grupos biológicos sob a base da ausência de desvio do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) por parte das frequências

alélicas que compõem cada grupo. Considerando que a hipótese alternativa consiste em que cada bacia compõe um grupo biológico separado, e, portanto as frequências alélicas no interior de cada bacia estão em EHW, espera-se que um desvio deste demonstre fluxo gênico entre estas bacias. Toda vez que a conexão entre indivíduos das bacias do Orinoco e Amazonas é o produto da migração de fêmeas e machos, esta escala de refinamento (SNPs), onde estão envolvidos marcadores de herança biparental em grande número, permite estabelecer com melhor acurácia e sensibilidade as áreas de conexão e intercâmbio de indivíduos nas diferentes espécies.

Para tanto, foram utilizados os modelos de Mistura e Frequências Alélicas correlacionadas para gerar as probabilidades posteriores do número de grupos. As análises de atribuição de indivíduos foram executadas com 1 milhão de passos de *Markov-Chain-Monte-Carlo* (MCMC) com um descarte do 10% como *burn-in*. Cada análise foi repetida 10 vezes para um total de 4 K testados, e a convergência entre as diferentes corridas foi determinada pela verificação de igualdade das probabilidades posteriores e o valor de α de cada corrida independente. Uma vez obtida esta informação, os valores de Q de cada corrida para cada um dos K, foram obtidos utilizando o programa STRUCTURE HARVESTER 0.6.92 (EARL; VONHOLDT, 2011), estimando as estatísticas de atribuições de indivíduos aos clusters a partir de todas as réplicas através do programa CLUMPP (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007), e, finalmente visualizando graficamente os clusters de atribuição de indivíduos utilizando o programa DISTRUCT (ROSENBERG, 2003). O número mais provável de K grupos biológicos foi inferido utilizando o método de Evanno (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). Adicionalmente, a matriz de genótipos de SNPs foi utilizada na realização de uma análise de estrutura populacional através do uso do índice F_{st} entre as populações do Orinoco e Amazonas. O método seguiu o padrão utilizado em sequências de ADNmt no Capítulo I desta Tese.

Para a determinação das relações de ancestralidade entre bacias, onde a ausência de monofilia recíproca indicaria fluxo gênico ou divergência muito recente (WILLIS et al., 2010), foi realizada uma reconstrução filogenômica utilizando o programa PhyML (GUINDON et al., 2010) sob o modelo evolutivo HKY85 com 500 réplicas. Para tanto, foi obtido inicialmente o arquivo phym1 com o banco de dados das sequências genômicas dos indivíduos selecionados de cada bacia através do programa PyRAD (EATON, 2014). Este *pipeline* permitiu a montagem *de novo* de loci (tags de sequências) obtidas previamente pelo método de construção de bibliotecas genômicas baseadas em RADs (*Restriction site Associated DNA*), agrupando e concatenando as mesmas de uma maneira hierárquica até a obtenção de uma única sequência representando o genoma de cada indivíduo envolvido. Finalmente, a árvore filogenética foi visualizada e editada no programa FigTree (DRUMMOND et al., 2012), sendo que só os valores de suporte dos ramos (*bootstrap*) maiores a 50% foram mostrados.

Por outro lado, considerando que dentro do conceito de Unidade Evolutiva Significante (ESU) (CRANDALL et al., 2000) se incluem condições para as populações testadas, como por exemplo, carecer de habilidade de intercâmbio ecológico entre elas (diferentes adaptações ou pressões seletivas), se faz necessário testar a existência destas marcas no genoma nuclear para as populações de peixes das duas bacias, verificando se além dos eventos geológicos conhecidos, existem fatores ecológicos contribuindo à formação dos padrões de distribuição observados.

Para tanto, foi realizada uma análise de detecção de loci sob seleção (positiva ou negativa) utilizando o programa BAYESCAN (<http://www-leca.ujf-grenoble.fr/logiciels.htm>) que implementa a metodologia de Foll e Gaggiotti (2008). Foram utilizados dados genômicos (SNPs) apenas de indivíduos das espécies *B. rousseauxii*, *P. metaense*/*P. tigrinum* e *P. orinocoense*/*P. punctifer*, para os quais houve alguma evidência de estrutura no ADN mitocondrial e nuclear entre bacias em análises prévias. Em todos os casos foram usados 15 indivíduos por bacia. No caso de *P. orinocoense*/*P. punctifer*, dada a sua ocorrência em águas pretas e brancas, os indivíduos ocorrendo no Amazonas foram divididos em dois grupos durante a análise: Rio Negro e resto do Amazonas.

As comparações foram feitas no programa BAYESCAN. Este implementa um método Bayesiano baseado no modelo multinomial Dirichlet, estimando diretamente a probabilidade de cada locus estar sob seleção. BAYESCAN estima coeficientes de F_{st} específico para cada locus e para cada população (FOLL; GAGGIOTTI, 2008). Para identificar loci sob seleção, o software foca sobre a probabilidade de distribuição posterior de α_i onde um valor positivo e significativo indica seleção positiva, enquanto que um valor negativo e significativo indica seleção estabilizadora ou purificadora. A significância do desvio da neutralidade (desvio de α_i em relação a 0) será estimado para cada locus em BAYESCAN usando o algoritmo de pulo reversível Metropolis acoplado à Cadeias de Markov (MCMC). A rejeição da hipótese de seleção sob as populações foi conferida pelos valores de probabilidade posterior de cada loci, levando em conta uma baixa Taxa de Descoberta Falsa (FDR), sendo que aqueles loci identificados com um $FDR \leq 0,05$ foram considerados sob seleção, ao contrário, os loci e as populações envolvidas foram considerados isentas de evidências de pressões ecológicas ou seletivas no genoma. A visualização da distribuição das probabilidades para cada loci foi plotada utilizando o arquivo de saída do mesmo, e utilizado como input no pacote estatístico R, fazendo uso das funções sugeridas pelo autor.

14.2.3 Análise de dados ambientais: Pluviosidade e pH

Para determinar se os ciclos de precipitação (que condicionam o início dos ciclos reprodutivos em peixes migradores) possuíam diferenças entre as bacias do Orinoco e o Amazonas, foi realizado uma análise estatística multivariada de similaridade com modelo hierárquico de determinação de clusters, o qual permitiu o agrupamento de localidades que apresentaram ciclos de precipitação anuais estatisticamente similares pelo método de distância euclidiana.

Assim também, para avaliar a existência de diferenças nas variáveis físico-químicas da água entre as bacias do Orinoco e Amazonas, foram realizadas duas análises independentes. A primeira, foi executada para comparação de médias entre variáveis de pH compreendendo os principais rios de coleta de peixes migradores nas duas bacias (Orinoco VS. Solimões VS. Negro VS. Branco). A segunda análise foi elaborada para comparar as médias desta mesma variável entre bacias, mas apenas compreendendo os dados de locais de coleta específicos dos peixes sedentários (Orinoco VS. Negro). Deste modo, no caso dos peixes migradores, o teste estatístico de comparação de médias para as variáveis físico-químicas foi Tukey, com uma prévia análise de variância (ANOVA). Em relação aos peixes sedentários, foi utilizado um teste

de “t” para duas amostras. Em ambos os casos, os testes foram elaborados com uma confiabilidade de 95% e uma significância estatística de 5%.

Todas as análises estatísticas (multivariada, ANOVA e teste de “t”) foram executadas utilizando o software MINITAB (Minitab 17, Inc., USA). Os valores relacionados com a variável físico-química pH foram apresentados como a média \pm desvio padrão.

Estes dados foram comparados com os padrões genéticos de distribuição das populações, e desta maneira suportando a formação de possíveis Unidades Adaptativas.

14.2.4 Interpretação de dados e definição de Unidades de Conservação

As informações de análises do capítulo anterior (relacionados com estrutura populacional) somadas às novas evidências originadas neste capítulo foram utilizadas como insumo de uma análise interpretativa (ajustada a critérios científicos) para a delimitação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs), Unidades Adaptativas (AUs) e Unidades de Manejo (MUs).

Para tanto, foram inicialmente definidos ditos critérios para a identificação das unidades de conservação.

ESU

- a. As populações denominadas como ESUs devem mostrar concordância entre a descontinuidade filogenética e geográfica (CRANDALL et al., 2000)
- b. A população está historicamente e, de forma substancial, reprodutivamente isolada de outras populações (MORITZ, 1994; WAPLES, 1991).
- c. A população mostra monofilia recíproca no ADN mitocondrial e diferenças significativas nas frequências alélicas nucleares (MORITZ, 1994).
- d. A população se deriva de uma consistente e congruente filogenia de genes (AVISE, 1994).
- e. A população não deve ter capacidade de intercâmbio genético, isto é, a população não deve ter tido fluxo gênico atual ou recente com outras (CRANDALL et al., 2000).
- f. A população mostra evidências de uma adaptação incomum ou adaptação diferencial (AU) no seu ambiente (ou ecologicamente diferenciada) (FUNK et al., 2012; WAPLES, 1991).

MU

- a. A população não mostra monofilia recíproca no ADN mitocondrial, mas possui diferenças nas frequências alélicas nucleares (FUNK et al., 2012; MORITZ, 1994).
- b. A população apresenta diferenças nas frequências haplotípicas mitocondriais, apesar da falta de monofilia recíproca entre estes haplótipos (MORITZ, 1994).

- c. A população é demograficamente independente, isto é, sua dinâmica populacional (taxa de crescimento) depende mais das taxas locais de nascimento e morte em vez da imigração (FUNK et al., 2012; MORITZ, 1994).

Deste modo, cada um dos critérios foi avaliado por espécie à luz das evidências que se tivessem para cada uma. Como resultado desta análise, foram elaborados mapas geográficos representando graficamente as unidades de conservação obtidas.

15 RESULTADOS

15.1 Análise filogenética integrada de ADN mitocondrial (COI e RC) e nuclear (regiões exônicas dos genes *Glyt* e *myh6*)

Uma árvore de espécies, a qual integra o sinal filogenético de vários genes (nucleares e mitocondriais) de forma independente, permitiu determinar as possíveis ESUs formadas para cada espécie de uma forma estatisticamente mensuráveis através de inferência Bayesiana por teste de hipótese. Este método foi aplicado a todas as espécies migradoras ou sedentárias, exceto para *C. macropomum*, para quem as evidências mitocondriais e de genes nucleares mostraram claramente a não existência de uma ESU por bacia.

Em relação aos peixes migradores, por exemplo, *B. rousseauxii* e *P. brachypomus*, foi possível determinar duas ESUs, uma para cada bacia, com 0,9616 e 0,9792, respectivamente, de probabilidade posterior suportando o clado (Figura 24, 25). No resto das espécies migradoras (*P. metaense/P. tigrinum*, *P. orinocoense/P. punctifer*) a probabilidade posterior foi inferior a 0,95, impedindo rejeitar a hipótese nula de uma única ESU abrangendo as duas bacias (Figura 26, 27).

No caso dos peixes sedentários, foi observado para *N. unifasciatus* que Puerto Inírida (IN) não é uma ESU independente das populações de Puerto Gaitán (PG) e San José del Guaviare (GV). No entanto, PG e GV se comportaram como ESUs independentes entre si (Figura 28). Da mesma maneira, foi observado que as populações do Amazonas se comportam como uma única ESU independente com respeito ao Orinoco.

Quando observamos *P. axelrodi* e *P. altum*, vemos que os padrões são muitos similares entre ambas as espécies em termos da distribuição de ESUs. Assim, no caso das duas espécies, foi determinada uma ESU abrangendo todas as populações da bacia do Orinoco + Cucui (CUC), além de uma segunda ESU independente para Santa Isabel (SI). No caso particular de *P. axelrodi*, que neste estudo foi amostrada até Barcelos, foi achada uma terceira ESU composta justamente pelos indivíduos desta última localidade no Rio Negro (Amazonas) (Figura 29, 30).

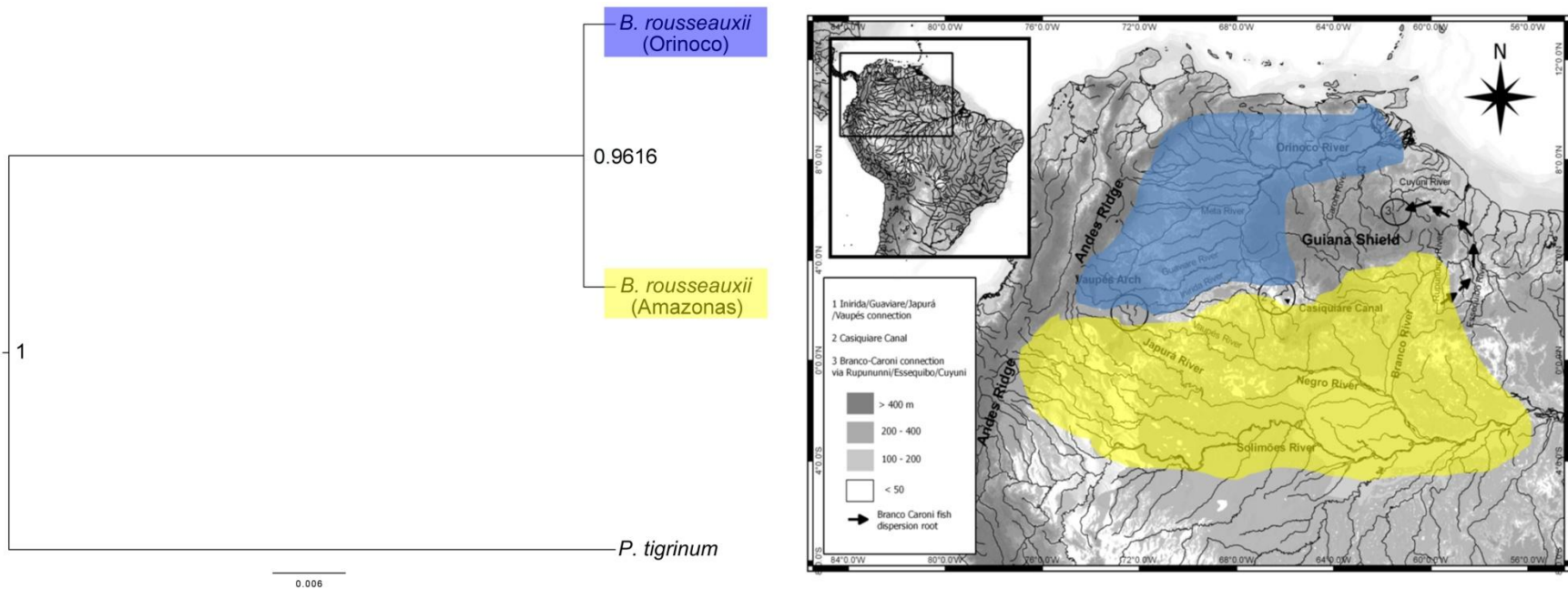


Figura 24. Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (*species tree*) implementada no programa *Star Beast* (do pacote BEAST) para a espécie *Brachyplatystoma rousseauxii*. Valores de suporte superiores a 0.95 permitem rejeitar a hipótese nula de uma única ESU para as populações representadas nos terminais da árvore. Cores diferentes representam ESUs independentes.

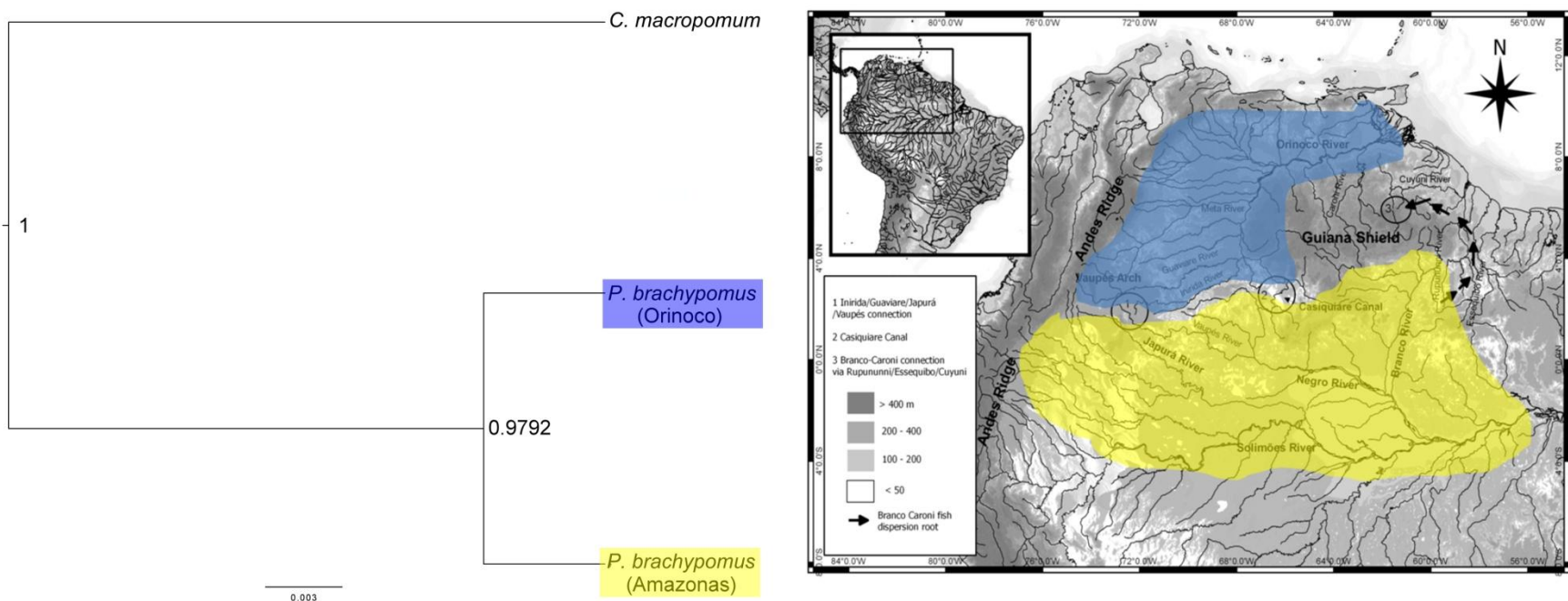


Figura 25. Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (*species tree*) implementada no programa *Star Beast* (do pacote BEAST) para a espécie *Piaractus brachypomus*. Valores de suporte superiores a 0.95 permitem rejeitar a hipótese nula de uma única ESU para as populações representadas nos terminais da árvore. Cores diferentes representam ESUs independentes.

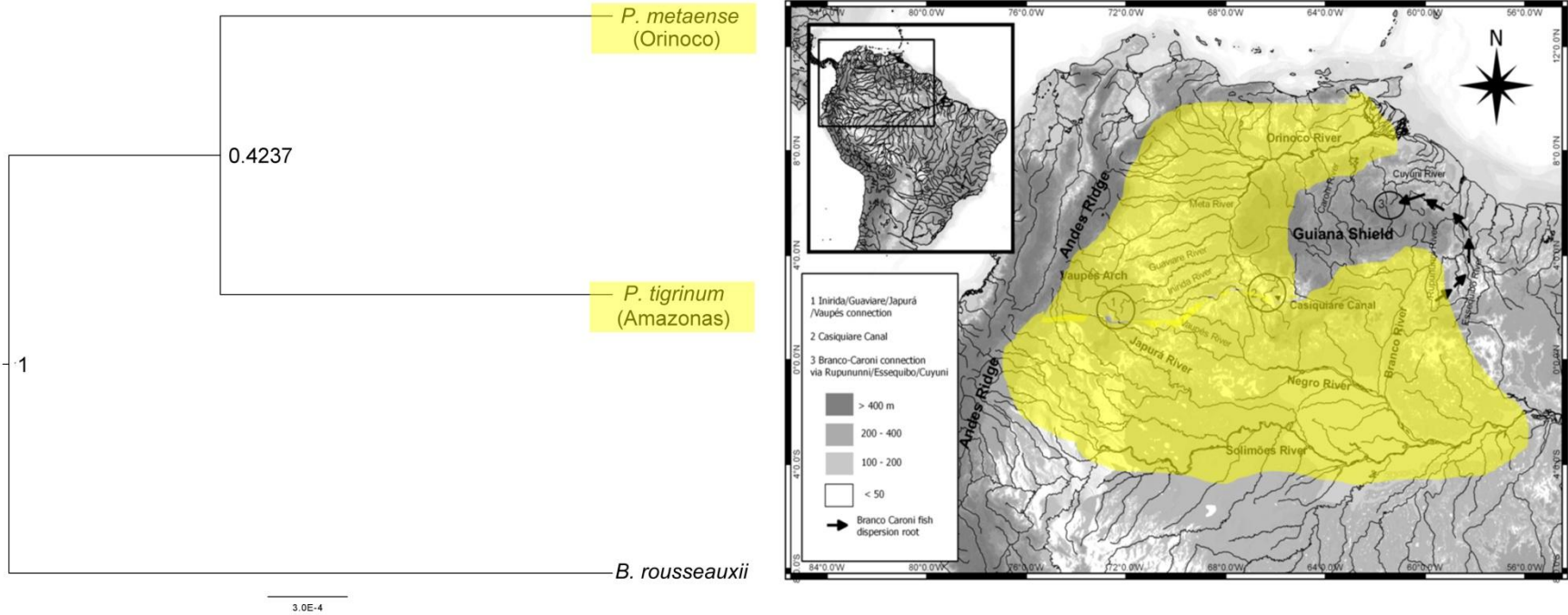


Figura 26. Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (*species tree*) implementada no programa *Star Beast* (do pacote BEAST) para a espécie *Pseudoplatystoma metaense*/*Pseudoplatystoma tigrinum*. Valores de suporte superiores a 0.95 permitem rejeitar a hipótese nula de uma única ESU para as populações representadas nos terminais da árvore. Cores diferentes representam ESUs independentes.

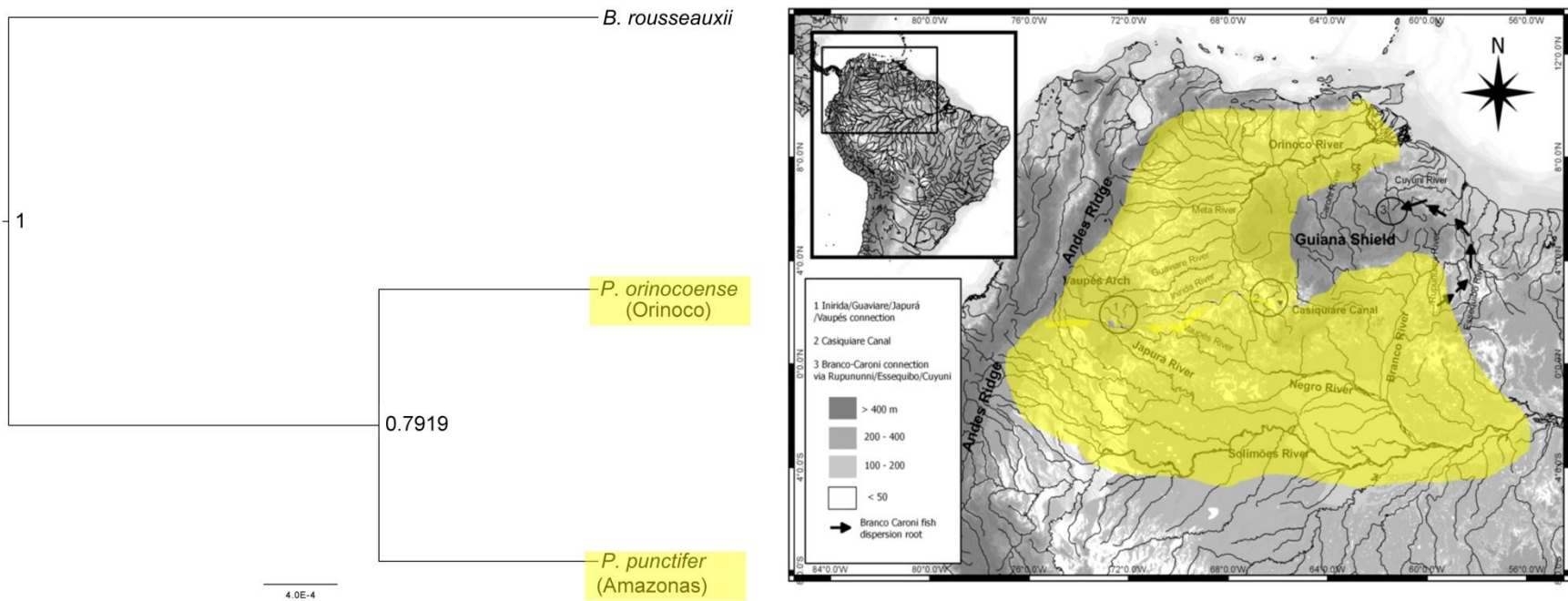


Figura 27. Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (*species tree*) implementada no programa *Star Beast* (do pacote BEAST) para a espécie *Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer*. Valores de suporte superiores a 0.95 permitem rejeitar a hipótese nula de uma única ESU para as populações representadas nos terminais da árvore. Cores diferentes representam ESUs independentes.

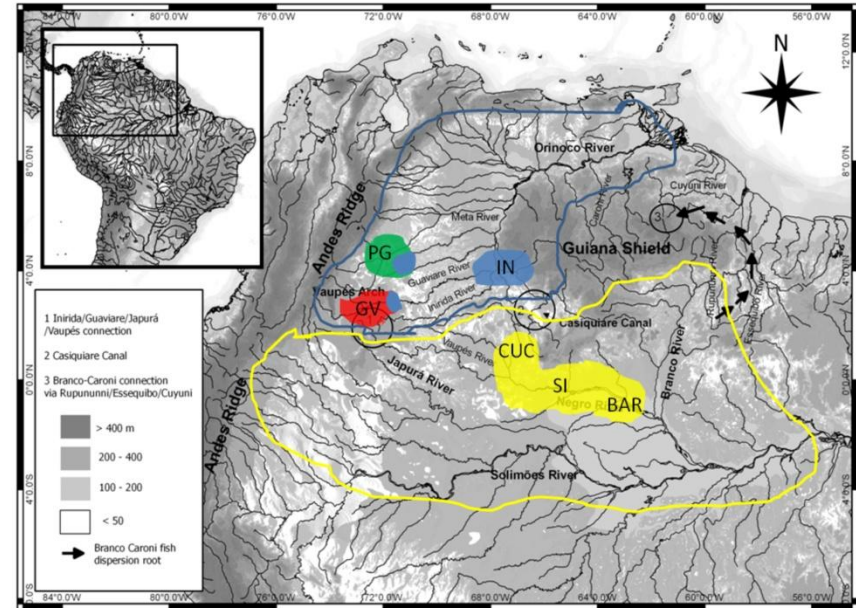
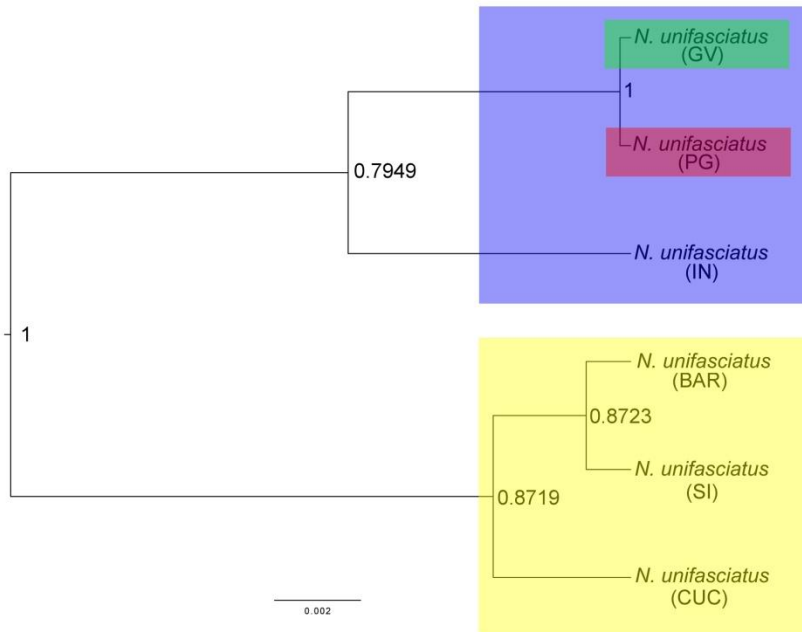


Figura 28. Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (*species tree*) implementada no programa *Star Beast* (do pacote BEAST) para a espécie *Nannostomus unifasciatus*. Valores de suporte superiores a 0.95 permitem rejeitar a hipótese nula de uma única ESU para as populações representadas nos terminais da árvore. Cores diferentes representam ESUs independentes.

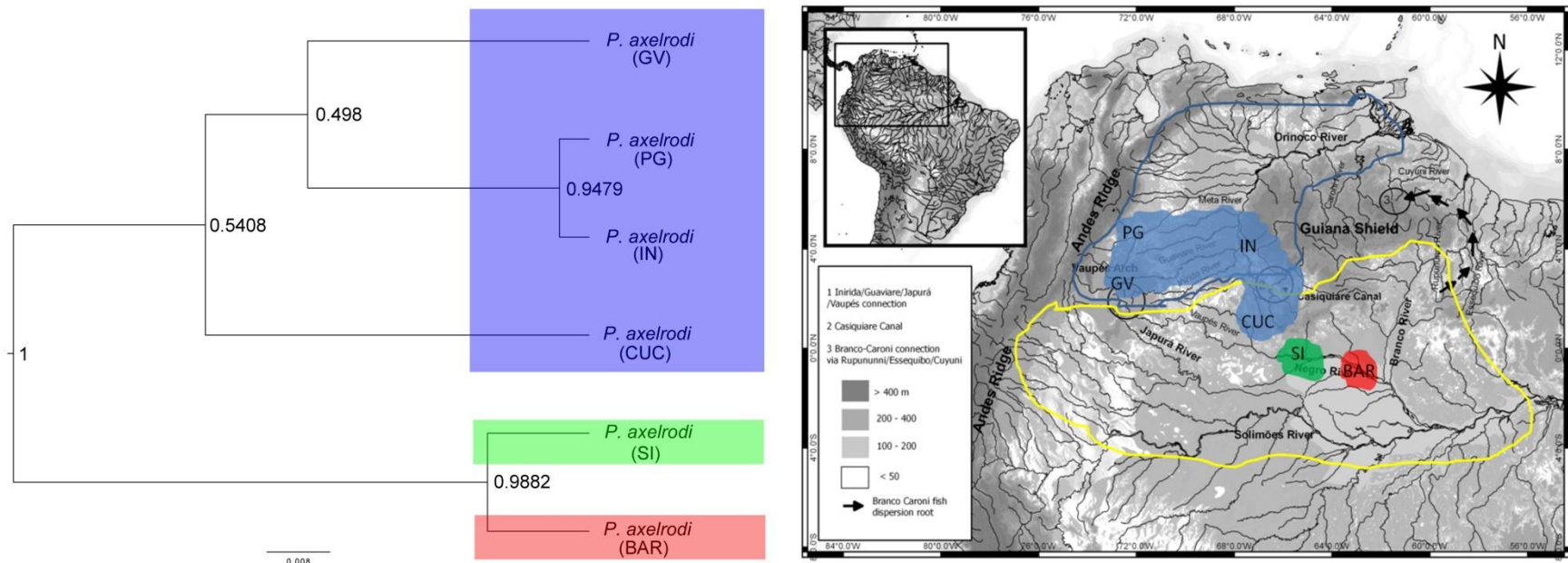


Figura 29. Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (*species tree*) implementada no programa *Star Beast* (do pacote BEAST) para a espécie *Paracheirodon axelrodi*. Valores de suporte superiores a 0.95 permitem rejeitar a hipótese nula de uma única ESU para as populações representadas nos terminais da árvore. Cores diferentes representam ESUs independentes.

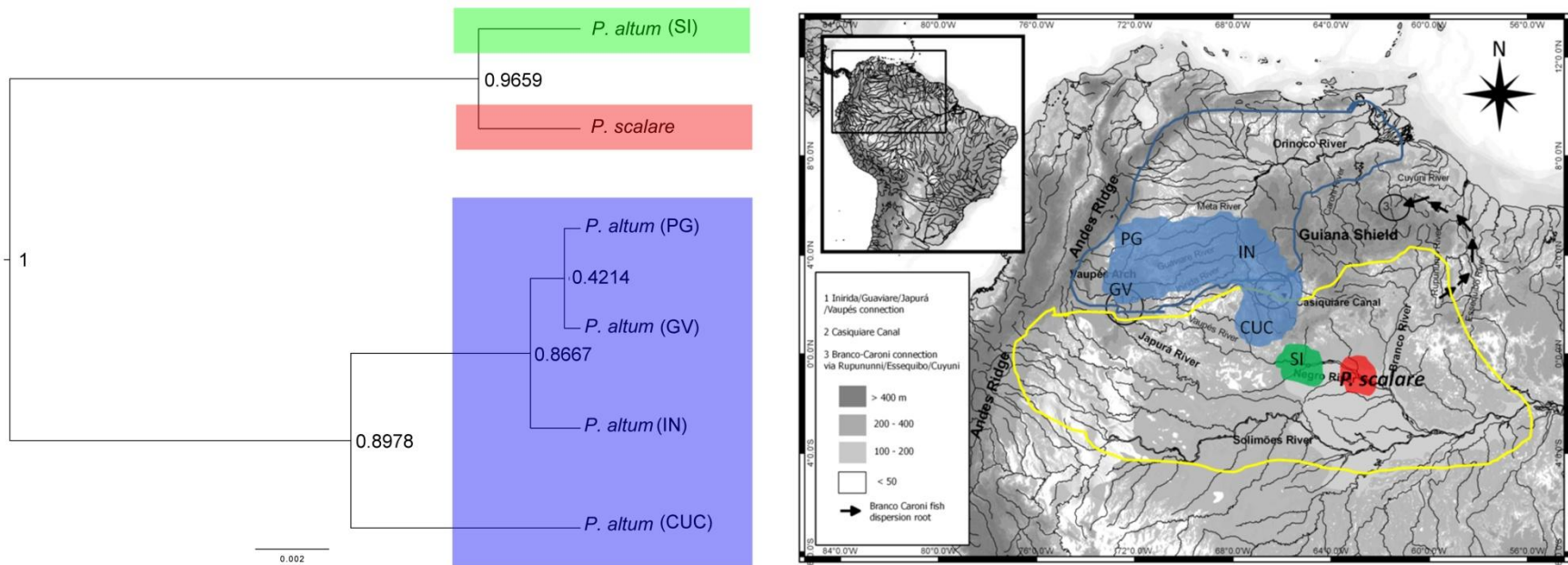


Figura 30. Determinação de Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) com base em análise filogenética por inferência Bayesiana multilocus (*species tree*) implementada no programa *Star Beast* (do pacote BEAST) para a espécie *Pterophyllum altum*. Valores de suporte superiores a 0.95 permitem rejeitar a hipótese nula de uma única ESU para as populações representadas nos terminais da árvore. Cores diferentes representam ESUs independentes.

15.2 ADN Nuclear: SNPs

O programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs (398 loci para *B. rousseauxii*, 601 para *C. macropomum*, 371 para *P. tigrinum* e 322 para *P. orinocoense/P. punctifer*), mostrou respectivamente para cada espécie, 2 (Ln Pr X|K = -26035,5), 1 (Ln Pr X|K = -14865,67), 2 (Ln Pr X|K = -3120,66) e 2 (Ln Pr X|K = -4031,6) grupos biológicos (Figura 31 - 34).

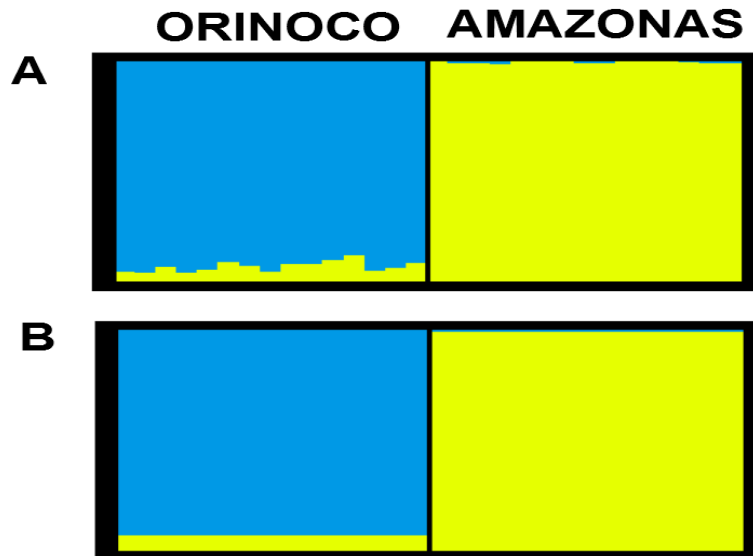


Figura 31. *Brachyplatystoma rousseauxii*. Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs. Cada cor (Azul: Orinoco; Amarelo: Amazonas) corresponde a uma composição genômica independente. Cada barra em “A” indica a probabilidade de que um indivíduo pertença a esse grupo genético/biológico.

Das espécies analisadas, *B. rousseauxii* foi a única para a qual não houve evidências genômicas de fluxo gênico entre indivíduos das bacias do Orinoco e Amazonas, mas se observam alguns vestígios genômicos que mostram uma divergência num passado relativamente recente (Figura 31A), mostrando que estas duas populações, apesar do Orinoco mostrar uma origem ancestral Amazônica, hoje são biologicamente independentes e estruturadas. Deste modo, cada bacia demonstrou ser uma ESU independente (Figura 31B). Caso contrário foi mostrado para *C. macropomum*, para a qual não se observaram diferenças genômicas individuais entre ambas as bacias (Figura 32A), se comportando como uma única ESU (Figura 32B).



Figura 32. *Colossoma macropomum*. Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e o Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs. Cada cor (Azul: Orinoco; Amarelo: Amazonas) corresponde a uma composição genômica independente. Cada barra em “A” indica a probabilidade de que um indivíduo pertença a esse grupo genético/biológico.

No caso de *P. metaense/P. tigrinum*, foi possível evidenciar fluxo gênico em um passado recente entre indivíduos do Orinoco e Amazonas, pois é clara a presença de um indivíduo no Orinoco com forte origem ancestral do Amazonas. Assim, a Figura 33A mostra no Orinoco a presença de um indivíduo da localidade de Puerto López (PL) com uma alta composição genômica do Amazonas (89,4%) e apenas 10,6% do Orinoco. Todos os indivíduos dentro da bacia Amazônica possuem uma composição genômica própria dessa bacia que oscila entre 98,6% e 99,97%, o que evidencia que esse indivíduo presente no Orinoco é um migrante do passado recente desde o Amazonas. Apesar disso, a formação de duas MU demograficamente independentes é evidente para cada uma das bacias (Figura 33B).

Os indivíduos da espécie *P. orinocoense/P. punctifer* mostraram uma forte evidência de fluxo gênico recente entre as duas bacias, mas limitado a uma área específica: Alto Rio Negro e Alto Rio Orinoco (Figura 34A). O intercâmbio genômico acontece entre Puerto Inírida (no Orinoco) e Santa Isabel (No Rio Negro – Amazonas). Os indivíduos encontrados nesta área possuem uma composição genômica em média de 55,71% do Amazonas e 44,29% do Orinoco. Apesar disso, foi encontrado adicionalmente um indivíduo no local La Pedrera (Alto Japurá – Amazonas) com composição genômica característica desta área de intercâmbio. Embora esta evidência de fluxo gênico individual, populacionalmente, o resto das bacias mostraram possuir uma marcada diferenciação na composição genômica, demonstrando ser pelos menos MUs demograficamente independentes (Figura 34B).

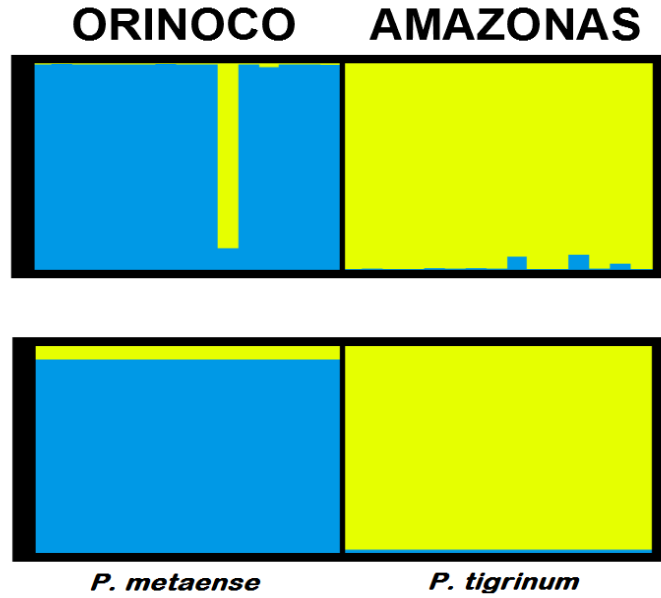


Figura 33. *Pseudoplatystoma metaense*/*Pseudoplatystoma tigrinum*. Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e o Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs. Cada cor (Azul: Orinoco; Amarelo: Amazonas) corresponde a uma composição genômica independente. Cada barra em “A” indica a probabilidade de que um indivíduo pertença a esse grupo genético/biológico.

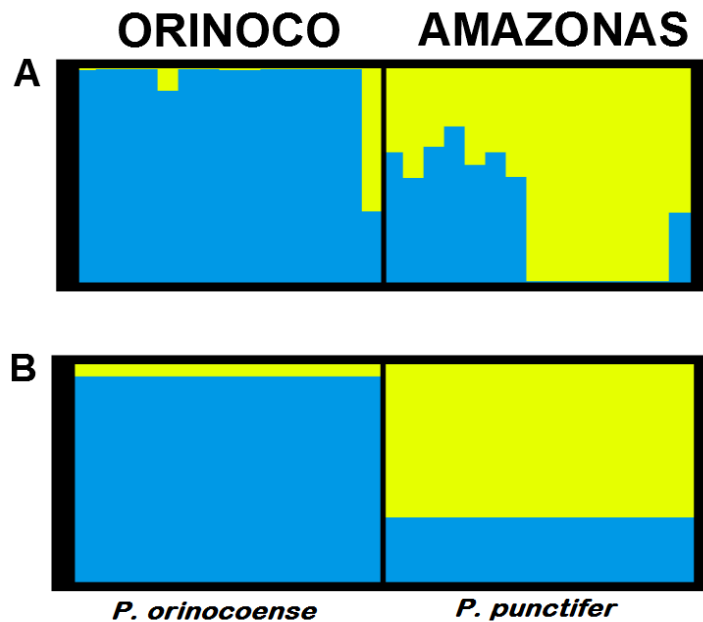


Figura 34. *Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer*. Gráfico de ancestralidade genômica individual (A) e populacional (B) para as bacias do Orinoco e Amazonas, gerado no programa STRUCTURE, utilizando marcadores SNPs. Cada cor (Azul: Orinoco; Amarelo: Amazonas) corresponde a uma composição genômica independente. Cada barra em “A” indica a probabilidade de que um indivíduo pertença a esse grupo genético/biológico.

A monofilia recíproca entre bacias é das mais fortes evidências para determinar que o isolamento reprodutivo existe entre elas (Moritz et al. 1994), e em caso de não ser evidente, pelo menos as relações de ancestralidade filogenéticas entre seus indivíduos permitirá verificar se pode ser atribuído a um isolamento muito recente entre elas, gerando *sorting* incompleto de linhagens.

Deste modo, uma vez executadas as análises filogenômicas entre indivíduos das bacias do Orinoco e o Amazonas, foi determinado o seguinte:

Para os indivíduos de *B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. metaense*/*P. tigrinum*, *P. orinocoense*/*P. punctifer* nas duas bacias, foram obtidas sequências genômicas de 148946, 102716, 207294 e 191913 pares de bases, respectivamente.

Das espécies analisadas, a única evidenciando monofilia recíproca entre o Orinoco e o Amazonas foi *B. rousseauxii*, para quem foi obtido *bootstrap* de 86% e 94% respectivamente nos ramos que suportam o clado do Amazonas e do Orinoco (Figura 35).

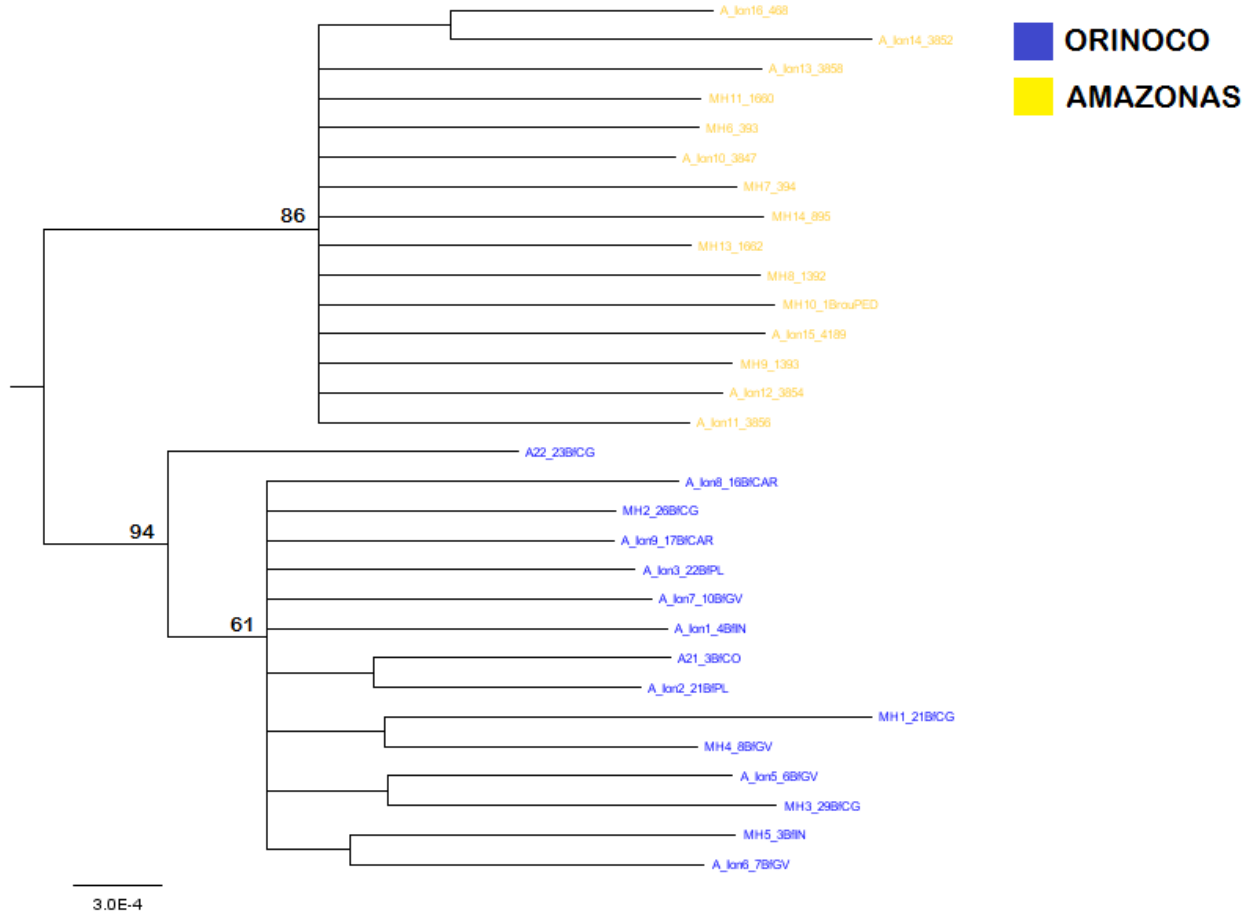


Figura 35. Árvore de Máxima Verossimilhança para *Brachyplatystoma rousseauxii* baseado em 148946 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e Amazonas. Na árvore são mostrados apenas suportes de *bootstrap* superiores a 50% para os ramos.

De forma contrária, em espécies como *C. macropomum*, *P. metaense*/*P. tigrinum* e *P. orinocoense*/*P. punctifer* não foi observada monofilia recíproca entre bacias (Figura 36 – 38). Para estas espécies foi claro que a causa da ausência desta monofilia recíproca foi o compartilhamento de alelos, e portanto um *sorting* incompleto de linhagens. Cabe destacar que em *P. metaense*/*P. tigrinum*, para a qual existiam dúvidas sobre o grau de relação reprodutiva entre bacias pela presença de um indivíduo de origem Amazônica dentro de Orinoco (ver análise de STRUCTURE), as análises filogenômicas determinaram um compartilhamento de alelos entre bacias de forma clara (Figura 37).

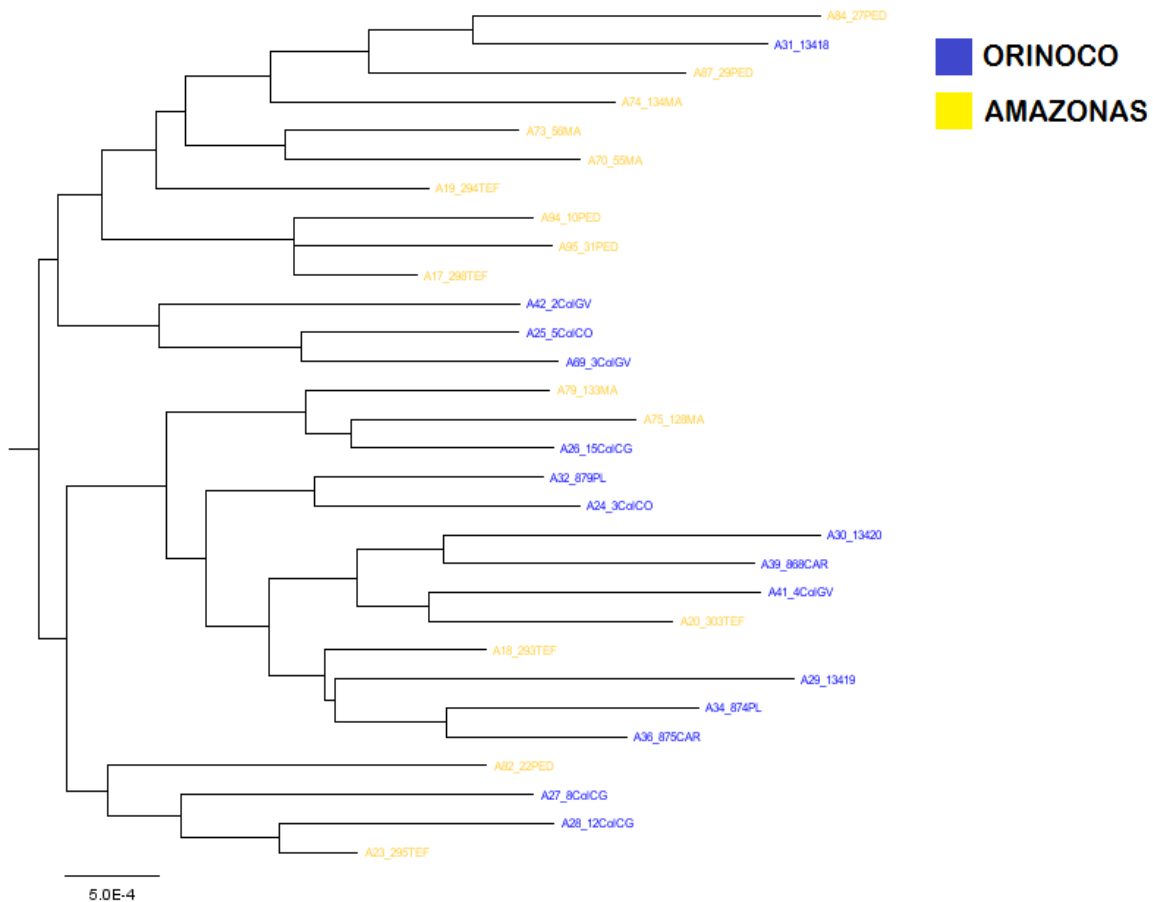


Figura 36. Árvore de Máxima Verossimilhança para *Colossoma macropomum* baseado em 102716 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e o Amazonas. Na árvore são mostrados apenas suportes de *bootstrap* superiores a 50% para os ramos.

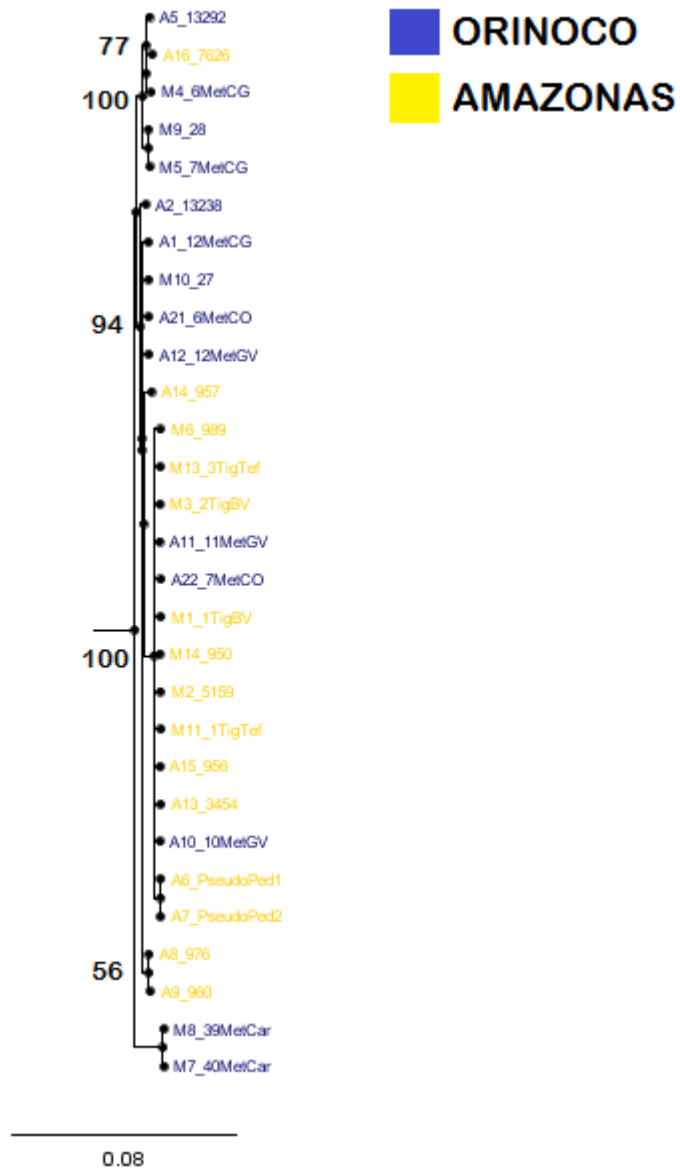


Figura 37. Árvore de Máxima Verossimilhança para *P. metaense*/*P. tigrinum* baseado em 207294 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e Amazonas. Na árvore são mostrados apenas suportes de *bootstrap* superiores a 50% para os ramos.

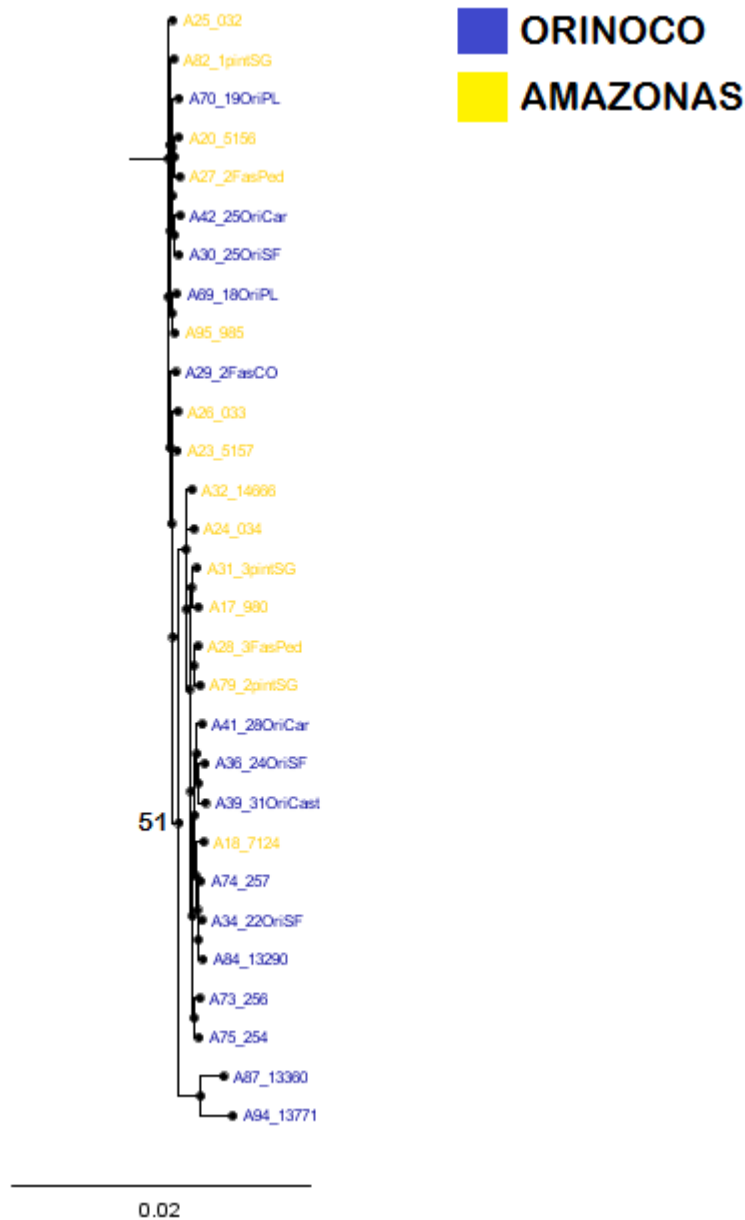


Figura 38. Árvore de Máxima Verossimilhança para *P. orinocoense*/*P. punctifer* baseado em 191913 pares de bases do genoma nuclear de indivíduos da bacia do Orinoco e Amazonas. Na árvore são mostrados apenas suportes de *bootstrap* superiores a 50% para os ramos.

Do mesmo modo que com ADNmt (marcador de herança uniparental), foi calculado o fluxo gênico indireto (F_{st}) para estas mesmas espécies (*B. rousseauxii*, *C. macropomum*, *P. metaense*/*P. tigrinum* e *P. orinocoense*/*P. punctifer*) utilizando marcadores genômicos SNPs (de herança biparental), com o fim de observar a contribuição de fêmeas e machos na estrutura destas espécies entre bacias, e deste modo testar a hipótese de que Orinoco e o Amazonas se comportam como unidades de manejo dentro de uma mesma ESU.

Como resultado, obteve-se que para *B. rousseauxii*, *C. macropomum* e *P. metaense/P. tigrinum*, as bacias do Orinoco e Amazonas se comportam como unidades estruturadas ($F_{st} = 0,29$, $0,0258$ e $0,3056$, respectivamente), pois a hipótese de panmixia entre ambas foi rejeitada contundentemente ($P < 0,05$). Em relação às espécies *P. orinocoense/P. punctifer*, encontrou-se que o Orinoco e o Amazonas não possuem estrutura significativa ($F_{st} = 0,0321$; $P > 0,05$).

Por outro lado, também foi analisado o genoma dos peixes migradores para avaliar estatisticamente a presença de loci sob seleção para orientar melhor a delimitação e caracterização das Unidades Evolutivas Significantes – ESUs entre bacias (CRANDALL et al., 2000), as quais podem possuir Unidades Adaptativas - AUs no seu interior, modeladas pela seleção (FUNK et al., 2012). Isto apenas para as espécies cujo genoma foi sequenciado neste trabalho e apresentaram algum grau de estrutura populacional no nível genômico em análises prévias. Deste modo, foi utilizado o programa BAYESCAN, obtendo que para *B. rousseauxii*, *P. metaense/P. tigrinum* não houve presença de loci significativamente sob seleção entre bacias num nível de $FDR < 0,05$ (Figura 39 e 40). No caso de *P. orinocoense/P. punctifer*, onde foram também analisados indivíduos baseados nas diferenças de tipo de água (Rio Negro VS. Orinoco e Rio Negro VS. Solimões), igualmente não houve presença significativa de loci sob seleção num nível de $FDR < 0,05$ (Figura 41 e 42).

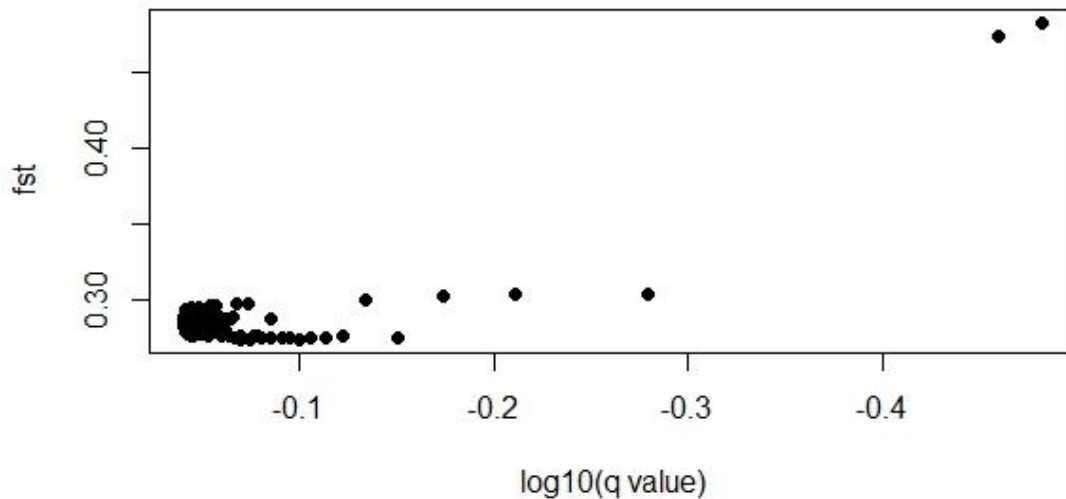


Figura 39. Análise Bayesiana do genoma de *Brachyplatystoma rousseauxii* para a descoberta de loci sob seleção entre o Orinoco VS. Amazonas. F_{st} corresponde ao índice de fixação tradicional, e $\log_{10}(q \text{ value})$ corresponde ao valor de probabilidade em que o FDR (*False Discovery Rate*) se torna significativo. FDR utilizado foi $<0,05$.

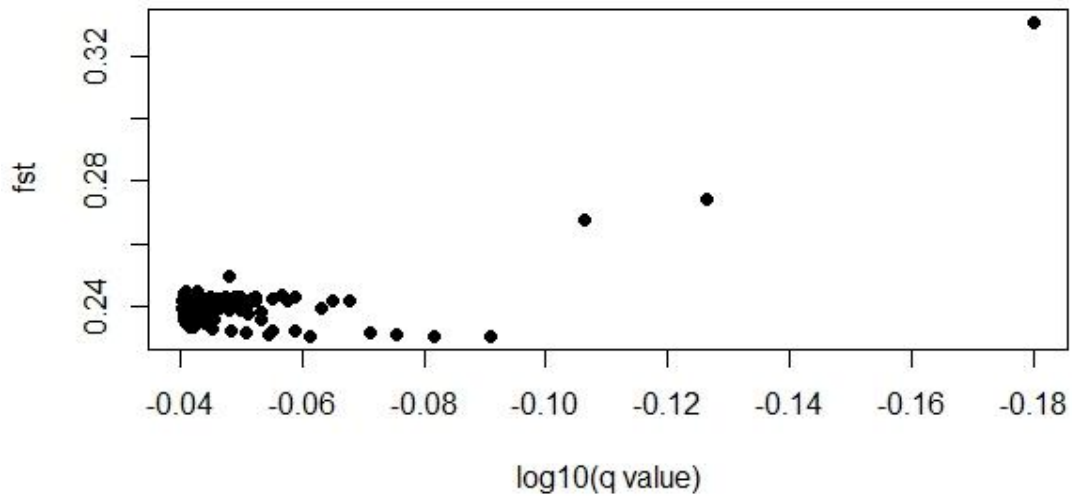


Figura 40. Análise Bayesiana do genoma de *Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum* para a descoberta de loci sob seleção entre o Orinoco VS. Amazonas. Fst corresponde ao índice de fixação tradicional, e $\log_{10}(q \text{ value})$ corresponde ao valor de probabilidade em que o FDR (*False Discovery Rate*) se torna significativo. FDR utilizado foi $<0,05$.

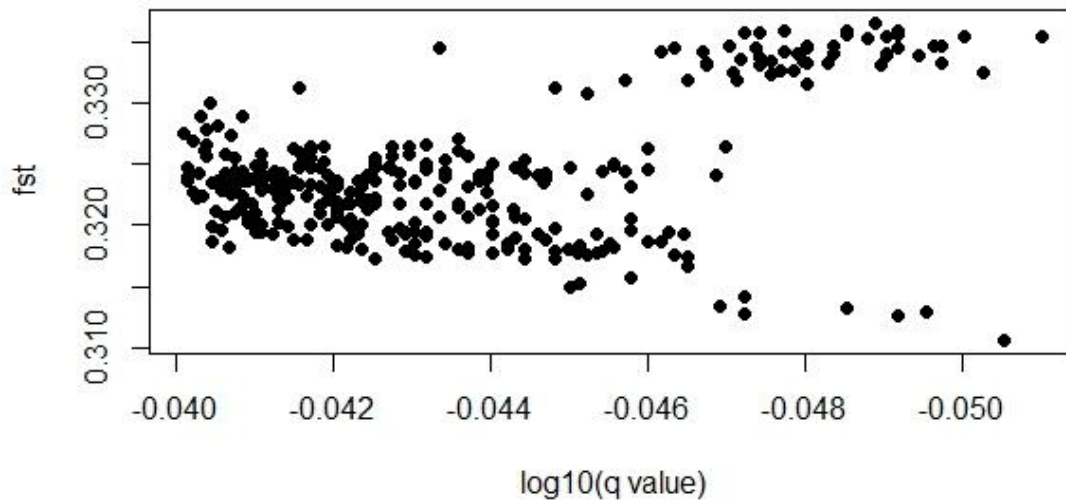


Figura 41. Análise Bayesiana do genoma de *Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer* para a descoberta de loci sob seleção entre o Orinoco VS. Rio Negro. Fst corresponde ao índice de fixação tradicional, e $\log_{10}(q \text{ value})$ corresponde ao valor de probabilidade em que o FDR (*False Discovery Rate*) se torna significativo. FDR utilizado foi $<0,05$.

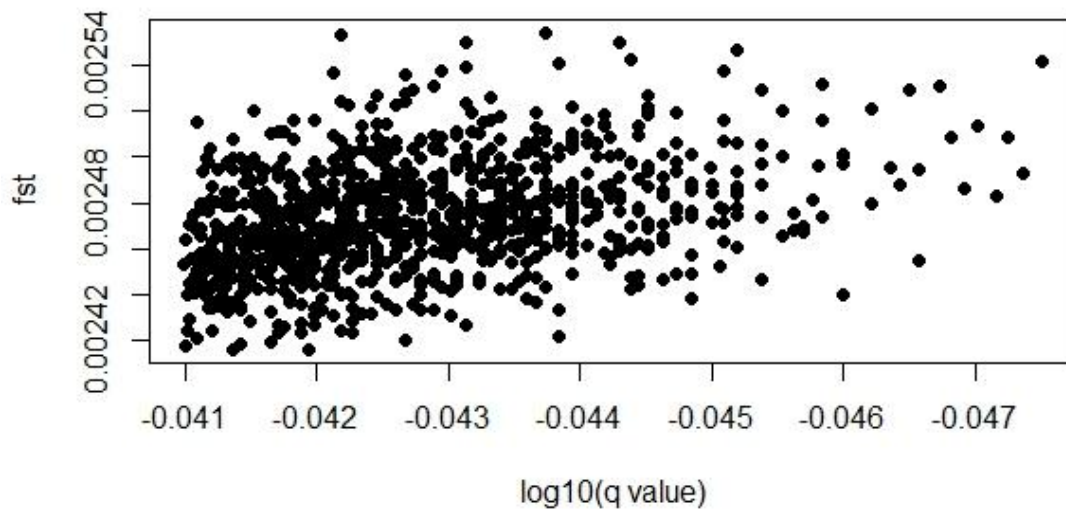


Figura 42. Análise Bayesiana do genoma de *Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer* para a descoberta de loci sob seleção entre o Rio Negro VS. Solimões. Fst corresponde ao índice de fixação tradicional, e $\log_{10}(q \text{ value})$ corresponde ao valor de probabilidade em que o FDR (*False Discovery Rate*) se torna significativo. FDR utilizado foi $<0,05$.

15.3 Dados ambientais: Pluviosidade e pH

Com respeito à variável físico-química pH para peixes migradores, foram obtidos 23 ($7,07 \pm 0,32$), 27 ($6,78 \pm 0,45$), 25 ($6,11 \pm 0,28$) e 29 ($4,43 \pm 0,66$) dados, respectivamente para os rios Orinoco, Solimões, Branco e Negro (Figura 43). As análises estatísticas demonstraram que o Orinoco não possui diferenças significativas de pH com o Solimões ($P > 0,05$); no entanto, estas duas se diferenciam significativamente do Branco e mais fortemente do Negro ($P < 0,05$). Este último Rio mostrou possuir um pH muito baixo e significativamente diferente do resto de sistemas aquáticos (Orinoco, Solimões e Branco; $P < 0,05$) (Figura 43). Em relação aos dados de peixes sedentários, os quais foram tomados de locais da área de coleta deste tipo de peixes, foram obtidos 26 dados para cada sistema aquático com valores de pH de $4,78 \pm 0,46$ e $4,54 \pm 0,60$, respectivamente para o Orinoco e Negro (Figura 44). Não houve diferenças estatisticamente significantes entre valores de pH da água onde habitam estes tipo de peixes entre as bacias ($P > 0,05$).

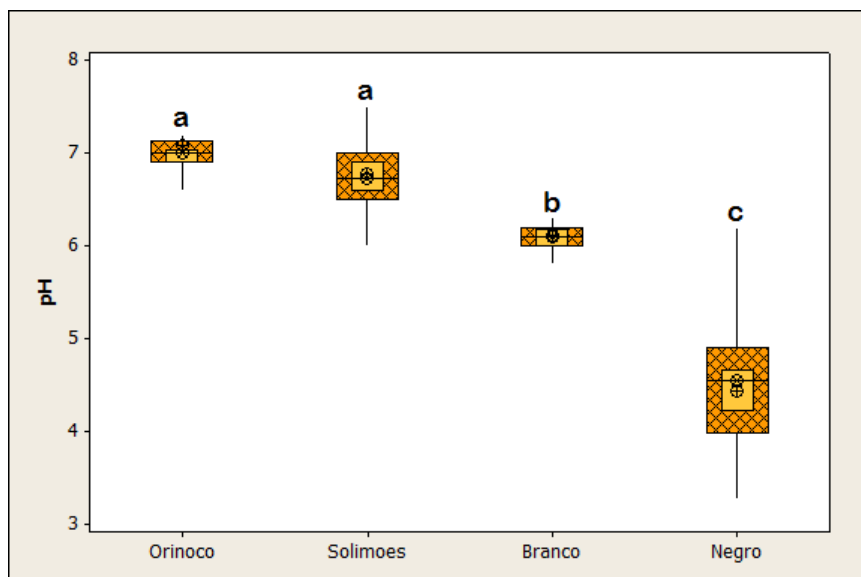


Figura 43. Análise estatística de comparação de médias (Tukey test) para a variável pH da água das áreas de coleta de peixes migradores nos rios Orinoco, Solimões, Branco e Negro. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre rios ($P < 0,05$).

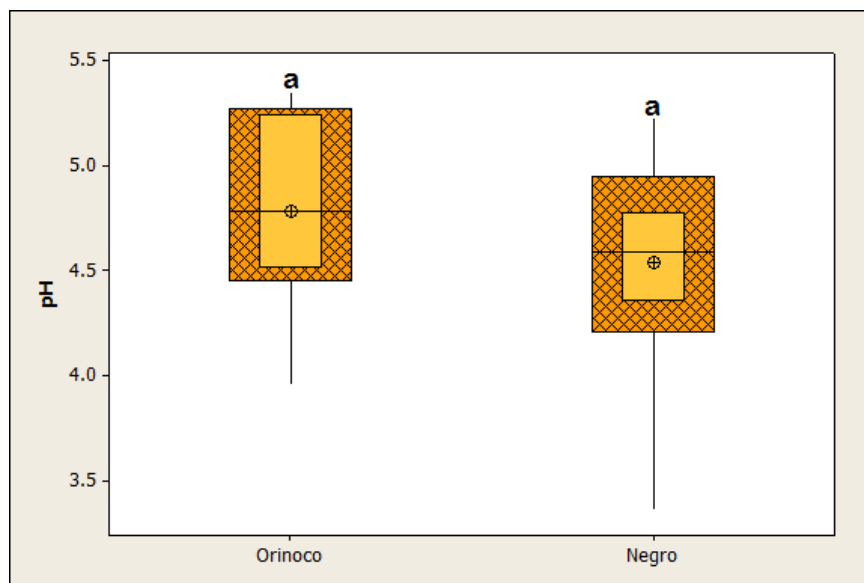


Figura 44. Análise estatística de comparação de médias ("t" test) para a variável pH da água das áreas de coleta de peixes sedentários nos rios Orinoco e Negro. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre rios ($P < 0,05$).

Quando avaliamos a similaridade dos padrões de pluviosidade dos diferentes locais de coleta dos peixes, foram observados 5 partições ou clusters finais (Figura 45).

Determinou-se que o primeiro cluster (de cor vermelha na Figura 45) foi conformado por padrões de precipitação do Alto Rio Negro, partindo desde Santa Isabel até Cucui, seguindo em direção ao Alto Orinoco (incluindo Inírida) até Puerto Carreño, incluindo San José del Guaviare, Puerto López e Puerto Gaitán. Também foi incluído todo o Alto Japurá a partir de La Pedrera. O segundo cluster (de cor verde na Figura 45) foi conformado por padrões de precipitação que incluíram Barcelos, Baixo Rio Branco, Manaus e toda a calha principal do Amazonas a partir de Tefé e até o seu delta. Do mesmo modo, o terceiro cluster (de cor azul na Figura 45) ficou integrado pelos padrões de precipitação do Médio e Alto Rio Branco (Boa Vista), incluindo a sua cabeceira e ramificações, alto rio Caroní (afluente do Orinoco) e até uma parte importante do sistema Rupununi e Essequibo nas Guianas. No caso do quarto cluster (de cor roxa na Figura 45), este foi composto pela região que abrange todo o Rio Apure, Caicara del Orinoco e parte da área de influência da sua foz sobre a calha principal do Rio Orinoco. Finalmente, o quinto cluster (de cor amarela na Figura 45) teve como integrantes aos padrões de pluviosidade que abrangeram o delta do Rio Orinoco, incluindo Ciudad Bolívar, San Félix, Ciudad Guayana, Castillos até a foz do Orinoco.

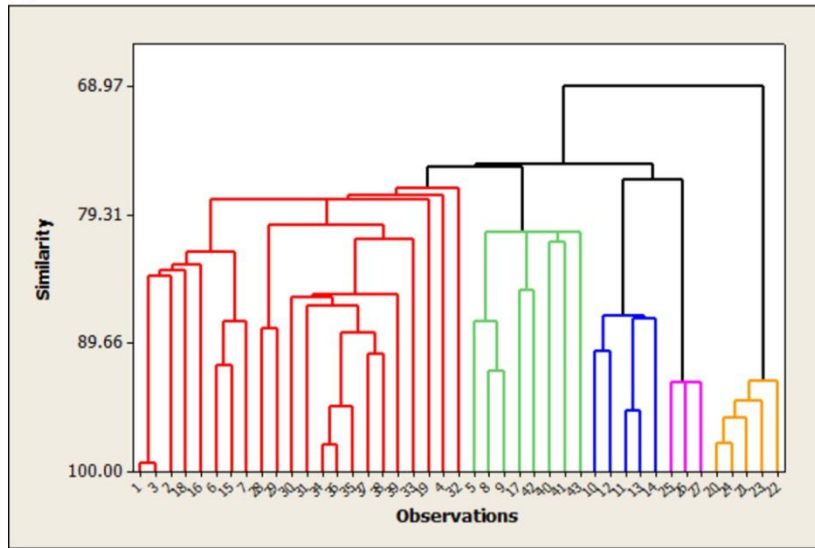
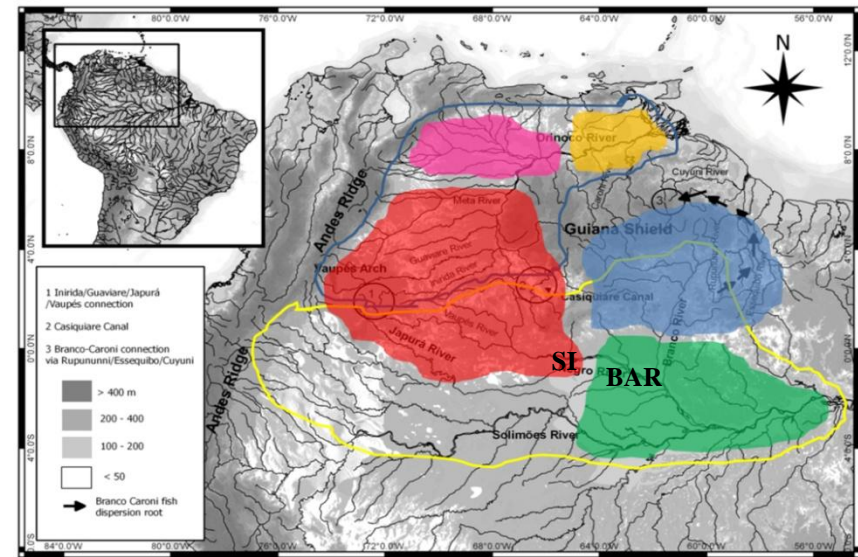
A**B**

Figura 45. Análise de similaridade de padrões de pluviosidade entre as bacias do Orinoco e Amazonas. “A” corresponde à análise estatística de agrupamento por similaridade de ciclos de precipitação anuais entre 43 locais que incluíram todas as áreas de coleta para as espécies de peixes migradoras e sedentárias. Cada cor indica um cluster independente. 1: Araracuara, 2: Chorrera, 3: Puerto Santander, 4: Florencia, 5: Tefe, 6: Bittencourt, 7: La Pedrera, 8: Manaus, 9: Coari, 10: Boa Vista, 11: Mucajai, 12: Caracarai, 13: Iracema, 14: Lethem, 15: São Gabriel da Cachoeira, 16: Cucui, 17: Barcelos (BAR), 18: Santa Isabel (Santa Isabel), 19: Puerto Colombia, 20: Ciudad Guayana, 21: Castillo, 22: Ciudad Bolívar, 23: Barrancas, 24: San Félix, 25: Apure, 26: Caicara del Orinoco, 27: San Fernando de Apure, 28: Puerto Carreño, 29: Puerto Ayacucho, 30: Puerto Gaitán, 31: Puerto López, 32: Acacías, 33: Puerto Inírida, 34: San José del Guaviare, 35: Mapiripán, 36: Concordia, 37: Puerto Rico, 38: Puerto Toledo, 39: La Macarena, 40: Parintins, 41: Santarém, 42: Almeirim, 43: Macapá. “B” corresponde à interpretação geográfica dos resultados de similaridade dos ciclos de precipitação entre locais. Cada cor de mancha no mapa da Figura 45B está relacionada com um cluster na Figura 45A.

15.4 Análise interpretativa dos dados e definição de Unidades de Conservação.

a. *Brachyplatystoma rousseauxii*

Cada bacia (Orinoco e Amazonas) cumpre com todos os critérios de ESU (Figura 46). Possuem concordância na descontinuidade filogenética e geográfica, as análises de coalescência para determinação do tempo de divergência, além das análises filogenéticas, demonstram que estão histórica e reprodutivamente isoladas, possuem monofilia recíproca no ADNmt e diferenças nas frequências alélicas nucleares desde o ponto de vista genômico. As populações de cada bacia derivam de uma filogenia de genes (genômica ou análise multilocus) consistente. Não existe evidência de fluxo gênico atual ou recente entre elas. Neste caso, as ESU têm sido modeladas pela deriva genética após um evento vicariante, pois não foi encontrada evidência de adaptação com base genética ou condições ecológicas significativamente diferenciadas entre as bacias. Cada bacia, ao mesmo tempo, é em si mesma uma única Unidade de Manejo, pois no seu interior todas as localidades se mostram como uma unidade panmítica tanto com evidência mitocondrial quanto com abordagem genômica.

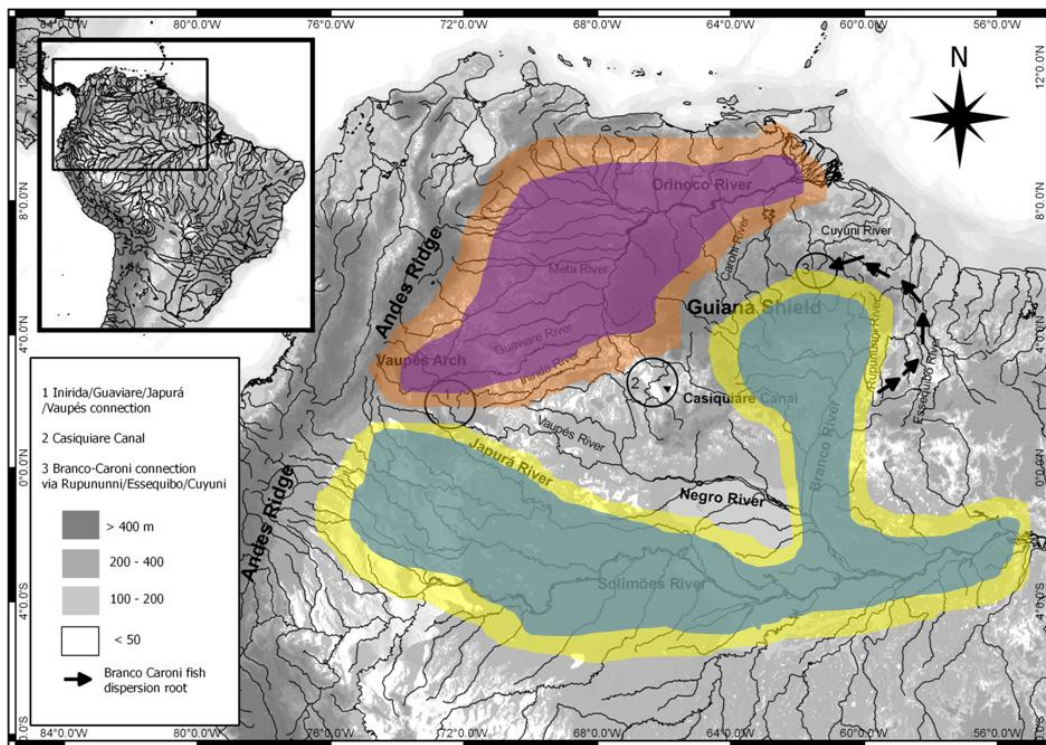


Figura 46. Unidades de Conservação para *Brachyplatystoma rousseauxii* nas bacias do Orinoco e Amazonas. As manchas de cor laranja e amarela representam Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) independentes, respectivamente, para o Orinoco e Amazonas. No seu interior, cada ESU possui uma única Unidade de Manejo (MU), representada pelas cores roxa e azul, respectivamente, para a ESU do Orinoco e Amazonas.

b. *Colossoma macropomum*

Para esta espécie as evidências mostram que as bacias do Orinoco e Amazonas não se constituem em duas ESUs independentes, mas sim numa única ESU abrangendo às duas bacias. Neste caso, *C. macropomum* não cumpre com os critérios de isolamento histórico e substancial entre bacias (a quebra populacional entre bacias foi num passado muito recente, mostrando inclusive retenção do polimorfismo ancestral), não mostra monofilia recíproca no ADNmt nem diferenças nas frequências alélicas nucleares e muito menos evidências de uma adaptação ou diferenças ecológicas significativas.

Cada bacia, em vez disso, cumpre com os critérios para se constituírem em MUs independentes. Algumas evidências as fazem demograficamente independentes. Por exemplo, o F_{st} baseado em marcadores SNPs mostra uma estrutura significativa entre ambas as bacias, ao mesmo tempo estas se mostram estruturadas no ADNmt.

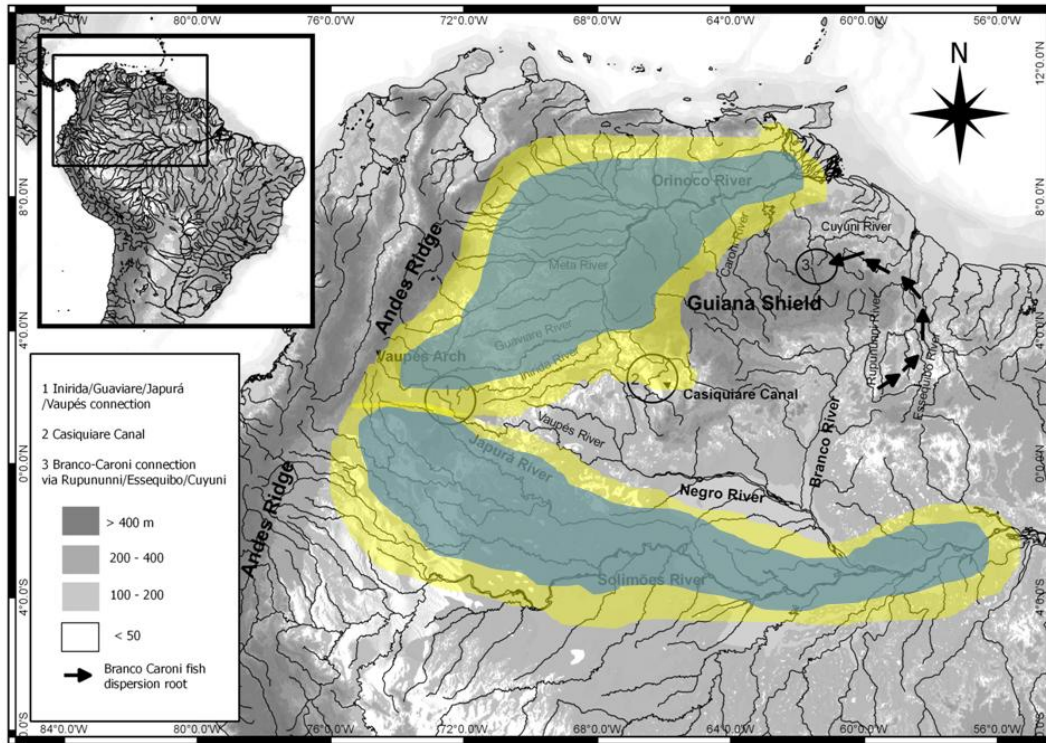


Figura 47. Unidades de Conservação para *Colossoma macropomum* nas bacias do Orinoco e Amazonas. A mancha de cor amarela representa uma única Unidade Evolutiva Significante (ESU) abrangendo as duas bacias: Orinoco e Amazonas. No seu interior, esta ESU possui duas Unidades de Manejo (MU) representadas pelas manchas de cor azul: uma MU para o Orinoco e outra para o Amazonas.

c. *Piaractus brachypomus*

Orinoco e Amazonas se constituem em ESUs independentes. Possuem concordância na descontinuidade filogenética e geográfica, as análises de coalescência par a determinação do tempo de divergência, além das análises filogenéticas, demonstram que estão histórica e reprodutivamente isoladas, possuem monofilia recíproca no ADNmt. As populações de cada bacia derivam de uma filogenia de genes (análise multilocus) consistente. Não existe evidência de fluxo gênico atual ou recente entre elas. Neste caso, as ESUs têm sido modeladas pela deriva genética após um evento alopátrico, pois não foi encontrada evidência de adaptação concordante com a distribuição genética das populações ou condições ecológicas significativamente diferenciadas entre as bacias.

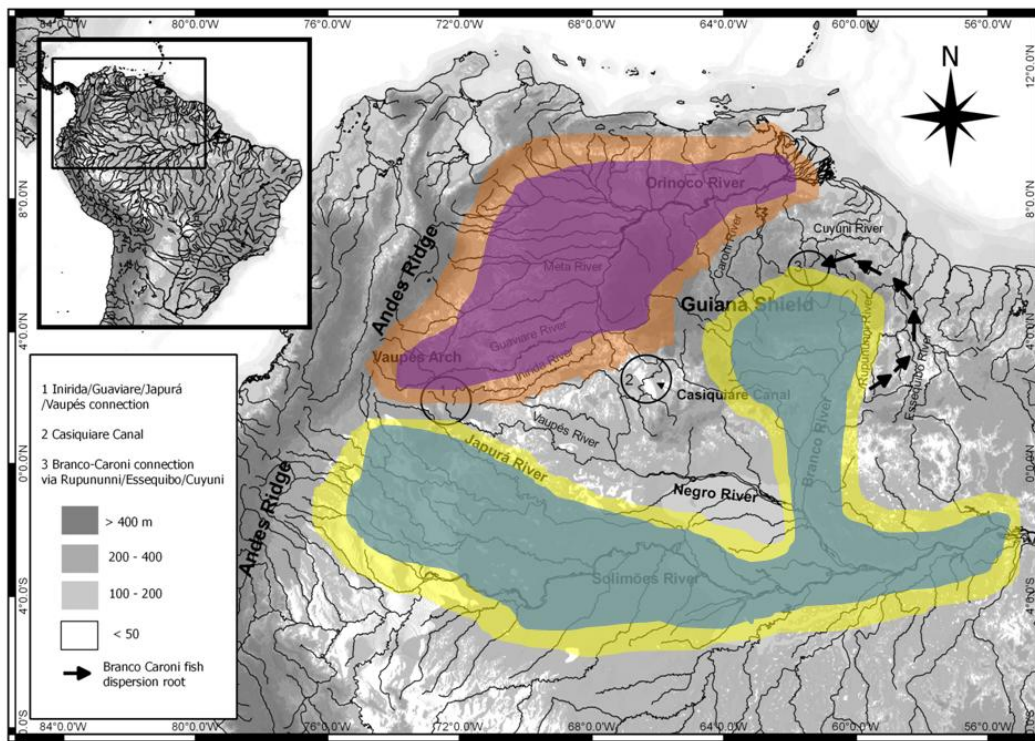


Figura 48. Unidades de Conservação para *Piaractus brachypomus* nas bacias do Orinoco e Amazonas. As manchas de cor laranja e amarelo representam Unidades Evolutivas Significativas (ESUs) independentes, respectivamente, para o Orinoco e Amazonas. No seu interior, cada ESU possui uma única Unidade de Manejo (MU), representada pelas cores roxa e azul, respectivamente, para a ESU do Orinoco e Amazonas.

Cada bacia possui uma única MU. Apesar de se observarem dois grupos biológicos dentro do Orinoco (análise ADNmt - BAPS), estes estão hoje misturados e homogeneamente distribuídos dentro desta bacia. Assim, não existem barreiras visíveis restringindo o fluxo gênico atualmente, ou independência demográfica entre localidades que permitam determinar mais de uma MU dentro do Orinoco. O Amazonas, por sua vez, apesar da estrutura observada (F_{st} ADNmt) entre algumas localidades, é evidente que o fluxo gênico se mantém homogeneizando as frequências haplotípicas, impedindo

independência demográfica no interior desta bacia, como é observado na análise de grupos biológicos no BAPS.

d. *Pseudoplatystoma metaense*/*Pseudoplatystoma tigrinum*

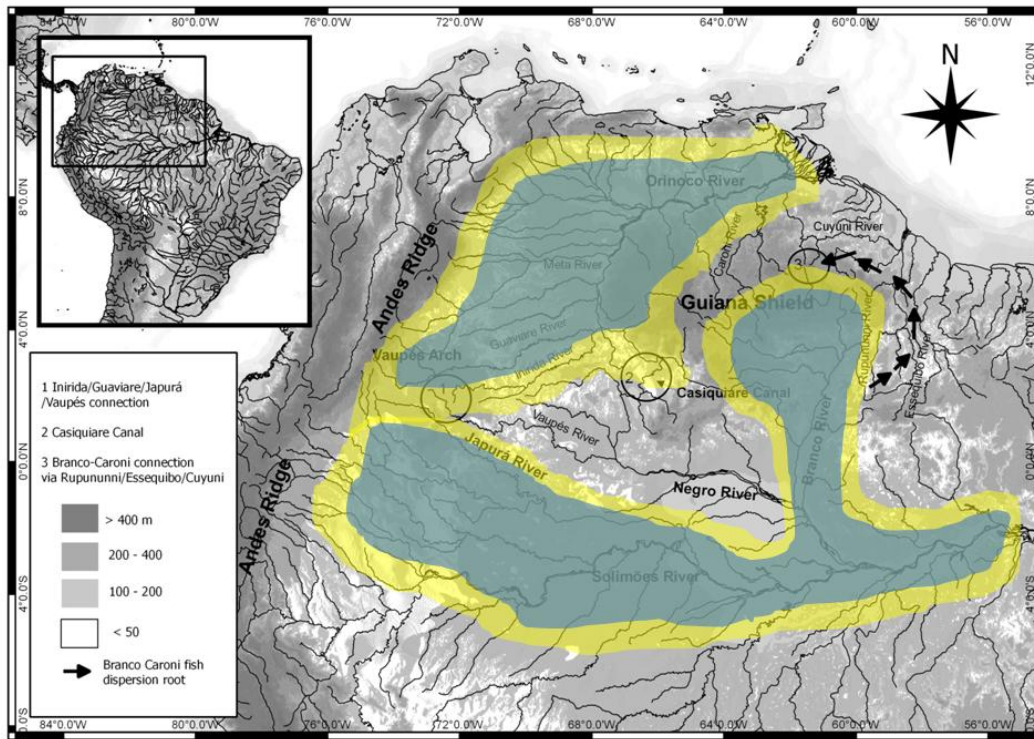


Figura 49. Unidades de Conservação para *Pseudoplatystoma metaense*/*Pseudoplatystoma tigrinum* nas bacias do Orinoco e Amazonas. A mancha de cor amarela representa uma única Unidade Evolutiva Significante (ESU) abrangendo as duas bacias: Orinoco e Amazonas. No seu interior, esta ESU possui duas Unidades de Manejo (MU) representadas pelas manchas de cor azul: uma MU para o Orinoco e outra para o Amazonas.

As bacias do Orinoco e Amazonas formam uma única ESU. As populações do Orinoco e Amazonas não cumprem com os critérios para se tornarem Unidades Evolutivas Significantes independentes. Não estão historicamente isoladas (incurções recentes têm acontecido entre bacias, além de fluxo gênico no passado recente evidenciado pelo STRUCTURE). Tem ainda capacidade de intercâmbio genético. Não apresentam monofilia recíproca no ADNmt. As populações das duas bacias não derivam de uma consistente filogenia de genes: tanto a análise multilocus quanto a análise filogenômica mostram rejeição da hipótese de independência de ESUs para as bacias.

Da mesma maneira que para outras espécies já mencionadas, não existem evidências ecológicas significativamente diferenciadas entre bacias para determinar que algum dos padrões genéticos observados para estas populações tenha sua base neles

(Não existem Unidades Adaptativas). Os padrões genéticos parecem estar relacionados a um evento vicariante para as bacias, sendo a deriva a causa principal das divergências.

Por outro lado, cabe salientar que existe forte evidência para determinar que cada bacia constitui-se numa MU independente. Possuem diferenças nas frequências alélicas nucleares (SNPs) e são evidentemente unidades demográficas independentes.

e. *Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma metaense*

Orinoco e Amazonas não constituem hoje ESUs independentes. Apesar de se observar um claro período de isolamento reprodutivo para as bacias desde um passado distante, existem evidências de um contato secundário desde um passado recente e que se manifesta até a atualidade. Isto violou os critérios das ESUs, ocasionando falta de monofilia recíproca no ADNmt e falta de concordância na descontinuidade filogenética e geográfica. Evidentemente não estão reprodutivamente isoladas, e portanto com alta capacidade de intercâmbio genético. A filogenia de genes (genômica ou multilocus) mostra inconsistência estatística para considerar as duas como ESUs independentes.

Neste caso particular, condições ecológicas de pluviosidade (cluster 1; vermelho na Figura 45) parecem mostrar uma concordância com eventos reprodutivos acontecendo apenas desde Inírida (Orinoco) até Santa Isabel (Rio Negro). Embora, BAYESCAN não mostrou marcas genômicas de alguma adaptação (incluída o tipo de água). A existência de Unidades Adaptativas não foi evidente.

Apesar disto, as bacias do Orinoco e Amazonas formam Unidades de Manejo independentes, pois os critérios se cumprem. Existem diferenças nas frequências alélicas nucleares (SNPs). As bacias, em termos gerais, constituem unidades demograficamente independentes.

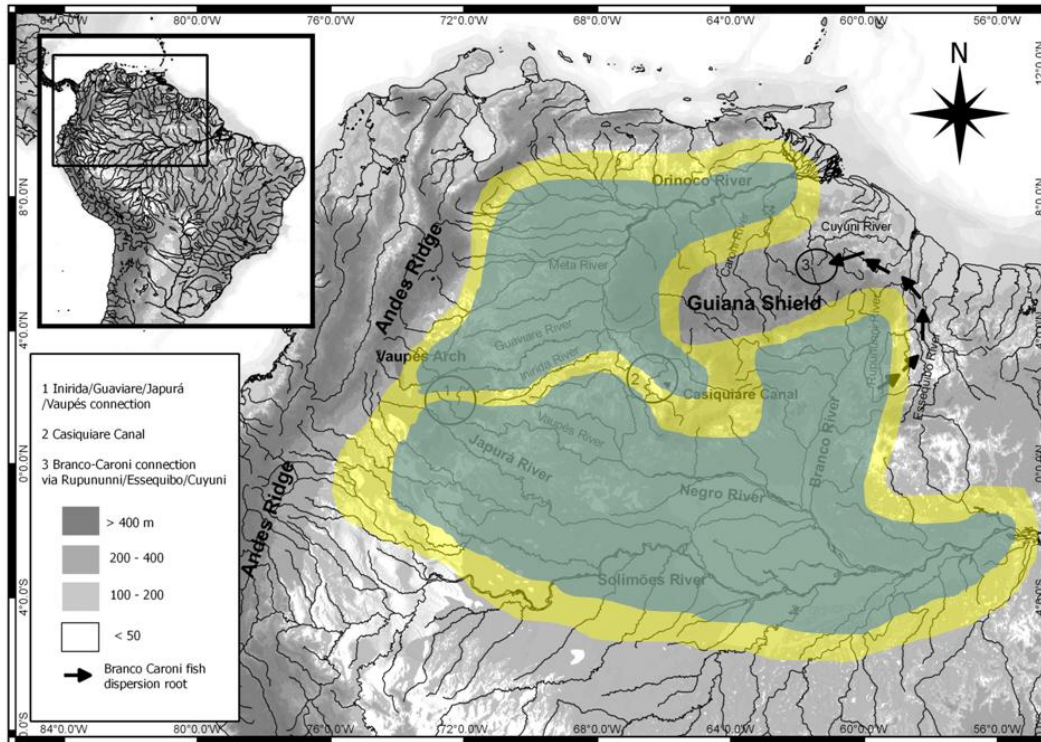


Figura 50. Unidades de Conservação para *Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer* nas bacias do Orinoco e Amazonas. A mancha de cor amarela representa uma única Unidade Evolutiva Significante (ESU) abrangendo as duas bacias: Orinoco e Amazonas. No seu interior, esta ESU possui duas Unidades de Manejo (MU) representadas pelas manchas de cor azul: uma MU para o Orinoco e outra para o Amazonas.

f. *Nannostomus unifasciatus*

Orinoco possui uma única Unidade Evolutiva Significante. As evidências no ADNmt mostram que Puerto Gaitán (PG), San José del Guaviare (GV) e Puerto Inírida (IN) compartilham haplótipos entre si, e não possuem monofilia recíproca entre elas (ver rede de haplótipos do programa HAPLOVIEWER). PG e GV formam um único grupo biológico (no ADNmt) que se estende até uma fração da população de IN. Isto é confirmado pelo ADN nuclear, onde PG e GV formam parte de um único grupo biológico que também se estende até IN (ver figuras do programa BAPS). A análise multilocus mostra que PG e GV são ESUs independentes entre si, mas não são independentes de IN. Isto, à luz dos critérios para definir ESUs, não é possível: “A população está historicamente e, de forma substancial, reprodutivamente isolada de outras populações (MORITZ, 1994; WAPLES, 1991)”. Assim, o fato de não estarem completamente isoladas de IN, torna PG e GV apenas em Unidades de Manejo independentes, como o indicam a maior parte das evidências. Deste modo, temos 3 MUs (PG, GV e IN) dentro de uma grande ESU (Orinoco).

No Amazonas, localidades como Cucui (CUC), Santa Isabel (SI) e Barcelos (BAR) fazem parte de uma única grande ESU, embora, com uma menor ESU simpátrica representada por alguns indivíduos da localidade de SI. Esta ESU menor mostra uma

clara monofilia recíproca no ADNmt (separada por vários passos mutacionais de outras populações), cumprindo com critérios para ser considerada uma ESU independente. CUC, SI e BAR não se mostram monofileticamente recíprocas entre elas (no ADNmt) ou, quando comparadas entre si, não se mostram cada uma “derivada de uma filogenia” de genes consistente (análise multilocus). Os dados de formação de grupos biológicos utilizando ADN nuclear também respaldam esta hipótese.

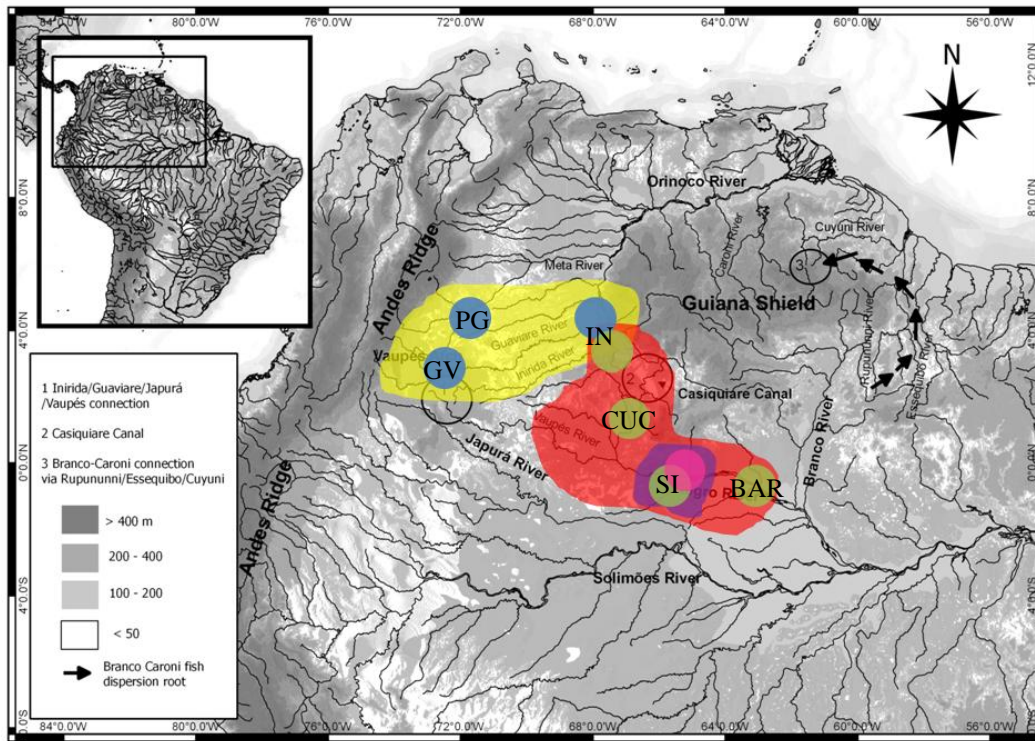


Figura 51. Unidades de Conservação para *Nannostomus unifasciatus* nas bacias do Orinoco e Amazonas. Manchas de cor amarela, vermelha e roxa representam Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) independentes, embora, com sobreposição na área de Puerto Inírida (Orinoco) para duas delas (amarela e vermelha). A ESU representada pela cor roxa ocorre em simpatria com a ESU vermelha, justo na área de Santa Isabel. No seu interior, cada ESU possui várias Unidades de Manejo (MUs). A ESU amarela possui três MUs (San José del Guaviare - GV, Puerto Gaitán - PG e Puerto Inírida - IN) representadas pela cor azul. A ESU representada pela cor vermelha possui quatro MUs (Puerto Inírida - IN, Cucui - CUC, Santa Isabel - SI e Barcelos- BAR) representadas pela cor verde. A ESU representada pela cor roxa é em si mesma uma MU, a qual está representada de cor fúcsia (Santa Isabel – SI) só para efeitos operacionais.

Adicionalmente, esta grande ESU se estende até IN no Orinoco. Tanto o ADNmt (ver rede de haplótipos do programa HAPLOVIEWER) quanto a formação de grupos biológicos (ADNmt ou ADNnu) mostram que existe uma fração de indivíduos em IN que não possuem um isolamento reprodutivo histórico e substancial em relação ao Amazonas (ver figuras do programa BAPS). Além disso, hoje existem conexões hídricas como o Casiquiare e ramificações hídricas entre cabeceiras (Rio Orinoco e Negro) que são não visíveis, as quais permitem sugerir que ainda existe potencial “capacidade de intercâmbio genético” entre IN e CUC. Estas evidências refutam os critérios para

considerar que esta fração de IN seja uma ESU independente. Embora, ela se mostra demograficamente independente do Amazonas, e portanto se torna uma MU dentro desta grande ESU. Da mesma maneira, CUC, SI e BAR são hoje unidades demograficamente independentes entre si (MUs), com evidência de restrição ao fluxo gênico (F_{st}) explicado pela distância geográfica entre estas localidades (IBD).

Não existem evidências significativas para inferir sobre a existência de Unidades Adaptativas por diferenças ecológicas entre os ambientes onde habitam as populações. Os padrões genéticos na tiveram uma associação visível com estas variáveis ecológicas analisadas.

g. *Paracheirodon axelrodi*

Orinoco (PG, GV, IN) + CUC se mostram conformando uma única ESU. CUC e o Orinoco não apresentam ainda monofilia recíproca no ADNmt (ver figura do BAPS) ou isolamento reprodutivo histórico e substancial. Apresentam compartilhamento de um grupo biológico (ADNmt ou nuclear). Na filogenia de genes (análise multilocus) elas não possuem suporte estatístico para serem ESUs independentes, pelo qual se viola o critério de “derivar de uma consistente filogenia de genes” para se tornarem ESUs separadas. Conexões hídricas como o Casiquiare e ramificações hídricas entre cabeceiras (Rio Orinoco e Negro) permitem sugerir que ainda existe potencial “capacidade de intercâmbio genético” entre as populações do Orinoco e CUC, invalidando a possibilidade de serem ESUs independentes.

Quando o grupo formado pelas populações do Orinoco + CUC são comparadas com SI ou BAR, claramente se observa uma clara monofilia recíproca entre estes grupos (no ADNmt) e com uma alta consistência estatística (probabilidade posterior) na filogenia de genes na análise multilocus. Dentro desta primeira ESU conformada por Orinoco + CUC existem 4 Unidades de Manejo. Estas correspondem a PG, GV, IN e CUC. Claramente estas populações não possuem monofilia recíproca entre si e uma clara restrição ao fluxo gênico (F_{st} ADNmt). Genética e geograficamente falando, elas são demograficamente independentes, pois no caso dos peixes sedentários “sua dinâmica populacional (taxa de crescimento) depende mais da taxa de nascimento e morte local do que a imigração”.

No caso de SI e BAR, apesar de que são claras as suas diferenças com respeito à ESU conformada pelas populações do Orinoco + CUC, ainda não é claro se estas duas localidades representam diferenças suficientes entre si para serem consideradas ESUs independentes. Assim, SI e BAR mostram evidência de estrutura populacional no ADNmt, não compartilhamento de haplótipos, mas não mostram monofilia recíproca entre elas, ao ponto de se observarem como um mesmo grupo biológico (ver figura do BAPS para o ADNmt). Isto indica que provavelmente houve fluxo gênico recente, o que invalida o critério de “não ter tido fluxo gênico atual ou recente com outras populações”. Embora isso, cada população derivou de uma consistente filogenia de genes (análise multilocus), mostrando um suporte suficiente (0,98) para indicar que estas são ESUs independentes. Isto provavelmente originado pelas fortes diferenças observadas no ADN nuclear entre estas localidades (ver figura do BAPS para ADNnu).

Neste sentido, foi observado um padrão ecológico diferencial de pluviosidade concordando com os padrões genéticos diferenciais observados tanto na estrutura de genes no nível nuclear quanto na filogenia de genes (análise multilocus).

Deste modo, e diante das evidências, SI e BAR são consideradas ESUs independentes para efeitos de priorização dos esforços de conservação das suas populações.

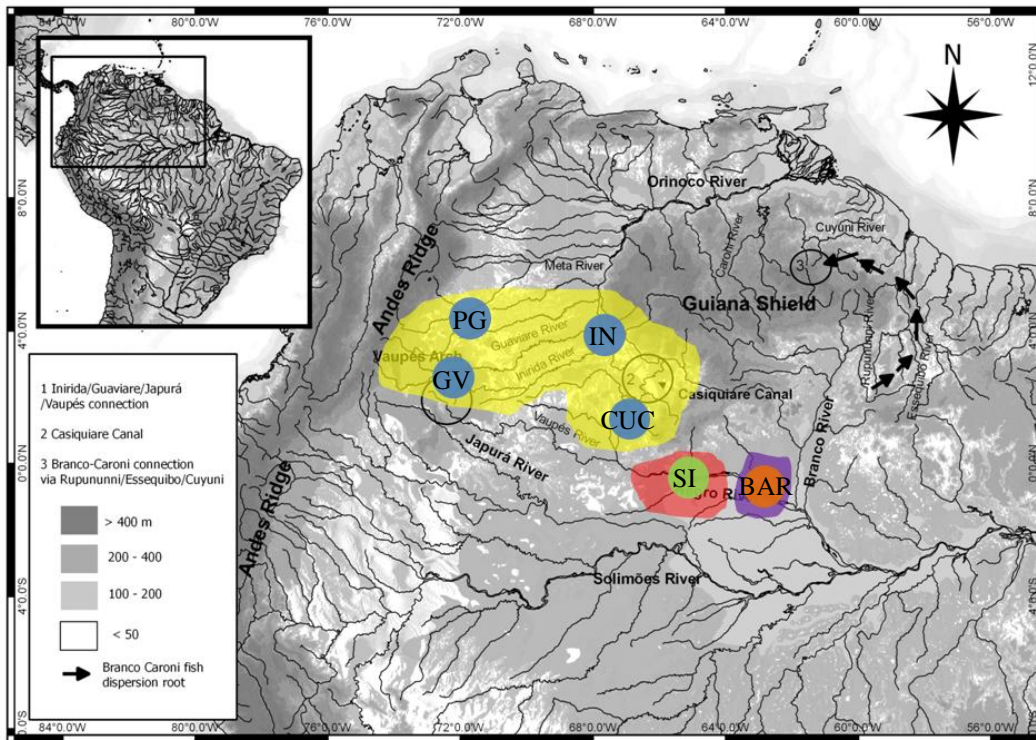


Figura 52. Unidades de Conservação para *Paracheirodon axelrodi* nas bacias do Orinoco e Amazonas. Manchas de cor amarela, vermelha e roxa representam Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) independentes. No seu interior, a ESU representada pela cor amarela possui quatro Unidades de Manejo representadas pelos círculos de cor azul: San José del Guaviare (GV), Puerto Gaitán (PG), Puerto Inírida (IN) e Cucui (CUC). As ESUs representadas pela cor vermelha e roxa são em si mesmas MUs, representadas cada uma com círculos de cor verde (Santa Isabel - SI) e laranja (Barcelos - BAR), só para efeitos operacionais.

h. *Pterophyllum altum*

Esta espécie apresentou padrões em termos de Unidades de Conservação similares aos achados em *P. axelrodi*.

Orinoco (PG, GV, IN) + CUC se mostram conformando uma única ESU. Isto, baseado na evidência de que CUC e o Orinoco pertencem ao mesmo grupo biológico na análise de ADNnu (ver figura do BAPS), demonstrando que não existe um isolamento reprodutivo histórico e substancial entre elas, se não apenas recente. Na filogenia de genes (análise multilocus) elas não possuem suporte estatístico para serem

ESUs independentes, pelo qual se viola o critério de “derivar de uma consistente filogenia de genes” para se tornarem ESUs separadas. Conexões hídricas como o Casiquiare e ramificações hídricas entre cabeceiras (Rio Orinoco e Negro) permitem sugerir que ainda existe potencial “capacidade de intercâmbio genético” entre as populações do Orinoco e CUC, invalidando a possibilidade de serem ESUs independentes. Entre estas populações não existem diferenças ecológicas que permitam deduzir possíveis adaptações.

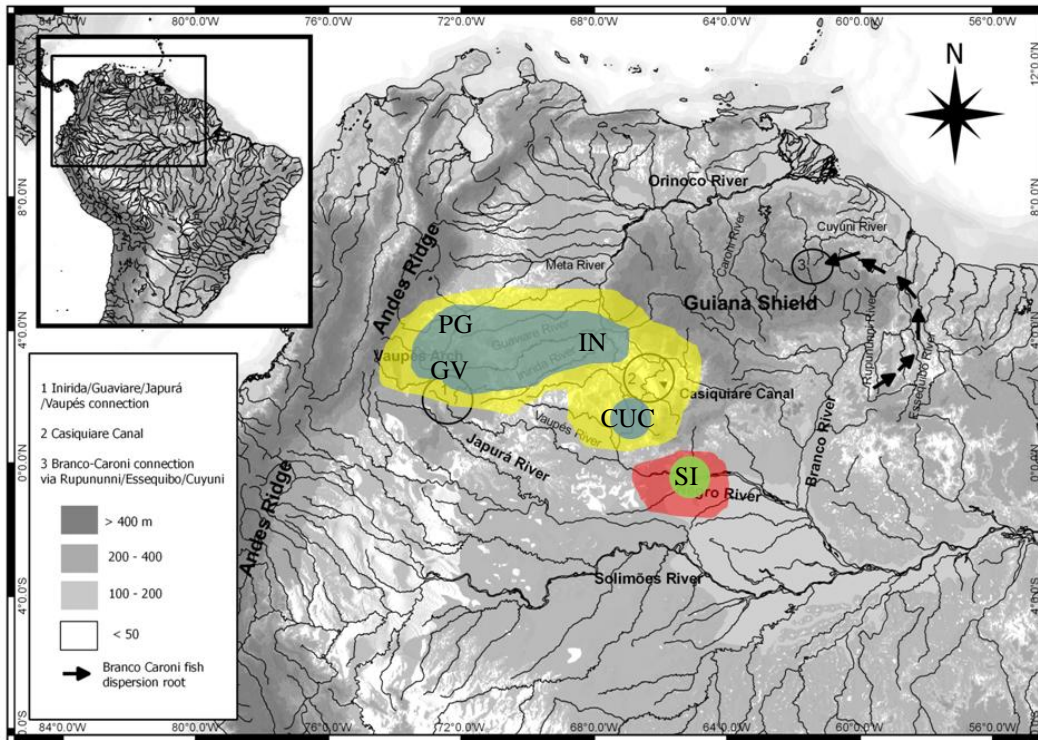


Figura 53. Unidades de Conservação para *Pterophyllum altum* nas bacias do Orinoco e Amazonas. Manchas de cor amarela e vermelha representam Unidades Evolutivas Significantes (ESUs) independentes. No seu interior, a ESU representada pela cor amarela possui duas Unidades de Manejo (UM) representadas pelas formas de cor azul. A primeira MU está formada pelas localidades de San José del Guaviare (GV), Puerto Gaitán (PG) e Puerto Inírida (IN), enquanto que a segunda MU está conformada pela localidade de Cucui (CUC). A ESU representada pela cor vermelha é em si mesma uma MU, representada pelo círculo de cor verde (Santa Isabel - SI), só para efeitos operacionais.

Esta ESU formada pelas populações do Orinoco + CUC, mostra fortes diferenças quando comparada com SI, demonstrando que esta última se comporta também como uma ESU independente. Na análise, estes grupos apresentam monofilia recíproca (no ADNmt), cumprem com o critério de “derivar de uma consistente filogenia de genes”, evidente na análise multilocus. Possuem isolamento reprodutivo histórico e substancial. É evidente a concordância na descontinuidade filogenética e geográfica entre ambos, não existe evidência de fluxo gênico atual ou recente. As diferenças genéticas achadas para estas duas ESUs não possuem concordância com as variáveis ecológicas

estimadas neste trabalho. A distância geográfica não é a responsável pelos padrões de diferenciação genética observados.

Dentro da primeira ESU, PG, GV e IN constituem uma única MU, enquanto que CUC forma uma MU independente. Claramente PG, GV e IN não mostram estrutura no ADNmt (Fst) nem possuem monofilia recíproca entre si, se tornando em uma MU independente. Contrário a isso, e apesar de compartilhar alelos nucleares, CUC mostra estar estruturada com respeito a PG, GV e IN no ADNmt, além da evidente restrição geográfica e física ao fluxo de migrantes (Arco do Vaupés). Isto faz com que CUC se torne demograficamente independente das populações do Orinoco, sendo que a “sua dinâmica populacional (taxa de crescimento) depende mais da taxa de nascimento e morte local do que a imigração”.

Por sua vez, SI se constitui numa ESU independente com uma única Unidade de Manejo.

16 DISCUSSÃO

Vários autores concordam em afirmar que as forças evolutivas que modelam a evolução são a deriva e a seleção natural, gerando variação neutra e adaptativa, respectivamente; e que de acordo ao grau de variação gerado, permitem distinguir hierarquicamente unidades espaciais onde esta variação se distribui, e que devem ser conservadas para que os processos evolutivos continuem sua trajetória (ALLENDORF; LUIKART, 2007; CRANDALL et al., 2000; FRASER; BERNATCHEZ, 2001; PRIMMER, 2009). No presente estudo, a identificação destas forças modelando as unidades de conservação, não foi a exceção.

Assim, por exemplo, os dados sugeriram que a deriva foi a encarregada de modelar as ESUs independentes, após um evento alopátrico entre bacias, para *B. rousseauxii* e *P. brachypomus*, pelo que se rejeita a hipótese de uma única unidade biológica para as duas bacias (BARTHEM; GOULDING, 1997). Esta mesma força foi a encarregada de criar duas MUs independentes (Orinoco e Amazonas) para *C. macropomum*, *P. metaense/P. tigrinum* e *P. orinocoense/P. punctifer* dentro de uma mesma SEU, pelo que nestes dois últimos casos, foi rejeitada a hipótese de duas entidades biologicamente independentes (uma espécie por bacia) proposta por Buitrago e Burr (2007). Finalmente, a deriva foi vista também como a principal força modeladora de ESUs em casos particulares como em sedentários, onde até três ESUs podem ser observadas por espécie, muitas delas compartilhadas entre bacias e outras exclusivas, pelo que se rejeita a hipótese de uma única entidade biológica compartilhada entre as bacias do Orinoco e Amazonas sugerida por Reis et al. (2003). Embora isso, apesar de que os resultados para detectar variação adaptativa não foram totalmente satisfatórios, algumas evidências deixaram ver a possibilidade de que esta força pode estar agindo sem que nossos métodos a tenham detectado com muita acurácia, mas que merecem ter relevância e serem discutidos aqui.

Variáveis que poderiam gerar variação adaptativa como o pH, não mostraram diferenças entre os ambientes dos locais de coleta tanto dos sedentários quanto dos migradores. Isto é afirmado levando em conta que apesar de que Boa Vista mostrou uma diferença com respeito ao Solimões e Orinoco, sua média de pH se encontra dentro da amplitude de valores que pode chegar a ter o Solimões, sendo que

biologicamente isto não representaria um fator diferenciador ou adaptativo significativo para as populações entre estas sub-bacias, nem com o Orinoco. Porém, existem exceções, dessa vez foi no caso de *P. orinocoense*/*P. punctifer*, cuja distribuição se deu no Orinoco e Negro, entre os quais existiu uma evidente e significativa diferença no pH da água. Apesar disso, quando se quis determinar a existência de alguma base genética para uma possível adaptação a este meio, as análises não demonstraram evidência para acolher a hipótese. Então, como podemos explicar que seja a única espécie de todas as migradoras com capacidade de quebrar esta barreira, e inclusive utilizar o maior filtro zoo-geográfico (Casiquiare) sem problemas?

Na espécie de ciclídeo *Cichla monoculus*, que ocorre tanto no Solimões quanto no Rio Negro, uma clara estrutura filogenética foi observada entre as populações ocupando estes ambientes (WILLIS et al., 2010), sugerindo que provavelmente se trate de variação adaptativa por seleção. No entanto, esta estrutura não é observada em *P. orinocoense*/*P. punctifer* (ADNmt, ADNnu), o que nos orienta a sugerir que provavelmente se trate de um fenômeno de plasticidade fenotípica da espécie, o qual lhe permite ocupar estes ambientes como área de reprodução e alimentação sem limitações. West-Eberhard (1989) define a plasticidade fenotípica como uma habilidade singular do genótipo para produzir mais de uma forma alternativa de morfologia, estado fisiológico e/ou comportamento em resposta às condições ambientais. Neste caso, pode se tratar de uma forma alternativa do estado fisiológico para a sobrevivência neste tipo de ambiente.

Em peixes, a respiração e captação do oxigênio a partir da água se dá através das brânquias, onde acontece o intercâmbio gasoso entre este líquido e o sangue dos indivíduos. Neste processo, o pH desempenha um papel fundamental (HART; REYNOLDS, 2008). O transporte do oxigênio nos peixes é baseado na mudança da conformação da estrutura quaternária da molécula de hemoglobina, a qual é causada pela união de pequenos componentes de soluto, como por exemplo, o H⁺. Sabe-se que os produtos do exon externo da hemoglobina (sítio de ligação ao oxigênio) podem ser modulados por um efator (EATON, 1980), o que permite exibir variações para suprir completamente os requerimentos fisiológicos de uma determinada espécie. Deste modo, a expressão e cooperativismo das subunidades da hemoglobina, e portanto a afinidade ao oxigênio, podem ser reguladas pela disponibilidade de prótons no meio aquático, o que depende do pH (HART; REYNOLDS, 2008). Inclusive, se fala de formas alternativas de hemoglobina (iso-hemoglobinas) de acordo às exigências do ambiente no qual se encontram os peixes (BRIX; CLEMENTS; WELLS, 1999). Este fenômeno tem sido considerado por Hart e Reynolds (2008) uma clara mostra de plasticidade fenotípica em alguns peixes teleósteos. Em ciclídeos africanos já é conhecida a plasticidade relacionada com ambientes de baixos níveis de oxigênio (CHAPMAN; GALIS; SHINN, 2000), onde a prole F1 de populações de peixes com grande potencial de dispersão entre estes tipos de ambientes, possuíam também uma maior plasticidade no tamanho cerebral, aparentemente relacionada com a capacidade de sobreviver nestes ambientes (CRISPO; CHAPMAN, 2010).

Por outro lado, nesta mesma espécie (*P. orinocoense*/*P. punctifer*) foi observado um padrão genético no qual, apesar do evidente isolamento reprodutivo que sofreram as populações de ambas as bacias, o contato secundário e reprodução atual foram possíveis. Uma das hipóteses para explicar este fato radica em que, além de não ter sido tempo suficiente de isolamento reprodutivo (~1.052 milhões de anos) para causar

diferenças nos sistemas de reprodução, a área na qual ocorreram estes eventos se manteve sob um mesmo regime de pluviosidade, possivelmente durante todo o tempo de isolamento, permitindo que a sincronização dos ciclos reprodutivos se mantivesse intacta, possibilitando que ao cabo deste tempo se mantivessem os principais instintos de interação social-reprodutiva entre bacias. Dentro dos fatores que podem causar isolamento reprodutivo temporal ou estacionário (barreiras pré-zigóticas) em peixes, se encontra a precipitação, fator ecológico intimamente ligado aos ciclos reprodutivos das espécies migradoras (BARTHEM; GOULDING, 1997; CHELLAPPA et al., 2009; GURGEL; VERANI; CHELLAPPA, 2012), onde as chances de encontro entre parentais devem coincidir, tanto na maturação gonadal quanto na desova, mais ainda quando dita desova é total e não parcial nas espécies deste gênero (BRITO; BAZZOLI, 2003), embora, com algumas possíveis variações pequenas de tempos de desova entre fêmeas (GODINHO; KYNARD; GODINHO, 2007).

Adicionalmente, foi observado que o local de reprodução entre estas populações se dá desde a cabeceira do Orinoco e apenas até Santa Isabel, sendo que não existem barreiras físicas, pelo menos visíveis, impedindo que esta área seja ampliada além de Santa Isabel (descendo o Rio Negro). Para explicar este fenômeno é necessário considerar variáveis ambientais afetando a espécie alvo e às que interagem com ela. Assim, comecemos por dizer que a área de reprodução correspondente ao regime de pluviosidade (que cobre grande parte do Alto / Médio Orinoco, Casiquiare e Rio Negro) chega apenas até Santa Isabel, justo no local onde a zona de reprodução também acaba (ver Figura 34). Santa Isabel também coincide com o limite de distribuição dos haplótipos mitocondriais próprios da população do Orinoco, sendo que além dessa área, desaparecem (ver Figura 12). Aqui já foi provado que não existem evidências de base genéticas para falar de adaptação na espécie, tanto ao regime de pluviosidade quanto ao pH. Portanto, resta só sugerir a combinação de três hipóteses baseadas nas evidências que dispomos, as quais juntas poderiam explicar este comportamento.

- a. Considerando a sua condição de ictiófago (DEZA; BAZÁN; CULQUICHICÓN, 2005), é possível que *P. orinocoense*/*P. punctifer* e sua descendência se estabeleça até as áreas inundáveis de Santa Isabel devido à presença de um maior número de espécies que formam parte da sua dieta alimentar, sendo que águas abaixo, a partir dos rios de água branca como o Demini e até chegar ao Branco, pode existir uma barreira físico-química seletiva para estas pequenas espécies, diminuindo sua disponibilidade e número, o qual não resulta troficamente viável para a sobrevivência de juvenis de *P. orinocoense*/*P. punctifer*, e muito menos de parentais que migram grandes distâncias desde o Orinoco para um evento reprodutivo. Esta área já tem sido considerada como barreira para espécies de pequeno porte entre o Baixo e Médio Rio Negro (SCHNEIDER et al., 2012; TERCENIO; SCHNEIDER; PORTO, 2012).
- b. O regime de pluviosidade desta área mantém um modelo de ciclos de inundação diferenciado do resto do Rio Negro, permitindo a abundância e disponibilidade de espécies que formam parte da dieta de *P. orinocoense*/*P. punctifer* durante os períodos que coincidem com sua época de reprodução, sendo que águas abaixo, com influência de águas brancas, tanto os ciclos de inundação quanto a abundância e diversidade de espécies que fazem parte

da sua dieta podem ser diferentes e reduzidos. Saint-Paul et al. (2000) demonstraram a existência de diferenças na diversidade de espécies em comunidades de peixes Amazônicos entre períodos de inundação e seca, além de evidenciar que existia uma maior diversidade de espécies em áreas inundáveis de águas pretas quando comparada com água branca.

- c. As fêmeas do Orinoco e sua descendência estão apresentando um comportamento residente nesta área. Godinho et al. (2007), utilizando radiotelemetria em fêmeas de uma espécie congênere (*P. corruscans*) num estudo ecológico, determinaram que parte das fêmeas que migram aos locais de reprodução permanecem ali até a seguinte temporada de acasalamento, sugerindo que dentro da espécie se dá um comportamento residente.

Por outro lado, dentro deste estudo foi observado que Barcelos se mostra como uma ESU independente dentro do Amazonas para *P. axelrodi*. Isto claramente pode se dever à influência diferenciada de fatores como as precipitações, as quais podem estar levando a uma variação comportamental em termos de períodos de alimentação e fluxo gênico para esta população, considerando o domínio e relação das chuvas com estes comportamentos ecológicos em espécies de pequeno porte (MARSHALL; FORSBERG; THOMÉ-SOUZA, 2007; PIGGOTT; CHAO; BEHEREGARAY, 2011; WINEMILLER, 1993). Adicionalmente, sabe-se que Barcelos, apesar da sua localização sobre influência de águas pretas do Rio Negro, também conta com a influência de água branca de dois Rios. O primeiro deles é o Demini, logo acima de Barcelos. O segundo, o Rio Branco, logo abaixo de Barcelos. Nesse sentido, são prováveis duas situações. A primeira consiste em que o Rio Demini poderia estar atuando, através da influência de descarga, como barreira para o isolamento das populações. A segunda é de ordem adaptativa, onde a dinâmica de descarga dos dois Rios pode estar tendo efeitos sobre as populações de *P. axelrodi* nesta localidade, levando-as a uma adaptação local. Este ponto geográfico, sob a influência destes Rios, também tem sido identificado como fator de quebra populacional para ESUs de espécies ornamentais como *Nannostomus eques* (TERENCIO; SCHNEIDER; PORTO, 2012), e considerado como provável barreira ecológica por tipo água entre o Médio e Baixo Rio Negro em *Carnegiella strigata* (SCHNEIDER et al., 2012). Isto também poderia explicar a distribuição natural de ocorrência da espécie *P. altum* apenas até áreas acima de Barcelos (p. e. Santa Isabel) e não na área de Barcelos propriamente, a partir de onde encontramos apenas sua espécie congênere *P. scalare*. Outra evidência importante de possível variação adaptativa, é a estrutura no ADNnu para este ponto de transição SI-BAR, tanto em *P. altum* quanto em *P. axelrodi*.

Considerando a baixa taxa de substituição do genoma nuclear, para a observação de diferenciação genética neste tipo de marcadores é necessário um longo tempo de isolamento reprodutivo, onde a deriva tenha o tempo suficiente de fixar alelos de forma diferencial entre as populações divergindo. No entanto, é claro que uma provável dispersão de SI para BAR é relativamente recente (ADNmt), pelo qual só podemos sugerir a ação de uma força evolutiva diferente da deriva, além de suficientemente poderosa para gerar divergências em regiões codificantes de proteínas no genoma nuclear: a Seleção. É sabido que a probabilidade de fixação de um alelo por deriva é de $1/2N_e$ (demonstrando uma dependência do tamanho efetivo da população),

demorando até 4Ne gerações para a sua fixação. Enquanto que a fixação de um alelo por forças adaptativas dependerá do seu coeficiente de seleção (benefício), sendo que a probabilidade de fixação se dará num período de tempo mais curto e aumentará devido à força da seleção (MITTON, 2000; WHITLOCK, 2003). Deste modo, é provável que estes genes nucleares estejam espacialmente ligados a regiões relacionadas com adaptação a condições físico-químicas da água (pH, oxigênio), comportamento ou outro relacionado, as quais estão sujeitas a forças de seleção neste local. Wagner et al. (2013) demonstraram que eventos de rápida especiação por seleção em ciclídeos africanos não são detectáveis através de informação derivada do ADNmt (ausência de monofilia recíproca), mas sim através do genoma nuclear, o qual permitiu observar a diferenciação genética entre os grupos que sofreram radiação adaptativa.

Os peixes sedentários têm maior capacidade de registrar no seu ADN os eventos vicariantes ou ecológicos aos quais são submetidos, pois a sua condição sedentária limita a sua capacidade para superar as barreiras físicas, ou fugir espacialmente de pressões ambientais impostas, pois para eles só fica a adaptação rápida ou a seleção negativa, como já tem sido demonstrado para taxa de peixes sedentários Africanos e Neotropicais (ALEXANDER et al., 2006; LÓPEZ-FERNÁNDEZ et al., 2013; MEYER; KNOWLES; VERHEYEN, 1996). De fato, para a maior parte de espécies de peixes sedentárias Neotropicais tem se identificada uma resposta eficiente às mudanças de tipo de água, muitas associadas a processos de seleção diversificadora (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2012a, 2012b), dada a sua capacidade de ampla distribuição geográfica e em diversos ambientes (HRBEK; LARSON, 1999), sendo identificada como uma força evolutiva especialmente favorecedora de comportamentos sedentários (MCLAUGHLIN; FERGUSON; NOAKES, 1999).

Mas, por que este evento de formação de ESU sob a área de Barcelos não se repete também para *N. unifasciatus*?

No caso de *N. unifasciatus*, é evidente na análise multilocus que uma provável colonização de Santa Isabel e Barcelos por parte da linhagem de Cucui é mais recente do que para *P. axelrodi* e *P. altum*, inclusive sem evidência estatística suficiente para considerar Santa Isabel e Barcelos ESUs independentes. Apesar disso, as diferenças entre estas duas localidades foram elevadas nesta análise (probabilidade posterior > 0,8), sugerindo algum processo de diferenciação em andamento, embora a pouca distância geográfica que as separa, comparada com a que possuem de Cucui. Nessa ordem de ideias, poderíamos sugerir que o tempo percorrido desde a colonização de *N. unifasciatus* da área de Barcelos, tem sido relativamente insuficiente para uma fixação completa de alelos nessa população (produto da deriva ou a seleção). Siström et al. (2009), utilizando uma maior amostragem para *N. unifasciatus* ao longo do Rio Negro, incluindo Santa Isabel e Barcelos, não evidencia diferenças genéticas entre populações destes locais, sugerindo também uma provável colonização recente. Cooke et al. (2009) sugerem que o processo de colonização de espécies sedentárias de pequeno porte segue primeiro um passo de chegada, posteriormente um passo de acumulação de diferenças (IBD), e finalmente um passo de expansão (se as condições de habitat são favoráveis). Isso reafirma a hipótese que sugere que o observado em *N. unifasciatus* se trata de um processo de estruturação e isolamento iniciado recentemente, e portanto incompleto.

Por outro lado, é importante resaltar que durante a delimitação de Unidades de Conservação foi evidente que o número de ESUs em peixes ornamentais foi maior do

que nos migradores, inclusive, com presença de ESUs sobrepostas. Isto sugere uma maior capacidade de especiação neste tipo de organismos do que aqueles com condição migradora. Esta capacidade de explosão diversificadora está relacionada, como já foi dito antes, com sua condição sedentária, que: acelera os processos de IB (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2009), os faz mais vulneráveis aos processos alopátricos por tectonismo e translocações de pequenos rios (SCHNEIDER et al., 2012; SISTROM; CHAO; BEHEREGARAY, 2009), e expõe obrigatoriamente às populações a uma maior quantidade de ambientes variáveis (aumentando a diversificação por adaptação) (MCLAUGHLIN; FERGUSON; NOAKES, 1999). Adicionalmente, estas espécies possuem um tempo de geração excessivamente reduzido (0,5 – 1 ano) (ANJOS; ANJOS, 2006; LOH et al., 2013), o que aumenta a replicação do seu genoma e portanto as inserções de mutações (3 - 10 vezes mais rápido do que em migradores), sendo distribuídas rapidamente dentro da população local, acelerando a sua evolução e diferenciação genética em relação a outras populações (OHTA; GILLESPIE, 1996).

Esta capacidade diversificadora em peixes sedentários tem sido observada em outras espécies de peixes no Amazonas. Para o Rio Negro, Piggot et al. (2011) determinam três ESUs simpátricas para *Carnegiella marthae*, Cooke et al. (2009) encontram que à cabeceira do Rio Negro se comporta como uma unidade geneticamente independente do resto do Rio Negro para *Paracheirodon axelrodi*, Terencio et al. (2012) determinaram duas ESUs dentro do Rio Negro para *Nannostomus eques*, onde o Rio Branco foi a mais provável causa de divergência entre ambas. Da mesma maneira, Sistrom et al. (2009) descobriram que *Nannostomus unifasciatus* possui, como no presente estudo, duas ESUs dentro do Rio Negro, sendo que uma está amplamente distribuída desde a cabeceira até o baixo Rio Negro, enquanto que a outra é menor e está sobreposta com esta grande ESU na altura de Santa Isabel. No entanto, o autor demonstra que esta pequena ESU não surgiu em simpatria com a outra, e sim que foi produto de um evento alopátrico na cabeceira do Rio Negro, posterior ao qual esta linhagem colonizou a área de Santa Isabel pelo norte, desde a cabeceira do Rio Negro e por uma rota diferente da calha principal. Finalmente, é importante destacar que o surgimento de espécies crípticas possui vários antecedentes dentro do Amazonas devido à sua complexa história geológica, a qual tem permitido a diversificação de ambientes ecológicos (HOORN; WESSELINGH, 2011). Alguns exemplos têm sido observados para espécies como *Cichla* spp. (WILLIS et al., 2007), *Fluviphylax* spp. (SOUZA, 2008), *Hypopygus* spp. (SCHMITT, 2005), *Serrasalmus* spp. (HUBERT et al., 2007a), *Triportheus albus* (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2012a), e *Colomesus asellus* (COOKE; CHAO; BEHEREGARAY, 2012b).

Implicações para a conservação das espécies

- a. Alguns dos critérios para as classificações de risco realizadas até hoje pela IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) para a ictiofauna, estão baseados em listas de espécies e descrições de ocorrência, onde aquelas espécies evidenciando algum grau de exploração comercial, mas com uma aparente ampla distribuição, apenas podem ser consideradas como de Preocupação menor. Esta é a justificativa que a organização dá para inferir que *B. rousseauxii* deve ser considerada uma espécie nesta categoria

(<http://www.iucnredlist.org/details/167648/0>). Outras espécies, sobre as quais se assume um comportamento similar, não se encontram na lista (Tabela 16). Apesar disso, para a bacia do Orinoco, Colômbia começou assumir uma posição mais rígida e criteriosa para considerar o risco de extinção das suas espécies de peixes, sendo que muitas têm sido já categorizadas (Tabela 16), embora, muitas ainda não aparecem, possivelmente por falta de conhecimento em relação à sua distribuição e limites espaciais. Aqui demonstramos que espécies como *B. rousseauxii*, *P. brachypomus*, *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum* possuem ESUs independentes para cada bacia, são geneticamente descontínuas, portanto estoques de pesca diferentes, então com maior risco de serem insubstituíveis, e portanto com necessidades de conservação diferenciadas. Claramente os dados genéticos nos mostram que este critério de “grande tamanho efetivo pela longa distribuição entre bacias do Orinoco e Amazonas” é jogado fora para estas espécies, o que imperiosamente nos leva a considerar a categorização e recategorização do risco de extinção para estas espécies.

- b. *Colossoma macropomum* e *P. orinocoense*/*P. punctifer*, por causa do sua pouca variabilidade genética observada e recente expansão dentro do Orinoco, demonstram um processo de recuperação populacional em curso nesta bacia. Estes tipos de populações são mais vulneráveis às modificações de ambiente, destruição de habitat e sobre exploração pesqueira, pelo qual é necessário tomar medidas sobre a proteção das mesmas em um grau ainda maior do que o resto das outras, possivelmente elevando o grau de vulnerabilidade nas listas de risco, especialmente para esta bacia.
- c. Para peixes ornamentais, ESUs com uma única MU ocupando uma área reduzida, devem ser consideradas unidades com restrições maiores (ampliação do período de defeso e diminuição da cota de captura), devido à dificuldade para serem repostas ou substituídas em curto prazo.
- d. No caso de espécies que possuem Unidades de Conservação que abarcam territórios transfronteiriços como *C. macropomum*, *P. metaense*/*P. tigrinum*, *P. orinocoense*/*P. punctifer*, *N. unifasciatus*, *P. axelrodi* e *P. altum*, devem possuir legislações e planos de conservação unificados para a ictiofauna, pelo menos para estas áreas de fronteira em termos de delimitação de reservas, períodos de defeso, caça, translocação, tamanhos mínimos e cota de captura.
- e. O fato de que durante este trabalho se tenha demonstrado que os peixes sedentários possuem uma maior quantidade de ESUs, muitas delas em simpatria, permitem sugerir que estas espécies possuem um maior potencial de especiação e capacidade diversificadora, o que portanto os deve tornar um alvo mais sensível e prioritário para a conservação, do contrário, uma falta de ações em curto prazo para a proteção e conservação de uma pequena área, pode significar e extinção de mais de uma potencial espécie.

Finalmente, é possível concluir que as bacias do Orinoco e Amazonas não constituem ESUs independentes para todas as espécies da sua ictiofauna (apenas para

duas delas dentro deste trabalho), sendo que às vezes estas ESUs podem estar compartilhadas entre bacias, e em outras ocasiões as bacias podem abrigar mais de uma destas Unidades, especialmente em peixes ornamentais, cuja condição sedentária os fazem mais susceptíveis à especiação e formação de um maior número de unidades de conservação dentro de um mesmo sistema fluvial. O fato de terem nomes independentes não faz das bacias também unidades biologicamente isoladas, pois muito de sua ictiofauna é ainda compartilhada, assim também como a responsabilidade política dos países de manter estes processos evolutivos ao longo do tempo.

Tabela 19. Classificação do risco de extinção das espécies de peixes dentro do presente estudo, segundo a IUCN (*International Union for Conservation of Nature*) e o Instituto Humboldt da Colômbia.

Espécie	Classificação do risco		
	IUCN	Lista Vermelha de Colômbia	
		2002	2012
<i>Brachyplatystoma rousseauxii</i>	Preocupação menor	-	Vulnerável
<i>Colossoma macropomum</i>	-	Ameaçada	Quase ameaçada
<i>Piaractus brachypomus</i>	-	-	-
<i>Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum</i>	-	Em perigo	Vulnerável
<i>Pseudoplatystoma orinocoense/Pseudoplatystoma punctifer</i>	-	Em perigo	Vulnerável
<i>Nannostomus unifasciatus</i>	-	-	-
<i>Paracheirodon axelrodi</i>	-	-	-
<i>Pterophyllum altum</i>	-	-	Vulnerável

IUCN: International Union for Conservation of Nature. A ordem de risco, de maior à menor, é: Ameaçada, Em perigo, Vulnerável, Quase ameaçada e Preocupação menor.

17 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABADÍA-CARDOSO, A.; CLEMENTO, A. J.; GARZA, J. C. Discovery and characterization of single-nucleotide polymorphisms in steelhead/rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. **Molecular ecology resources**, v. 11 Suppl 1, p. 31-49, mar. 2011.
- ABREU, M. M. DE et al. Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguay River Basin. **Genetics and Molecular Biology**, v. 32, n. 4, p. 868-873, out. 2009.
- AGOSTINHO, A. A. et al. Migratory fishes of the upper Paraná River basin, Brazil. In: CAROLSFELD, J. et al. (Eds.). **Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status**. 1. ed. Victoria: World Fisheries Trust, the World Bank and the International Development Research Centre, 2003. p. 19-99.
- AGUILERA, O. et al. Palaeontological evidence for the last temporal occurrence of the ancient western Amazonian river outflow into the Caribbean. **PloS one**, v. 8, n. 9, p. e76202, jan. 2013.
- ALBERT, J. S.; REIS, R. E. **Historical biogeography of Neotropical freshwater fishes**. 1. ed. Berkely: University of California Press, 2011. p. 406
- ALEXANDER, H. J. et al. PARALLEL EVOLUTION AND VICARIANCE IN THE GUPPY (*POECILIA RETICULATA*) OVER MULTIPLE SPATIAL AND TEMPORAL SCALES. **Evolution**, v. 60, n. 11, p. 2352-2369, nov. 2006.
- ALFARO, M. E.; HOLDER, M. T. The Posterior and the Prior in Bayesian Phylogenetics. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 37, n. 1, p. 19-42, dez. 2006.
- ALLENDORF, F.; HOHENLOHE, P.; LUIKART, G. Genomics and the future of conservation genetics. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 10, p. 697-709, 2010.
- ALLENDORF, F. W.; LUIKART, G. **Conservation and the genetics of populations**. Oxford, USA: Blackwell Publishing, 2007. p. 663
- ALVAREZ, A.; DANIEL, C.; RODRIGUEZ, M. **Estudio regional continental de zonas homogéneas en el departamento del Guaviare, San José del Guaviare**. San José del Guaviare: [s.n.].
- ANJOS, H. D. B. et al. Exportação de peixes ornamentais do Estado do Amazonas, bacia amazônica, Brasil. **Pesca de São Paulo**, v. 35, n. 2, p. 259-274, 2009.
- ANJOS, H. D. B.; ANJOS, C. R. BIOLOGIA REPRODUTIVA E DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E LARVAL DO CARDINAL TETRA, *Paracheirodon axelrodi* SCHULTZ, 1956 (CHARACIFORMES : CHARACIDAE), EM LABORATÓRIO. **Boletim do Instituto de Pesca**, v. 32, n. 2, p. 151-160, 2006.
- ARARIPE, J.; RÉGO, P. DO; QUEIROZ, H. Dispersal capacity and genetic structure of *Arapaima gigas* on different geographic scales using microsatellite markers. **PloS one**, v. 8, n. 1, p. e54470, 2013.

- ARAUJO-LIMA, C. A. R. M.; RUFFINO, M. L. **Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and Conservation Status**. The Intern ed. Ottawa: IDRC/World Bank, 2003. p. 361
- ARAUJO-LIMA, C.; GOULDING, M. **So fruitful a fish: ecology, conservation, and aquaculture of the Amazon's tambaqui**. 1. ed. New York, NY: Columbia University Press, 1997. p. 191
- ARBOGAST, B. S.; KENAGY, G. J. Comparative phylogeography as an integrative approach to historical biogeography. **Journal of Biogeography**, v. 28, n. 7, p. 819-825, 7 jul. 2008.
- ARBOUR, J. H.; FERNÁNDEZ, H. L. Guianacara dacrya, a new species from the rio Branco and Essequibo River drainages of the Guiana Shield (Perciformes: Cichlidae). **Neotropical Ichthyology**, v. 9, n. 1, p. 87-96, mar. 2011.
- ARMBRUSTER, J. W.; PROVENZANO, F. Four new species of the suckermouth armored catfish genus *Lasiancistrus* (Loricariidae: Ancistrinae). **Ichthyological Exploration of Freshwaters**, v. 11, n. 3, p. 241-254, 2000.
- AVISE, J. et al. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 18, p. 489-522, 1987.
- AVISE, J. C. **Molecular Markers, Natural History and Evolution: Natural History and Evolution**. New York, USA: Chapman & Hall, 1994. p. 511
- AVISE, J. C. **Phylogeography: The History and Formation of Species**. 1. ed. Cambridge: Harvard University Press, 2000. p. 447
- AVISE, J. C. Phylogeography: retrospect and prospect. **Journal of Biogeography**, v. 36, n. 1, p. 3-15, jan. 2009.
- AVISE, J. C.; WALKER, D.; JOHNS, G. C. Speciation durations and Pleistocene effects on vertebrate phylogeography. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 265, n. 1407, p. 1707-1712, 22 set. 1998.
- AZEVEDO, P. Reprodução dos peixes de água doce. **Caça e Pesca**, v. 12, p. 16, 1953.
- BAIRD, N. A et al. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. **PLoS one**, v. 3, n. 10, p. e3376, jan. 2008.
- BARLETTA, M. **Estudo da comunidade de peixes bentônicos em três áreas do canal principal, próximas à confluência dos rios Negro e Solimões, Amazonas (Amazônia Central, Brasil)**. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia, Universidade Federal do Amazonas, 1995.
- BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N. N. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da amazônia. In: RUFFINNO, M. L. (Ed.). **A pesca e os recursos pesqueiros na Amazonia. Projeto manejo dos recursos naturais de Várzea**. [s.l.] IBAMA MMA/PROVÁRZEA, 2004. p. 11-55.
- BARTHEM, R.; GOULDING, M. **The Catfish Connection: Ecology, Migration, and Conservation of Amazon Predators**. 1. ed. New York, NY: Columbia University Press, 1997. p. 144

BATISTA, J. et al. **Genetic variability studies of piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) and dourada (*B. rousseauxii*)(Pimelodidae: Siluriformes) in the Amazon: basis for**Proceedings of VI International Congress on the Biology of Fish, Manaus, AM, Brazil. **Anais...**2004Disponível em: <http://scholar.google.com.secure.sci-hub.org/scholar?q=Genetic+variability+studies+of+piramutaba++Brachyplatystoma+vaillantii+and+dourada++B.+rousseauxii+%28Pimelodidae%3A+Siluriformes%29+in+the+Amazon%3A+basis+for+management+and+conservation&btnG=&hl=es&as_sdt=0%2C5#0>. Acesso em: 2 maio. 2015

BATISTA, J. et al. Variabilidade genética da dourada e da piramutaba na bacia amazônica. In: FABRÉ, N. N.; BARTHEM, R. B. (Eds.). **O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: Piramutaba e dourada no eixo Solimoes-Amazonas**. Manaus, Brasil: Edições ProVárzea/Ibama, 2005. p. 15-19.

BATISTA, J.; ALVES-GOMES, J. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. **Genetics and Molecular Research**, v. 5, p. 723-740, 2006.

BATISTA, J. S. et al. DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. **Conservation Genetics Resources**, v. 2, n. 1, p. 5-10, 1 nov. 2009.

BAXTER, S. W. et al. Linkage mapping and comparative genomics using next-generation RAD sequencing of a non-model organism. **PloS one**, v. 6, n. 4, p. e19315, jan. 2011.

BAYLEY, P. B. Studies on the migratory characin, *Prochilodus platensis* Holmberg 1889, (Pisces, Characoidei) in the River Pilcomayo, South America. **Journal of Fish Biology**, v. 5, n. 1, p. 25-40, jan. 1973.

BEAUMONT, M.; NICHOLS, R. Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. **Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences**, v. 263, n. 1377, p. 1619-1626, 1996.

BEHEREGARAY, L. B. et al. Ecological speciation in the tropics: insights from comparative genetic studies in Amazonia. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. January, p. 1-19, 21 jan. 2015.

BEMERGUY, R.; COSTA, J. Considerações sobre o sistema de drenagem da Amazônia e sua relação com o arcabouço tectono-estrutural. **Belém: Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi**, v. 3, p. 75-97, 1991.

BENSCH, S.; ÅKESSON, S.; IRWIN, D. E. The use of AFLP to find an informative SNP : genetic differences across a migratory divide in willow warblers. **Molecular ecology**, v. 11, p. 2359-2366, 2002.

BERMINGHAM, E.; MARTIN, P. Comparative mtDNA phylogeography of neotropical freshwater fishes : testing shared history to infer the evolutionary landscape of lower Central America. **Molecular Ecology**, v. 7, p. 499-517, 1998.

- BERTOZZI, T. et al. Anonymous nuclear loci in non-model organisms : making the most of high throughput genome surveys . p. 1-4, 2012.
- BICKFORD, D. et al. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 22, n. 3, p. 148-55, mar. 2007.
- BINDER, T. R.; COOKEE, S. J.; HINCH, S. G. Encyclopedia of fish physiology: from genome to environment. In: FARRELL, A. P. (Ed.). **Encyclopedia of Fish Physiology: From Genome to Environment**. 3. ed. San Diego: Academic Press, 2011. p. 1921–1927.
- BONETTO, A. et al. Información complementaria sobre migraciones de peces en la cuenca del Plata. **Physis**, v. 30, p. 505-520, 1971.
- BONETTO, A.; PIGNALBERI, C. Nuevos aportes al conocimiento de las migraciones de los peces en los ríos mesopotámicos de la República Argentina. **Comunicación Instituto Nacional de Limnología, Santo Tomé**, v. 1, p. 1-14, 1964.
- BRADBURY, I. R. et al. Evaluating SNP ascertainment bias and its impact on population assignment in Atlantic cod, *Gadus morhua*. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 218-25, mar. 2011.
- BREDER, C. M.; ROSEN, D. E. **Modes of reproduction in fishes**. 1. ed. Garden City: Natural History Press, 1966. p. 941
- BRITO, M. F. G.; BAZZOLI, N. Reproduction of the surubim catfish (Pisces, Pimelodidae) in the São Francisco River, Pirapora Region, Minas Gerais, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 55, n. 5, p. 624-633, out. 2003.
- BRIX, O.; CLEMENTS, K. D.; WELLS, R. M. G. Haemoglobin components and oxygen transport in relation to habitat distribution in triplefin fishes (Tripterygiidae). **Journal of Comparative Physiology B: Biochemical, Systemic, and Environmental Physiology**, v. 169, n. 4-5, p. 329-334, 23 jul. 1999.
- BROWN, L. R.; MOYLE, P. B. Invading species in the Eel River , California : successes , failures , and relationships with resident species. **Environmental Biology of Fishes**, v. 49, p. 271-291, 1997.
- BROWN, W. M.; GEORGE, M.; WILSON, A. C. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. **Proceedings of the National Academic of Sciences**, v. 76, n. 4, p. 1967-1971, 1979.
- BUITRAGO-SUÁREZ, A. U.; BURR, B. M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* (Siluriformes : Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p. 1-38, 2007.
- CAMPBELL, N. R.; NARUM, S. R. Development of 54 novel single-nucleotide polymorphism (SNP) assays for sockeye and coho salmon and assessment of available SNPs to differentiate stocks within the Columbia River. **Molecular Ecology Resources**, v. 11 Suppl 1, p. 20-30, mar. 2011.
- CARVAJAL-VALLEJOS, F. M. et al. Genetic structure in the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: influence of life history strategies. **Genetica**, v. 142, n. 4, p. 323-36, ago. 2014.

- CARVALHO, D.; OLIVEIRA, D. Hidden genetic diversity and distinct evolutionarily significant units in an commercially important Neotropical apex predator, the catfish *Pseudoplatystoma corruscans*. **Conservation Genetics**, v. 13, n. 6, p. 1671-1675, 2012.
- CARVALHO-COSTA, L. F. et al. Molecular systematics of the neotropical shovelnose catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker 1862 based on nuclear and mtDNA markers. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 59, n. 1, p. 177-94, abr. 2011.
- CATCHEN, J. M. et al. Stacks: building and genotyping Loci de novo from short-read sequences. **G3 (Bethesda, Md.)**, v. 1, n. 3, p. 171-82, ago. 2011.
- CAVALLOTTO, J. L.; VIOLANTE, R. A.; HERNÁNDEZ-MOLINA, F. J. Geological aspects and evolution of the Patagonian continental margin. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 2, p. 346-362, 31 jun. 2011.
- CHAO, N. L. The fishery, diversity, and conservation of ornamental fishes in the rio Negro Basin, Brazil - A review of Project Piaba (1989-99). In: CHAO, N. L. et al. (Eds.). **Conservation and management of ornamental fish resources of the rio Negro Basin, Amazonia, Brazil - Project Piaba**. 1. ed. Manaus: Universidade Federal do Amazonas, 2001. p. 161-201.
- CHAPMAN, B. B. et al. Partial migration in fishes: definitions, methodologies and taxonomic distribution. **Journal of fish biology**, v. 81, n. 2, p. 479-99, jul. 2012.
- CHAPMAN, C. Primate seed dispersal: the fate of dispersed seeds. **Biotropica**, v. 1989, p. 147-154, 1989.
- CHAPMAN, L. G.; GALIS, F.; SHINN, J. Phenotypic plasticity and the possible role of genetic assimilation: Hypoxia-induced trade-offs in the morphological traits of an African cichlid. **Ecology Letters**, v. 3, n. 5, p. 387-393, set. 2000.
- CHELLAPPA, S. et al. Reproductive seasonality of the fish fauna and limnoecology of semi-arid Brazilian reservoirs. **Limnologica - Ecology and Management of Inland Waters**, v. 39, n. 4, p. 325-329, dez. 2009.
- CIONEK, V. D. M. et al. Fishes from first order streams of lower Paranapanema and Ivaí rivers, upper Paraná River basin, Paraná, Brazil. **Check List**, v. 8, n. 6, p. 1158-1162, 2012.
- COATES, B. S. et al. Comparative performance of single nucleotide polymorphism and microsatellite markers for population genetic analysis. **The Journal of heredity**, v. 100, n. 5, p. 556-64, 2009.
- COLLINS, S. M. et al. Population Structure of a Neotropical Migratory Fish : Contrasting Perspectives from Genetics and Otolith Microchemistry. **Transactions of the American Fisheries Society**, v. 142, p. 1192-1201, 2013.
- COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Phylogeography of a flooded forest specialist fish from central Amazonia based on intron DNA: the cardinal tetra *Paracheirodon axelrodi*. **Freshwater Biology**, v. 54, n. 6, p. 1216-1232, jun. 2009.
- COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Divergent natural selection with gene flow along major environmental gradients in Amazonia: insights from genome

scans, population genetics and phylogeography of the characin fish *Triportheus albus*. **Molecular ecology**, v. 21, n. 10, p. 2410-27, maio 2012a.

COOKE, G. M.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Natural selection in the water: freshwater invasion and adaptation by water colour in the Amazonian pufferfish. **Journal of evolutionary biology**, v. 25, n. 7, p. 1305-20, jul. 2012b.

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

CORPORACIÓN COLOMBIA INTERNACIONAL – INCODER. **PESCA Y ACUICULTURA COLOMBIA, INFORME TÉCNICO**. Bogotá: [s.n.]. Disponível em: <http://www.cci.org.co/cci/cci_x/datos/BoletinesIncoder/Publicaciones/InformeCompleto2008.pdf>.

COSER, R. et al. Development of microsatellite markers for the near threatened eagles *Harpia harpyja* and *Morphnus guianensis* using next-generation sequencing. **Conservation Genetics Resources**, 18 jul. 2014.

CRAMPTON, W. G. R.; ALBERT, J. S. Redescription of *Gymnotus coropinae* (Gymnotiformes, Gym-notidae), an often misidentified species of Neotropical electric fish, with notes on natural history and electric signals. **Zootaxa**, v. 348, p. 1-20, 2003.

CRANDALL, K. A. et al. Considering evolutionary process in conservation biology. **Perspectives**, v. 15, n. 7, p. 290-295, 2000.

CRESSA, C. et al. Aspectos generales de la limnología en Venezuela. **Interciencia**, v. 18, n. 5, p. 237-248, 1993.

CRISPO, E.; CHAPMAN, L. J. Geographic variation in phenotypic plasticity in response to dissolved oxygen in an African cichlid fish. **Journal of evolutionary biology**, v. 23, n. 10, p. 2091-103, out. 2010.

DAVEY, J. W.; BLAXTER, M. L. RADSeq: next-generation population genetics. **Briefings in functional genomics**, v. 9, n. 5-6, p. 416-23, dez. 2010.

DE GUIA, A. P. O.; SAITOH, T. The gap between the concept and definitions in the Evolutionarily Significant Unit: the need to integrate neutral genetic variation and adaptive variation. **Ecological Research**, v. 22, n. 4, p. 604-612, 26 out. 2006.

DEPETRIS, P. J.; PAOLINI, J. E. **Biogeochemical Aspects of South American Rivers The Paraná and the Orinoco**. Disponível em: <<http://www.scopenvironment.org/downloadpubs/scope42/contents.html>>. Acesso em: 7 mar. 2015.

DEZA, S.; BAZÁN, R.; CULQUICHICÓN, Z. BIOECOLOGÍA Y PESQUERÍA DE *Pseudoplatystoma fasciatum* (LINNAEUS , 1766 ; PISCES), DONCELLA , EN LA REGIÓN UCAYALI. **Folia Amazónica**, v. 14, n. 2, p. 5-18, 2005.

DÍAZ DE GAMERO, M. L. The changing course of the Orinoco River during the Neogene: a review. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 123, n. 1-4, p. 385-402, jul. 1996.

DRUMMOND, A. J. et al. Relaxed phylogenetics and dating with confidence. **PLoS biology**, v. 4, n. 5, p. e88, maio 2006.

DRUMMOND, A. J. et al. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. **Molecular biology and evolution**, v. 29, n. 8, p. 1969-73, ago. 2012.

EARL, D. A.; VONHOLDT, B. M. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. **Conservation Genetics Resources**, v. 4, n. 2, p. 359-361, 13 out. 2011.

EATON, D. A. R. PyRAD: Assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. **Bioinformatics**, v. 30, n. 13, p. 1844-1849, 2014.

EATON, W. A. The relationship between coding sequences and function in haemoglobin. **Nature**, v. 284, n. 5752, p. 183-185, 13 mar. 1980.

ELMER, K. R. et al. NEOTROPICAL CICHLID FISHES. **Evolution**, v. 67, n. 2013, p. 281-288, 2013.

ESCOBAR-LIZARAZO, M. D. **Diversidade genética e padrões populacionais da Pirapitinga *Piaractus brachypomus* (Cuvier, 1818) Characiformes: um critério para seu manejo**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas, 2013.

EVANNO, G.; REGNAUT, S.; GOUDET, J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. **Molecular ecology**, v. 14, n. 8, p. 2611-20, jul. 2005.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular ecology resources**, v. 10, n. 3, p. 564-7, maio 2010.

EYTAN, R. I.; HELLBERG, M. E. NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL SEQUENCE DATA REVEAL AND CONCEAL DIFFERENT DEMOGRAPHIC HISTORIES AND POPULATION GENETIC PROCESSES IN CARIBBEAN REEF FISHES. **Evolution**, v. 64, n. 12, p. 3380-3397, 2010.

FARIAS, I. **AVALIAÇÃO DA VARIABILIDADE GENÉTICA DAS POPULAÇÕES DE ARAPAIMA GIGAS (PIRARUCU) DA BACIA AMAZONICA ATRAVÉS DE GENES DO** (B. F. Alcantara, F. V Montreuil, Eds.) Seminario taller internacional de manejo de paiche o pirarucu. **Anais...Iquitos: Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP) y World Wildlife Foundation (WWF) - Russell E. Train Education for Nature Program, 2003** Disponível em: <<http://www.iiap.org.pe/sci-hub.org/promamazonia/sbiocomercio/Upload%5CLineas%5CDocumentos/359.pdf#page=149>>. Acesso em: 2 maio. 2015

FARIAS, I. et al. Padrões Genético-populacionais de peixes da Várzea. In: RENNO, J. F.; DÁVILLA, C. (Eds.). **Biología de las poblaciones de peces de la Amazonía y Piscicultura**. Iquitos, Perú: Editoria IIAP, 2006. p. 91-95.

FARIAS, I. P. et al. **Population genetics of commercially important characids of the várzea: implication for conservation** Proceedings of XIX Annual Meeting of the Society for Conservation Biology, 2005. **Anais...Brasília, Brasil: 2005** Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/sci-hub.org/doi/10.1111/brv.12153/full>>. Acesso em: 2 maio. 2015

FARIAS, I. P. et al. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossomamacropomum*

- (Teleostei: Characiformes). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 56, n. 3, p. 1129-35, set. 2010.
- FARIAS, I. P.; HRBEK, T. Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae) of the Amazon basin. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 49, n. 1, p. 32-43, out. 2008.
- FAY, J. C.; WU, C. Letter to the Editor A Human Population Bottleneck Can Account for the Discordance Between Patterns of Mitochondrial Versus Nuclear DNA Variation. **Molecular biology and evolution**, v. 16, n. 7, p. 1003-1005, 1999.
- FERNANDEZ-ACOSTA, A. et al. **Pesca y Acuicultura Colombia 2008: Informe Técnico Regional Cuencas del Orinoco y Amazonas**. Bogotá, Colombia: Corporación Colombia Internacional, 2008.
- FERRARIS, C. J.; MAGO-LECCIA, F. A new genus and species of pimelodid catfish from the Rio Negro and Rio Orinoco drainages of Venezuela (Siluriformes: Pimelodidae). **Copeia**, v. 1989, n. 1, p. 166-171, 1989.
- FOLGUERA, A. et al. A review of Late Cretaceous to Quaternary palaeogeography of the southern Andes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 103, n. 2, p. 250-268, 31 jun. 2011.
- FOLL, M.; GAGGIOTTI, O. A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a Bayesian perspective. **Genetics**, v. 180, n. 2, p. 977-993, 2008.
- FRANKHAM, R. Genetics and conservation biology. v. 326, p. 22-29, 2003.
- FRANKHAM, R. et al. Predicting the probability of outbreeding depression. **Conservation Biology**, v. 25, p. 465–475, 2011.
- FRASER, D. J.; BERNATCHEZ, L. Adaptive evolutionary conservation : towards a unified concept for defining conservation units. **Molecular Ecology**, v. 10, p. 2741-2752, 2001.
- FREEMAN, B. et al. Molecular systematics of Serrasalminae: deciphering the identities of piranha species and unraveling their evolutionary histories. **Zootaxa**, v. 1484, p. 1-38, 2007.
- FUNK, W. C. et al. Harnessing genomics for delineating conservation units. **Trends in ecology & evolution**, v. 27, n. 9, p. 489-96, set. 2012.
- FURCH, K.; JUNK, W. J. Physicochemical conditions in the floodplains. In: **The Central Amazon Floodplain**. Berlin: Springer Berlin Heidelberg, 1997. p. 69-108.
- GILL, M. S. et al. Improving Bayesian Population Dynamics Inference: A Coalescent-Based Model for Multiple Loci. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 3, p. 713-724, 22 nov. 2012.
- GODINHO, A.; KYNARD, B.; GODINHO, H. Migration and spawning of female surubim (*Pseudoplatystoma corruscans*, Pimelodidae) in the São Francisco river, Brazil. **Environmental Biology of Fishes**, v. 80, p. 421-433, 2007.
- GODINHO, A. L.; KYNARD, B. Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs. **River Research and Applications**, v. 25, n. 6, p. 702-712, jul. 2009.

- GODINHO, A. L.; LAMAS, I. R.; GODINHO, H. P. Reproductive ecology of Brazilian freshwater fishes. **Environmental Biology of Fishes**, v. 87, n. 2, p. 143-162, 7 nov. 2010.
- GODOY, J. A. La genética, los marcadores moleculares y la conservación de especies. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 1, p. 23-33, 2009.
- GOULDING, M. **The Fishes and the Forest: Explorations in Amazonian Natural History**. 1. ed. Berkely: California University Press, 1980. p. 280
- GOULDING, M.; BARTHEM, R. **The Smithsonian atlas of the Amazon**. 1. ed. Washington DC, USA: Smithsonian Books, 2003. p. 253
- GOULDING, M.; CARVALHO, M. L. Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Characidae): an important Amazonian food fish. **Revista Brasileira de Zoologia**, v. 1, n. 2, p. 107-133, 1982.
- GRAVENA, W. et al. Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (*Cetacea: Iniidae*)? **Conservation Genetics**, v. 15, n. 3, p. 619-629, 31 jan. 2014.
- GRIFFITHS, R. C.; TAVARÉ, S. Sampling theory for neutral alleles in a varying environment. **Philosophical Transactions: Biological Science**, v. 344, n. 403, p. 410, 1994.
- GUINDON, S. et al. New algorithms and methods to estimate maximum-likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. **Systematic biology**, v. 59, n. 3, p. 307-21, maio 2010.
- GURGEL, L. D. L.; VERANI, J. R.; CHELLAPPA, S. Reproductive ecology of *Prochilodus brevis* an endemic fish from the semiarid Region of Brazil. **TheScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 1-7, jan. 2012.
- HAMNER, R. M.; FRESHWATER, D. W.; WHITFIELD, P. E. Mitochondrial cytochrome b analysis reveals two invasive lionfish species with strong founder effects in the western Atlantic. **Journal of Fish Biology**, v. 71, n. sb, p. 214-222, out. 2007.
- HAMOY, I. G.; SANTOS, S. Multiplex PCR panel of microsatellite markers for the tambaqui, *Colossoma macropomum*, developed as a tool for use in conservation and broodstock management. v. 11, n. 1, p. 141-146, 2012.
- HARDIN, G. The Competitive Exclusion Principle. **Science**, v. 131, n. 3409, p. 1292-1297, 1960.
- HART, P. J. B.; REYNOLDS, J. D. **Handbook of Fish Biology and Fisheries**. 3. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2008. p. 432
- HATANAKA, T.; HENRIQUE-SILVA, F.; GALETTI, P. M. Population substructuring in a migratory freshwater fish *Prochilodus argenteus* (Characiformes, Prochilodontidae) from the São Francisco River. **Genetica**, v. 126, p. 1-7, 2006.
- HAUSER, L. et al. An empirical comparison of SNPs and microsatellites for parentage and kinship assignment in a wild sockeye salmon (*Oncorhynchus nerka*) population. **Molecular ecology resources**, v. 11, p. 150-161, mar. 2011.

- HELED, J.; DRUMMOND, A. J. Bayesian inference of species trees from multilocus data. **Molecular biology and evolution**, v. 27, n. 3, p. 570-80, mar. 2010.
- HELYAR, S. J. et al. Application of SNPs for population genetics of nonmodel organisms: new opportunities and challenges. **Molecular ecology resources**, v. 11, p. 123-36, mar. 2011.
- HOHENLOHE, P. A et al. Population genomics of parallel adaptation in threespine stickleback using sequenced RAD tags. **PLoS genetics**, v. 6, n. 2, p. e1000862, fev. 2010.
- HOLDEREGGER, R.; KAMM, U.; GUGERLI, F. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. **Landscape Ecology**, v. 21, n. 6, p. 797-807, 2006.
- HOORN, C. Marine incursions and the influence of Andean tectonics on the Miocene depositional history of northwestern Amazonia: results of a palynostratigraphic study. **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 105, p. 267-309, 1993.
- HOORN, C. Fluvial palaeoenvironments in the intracratonic Amazonas Basin (early Miocene-early middle Miocene, Colombia). **Palaeogeography, Palaeoclimatology, Palaeoecology**, v. 109, n. 1, p. 1-54, 1994.
- HOORN, C. et al. Andean tectonics as a cause for changing drainage patterns in Miocene northern South America. **Geology**, v. 23, p. 237-240, 1995.
- HOORN, C.; WESSELINGH, F. **Amazonia, landscape and species evolution: a look into the past**. 1. ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell, John Wiley & Sons, 2011. p. 482
- HRBEK, T.; CROSSA, M.; FARIAS, I. Genética da conservação de *Arapaima gigas*: implicações para localização de áreas protegidas. In: RENNO, J.-F.; DÁVILA, C. (Eds.). **Biología de las poblaciones de peces de la Amazonía y Piscicultura**. Iquitos, Perú: Editora IIAP, 2006. p. 96-101.
- HRBEK, T.; FARIAS, I.; CROSSA, M. Population genetic analysis of *Arapaima gigas*, one of the largest freshwater fishes of the Amazon basin: implications for its conservation. **Animal Conservation**, v. 8, n. 3, p. 297-308, 2005.
- HRBEK, T.; LARSON, A. The evolution of diapause in the killifish family Rivulidae (Atherinomorpha, Cyprinodontiformes): A molecular phylogenetic and biogeographic perspective. **Evolution**, v. 53, n. 4, p. 1200-1216, 1999.
- HRBEK, T.; SECKINGER, J.; MEYER, A. A phylogenetic and biogeographic perspective on the evolution of poeciliid fishes. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 43, n. 3, p. 986-98, jun. 2007.
- HUBERT, N. et al. Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna. **Molecular Ecology**, v. 16, n. 10, p. 2115-2136, maio 2007a.
- HUBERT, N. et al. Isolation by distance and Pleistocene expansion of the lowland populations of the white piranha *Serrasalmus rhombeus*. **Molecular ecology**, v. 16, n. 12, p. 2488-503, jun. 2007b.
- HUBERT, N.; RENNO, J.-F. Historical biogeography of South American freshwater fishes. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 8, p. 1414-1436, ago. 2006.

- HUELSENBECK, J. P. et al. Bayesian inference of phylogeny and its impact on evolutionary biology. **Science (New York, N.Y.)**, v. 294, n. 5550, p. 2310-4, 14 dez. 2001.
- HUGHES, J. M. et al. Extreme genetic structure in a small-bodied freshwater fish, the purple spotted gudgeon, *Mogurnda adspersa* (Eleotridae). **PloS one**, v. 7, n. 7, p. e40546, jan. 2012.
- ISAAC, V. J.; RUFFINO, M. L. Population dynamics of tambaqui, *Colossoma macropomum* Cuvier, in the Lower Amazon, Brazil. **Fisheries Management and Ecology**, v. 3, p. 315-333, 1996.
- ISAAC, V.; RUFFINO, M. A estatística pesqueira no baixo amazonas: experiencia do projeto lara. **IBAMA, Coleção Meio Ambiente Série Estudos de ...**, v. 22, p. 201-223, 2000.
- JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 23, n. 14, p. 1801-6, 15 jul. 2007.
- JOB, G.; VON HAESLER, A.; STRIMMER, K. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. **BMC evolutionary biology**, v. 4, p. 18, 28 jun. 2004.
- KALINOWSKI, S. How many alleles per locus should be used to estimate genetic distances ? **Heredity**, v. 88, p. 62-65, 2002.
- KARL, S. A.; AVISE, J. C. PCR-based Assays of Mendelian Polymorphisms from Anonymous Single-Copy Nuclear DNA : Techniques and Applications for Population Genetics 1. **Molecular biology and evolution**, v. 10, n. 2, p. 342-361, 1993.
- KEARSE, M. et al. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 12, p. 1647-9, 15 jun. 2012.
- KELLER, I. et al. Population genomic signatures of divergent adaptation, gene flow and hybrid speciation in the rapid radiation of Lake Victoria cichlid fishes. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 11, p. 2848-63, jun. 2013.
- KELLOGG, J. Cenozoic tectonic history of the Sierra de Perijá, Venezuela-Colombia, and adjacent basins. **Geological Society of America Memoirs**, v. 162, n. 239, p. 262, 1984.
- KINZIGER, A. P. et al. Small founding number and low genetic diversity in an introduced species exhibiting limited invasion success (speckled dace, *Rhinichthys osculus*). **Ecology and evolution**, v. 1, n. 1, p. 73-84, set. 2011.
- KOHN, M. H. et al. Genomics and conservation genetics. **Trends in ecology & evolution**, v. 21, n. 11, p. 629-37, nov. 2006.
- KOLM, N. et al. Life history evolution in cichlids 1: revisiting the evolution of life histories in relation to parental care. **Journal of evolutionary biology**, v. 19, n. 1, p. 66-75, jan. 2006.
- KÜCHLER, I. L.; MIEKELEY, N.; FORSBERG, B. R. A Contribution to the Chemical Characterization of Rivers in the Rio Negro Basin , Brazil. v. 11, n. 3, p. 286-292, 2008.

- LANDE, R. Genetics and demography in biological conservation. **Science**, v. 241, n. 4872, p. 1455-1460, 1988.
- LANTERI, A. A.; CONFALONIERI, V. A. Filogeografía: objetivos, métodos y ejemplos. In: MORRONE, J. J.; LLORENTE, J. (Eds.). **Una perspectiva latinoamericana de la biogeografía**. 1. ed. Ciudad de México: Las Prensas de Ciencias, Facultad de Ciencias, UNAM, 2003. p. 185-194.
- LASSO, C. A. et al. **Biodiversidad de la cuenca del Orinoco: bases científicas para la identificación de áreas prioritarias para la conservación y uso sostenible de la biodiversidad**. 1. ed. Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, WWF Colombia, Fundación Omacha, Fundación La Salle e Instituto de Estudios de la Orinoquia (Universidad Nacional de Colombia), 2010. p. 609
- LASSO, C.; MACHADO-ALLISON, A.; HERNÁNDEZ, R. Consideraciones zoogeográficas de los peces de La Gran Sabana (Alto Caroni) Venezuela, y sus relaciones con las cuencas vecinas. **Memoria de La Sociedad de Ciencias Naturales La Salle**, v. 1990, p. 133-134, 1990.
- LATRUBESSE, E. M.; FRANZINELLI, E. The late Quaternary evolution of the Negro River, Amazon, Brazil: Implications for island and floodplain formation in large anabranching tropical systems. **Geomorphology**, v. 70, n. 3-4, p. 372-397, set. 2005.
- LAVINA, E.; FAUTH, G. Evolução geológica da América do Sul nos últimos 250 milhões de anos. In: DE CARVALHO, C.; ALMEIDA, E. (Eds.). **Biogeografia da América do Sul: padrões e processos**. 1. ed. Sao Paulo: Roca Ltda, 2010. p. 3-13.
- LEE, J. Y.; EDWARDS, S. V. Divergence across Australia's Carpentarian barrier: statistical phylogeography of the red-backed fairy wren (*Malurus melanocephalus*). **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 62, n. 12, p. 3117-34, dez. 2008.
- LEWIS, W. M. et al. Foodweb analysis of the Orinoco floodplain based on production estimates and isotope data. **Journal of the North American Benthological Society**, v. 20, n. 2, p. 241-254, 2001.
- LI, C. et al. A practical approach to phylogenomics: the phylogeny of ray-finned fish (Actinopterygii) as a case study. **BMC evolutionary biology**, v. 7, p. 44, jan. 2007.
- LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 25, n. 11, p. 1451-2, 1 jun. 2009.
- LIMA, F. et al. Genera incertae sedis in Characidae. In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds.). **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. Porto Alegre, Brasil: Edipucrs, 2003. p. 106-168.
- LISCHER, H. E. L.; EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics (Oxford, England)**, v. 28, n. 2, p. 298-9, 15 jan. 2012.
- LITTMANN, M. Systematic review of the Neotropical shovelnose catfish genus *Sorubim* Cuvier (Siluriformes, Pimelodidae). **Zootaxa**, v. 1422, p. 1-29, 2007.

- LOH, Y.-H. E. et al. Origins of shared genetic variation in African cichlids. **Molecular biology and evolution**, v. 30, n. 4, p. 906-17, abr. 2013.
- LÓPEZ-FERNÁNDEZ, H. et al. Testing for ancient adaptive radiations in Neotropical cichlid fishes. **Evolution**, v. 67, n. 5, p. 1321-1337, 2013.
- LOVEJOY, N. R.; ARAUJO, L. G. Molecular systematics , biogeography and population structure of Neotropical freshwater needlefishes of the genus *Potamorhaphis*. **Molecular Ecology**, v. 9, p. 259-268, 2000.
- LOVEJOY, N.; WILLIS, S.; ALBERT, J. Molecular signatures of Neogene biogeographical events in the Amazon fish fauna. In: HOORN, C.; WESSELINGH, F (Eds.). **Amazonia: Landscape and Species Evolution: A look into the past**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2011. p. 405-417.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. Speciation in tropical freshwater fishes. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 1, n. 1, p. 51-75, 1969.
- LOWE-MCCONNELL, R. H. **Fish communities in tropical freshwaters: their distribution, ecology, and evolution**. 1. ed. London, UK: Longman Publishing Group, 1975. p. 337
- LOWE-MCCONNELL, R. H. **Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais Vol. 03**. 3. ed. Sao Paulo: Edusp, 1999. p. 534
- LUCAS, M. et al. **Migration of freshwater fishes**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Science, 2001. p. 412
- LUIKART, G.; ENGLAND, P.; TALLMON, D. The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing. **Nature reviews genetics**, v. 4, n. 12, p. 981-994, 2003.
- LUJAN, N. K.; ARMBRUSTER, J. W. The Guiana Shield. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater fishes**. 1. ed. Los Angeles: University of California Press, 2011. p. 211-224.
- LUNDBERG, J. G. et al. The stage for Neotropical fish diversification: A history of tropical South American rivers. In: MALABARBA, L. R. et al. (Eds.). **Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes**. 1. ed. Porto Alegre: Porto Alegre Edipucrs, 1998. p. 13-48.
- LUNDBERG, J. G.; MACHADO-ALLISON, A.; KAY, R. F. Miocene Characid Fishes from Colombia : Evolutionary Stasis and Extirpation. **Science**, v. 234, n. 1982, p. 208-209, 1986.
- LYNCH, M. et al. The quantitative and molecular genetic architecture of a subdivided species. **Evolution**, v. 53, n. 1, p. 100-110, 1999.
- MACELLARI, C. Cenozoic Sedimentation and Tectonics of the Southwestern Caribbean Pull-Apart Basin, Venezuela and Colombia. In: **Petroleum Basins of South America**. 1. ed. [s.l.] AAPG Memoir, 1995. p. 757-780.
- MACHADO, V. N. **Análise da variabilidade genética da curimatã, *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) (Characiformes, Prochilodontidae) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2009.

- MACHADO-ALLISON, A. Factors affecting fish communities in the flooded plains of Venezuela. **Acta Biológica Venezuéllica**, v. 15, n. 2, p. 59-75, 1994.
- MACHADO-ALLISON, A. Notas sobre el Origen del Orinoco, su relación con cuencas vecinas, las evidencias biológico-paleotológicas y su conservación: una revisión. **Boletín de la Academia de Ciencias Físicas, Matemáticas y Naturales**, v. 68, n. 1, p. 25-64, 2008.
- MALDONADO-OCAMPO, J. A.; VARI, R. P.; USMA, J. S. Checklist of the Freshwater Fishes of Colombia. **Biota Colombiana**, v. 9, n. 2, p. 143-237, 2008.
- MANTEL, N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer research**, v. 27, n. 1, p. 209-220, 1967.
- MARIONI, B.; BOTERO-ARIAS, R.; FONSECA-JUNIOR, S. F. Local community involvement as a basis for sustainable crocodilian management in Protected Areas of Central Amazonia: problem or solution? **Tropical Conservation ScienceTropical ...**, v. 6, n. 4, p. 484-492, 2013.
- MARMOS, L. **Monitoramento hidrogeoquímico nas bacias do rio cauamé e dos igarapés água boa e água boa de cima, municípios de boa vista e alto alegre (RR)**. [s.l.] Centro Universitário Luterano de Manaus, 2002.
- MARSHALL, B. G.; FORSBERG, B. R.; THOMÉ-SOUZA, M. J. F. Autotrophic energy sources for Paracheirodon axelrodi (Osteichthyes, Characidae) in the middle Negro River, Central Amazon, Brazil. **Hydrobiologia**, v. 596, n. 1, p. 95-103, 19 jul. 2007.
- MATOSO, D. A. et al. Preliminary qualitative analysis on mtDNA in Astyanax fasciatus populations Cuvier, 1819 (Teleostei; Characidae) indicate population distinctiveness. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 3, p. 663-667, jun. 2010.
- MAYR, E. **Systematics and the Origin of Species, from the Viewpoint of a Zoologist**. 1. ed. Harvard: Harvard University Press, 1942. p. 334
- MCLAUGHLIN, R. L.; FERGUSON, M. M.; NOAKES, D. L. G. Adaptive peaks and alternative foraging tactics in brook charr: evidence of short-term divergent selection for sitting-and-waiting and actively searching. **Behavioral Ecology and Sociobiology**, v. 45, n. 5, p. 386-395, 15 abr. 1999.
- MENEZES, S. U.; GÓES, R. M. N. A hidroquímica do Rio Solimoes - Amazonas. **Acta Amazonica**, v. 18, n. 3, p. 145-172, 1988.
- MEYER, A. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. In: HOCHACHKA, P.; MOMMSEN, P. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of fishes**. 2. ed. Amsterdam, Netherlands: Elsevier Press, 1993. p. 1-38.
- MEYER, A.; KNOWLES, L. L.; VERHEYEN, E. Widespread geographical distribution of mitochondrial haplotypes in rock-dwelling cichlid fishes from Lake Tanganyika. **Molecular Ecology**, v. 5, n. 3, p. 341-350, jun. 1996.
- MEYER, M. et al. Targeted high-throughput sequencing of tagged nucleic acid samples. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 15, p. e97, jan. 2007.
- MILLER, M. R. et al. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. **Genome research**, v. 17, n. 2, p. 240-8, fev. 2007.

- MIREIDE, M. et al. Hidroquímica do rio Solimões na região entre Manacapuru e Alvarães – Amazonas – Brasil The Solimões river hydrochemistry between Manacapuru and Alvarães – Brasil. v. 39, n. 4, p. 943-952, 2009.
- MITTERMEIER, R. Effects of hunting on rain forest primates. In: MARSH, C.; MITTERMEIER, R. A. (Eds.). **Primate Conservation in the Tropical Rain Forest**. New York, USA: Editorial Alan Riss, 1987. p. 109-146.
- MITTON, J. B. **Selection in Natural Populations**. 1. ed. [s.l.] Oxford University Press, 2000. p. 240
- MOJICA, J. I. **Libro rojo de peces dulceacuícolas de Colombia**. 1. ed. Bogotá: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander von Humboldt, 2012. p. 319
- MOLINA, G. L. K. **Estudio preliminar del carbono orgánico disuelto en los ríos Orinoco, Bita y Meta, en el área de influencia de Puerto Carreño**. [s.l.] Universidad de los Andes, 2002.
- MONTOYA-BURGOS, J. I. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. **Molecular ecology**, v. 12, n. 7, p. 1855-67, jul. 2003.
- MOORE, W. S. Inferring Phylogenies from mtDNA Variation : Mitochondrial-Gene Trees Versus Nuclear-Gene Trees. **Evolution**, v. 49, n. 4, p. 718-726, 1995.
- MORA, A. et al. Tectonic History of the Andes and Sub-Andean Zones: Implications for the Development of the Amazon Drainage Basin. In: HOORN, C.; WESSELINGH, F. P. (Eds.). **Amazonia: Landscape and Species Evolution: A look into the past**. 1. ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell Publishing Ltd., 2011. p. 38-60.
- MORA, A. P. et al. Parámetros físicoquímicos de algunos cuerpos de agua adyacentes a la confluencia de los ríos Orinoco y Ventuari, estado d Amazonas, Venezuela. **Boletín del centro de investigaciones**, v. 41, n. 1, p. 44-59, 2007.
- MORAN, P.; KORNFIELD, I. Retention of an ancestral polymorphism in the Mbuna species flock (Teleostei: Cichlidae) of Lake Malawi. **Molecular Biology and Evolution**, v. 10, n. 5, p. 1015-1029, 1993.
- MORIN, P. A; MARTIEN, K. K.; TAYLOR, B. L. Assessing statistical power of SNPs for population structure and conservation studies. **Molecular Ecology Resources**, v. 9, n. 1, p. 66-73, jan. 2009.
- MORIN, P. A.; LUIKART, G.; WAYNE, R. K. SNPs in ecology, evolution and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 19, n. 4, p. 208-216, abr. 2004.
- MORITZ, C. Defining evolutionarily significant units for conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 9, p. 373-375, 1994.
- MORITZ, C. Conservation units and translocations: strategies for conserving evolutionary processes. **Hereditas**, v. 130, n. 3, p. 217-228, 1999.
- MORITZ, C. Strategies to Protect Biological Diversity and the Evolutionary Process that Sustain It. **Systematic biology**, v. 51, n. 2, p. 238-254, 2002.
- MOYER, G. R. et al. HISTORICAL DEMOGRAPHY, SELECTION, AND COALESCENCE OF MITOCHONDRIAL AND NUCLEAR GENES IN PROCHILODUS

SPECIES OF NORTHERN SOUTH AMERICA. **Evolution**, v. 59, n. 3, p. 599-610, mar. 2005.

MUNRO, A. D.; SCOTT, A. P.; LAM, T. J. **Reproductive Seasonality in Teleosts: Environmental Influences**. [s.l.] CRC Press, 1990. p. 264

NAKANO, T. et al. Population genetic history of hepatitis C virus 1b infection in China. **The Journal of general virology**, v. 87, n. Pt 1, p. 73-82, jan. 2006.

NARUM, S.; HESS, J. Comparison of FST outlier tests for SNP loci under selection. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 184-194., 2011.

NICOD, J. C.; LARGIADER, C. R. SNPs by AFLP (SBA): a rapid SNP isolation strategy for non-model organisms. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 5, p. 19e-19, 1 mar. 2003.

NIELSEN, E. E. et al. Population genomics of marine fishes: identifying adaptive variation in space and time. **Molecular ecology**, v. 18, n. 15, p. 3128-3150, 2009.

NIELSEN, R. et al. Genotype and SNP calling from next-generation sequencing data. **Nature reviews. Genetics**, v. 12, n. 6, p. 443-51, jun. 2011.

NORTHCOTE, T.; HINCH, S. Fish migration and passage in forested watersheds. In: NORTHCOTE, T. G.; HARTMAN, G. F. (Eds.). **Fishes and Forestry: Worldwide Watershed Interactions and Management**. 1. ed. Oxford, UK: Blackwell Science, 2004. p. 123-142.

NOSIL, P. Speciation with gene flow could be common. **Molecular ecology**, v. 17, n. 9, p. 2103-6, 10 maio 2008.

NOSIL, P.; FUNK, D.; ORTIZ-BARRIENTOS, D. Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. **Molecular ecology**, v. 18, n. 3, p. 375-402, 2009.

NOVOA, D. F. **Los recursos pesqueros del eje fluvial Orinoco-Apure: Presente y futuro**. 1. ed. Caracas, Venezuela: Ministerio de Agricultura y Tierra, 2002. p. 148

OHTA, T.; GILLESPIE, J. H. Development of neutral and nearly neutral theories. **Theoretical Population Biology**, v. 49, p. 128-142, 1996.

OLSEN, M. T. et al. A simple route to single-nucleotide polymorphisms in a nonmodel species: identification and characterization of SNPs in the Arctic ringed seal (*Pusa hispida hispida*). **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 9-19, mar. 2011.

PALSBØLL, P.; BERUBE, M.; ALLENDORF, F. Identification of management units using population genetic data. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, p. 11-16, 2007.

PARADA-GUEVARA, S. L.; CRUZ-CASALLAS, P. E. Variación de la calidad del agua y morbilidad durante el proceso de captura y post captura de dos especies de loricáridos comercializados en Acacias (Meta) Colombia. **Orinoquia**, v. 15, n. 2, p. 180-191, 2011.

PASSOS, K. B. **Genética populacional do jaraqui de escama grossa (Semaprochilodus insignis - Prochilodontidae, Characiformes)**. [s.l.] Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2009.

PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behaviour. **Ecology of Freshwater Fish**, v. 18, n. 2, p. 215-225, jun. 2009.

- PERES, C. A. Effects of Hunting on Western Amazonian Primate Communities. **Biological Conservation**, v. 54, p. 47-59, 1990.
- PETERSON, B. K. et al. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. **PloS one**, v. 7, n. 5, p. e37135, jan. 2012.
- PIGGOTT, M. P.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Three fishes in one: cryptic species in an Amazonian floodplain forest specialist. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 102, n. 2, p. 391-403, 17 fev. 2011.
- POLAND, J. A et al. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. **PloS one**, v. 7, n. 2, p. e32253, jan. 2012.
- POSADA, D. jModelTest: phylogenetic model averaging. **Molecular biology and evolution**, v. 25, n. 7, p. 1253-6, jul. 2008.
- PRIMMER, C. R. From conservation genetics to conservation genomics. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1162, p. 357-68, abr. 2009.
- PRITCHARD, J. K.; STEPHENS, M.; DONNELLY, P. Inference of Population Structure Using Multilocus Genotype Data. **Genetics**, v. 155, p. 945-959, 2000.
- PURITZ, J. B. et al. Demystifying the RAD fad. **Molecular Ecology**, 15 out. 2014.
- QUAIL, M. A et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. **BMC genomics**, v. 13, n. 1, p. 341, jan. 2012.
- REED, D.; FRANKHAM, R. How closely correlated are molecular and quantitative measures of genetic variation? a meta-analysis. **Evolution**, v. 55, n. 6, p. 1095-1103, 2001.
- REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. **Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America**. 1. ed. Porto Alegre, Brasil: Edipucrs, 2003. p. 86
- REIS, R.; LIMA, F. **Brachyplatystoma rousseauxii (Gilded catfish)**. Disponível em: <<http://www.iucnredlist.org/details/167648/0>>. Acesso em: 16 jan. 2015.
- RIEHL, R.; BAENSCH, H. A. **Aquarien Atlas, Band 1**. 10. ed. Melle, Germany: Mergus Verlag GmbH, 1996. p. 992
- RODEN, S. E.; DUTTON, P. H.; MORIN, P. A. AFLP fragment isolation technique as a method to produce random sequences for single nucleotide polymorphism discovery in the green turtle, *Chelonia mydas*. **The Journal of heredity**, v. 100, n. 3, p. 390-3, 2009.
- ROE, A. D.; SPERLING, F. A. H. Patterns of evolution of mitochondrial cytochrome c oxidase I and II DNA and implications for DNA barcoding. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 1, p. 325-45, jul. 2007.
- ROSENBERG, N. A. Distruct: a Program for the Graphical Display of Population Structure. **Molecular Ecology Notes**, v. 4, n. 1, p. 137-138, 10 dez. 2003.

ROSENBLUM, E. B.; NOVEMBRE, J. Ascertainment bias in spatially structured populations: a case study in the eastern fence lizard. **The Journal of heredity**, v. 98, n. 4, p. 331-6, 2007.

RUFFINO, M.; ISAAC, V. The fisheries of the lower Amazon: questions of management and development. **Acta Biologica Venezuelica**, v. 15, n. 2, p. 37-46, 1994.

RUFFINO, M. L. et al. **Estatística pesqueira do Amazonas e Pará--2002**. Belém: [s.n.]. Disponível em: <[http://scholar.google.com.secure.sci-hub.org/scholar?q=Estatística+pesqueira+do+Amazonas+e+Pará--2001+ML+\(Coord.\).+RUFFINO+--+2002+-+IBAMA:+Provárzea&btnG=&hl=es&as_sdt=0,5#0](http://scholar.google.com.secure.sci-hub.org/scholar?q=Estatística+pesqueira+do+Amazonas+e+Pará--2001+ML+(Coord.).+RUFFINO+--+2002+-+IBAMA:+Provárzea&btnG=&hl=es&as_sdt=0,5#0)>. Acesso em: 28 jan. 2015.

SABAJ, M. H.; AGUILERA, O. A.; LUNDBERG, J. G. Fossil catfishes of the families Doradidae and Pimelodidae (Teleostei : Siluriformes) from the Miocene Urumaco Formation of Venezuela. **Proceedings of the Academy of Natural Sciences of Philadelphia**, v. 156, n. 1, p. 157-194, 2007.

SABAJ, M.; TAPHORN, D.; CASTILLO, O. Two new species of thicklip thornycats, genus *Rhinodoras* (Teleostei: Siluriformes: Doradidae). **Copeia**, n. 1, p. 209-226, 2008.

SAINT-PAUL, U. et al. Fish communities in central Amazonian white- and blackwater floodplains. **Environmental Biology of Fishes**, v. 57, p. 235-250, 2000.

SALZBURGER, W.; EWING, G. B.; VON HAESELER, A. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. **Molecular ecology**, v. 20, n. 9, p. 1952-63, maio 2011.

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.; MANIATIS, T. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. 2nd ed ed. New York, NY: Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor, 1989. v. 1

SAMBROOK, J.; RUSELL, D. Commonly Used Techniques in Molecular Cloning. In: SAMBROOK, J.; RUSELL, D. (Eds.). **Molecular Cloning**. 3. ed. NY, USA: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.

SÁNCHEZ-BOTERO, J. I.; GARCEZ, D. S.; CHAVES CORTEZÃO, W. HISTÓRICO DO COMPRIMENTO TOTAL DE TAMBAQUI (*Colossoma macropomum*, CHARACIFORMES: CHARACIDAE, CUVIER, 1818) DESEMBARCADO NO MERCADO DE TEFÉ, AMAZONAS, BRASIL, COM NOVE RECOMENDAÇÕES PARA O MANEJO PESQUEIRO DA ESPÉCIE. **Uakari**, v. 2, n. 1, p. 27-33, 2006.

SANTOS, G.; SANTOS, A. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. **Estudos avançados**, v. 19, n. 54, p. 165-182, 2005.

SANTOS, M. C. F.; RUFFINO, M. L.; FARIAS, I. P. High levels of genetic variability and panmixia of the tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1816) in the main channel of the Amazon River. **Journal of Fish Biology**, v. 71, n. sa, p. 33-44, ago. 2007.

SANTOS, M. D. C. F.; HRBEK, T.; FARIAS, I. P. Microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminae, Characiformes), an economically important keystone species of the Amazon River floodplain. **Molecular ecology resources**, v. 9, n. 3, p. 874-6, maio 2009.

SCHMIDT, G. W. Primary production of phytoplankton in the three types of Amazonian waters. III. Primary productivity of phytoplankton in a tropical flood plain lake of Central Amazonia, Lago do Castanho, Amazonas, Brazil. **Amazoniana**, v. 4, p. 379-404, 1973.

SCHMITT, R. **Filogeografia de Hypopygus lepturus Hoedeman, 1962 (Gymnotiformes: Rhamphichthyidae) ao longo do médio rio Negro, Amazônia.** [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas, 2005.

SCHNEIDER, C. H. et al. Cryptic diversity in the mtDNA of the ornamental fish *Carnegiella strigata*. **Journal of fish biology**, v. 81, n. 4, p. 1210-24, set. 2012.

SEEB, J. E. et al. Single-nucleotide polymorphism (SNP) discovery and applications of SNP genotyping in nonmodel organisms. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 1-8, mar. 2011.

SIOLI, H. Studies in Amazonian waters. **Atas Simposio Biota Amazonica**, v. 3, p. 9-50, 1967.

SISTROM, M. J.; CHAO, N. L.; BEHEREGARAY, L. B. Population history of the Amazonian one-lined pencilfish based on intron DNA data. **Journal of Zoology**, v. 278, n. 4, p. 287-298, ago. 2009.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTI, G. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. **Molecular Ecology**, v. 10, n. 2, p. 407-417, fev. 2001.

SLATE, J. et al. Gene mapping in the wild with SNPs: guidelines and future directions. **Genetica**, v. 136, n. 1, p. 97-107, maio 2009.

SLATKIN, M. Gene Flow in Natural Populations. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 16, p. 393-430, 1985.

SMITH, M. J. et al. Multiplex preamplification PCR and microsatellite validation enables accurate single nucleotide polymorphism genotyping of historical fish scales. **Molecular Ecology Resources**, v. 11, p. 268-77, mar. 2011.

SOLOMON, S. E. et al. Paleodistributions and comparative molecular phylogeography of leafcutter ants (*Atta* spp.) provide new insight into the origins of Amazonian diversity. **PloS one**, v. 3, n. 7, p. e2738, jan. 2008.

SOUZA, E. R. D. E. **FILGEOGRAFIA DO GÊNERO NEOTROPICAL Fluviphylax (CYPRINODONTIFORMES : POECILIIDAE) DAS BACIAS DO AMAZONAS E ORINOCO.** [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA; Universidade Federal do Amazonas – UFAM, 2008.

SPRINGER, M. S. et al. Mitochondrial Versus Nuclear Gene Sequences in Deep-Level Mammalian Phylogeny Reconstruction. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 2, p. 132-143, 2001.

STALLARD, R.; KOEHNKEN, L.; JOHNSON, M. Weathering processes and the composition of inorganic material transported through the Orinoco River system, Venezuela and Colombia. **Geoderma**, v. 51, n. 1, p. 133-165, 1991.

STEARNS, S. **The evolution of life histories.** 1. ed. Oxford, UK: Oxford University Press., 1992. p. 247

- STEPHENS, M.; SMITH, N. J.; DONNELLY, P. A New Statistical Method for Haplotype Reconstruction from Population Data. **American Journal of Human Genetics**, v. 68, p. 978-989, 2001.
- STOLLE, E.; MORITZ, R. F. A. RESTseq--efficient benchtop population genomics with RESTriction Fragment SEQuencing. **PloS one**, v. 8, n. 5, p. e63960, jan. 2013.
- TAJIMA, F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, v. 123, n. 3, p. 585-595, 1 nov. 1989.
- TAPHORN, D. C. The Characiform Fishes of the Apure River Drainage, Venezuela. **Biollania special edition**, v. 4, p. 1-124, 2003.
- TAUTZ, D.; ELLEGREN, H.; WEIGEL, D. Next generation molecular ecology. **Molecular ecology**, v. 19 Suppl 1, p. 1-3, mar. 2010.
- TELLES, M. P. C. et al. Geographical genetics of *Pseudoplatystoma punctifer* (Castelnau, 1855) (Siluriformes, Pimelodidae) in the Amazon Basin. **Genetics and molecular research : GMR**, v. 13, n. 2, p. 3656-66, jan. 2014.
- TEMPLETON, A. R. The theory of speciation via the founder principle. **Genetics**, v. 94, n. 4, p. 1011-38, abr. 1980.
- TERENCIO, M. L.; SCHNEIDER, C. H.; PORTO, J. I. R. 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**, v. 81, n. 1, p. 110-24, jul. 2012.
- THOMAS, M. A; KLAPER, R. Genomics for the ecological toolbox. **Trends in ecology & evolution**, v. 19, n. 8, p. 439-45, ago. 2004.
- THOMPSON, A. W. et al. A time-calibrated, multi-locus phylogeny of piranhas and pacus (Characiformes: Serrasalminidae) and a comparison of species tree methods. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 81, p. 242-57, dez. 2014.
- THOMSON, R. C. et al. Developing markers for multilocus phylogenetics in non-model organisms: A test case with turtles. **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 49, n. 2, p. 514-25, nov. 2008.
- THOMSON, R. C.; WANG, I. J.; JOHNSON, J. R. Genome-enabled development of DNA markers for ecology, evolution and conservation. **Molecular ecology**, v. 19, n. 11, p. 2184-95, jun. 2010.
- TOFFOLI, D. **História evolutiva de espécies do gênero *Potamotrygon* Garman, 1877 (Potamotrygonidae) na Bacia Amazônica**. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) and Universidade Federal do Amazonas (UFAM), 2006.
- TOFFOLI, D. et al. A test of the utility of barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus *Potamotrygon* (Potamotrygonidae: Rajiformes). **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, p. 324-336, 2008.
- TOLLIS, M. et al. Multi-locus phylogeographic and population genetic analysis of *Anolis carolinensis*: historical demography of a genomic model species. **PloS one**, v. 7, n. 6, p. e38474, jan. 2012.

- TOONEN, R. J. et al. ezRAD: a simplified method for genomic genotyping in non-model organisms. **PeerJ**, v. 1, p. e203, jan. 2013.
- TURCQ, P.; BENEDETTI, M. **DINAMIQUE HYDROLOGIQUE ET GEOCHIMIQUE DU BASSIN AMAZONIEN: Rapport de la mission Negro Mai 2005 du Projet HYBAM. Campagne de mesures dans les Rios Negro , Jau et Curicuriari.** [s.l: s.n.].
- TURNER, T. F. et al. Phylogeography and intraspecific genetic variation of prochilodontid fishes endemic to rivers of northern South America. **Journal of Fish Biology**, v. 64, n. 1, p. 186-201, 2004.
- UGALDE, J. A. H.; URPÍ, J. M.; NUÑEZ, O. R. Diversidad genética y relaciones de parentesco de las poblaciones silvestres y cultivadas de pejibaye (*Bactris gasipaes*, Palmae), utilizando marcadores microsatelitales. **Revista de Biología Tropical**, v. 56, n. 1, p. 217-245, 2008.
- UNGERER, M. C.; JOHNSON, L. C.; HERMAN, M. A. Ecological genomics: understanding gene and genome function in the natural environment. **Heredity**, v. 100, n. 2, p. 178-83, fev. 2008.
- USMA, J. S. et al. Peces dulceacuícolas migratórios en Colombia. In: NARANJO, L. G.; AMAYA-ESPINEL, J. D. (Eds.). **Plan Nacional de las Especies Migratorias**. 1. ed. Bogotá, Colombia: Ministro de Ambiente, Vivienda y Desarrollo Territorial and World Wildlife Fund Colombia, 2009. p. 103-131.
- VIA, S. Natural selection in action during speciation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 1, p. 9939-9946, 2009.
- VIA, S.; WEST, J. The genetic mosaic suggests a new role for hitchhiking in ecological speciation. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 19, p. 4334-4345, 2008.
- VIGNAL, A. et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics, Selection, Evolution**, v. 34, p. 275-305, 2002.
- VOS, P. et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v. 23, n. 21, p. 4407-4414, 1995.
- VRIJENHOEK, R. C. Conservation genetics of freshwater fish. **Journal of Fish Biology**, v. 53, p. 394-412, dez. 1998.
- WAGNER, C. E. et al. Genome-wide RAD sequence data provide unprecedented resolution of species boundaries and relationships in the Lake Victoria cichlid adaptive radiation. **Molecular Ecology**, v. 22, n. 3, p. 787-98, fev. 2013.
- WALLACE, A. R. **A Narrative Of Travels On The Amazon And Rio Negro**. 1. ed. London: Ward, Lock and Co., 1853.
- WANG, Y.; NIELSEN, R. Estimating population divergence time and phylogeny from single-nucleotide polymorphisms data with outgroup ascertainment bias. **Molecular Ecology**, v. 21, n. 4, p. 974-86, fev. 2012.
- WAPLES, R. S. Pacific Salmon , *Oncorhynchus* spp ., and the Definition of “ Species ” Under the Endangered Species Act. **Marine Fisheries Review**, v. 53, n. 3, p. 11-22, 1991.

- WAPLES, R. S.; GAGGIOTTI, O. 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**, v. 15, n. 6, p. 1419-39, maio 2006.
- WEIR, B.; COCKERHAM, C. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, v. 38, n. 6, p. 1358-1370, 1984.
- WEITZMAN, S. H.; PALMER, L. Gasteropelecidae (Freshwater hatchetfishes). In: REIS, R. E.; KULLANDER, S. O.; FERRARIS, C. J. (Eds.). **Checklist of the Freshwater Fishes of South and Central America**. 1. ed. Porto Alegre, Brasil: Edipucrs, 2003. p. 101-103.
- WEITZMAN, S.; WEITZMAN, M. Biogeography and evolutionary diversification in Neotropical freshwater fishes, with comments on the refuge theory. In: PRANCE, G. T. (Ed.). **Biological diversification in the tropics**. 1. ed. New York, USA: Columbia University Press, 1982. p. 403-422.
- WELCOMME, R. **Fisheries ecology of floodplain rivers**. 1. ed. New York, USA: Longman Publishing Group, 1979.
- WELCOMME, R. River Fisheries. **FAO fisheries technical paper**, v. 262, p. 1-330, 1985.
- WERLE, E. et al. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. **Nucleic Acid Research**, v. 22, n. 20, p. 4354-4355, 1994.
- WESSELINGH, F.; HOORN, M. The stratigraphy and regional structure of Miocene deposits in western Amazonia (Peru, Colombia and Brazil), with implications for late Neogene landscape. **Scripta Geologica**, v. 133, p. 291-322, 2006.
- WEST-EBERHARD, M. J. PHENOTYPIC PLASTICITY AND THE ORIGINS OF DIVERSITY. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, n. 1989, p. 249-278, 1989.
- WHITLOCK, M. C. Fixation probability and time in subdivided populations. **Genetics**, v. 164, n. 2, p. 767-79, jun. 2003.
- WILLIS, S. C. et al. Systematics, biogeography, and evolution of the Neotropical peacock basses *Cichla* (Perciformes: Cichlidae). **Molecular phylogenetics and evolution**, v. 44, n. 1, p. 291-307, jul. 2007.
- WILLIS, S. C. et al. The Casiquiare river acts as a corridor between the Amazonas and Orinoco river basins: biogeographic analysis of the genus *Cichla*. **Molecular ecology**, v. 19, n. 5, p. 1014-30, mar. 2010.
- WINEMILLER, K. O. Seasonality of reproduction by liverbearing fishes in tropical rainforest streams. **Oecologia**, v. 95, n. 2, p. 266-276, 1993.
- WINEMILLER, K. O. et al. Fish assemblages of the Casiquiare River, a corridor and zoogeographical filter for dispersal between the Orinoco and Amazon basins. **Journal of Biogeography**, v. 35, n. 9, p. 1551-1563, set. 2008.
- WINEMILLER, K. O.; WILLIS, S. C. The Vaupes Arch and Casiquiare Canal: Barriers and Passages. In: ALBERT, J. S.; REIS, R. E. (Eds.). **Historical Biogeography of Neotropical Freshwater fishes**. 1. ed. Los Angeles: University of California Press, 2011. p. 225-242.

- YOU, F. M. et al. BatchPrimer3: A high throughput web application for PCR and sequencing primer design. **BMC bioinformatics**, v. 9, p. 253, 2008.
- ZARET, T. M.; RAND, A. S. Competition in Tropical Stream Fishes : Support for the Competitive Exclusion Principle. **Ecology**, v. 52, n. 2, p. 336-342, 1971.
- ZEISLER, R.; ARDIZZONE, G. **Las aguas continentales de America Latina**. 1. ed. Rome: COPESCAL-FAO, 1979.
- ZINK, R. M. Methods in comparative phylogeography, and their application to studying evolution in the north american aridlands. **Integrative and comparative biology**, v. 42, n. 5, p. 953-9, nov. 2002.
- ZUANON, J. **Aspectos da biologia, ecologia e pesca de grandes bagres (Pisces: Siluriformes, Siluroidei) na área da ilha da Marchantaria-Rio Solimões, AM**. [s.l.] Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia/Universidade Federal do Amazonas, 1990.

APÊNDICE 1

A. Lista de *barcodes* (*Molecular Identifiers* - MIDs) inseridos nos adaptadores “A” para a construção e posterior sequenciamento de bibliotecas genômicas em IonTorrent PGM.

aacctcattc	Cctactggtc	ttcgagacgc	ctgaccgaac
cctgagatac	Tctgcctgtc	tcgcaattac	tcctcgaatc
ttacaacctc	Cgatcggttc	acgagtgcgt	taggtggttc
aacctatccgc	Tcaggaatac	acgctcgaca	tctaaccggac
atccggaatc	Cctgggtgtc	agacgcactc	ttggagtgtc
tcgaccactc	Ttggcatctc	agcactgtag	tctagaggtc
cgaggttatc	Cttccataac	atcagacacg	tctggatgac
tccaagctgc	Ttggctggac	ctaaggtaac	atatcgcgag
tcttacacac	tccgacaagc	taaggagaac	cgtgtctcta
cgcatcgttc	cggacagatc	aagaggattc	ctcgcgtgtc
aggaatcgtc	Tctattcgtc	cagaaggaac	tagtatcagc
aacaatcggc	Aggcaattgc	ctgcaagttc	tctctatgcg
tccacttgc	Ttagtcggac	ttcgtgattc	tgatacgtct
agcacgaatc	tgccacgaac	ttccgataac	catagtagtg
ttcaattggc	Cagatccatc	tgagcggaac	cgagagatac

B. *Primers* para a amplificação de alta fidelidade durante o enriquecimento de livrarias genômicas para o sequenciamento em IonTorrent PGM.

Nome do primer	Sequência (5' – 3')
A_amp	CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGACTCAG
P1_amp	CCTCTCTATGGGCAGTCGGTGAT

APÊNDICE 2

Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações de pirapitinga (*Piaractus brachypomus*) das bacias do Orinoco e Amazonas (tempo de divergência relativo em mutações)

APÊNDICE 3

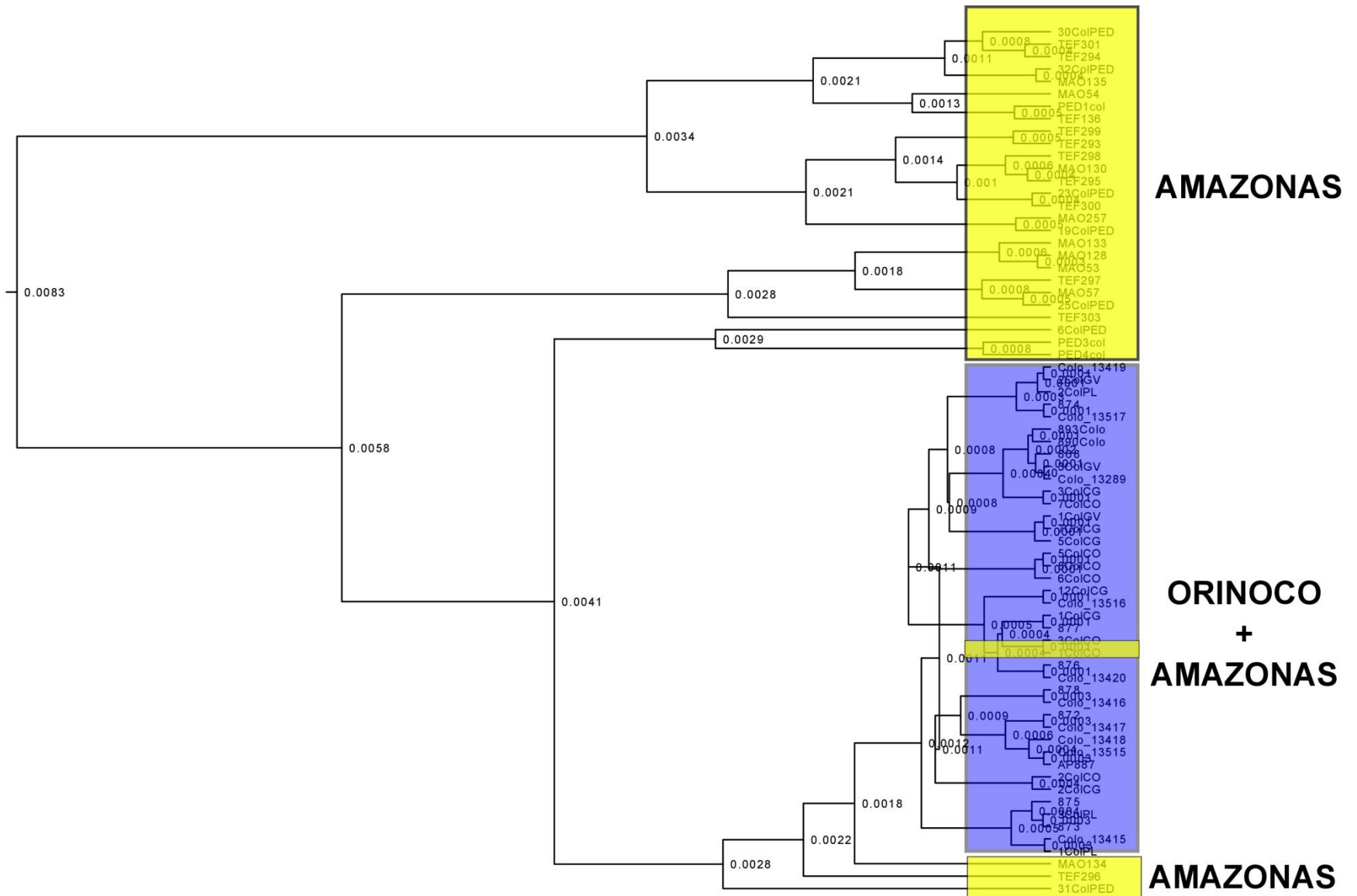
Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações de surubim (*Pseudoplatystoma orinocoense*/*Pseudoplatystoma punctifer*) das bacias do Orinoco e Amazonas sem incluir indivíduos híbridos do Rio Negro (tempo de divergência relativo em mutações)

APÊNDICE 4

Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações de dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*) das bacias do Orinoco e Amazonas (tempo de divergência relativa em mutações)

APÊNDICE 5

Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações de tambaqui (*Colossoma macropomum*) das bacias do Orinoco e Amazonas.

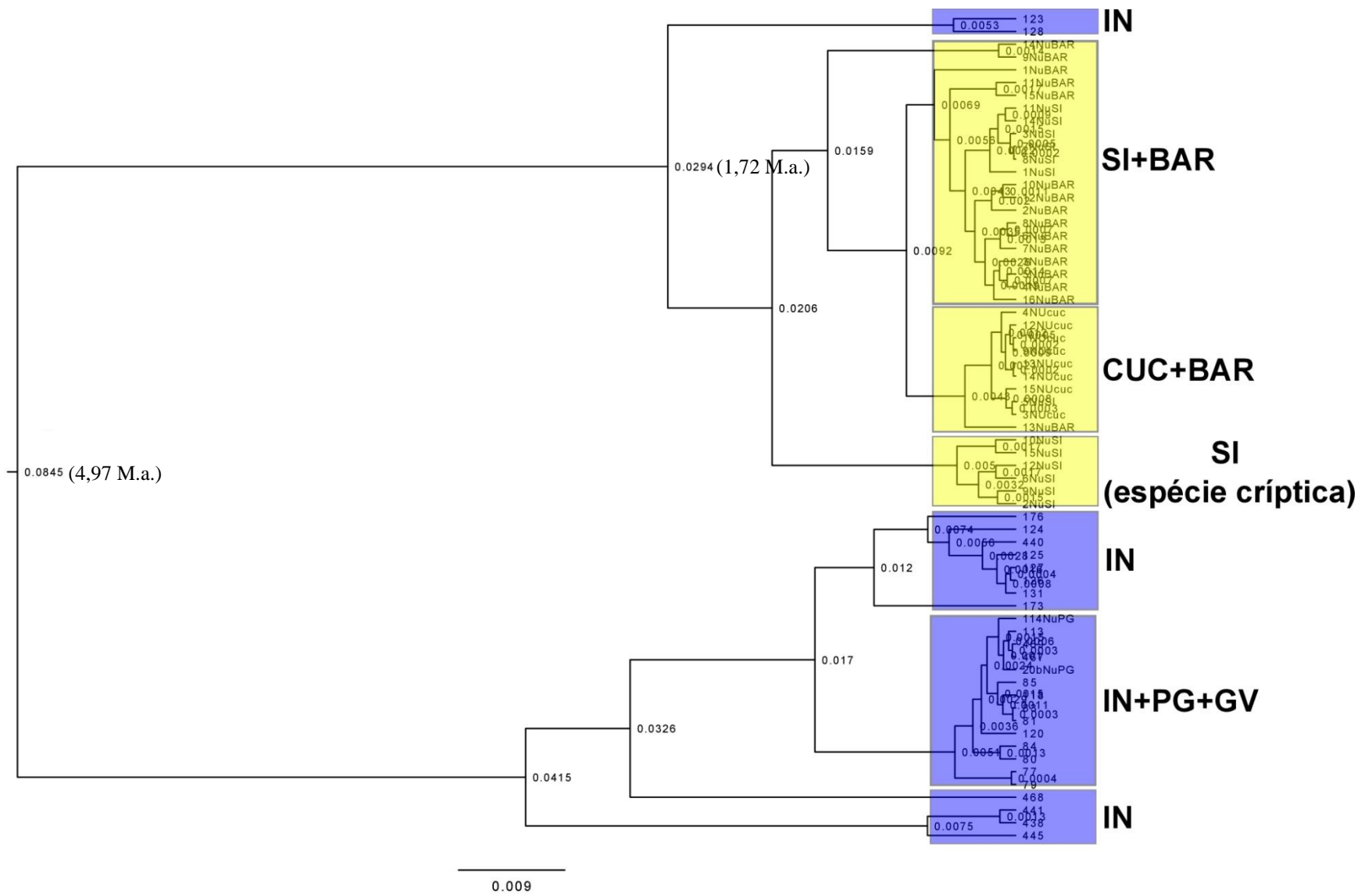


APÊNDICE 6

Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações de caparari (*Pseudoplatystoma metaense/Pseudoplatystoma tigrinum*) das bacias do Orinoco e Amazonas (tempo de divergência relativo em mutações)

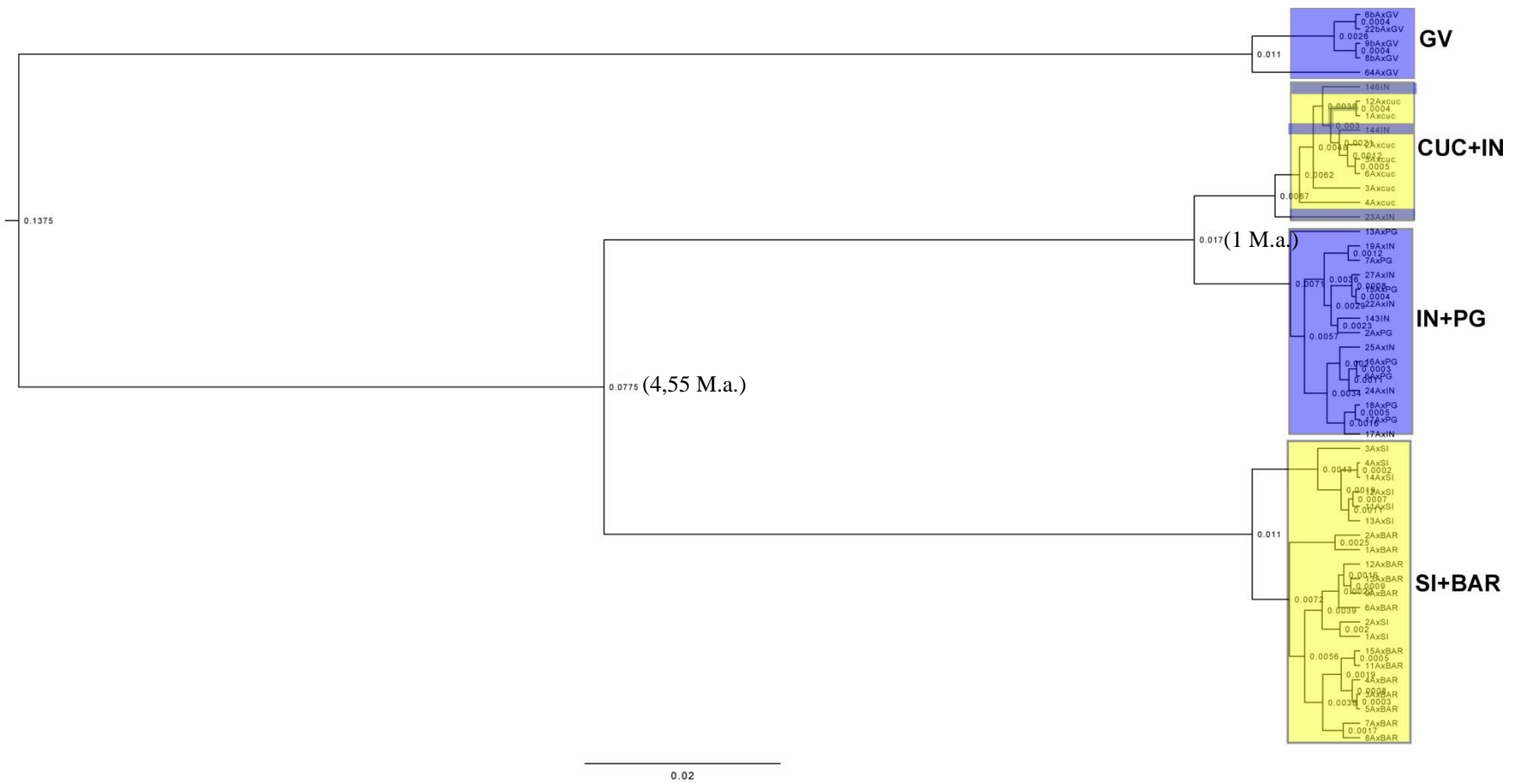
APÊNDICE 7

Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações do peixe lápis (*Nannostomus unifasciatus*) das bacias do Orinoco e Amazonas (tempo de divergência relativo em mutações)



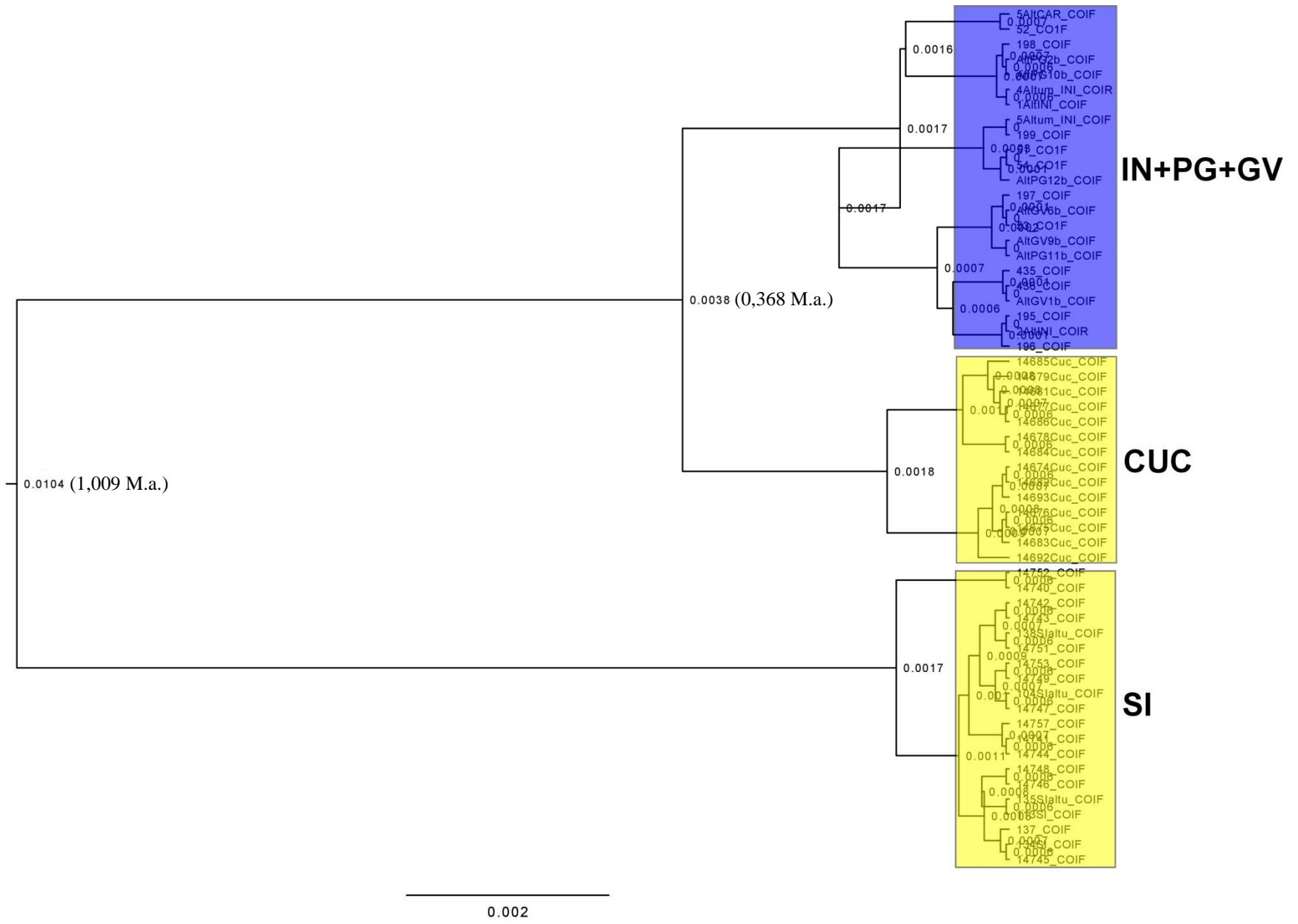
APÊNDICE 8

Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações de cardinal (*Paracheiroduon axelrodi*) das bacias do Orinoco e Amazonas (tempo de divergência relativo em mutações)



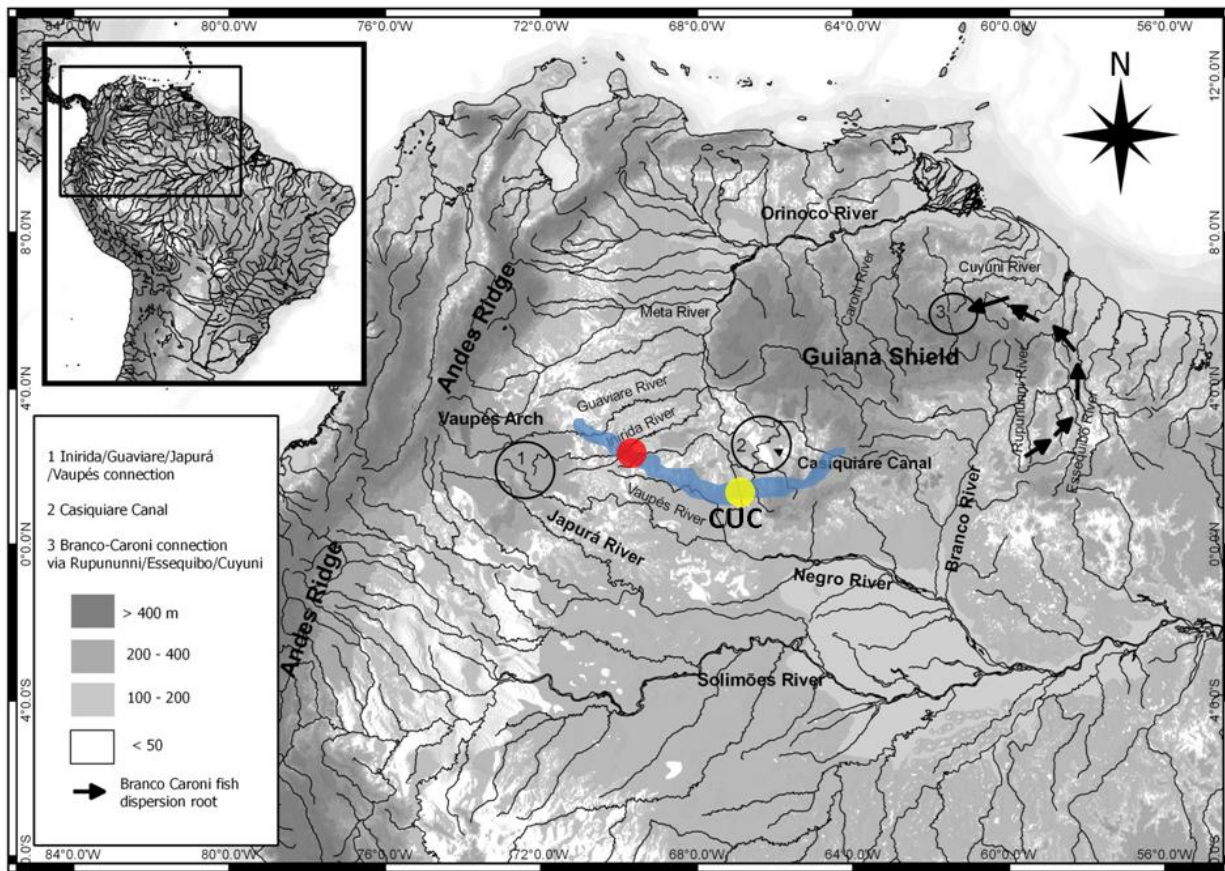
APÊNDICE 9

Análise de coalescência no programa BEAST utilizando o gene parcial de Citocromo oxidase I e Região controle para a determinação do tempo de divergência entre as populações de escalar (*Pterophyllum altum*) das bacias do Orinoco e Amazonas (tempo de divergência relativo em mutações)



APÊNDICE 10

Percurso provável no passado distante do Paleo rio Inírida-Negro e a localização hipotética do surgimento do ancestral comum mais recente das populações atuais de *Nannostomus unifasciatus*, *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum altum* dentro daquele Paleo rio.



Nota: O percurso do Paleo rio Inírida-Negro (~5 milhões de anos) era provavelmente em direção leste-oeste, nascendo no escudo (onde atualmente nasce o Orinoco), percorrendo a área atual de Cucui e médio rio Inírida, até desembocar nos vestígios do Paleo-Amazonas-Orinoco (Aguilera et al. 2012) ou em algum afluente deste sistema. Os círculos representam o local hipotético de surgimento de ancestral comum das populações atuais de *Nannostomus unifasciatus* (vermelho) e *Paracheirodon axelrodi* e *Pterophyllum altum* (amarelo).