INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA – PPG DIGEN

Os Botos da Bacia do Rio Madeira

Diversidade Genética, Hibridização e Conservação

Israela da Silva de Souza

Manaus – AM

Julho de 2017

ISRAELA DA SILVA DE SOUZA

Os Botos da Bacia do Rio Madeira: Diversidade Genética, Hibridização e Conservação

Orientadora: Dra. Waleska Gravena

Co-orientador: Dr. Tomas Hrbek

Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Apoio: Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL

Financiamento: Universal-CNPq; FAPEAM-FIXAM

Manaus – AM

Julho de 2017

"Confie em Jeová e faça o bem"

(Salmos 37:3)

FICHA CATALOGRÁFICA

©SEDAB/INPA - Ficha Catalográfica Automática gerada com dados fornecidos pelo(a) autor(a) Bibliotecário responsável: Jorge Luiz Cativo Alauzo - CRB11/908

S729b Souza, Israela da Silva de

Os botos da bacia do Rio Madeira: diversidade genética, hibridização e conservação / Israela da Silva de Souza; orientadora Waleska Gravena; coorientador Tomas Hrbek. -- Manaus:[s.l], 2017.

63 f.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) -- Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2017.

1. Biologia molecular. 2. Genética de populações.

3. Genética da conservação. I. Gravena, Waleska, orient. II. Hrbek, Tomas, coorient. III. Título.

CDD: 597.80415

SINOPSE: Utilizando a metodologia de sequenciamento de nova geração para analisar os padrões e processos evolutivos entre as populações de botos ao longo do rio Madeira. Foi reforçado que *Inia boliviensis* é geneticamente distinta de *I. geoffrensis*. Um fluxo gênico bidirecional foi observado, evidenciando a migração entre as duas espécies, mostrando que a hibridização é um evento natural entre cetáceos. Diante dos níveis de ameaças, planos de conservação para *I. boliviensis* e *I. geoffrensis*, estendidos aos híbridos descritos, considerando-os como entidades independentes, devem ser avaliadas por agências de conservação.

Palavras-chave: rio Madeira, botos da Amazônia, hibridização, SNPs, diversidade genética, migração.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Jeová, Deus. A Ele que com todo Seu amor, sempre me deu sabedoria, forças e perseverança para continuar nessa jornada acadêmica.

Aos meus pais, pilares de minha vida, foram de fundamental importância para que conseguisse continuar. Nem sempre entendendo o projeto, mas sempre apoiando e compreendendo qualquer alteração minha de humor, isolamento social e crises de desesperos. Sem vocês, eu literalmente não seria nada.

As minhas amadas irmãs (Scarllat, Railane e Brenda), eu sei o quanto sou chata, mas de alguma forma sempre nos entendemos no final, e é isso o que importa.

Aos meus orientadores.

Dra Waleska Gravena, meu Deus, como eu sou grata a você! Você tem sido muito mais que orientadora de mestrado, mas da vida! Uma amiga, irmã e confidente. Sou grata por toda a ajuda de todas as formas, pelos ensinamentos, horas de conversas, palavras de apoio, encorajamento, hospitalidade, e aos momentos de descontração. Sou grata principalmente por ter aceitado me orientar antes mesmo de ter entrado no programa, e ter abraçado a ideia quando a ideia nem era com botos. Meus eternos agradecimentos!

Dr Tomas Hrbek, obrigada por todo o auxílio com o banco de dados, interpretação dos resultados e o direcionamento nas questões biológicas. Sou grata também pela infinita paciência, sabedoria e ensinamentos, e por ter acreditado em mim, quando eu mesma já não acreditava. Por sempre saber que daria certo, ter visto beleza em números e resultados que para mim não faziam sentido algum.

Aos membros do LEGAL/LACA, Pedro Senna, Fabinho, Priscila, Robertinha, Luciana, Valéria, Juliana, Rommel, Enzio, Ingrid, bem como os agregados (ou será que nós é que éramos os agregados?), Francy, Érika, Naty, Natsumi e Leo, que tornaram os momentos de laboratório sempre uma grande alegria. Meus agradecimentos em especial, para Sandra com a ajuda na genômica e apoio, Jose Gregório pelo conforto e toda preocupação, ao Victor com a ajuda nos programas, e a Aline, pela paciência e aula de micros. Sou grata a todos vocês inclusive por toda a amizade, parcerias e preocupações mutuas.

À querida professora, Dra Izeni Pires Farias. Em primeiro, por ter me aceito em seu laboratório há muito tempo atrás, quando eu era apenas mais uma aluna de biologia e nem sabia se iria gostar da genética. Obrigada por toda a preocupação profissional e pessoal, desde os projetos de PIBIC que antecederam, e principalmente agora, no mestrado.

À Dina, que sempre se dispôs a ajudar, e na verdade me ajudou muito, principalmente na fase dos "testes e mais testes". Mas não somente a mim, como a todo o laboratório.

As minhas amigas Lívia, Camila, Jéssica Motta, Jessiquinha, Sarah, Paola e Sabrina. Amigas, sem vocês com toda a certeza do mundo isso teria sido mil vezes mais difícil! Eu gosto de todas vocês por tudo que cada uma representa na minha vida.

Aos órgãos de fomento, CNPq pela concessão de bolsa de estudo durante o mestrado. Ao Universal-CNPq e FAPEAM-FIXAM pelo financiamento do projeto.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia e Universidade Federal do Amazonas, por toda a infra-estrutura e oportunidade concedida. Por resumirem toda a minha vida acadêmica.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conversação e Biologia Evolutiva e a todos os professores do programa. Em especial, à coordenadora Gislene, sempre apoiando todos os alunos.

Aos colegas de turma, Genética 2015. Estendo ainda meus parabéns a todos que conseguiram concluir mais esta etapa. Parabéns e boa sorte a todos nós!

A todos que se preocuparam, torceram e de alguma forma colaboraram com este projeto. Tenho certeza que tenho muito agradecer, por isso espero que todos recebam meus sinceros "muito obrigada".

Por último, mas nem de longe o menos importante, ao Mário Nunes. Meu amor, nem tenho palavras para descrever o quanto sou grata a você! Com o fim do mestrado, você conseguiu me surpreender com tamanha paciência e amor. À você sou eternamente grata.

RESUMO

Na Amazônia os golfinhos do gênero *Inia*, popularmente conhecidos como botos são exclusivos dos rios de água doce. Devido à perda e degradação de seu habitat, poluição, competição por recursos naturais e fragmentação das populações causadas pelas construções de barragens, estão entre os cetáceos mais ameaçados. Dentro do gênero existem ainda discordâncias em relação ao número de espécies e subespécies, e para IUCN a espécie *Inia geoffrensis* está classificada como ameaçada de extinção. Considerando a necessidade de utilizar outros marcadores moleculares para complementar os resultados de Gravena e colaboradores, o presente trabalho utilizou a metodologia de sequenciamento de nova geração para avaliação dos padrões e processos que poderiam estar atuando nas mudanças evolutivas das populações de botos que ocorrem ao longo da bacia rio Madeira, além de novas respostas para as questões populacionais, fornecendo subsídios para conservação. Os resultados encontrados mostram que *Inia boliviensis* é geneticamente distinta de *I. geoffrensis*. No entanto, fluxo gênico bidirecional foi observado e evidencia a migração entre as duas espécies, como resultado, a hibridização torna-se um evento natural assim como outros casos documentados de híbridos entre cetáceos. A descontinuidade biológica pode ser então explicada pelo modelo de isolamento por distância, em que o contato apenas na zona de hibridização permite que as espécies nas áreas adjacentes mantenham suas histórias de vida independentes. Devido, as construções das UHE Jirau e Santo Antônio, na região de corredeiras no rio Madeira, essas populações foram isoladas, mas ainda que essas populações já tenham histórias evolutivas distintas, o isolamento entre as populações pode aumentar o nível de endogamia, principalmente entre os indivíduos que permaneceram restritos aos reservatórios formados com as construções. Adicionalmente evidenciamos uma redução do tamanho efetivo populacional, sugerindo um sinal que as populações tenham passado por gargalos populacionais como consequências da fragmentação e degradação contínua de habitat e diminuição dos recursos naturais. Diante dos níveis de ameaças, planos de conservação para *I. boliviensis* e *I. geoffrensis*, estendidos aos híbridos descritos, considerando-os como entidades independentes, devem ser avaliadas por agências de conservação.

Palavras-chave: rio Madeira, botos, hibridização, SNPs, diversidade genética, migração.

ABSTRACT

In the Amazon, dolphins of the genus *Inia*, popularly known as boto, are exclusive to freshwater rivers. Due to the loss and degradation of their habitat, competition for natural resources and fragmentation of populations caused by the construction of dams, they are among the most threatened cetaceans. Within the genus there are still divergences in the number of species and subspecies, and for IUCN the species *Inia geoffrensis* is classified as endangered. Considering the need to use other molecular markers to complement the data of Gravena and collaborators, the present study uses new generation sequencing methodology to evaluate the patterns and processes that may be acting on the evolutionary changes in the river dolphins populations that occur along the Madeira River basin. As well as, new responses to questions regarding these populations, providing subsidies for conservation. Our results show that *Inia boliviensis* is genetically distinct from *I. geoffrensis*. However, bidirectional gene flow was observed and evidences the migration between the two species, as a result, a hybridization becomes a natural event, as well as other documented cases of hybrids between cetaceans. The biological discontinuity between species can be explained by the isolation by distance model, in which contact are only observed in the hybridization zone, allowing species in adjacent areas to maintain their independent evolutionary histories. Due to the construction of HPP Jirau and Santo Antônio, in the Madeira River rapids, these populations were isolated, but although these populations already have different evolutionary histories, isolation between populations can increase the level of inbreeding, especially among individuals that were restricted in the reservoirs formed with the constructions. In addition, we observed a reduction in the effective population size, suggesting that populations experienced previous population bottlenecks, probably because of fragmentation, continuous degradation of habitat and a decrease in natural resources. In view of the threat levels, conservation plans to *I. boliviensis* and *I. geoffrensis*, extended to hybrids, considering them as independent entities, must be evaluated by the conservation agencies.

Keywords: Madeira River, botos, hybridization, SNPs, genetic diversity, migration.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS **1**

LISTA DE FIGURAS **2**

1 Introdução **5**

1.1 O gênero *Inia* e sua distribuição geográfica 5

1.2 Populações no rio Madeira 8

2 Justificativa **9**

3 Objetivos **10**

3.1 Objetivo Geral 10

3.2 Objetivos Específicos 11

4 Material e Métodos **11**

4.1 Área de estudo 11

4.2 Delineamento amostral 12

4.3 Marcador molecular 14

4.4 Preparação da biblioteca genômica 15

4.5 Amplificação da biblioteca 18

4.6 Sequenciamento de Nova Geração 18

4.7 Análises dos dados 19

4.7.1 Edição dos dados 19

4.7.2 Estrutura populacional 20

4.7.3 Parâmetros genéticos 21

4.7.4 Parâmetros demográficos 21

4.7.5 Reconstrução das relações filogenéticas 22

5 Resultados **22**

5.1 Estrutura populacional 23

5.2 Parâmetros genéticos e árvore filogenética 26

5.3 Parâmetros demográficos 27

5.3.1 Taxa de migração 31

6 Discussão **32**

6.1 Evidências genéticas de *Inia boliviensis* 33

6.2 Migração 35

6.3 Estrutura populacional 37

6.4 Dinâmica populacional e hibridização 39
6.4.1 Estimativas populacionais 41
6.5 Conservação 43
7 Conclusões 46
8 Referências 47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores da média das probabilidades posteriores, desvio padrão e delta *K*. Foram testados até seis agrupamentos, em negrito está o agrupamento com melhor probabilidade e maior número de delta *K*

Tabela 2: Valores da média das probabilidades posteriores, desvio padrão e delta *K*. Foram testados até seis agrupamentos nas duas corridas adicionais. Em negrito, as médias de melhor probabilidade de K e o maior de delta K

Tabela 3: AMOVA. Valores de F_{ST} de cada população (diagonal abaixo) e fluxo gênico (N*m*) (diagonal acima) obtido com os dados de NGS**.** Na população *Abaixo* é considerada todos os indivíduos de *I. geoffrensis*

Tabela 4: Probabilidades dos modelos genealógicos. Três cenários evolutivos foram testados na análise G-PhoCs. Cada cenário foi testado com e sem a migração. Para determinar que um cenário seja o melhor modelo genealógico foi utilizado o valor de probabilidade posterior mais próximo de um número real. Em amarelo, destaca o modelo de melhor probabilidade e assumindo a migração entre as populações

Tabela 5: Parâmetros demográficos. Tamanho efetivo populacional, tempos de divergências e intervalos de confiança estimados pelo G-PhoCS. Para conversão de tempo de divergência absoluta (em anos), e tamanho efetivo populacional (em números de indivíduos) foi assumido o tempo de divergência genômica entre os botos da Bolívia e Amazonas de 2,8 milhões de anos, e tempo de geração de 10 anos

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Exemplar de *Inia geoffrensis*. Exemplar encontrado no rio Negro, município Ariaú – AM

Figura 2: Mapa da distribuição das espécies e subespécies descritas para o gênero *Inia*. Em azul, na bacia do rio Araguaia-Tocantins, *I. araguaiaensis*. As duas subespécies de *Inia geoffrensis*, em verde, ocorrendo por toda bacia do rio Amazonas e Orinoco. Em rosa, *I. boliviensis*, na Bolívia e rio Madeira. As barras no rio Madeira representam a série de corredeiras na região, a barra única no rio Tucuruí representa a barragem Tucuruí

Figura 3: Distribuição das localidades. As duas barras em preto indicam as duas maiores corredeiras da bacia do rio Madeira, Teotônio e Jirau. Os pontos de coletas estão destacados em 27 localidades, rio Guaporé: 1. Baía Grande, 2. Contra Fiado, 3. Porto França, 4. Porto Acre, 5. Boca do rio Cautário; rio Mamoré: 6. Boca do lago Mercedes, 7. Surpresa, 8. Pakaás, rio Abunã: 9. Fortaleza do Abunã; rio Madeira: 10. Tamborete, 11. Jirau, 12. Ilha do Búfalo, 13. Abaixo de Teotônio, 14. Ensecadeira de Santo Antônio, 15. Porto Velho, 16. Belmonte, 17. São Carlos, 18. Mirari, 19. Três Casas, 20. Paracanatuba, 21. Lago Acará, 22. Liberdade, 23. Paraná do Uruá, 24. Aripuanã, 25. Guajará, 26. Lago Canumã e 27. Boca. Em azul e verde estão indicadas as duas unidades de manejo de *I. boliviensis*. A cor laranja são as localidades dos indivíduos híbridos. Os pontos em cor rosa indicam indivíduos puros de *I. geoffrensis*, sendo que na localidade 25 foram encontrados híbridos e indivíduos de *I. geoffrensis*, por isso está mostrado nas duas cores

Figura 4: Distribuição das localidades amostradas. Localidades de 1 a 7 representam as amostras da sub-bacia do rio Madeira. Localidades 8 e 9 são amostras do Paraná do Mamurí/lago Mamurí, próximo a Manaus e canal do Ariau, no rio Negro, respectivamente. No rio Solimões, localidade 10, representa a Reserva Sustentável de Mamirauá. Por fim, localidades 11 e 12 são amostras do rio Putumayo, cedida pelo Instituto von Humboldt na Colômbia, e rio Ucayali, no Peru. As duas barras no alto rio Madeira representam as duas UHE de Jirau e Santo Antônio construídas na região das corredeiras

Figura 5: Digestão e ligação dos adaptadores. As enzimas de restrição SdaI e Csp6 fragmentam o DNA em sítios de reconhecimentos específicos. Os adaptadores A e P1 são ligados nas extremidades dos fragmentos. Cada adaptador é composto pelos sítios de reconhecimento das enzimas (vermelho) e sítio de anelamento aos *primers forward* e *reverse* da PCR teste da ligação e sequenciamento (amarelo e azul). No adaptador A existe ainda a sequência *barcode* (laranja), exclusiva para cada amostra, e o *linker* (verde)

Figura 6: Gráfico das probabilidades (L(K)) de agrupamentos testados. Na horizontal, os números de grupos biológicos - *K*, testados nas 10 réplicas. Na vertical a média das probabilidades posteriores Ln(P) dos dados

Figura 7: Gráficos de ancestralidade. A) gráfico de ancestralidade na composição de cada indivíduo. B) gráfico de ancestralidade que compõe cada população. Nomes das populações a qual cada indivíduo pertence abaixo. *Acima* e *Entre corredeiras* são *I. boliviensis*. *Híbridos* e *Abaixo* são as amostras de *I. geoffrensis*

Figura 8: Árvore filogenética. Reconstrução filogenética inferida pelo método de máxima verossimilhança, gerada no programa *online IQ-Tree* (Nguyen *et al.*, 2015). Valores menores que 60% de suporte não amostrado. Legenda: *Acima* – Lago Mercedes (MCD), Porto França (FRC); *Entre corredeiras* – Ilha do Búfalo (BUF), Abaixo de Jirau (JIR); *Híbridos* – Enseada Paracanatuba (PCT), Igarapé Liberdade (LBD); *Abaixo* – Boca do Madeira (BCA)

Figura 9: Modelos genealógicos testados na inferência demográfica. As filogenias populacionais foram assumidas com genoma diplóide por população. Os parâmetros assumidos incluíram quatro tempos de divergência (τ) e nove tamanhos efetivo populacional (θ), todos expressados em unidade mutacional esperada por sítio. Para a obtenção de tempo de divergência absoluta (em anos), e tamanho efetivo populacional (em números de indivíduos) foi assumido o tempo de divergência genômica entre os botos da Bolívia e Amazonas de 2,8 milhões de anos, e tempo de geração de 10 anos

Figura 10: Representação esquemática de migração. Estimativa da proporção de indivíduos que chegaram por migração em uma população alvo. As setas indicam as direções do fluxo gênico inferidos na análise. A) migração entre as populações do rio

Madeira. B) migração entre os dois clados assumidos: Bolívia para *I. boliviensis* e Amazonas para *I. geoffrensis*

1 Introdução

Na Amazônia são descritos dois gêneros de cetáceos (*Sotalia* e *Inia*) popularmente conhecidos como tucuxis e botos. As espécies do gênero *Inia*, assim como *Sotalia fluviatilis*, são exclusivas de rios de água doce (BEST; DA SILVA, 1993; VIDAL, 1993), e devido a perda e degradação de seus habitats, poluição, competição por recursos naturais e fragmentação das populações causadas pelas construções de barragens (REEVES et al., 2003), estão entre os cetáceos mais ameaçados (REEVES; LEATHERWOOD, 1994; VIDAL et al., 1997).

Dentro do gênero *Inia* (D'ORBIGNY, 1834) existe ainda discordâncias em relação ao número de espécies e subespécies. Para *International Union for Conservation of Nature* (IUCN) a espécie *Inia geoffrensis* até 2017 era classificada como dados insuficientes (*Data Deficient* – DD) (IUCN, 2017).

Por essas razões, a lista vermelha de espécies ameaçadas (*The IUCN Red Listof Threatened Species*), bem como do Plano de Ação dos Mamíferos do Brasil, recomendam mais estudos sobre os parâmetros populacionais dos botos na Amazônia, usando diferentes métodos e principalmente sobre toda sua área de distribuição (IUCN, 2017; IBAMA, 2001). Sendo assim, o enfoque deste trabalho limita-se às espécies de *Inia* e as questões populacionais dos botos no rio Madeira, como complemento ao trabalho de (GRAVENA, 2013).

1.1 O gênero *Inia* e sua distribuição geográfica

Considerado os maiores golfinhos de rio e com significativo dimorfismo sexual, machos podem atingir 2,55m e alcançar 200 kg, as fêmeas são menores e podem atingir 2,25m e 155 kg (MARTIN; DA SILVA, 2006). Quanto ao comportamento social, possuem hábito solitário, sendo mais comum observarmos pares de mãe e filhote (DA SILVA, 2011), e eventuais agregações com mais de três indivíduos em áreas de descanso, alimentação e acasalamento (BEST; SILVA, 1989; DA SILVA; MARTIN, 2018). Possuem coloração corporal variando do cinza-escuro ao rosado (ou vermelho) que é dependente da idade e sexo do animal (MARTIN; DA SILVA, 2006) (Figura 1).

Figura 3: Exemplar de *Inia geoffrensis*. Exemplar encontrado no rio Negro, município Ariaú – AM (Fonte: Israela de Souza).

O gênero *Inia* (D'ORBIGNY, 1834) pertence à ordem Cetacea, subordem Odontoceti, superfamília Platanistoidea e família Iniidae (DA SILVA; MARTIN, 2014; RICE, 1998). Dentro do gênero existem discordâncias em relação ao número de espécies e subespécies, por isso será adotada a classificação utilizada pelos autores (DA SILVA, 1997; HAMILTON et al., 2001; HRBEK et al., 2014; PILLERI; GIHR, 1977). De acordo com esses autores *Inia* é representado pelas espécies *Inia araguaiaensis* (HRBEK et al., 2014); *Inia boliviensis* (D'ORBIGNY, 1834); e *Inia geoffrensis* (BLAINVILLE, 1817) dividida ainda em duas subespécies *Inia geoffrensis geoffrensis* (BLAINVILLE, 1817) e *Inia geoffrensis humboldtiana* (PILLERI E GIHR, 1977).

Quanto à distribuição das espécies do gênero, *I. araguaiaensis* ocorre na região central do Brasil, na bacia do rio Araguaia-Tocantins (Figura 2). (HRBEK et al., 2014) registraram *I. araguaiaensis* no rio Araguaia de Barra do Garças até as corredeiras de Santa Isabel e em vários afluentes nos estados de Goiás e lago Montaria no estado de Mato Grosso. No rio Tocantins, ultrapassando a hidrelétrica Tucuruí até a Ilha de Marajó, estado do Pará (SICILIANO et al., 2016).

Inia geoffrensis geoffrensis distribui-se ao longo dos rios do sistema Amazônico, ocorrendo nos principais afluentes dos rios Solimões, Branco, Negro e Madeira. Também pode ocorrer no rio Tapajós, abaixo das corredeiras de São Luís do Tapajós (Pilleri e (BEST; DA SILVA, 1993; DA SILVA, 2009; GRAVENA et al., 2014; PILLERI; GIHR, 1977). A subespécie *I. g. humboldtiana* ocorre na região média e baixa da bacia do rio Orinoco, incluindo o principal canal do rio Orinoco e seus

tributários (DA SILVA; BEST, 1994; FARIAS, 2015; PILLERI; GIHR, 1977). Ao contrário do que se imaginava, que o canal Cassiquiare era a principal conexão entre as duas subespécies das bacias dos rios Amazonas e Orinoco (HRBEK et al., 2014), Farias (2015) observou pouca conectividade entre os botos do Orinoco e alto rio Negro. A distribuição das duas subespécies está ilustrada também na figura 2.

A espécie *I. boliviensis* no entanto, tinha distribuição descrita como sendo restrita a região da Bolívia, nos rios Iténez-Guaporé, Abunã, Mamoré e a porção alta do rio Madeira fazendo fronteira com Brasil (ALIAGA-ROSSEL, 2003; DA SILVA, 1994; PILLERI; GIHR, 1977). Na Bolívia é encontrado nos rios distribuídos nos Estados de Cochabamba, Santa Cruz, Beni e Pando (ALIAGA-ROSSEL, 2003) (Figura 2).

Figura 4: Mapa da distribuição das espécies e subespécies descritas para o gênero *Inia*. Em azul, na bacia do rio Araguaia-Tocantins, *I. araguaiaensis*. As duas subespécies de *Inia geoffrensis*, em verde, ocorrendo por toda bacia do rio Amazonas e Orinoco. Em rosa, *I. boliviensis*, na Bolívia e rio Madeira. As barras no rio Madeira representam a série de corredeiras na região, a barra única no rio Tucuruí representa a barragem Tucuruí (Fonte: modificado de HRBEK et al., 2014).

Na fronteira com o Brasil ocorrem na sub-bacia do rio Iténez, nos rios Paraguá, Pauserna, Verde, Blanco, San Luis, San Martín (YAÑES, 1999), Santa Rosa, Machupo e demais tributários (ANDERSON, 1997). Na sub-bacia do rio Mamoré, em que eram descritos como ocorrendo somente do rio Ichilo até o município de Guajará-Mirim, no rio Beni (ALIAGA-ROSSEL, 2003). Nesta porção, entre os municípios de Guajará-Mirim e Porto Velho, existiam uma sequência de 18 corredeiras e cachoeiras (CELLA-RIBEIRO et al., 2013). Por isso, para muitos autores essas corredeiras eram consideradas como barreiras geográficas de *I. boliviensis*, que restringia sua dispersão para a bacia Amazônica pelo rio Madeira (ALIAGA-ROSSEL, 2003; BANGUERA-HINESTROZA et al., 2002; CASINOS; OCAÑA, 1979; CELLA-RIBEIRO et al., 2013; GRABERT, 1984; HAMILTON et al., 2001; PILLERI; GIHR, 1977).

No entanto, Gravena et al. (2014a) investigando se as corredeiras do rio Madeira exerciam de fato uma barreira geográfica para os botos, relataram que *I. boliviensis* não possui distribuição exclusiva nos rios da Bolívia. Estes ultrapassam 870 km além das corredeiras até próximo ao município de Borba (AM) (como mostrado na figura 2), e que, portanto, *Inia boliviensis* não está restrita a sub-bacia da Bolívia e nem somente a montante da cachoeira Teotônio, sua distribuição se estende por boa parte do rio Madeira, no Brasil.

1.2 Populações no rio Madeira

Gravena et al. (2014a e 2015) analisaram geneticamente as duas espécies de botos no rio Madeira, a fim de investigar a real barreira geográfica entre as populações. Desta forma, utilizaram dois tipos de marcadores moleculares (DNA mitocondrial e nuclear), em que foram sequenciadas três porções do DNA mitocondrial (Região controle – RC; Citocromo *b* – Cyt*b*; Citocromo *c* oxidase I – COI) e dez locos de microssatélites (DNA nuclear).

Os resultados do DNA mitocondrial identificaram que os botos abaixo da cachoeira Teotônio até o município de Borba, já próximo a foz do rio Madeira, como sendo *I. boliviensis* (GRAVENA et al., 2014a). Os dados de microssatélites, por outro lado, revelaram que a maioria dos botos abaixo da cachoeira Teotônio tinha genoma nuclear pertencente a *I. geoffrensis*. Assim, Gravena et al. (2015) concluíram que abaixo da cachoeira Teotônio até o município de Borba (AM), trata-se de uma zona híbrida

entre as espécies. Uma vez que os botos desta zona possuem genoma nuclear pertencente à *Inia geoffrensis* e genoma mitocondrial de *Inia boliviensis*.

Adicionalmente, foi verificado que na região das corredeiras existia uma subestruturação genética, indicando que dentro de *I. boliviensis* existiam duas populações que não eram recipocramente monofiléticas mas divergiam nas frequências dos alelos nucleares (GRAVENA et al., 2015), sendo assim, populações com essas características são importantes para propostas de conservação, e podem ser divididas em duas unidades de manejo distintas (MORITZ, 1994).

Contudo, nas análises genéticas de Gravena et al. (2014a e 2015) não foi possível estimar a idade de contato entre os dois táxons, mesmo usando marcadores mitocondriais e nucleares. Geralmente em estudos com híbridos a origem das espécies ou populações parentais é mais delicada, e por isso faz-se sempre necessário o uso de um número maior de marcadores, de preferência de herança materna, paterna e/ou bi-parental (FREELAND, 2005). Gravena et al. (2014a e 2015) conscientes da necessidade do uso de mais marcadores para as questões dos híbridos no rio Madeira, inclusive sobre a questão de *I. boliviensis* ainda não ser reconhecida como espécie, sugerem estudos utilizando marcadores genômicos capazes de avaliar os padrões e processos que podem estar atuando nas mudanças evolutivas dessas populações.

2 Justificativa

A viabilidade das populações de botos na bacia do rio Madeira ainda é incerta, principalmente porque para investigar a diversidade genética de uma população depende do tipo de marcador molecular utilizado no estudo. Cada marcador pode, por sua vez, ter diferentes respostas frente às modificações ambientais, como por exemplo, as usinas hidrelétricas (UHE) construídas na região das corredeiras.

Gravena et al. (2014b) após os estudos na região das corredeiras assumem que as populações de botos nessa área estão totalmente comprometidas por ações antrópicas. Tanto a população que está restrita ao reservatório da UHE Santo Antônio quanto às populações a montante da UHE Jirau, que atualmente se encontram em contato com outra unidade de manejo, e que possivelmente pode vir a desaparecer em algumas gerações.

Na última década, as técnicas moleculares têm fornecido ferramentas importantes para estudos de estrutura populacional, para populações exploradas comercialmente ou ameaçadas de extinção, na resolução de incertezas taxonômicas e delineamento de unidades de manejo, surgindo então à área da Genética da Conservação (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008). Nesta área os dados genéticos são obtidos a partir do sequenciamento de marcadores moleculares, e a escolha desses marcadores é dependente das questões que se querem responder (FREELAND, 2005).

Atualmente uma tecnologia de sequenciamento de alto rendimento tem ganhado o mercado das pesquisas científicas básica, aplicada e clínica, o Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing* – NGS) (METZKER, 2010). O NGS tem sido utilizado principalmente para o sequenciamento de grandes genomas e projetos de resequenciamento utilizando novos marcadores, como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), na detecção da diversidade genética de espécies, construção de mapas de haplótipos e em estudos com genomas completos (ELSHIRE et al., 2011). A principal vantagem no uso do NGS é sua habilidade de produzir uma enorme quantidade de dados por corrida, tornando uma tecnologia com maior custo/beneficio (METZKER, 2010).

Portanto, considerando a necessidade de utilizar diversos marcadores moleculares para complementar os resultados de Gravena et al. (2014a e 2015), além de buscar novas respostas para as questões populacionais dos botos, o uso de um marcador genômico permitirá caracterizar a variação genética para as diferentes populações de boto que ocorrem ao longo da bacia do rio Madeira e ajudar a fornecer subsídios para conservação.

3 Objetivos

3.1 Objetivo Geral

Investigar a diversidade genética das populações de boto (*Inia* spp.) que habitam a bacia do rio Madeira, utilizando marcadores genômicos, como os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), a partir da biblioteca genômica gerada pela digestão de duas enzimas associadas a sítio restrição (*Double Digest RAD Sequencing – ddRADseq*).

3.2 Objetivos Específicos

- Sequenciar uma biblioteca genômica, obtida pela metodologia de *ddRADseq*, de indivíduos representantes das diferentes populações de botos ao longo da bacia do rio Madeira por meio de NGS.

- Buscar por alelos exclusivos na população de híbridos do rio Madeira.

- Verificar se na zona híbrida os indivíduos possui maior ou menor diversidade genética que as espécies parentais (*Inia boliviensis* e *Inia geoffrensis*).

- Estimar o número de populações de botos encontrados no rio Madeira.

- Estimar o tempo de divergência, o tamanho efetivo populacional e o fluxo gênico entre as principais populações de botos no rio Madeira.

- Comparar a diversidade genética das populações de botos do rio Madeira com os dados de microssatélites obtidos por Gravena et al. (2015).

- Fornecer dados da composição genética das populações de botos para futuros planos de conservação.

4 Material e Métodos

4.1 Área de estudo

O rio Madeira é um dos principais rios apontados como barreira geográfica e a delimitar áreas de endemismo na Amazônia (CAPPARELLA, 1987; COHN-HAFT, 2000; CRACRAFT; PRUM, 1988; HAFFER, 1997). Ocupando vinte por cento da Bacia Amazônica, possui cerca de 1400 km de extensão em território brasileiro (GOULDING; BARTHEM; FERREIRA, 2003).

A bacia do rio Madeira é formada pela confluência de quatro grandes rios, Guaporé, Mamoré, Beni e Madre de Dios (BOURREL; PHILLIPS; MOREAU, 2009; GOULDING; BARTHEM; FERREIRA, 2003). Seu curso está dividido nos trechos: alto rio Madeira, composto pelos rios Mamoré, Beni e trecho de corredeiras, que inicia à jusante da cidade de Guajará-Mirim (RO) e termina na cachoeira Santo Antônio; e baixo rio Madeira, a montante da cachoeira Santo Antônio até sua foz no rio Amazonas.

Brasil e Bolívia compartilham cerca de 1000 km de suas águas ao longo dos rios Mamoré e Guaporé-Iténez (GOULDING; BARTHEM; FERREIRA, 2003).

O rio Mamoré é apontado como o quarto maior tributário da bacia Amazônica, nasce da confluência do rio Chapare e do rio Mamorecillo na Bolívia (GOULDING; BARTHEM; FERREIRA, 2003). Seu curso tem aproximadamente 2000 km de extensão e com o rio Beni forma o rio Madeira no município de Nova Mamoré (RO). Dentre os afluentes do rio Mamoré o rio Guaporé destaca-se pela sua riquíssima biodiversidade e é muito procurado para a prática de pesca esportiva. O rio Guaporé tem extensão de aproximadamente 1400 km e compartilham seu curso nos estados de Mato Grosso e Rondônia no Brasil.

Os indivíduos amostrados no presente trabalho foram coletados em seis expedições para captura de botos durante os anos de 2007 a 2011. Representam 27 localidades ao longo dos rios Guaporé, Mamoré e Madeira (Figura 3), totalizando 160 (cento e sessenta) amostras coletadas.

O protocolo para o manuseio e remoção de pequenas quantidades de amostras de tecidos cutâneos a partir de animais vivos foi devidamente aprovado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) (protocolo 01/2013) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e pelo IBAMA / ICMBIO No. 11325-1 e No. 13462-1.

4.2 Delineamento amostral

Considerando a metodologia de sequenciamento utilizada neste trabalho, a quantidade de indivíduos a serem sequenciados precisou ser limitada. Desta forma, das 160 amostras coletadas na bacia rio Madeira, uma subamostragem foi representada no NGS.

Nossa subamostragem contém quatro indivíduos puros de *I. boliviensis*, acima das corredeiras (localidades: 1 e 2) e os restritos a região das corredeiras, entre Abunã e cachoeira Teotônio (localidades 3 e 4). Dois indivíduos híbridos, descritos por ocorrerem desde abaixo da cachoeira Teotônio até próximo ao município de Borba (localidades 5 e 6). Seis indivíduos puros de *I. geoffrensis*: um indivíduo na boca do rio Madeira (localidade 7); e cinco indivíduos fora do rio Madeira, que foram usados como

controle de amostragem e representam as localidades nos rios Negro, Solimões, Putumayo e Ucayali (localidades 8 – 12) (Figura 4).

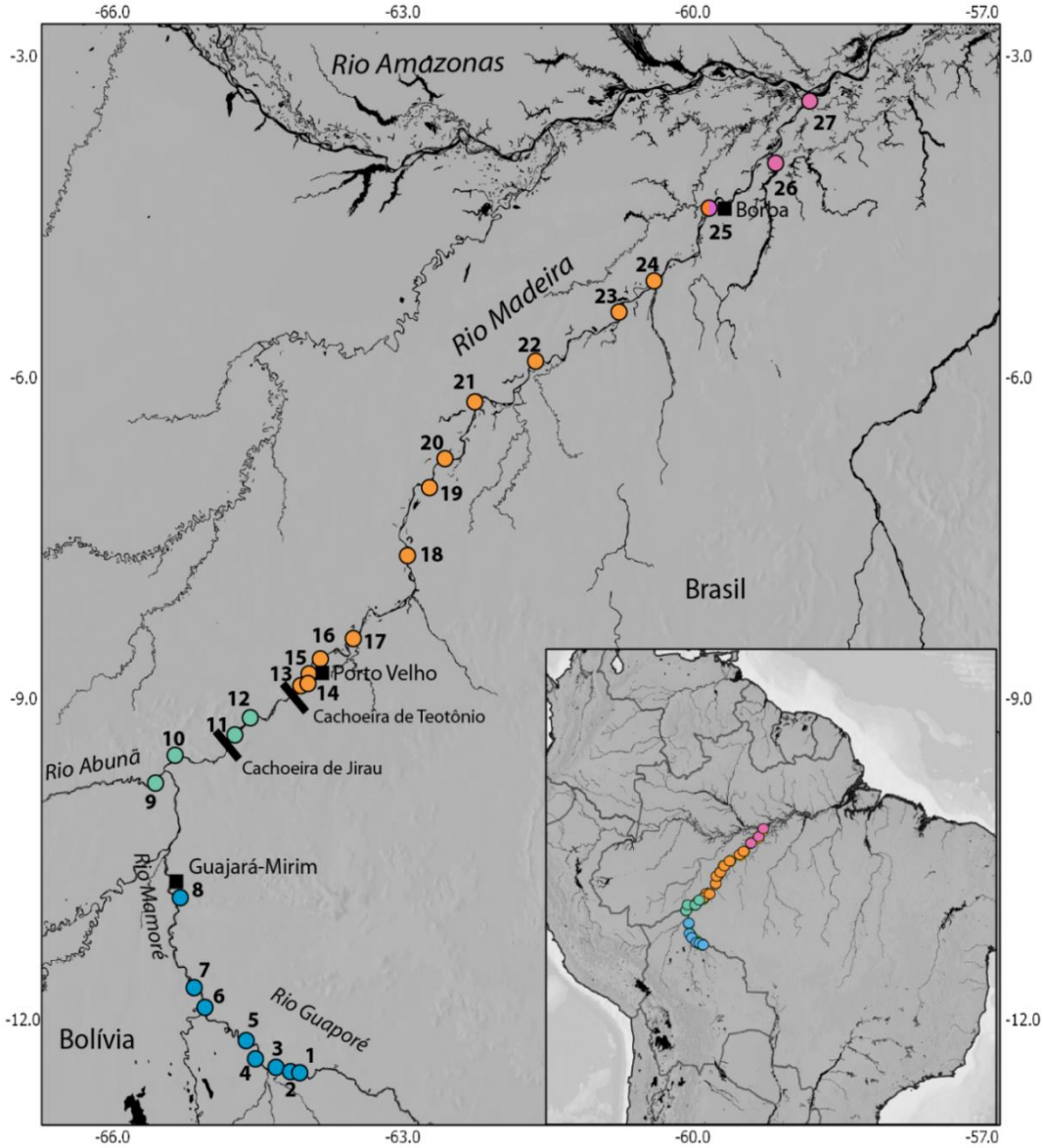


Figura 3: Distribuição das localidades. As duas barras em preto indicam as duas maiores corredeiras da bacia do rio Madeira, Teotônio e Jirau. Os pontos de coletas estão destacados em 27 localidades, **rio Guaporé:** 1. Baía Grande, 2. Contra Fiado, 3. Porto França, 4. Porto Acre, 5. Boca do rio Cautário; **rio Mamoré:** 6. Boca do lago Mercedes, 7. Surpresa, 8. Pakaás, **rio Abunã:** 9. Fortaleza do Abunã; **rio Madeira:** 10. Tamborete, 11. Jirau, 12. Ilha do Búfalo, 13. Abaixo de Teotônio, 14. Ensecadeira de Santo Antônio, 15. Porto Velho, 16. Belmonte, 17. São Carlos, 18. Mirari, 19. Três Casas, 20. Paracanatuba, 21. Lago Acará, 22. Liberdade, 23. Paraná do Uruá, 24. Aripuanã, 25. Guajará, 26. Lago Canumã e 27. Boca. Em azul e verde estão indicadas as duas unidades de manejo de *I. boliviensis*. A cor laranja são as localidades dos indivíduos híbridos. Os pontos em cor rosa indicam indivíduos puros de *I. geoffrensis*, sendo que na localidade 25 foram encontrados híbridos e indivíduos de *I. geoffrensis*, por isso está mostrado nas duas cores (Fonte: GRAVENA, 2013).

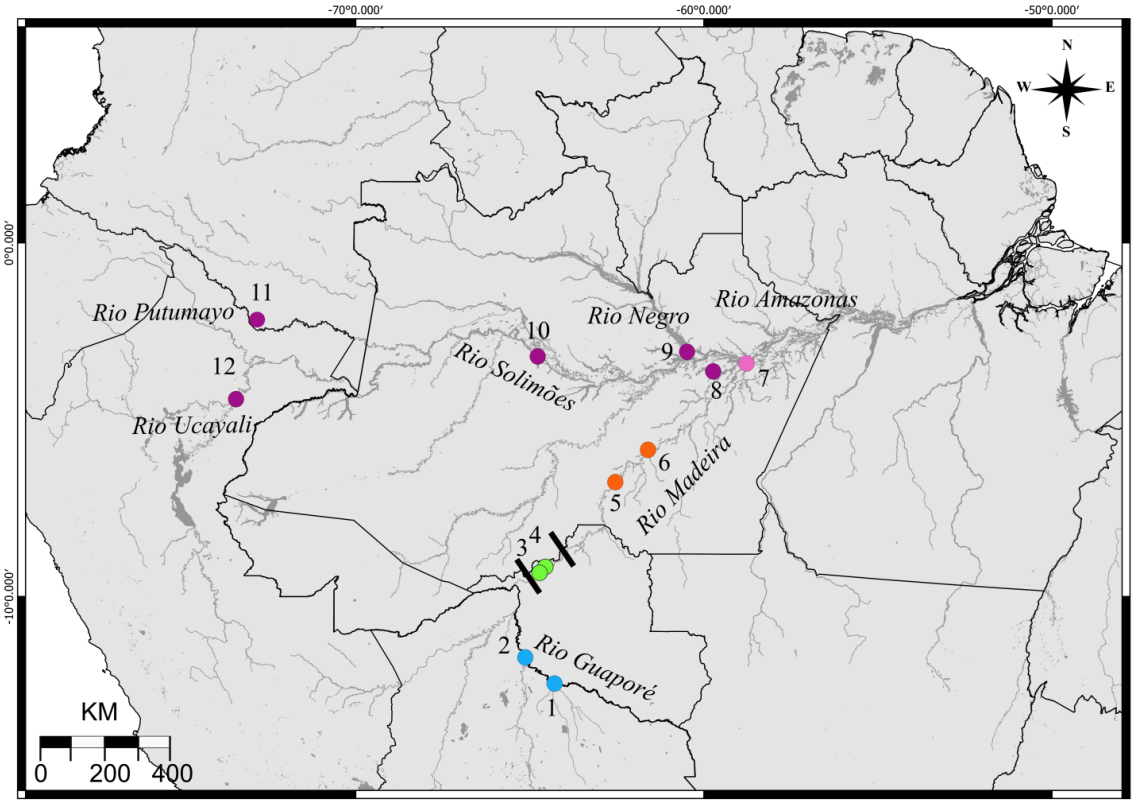


Figura 4: Distribuição das localidades amostradas. Localidades de 1 a 7 representam as amostras da sub-bacia do rio Madeira. Localidades 8 e 9 são amostras do Paraná do Mamurí/lago Mamurí, próximo a Manaus e canal do Ariau, no rio Negro, respectivamente. No rio Solimões, localidade 10, representa a Reserva Sustentável de Mamirauá. Por fim, localidades 11 e 12 são amostras do rio Putumayo, cedida pelo Instituto von Humboldt na Colômbia, e rio Ucayali, no Peru. As duas barras no alto rio Madeira representam as duas UHE de Jirau e Santo Antônio construídas na região das corredeiras. (Fonte: Mário Nunes).

É importante ressaltar que cada amostra selecionada, da bacia do rio Madeira e Reserva Sustentável de Mamirauá – RDS, foi previamente identificada e analisada geneticamente por Gravena (2013). As amostras dos demais rios foram igualmente identificadas e analisadas geneticamente por Farias (2015).

4.3 Marcador molecular

Os marcadores moleculares são usados como ferramentas genéticas para quantificar a diversidade genética das populações, medir o nível de endogamia, caracterizar novas espécies e traçar os padrões de dispersão (FREELAND, 2005).

Para esse estudo foram utilizados então os marcadores SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*), que é a variação de uma única base em uma sequência de DNA. Para que um SNP não seja confundido com uma mutação, considerando que qualquer uma das quatro bases nitrogenadas pode estar presente em qualquer posição de forma

aleatória, esta variação deve ocorrer no mínimo em 1% da população estudada (VIGNAL et al., 2002).

Atualmente os SNPs tem sido frequentemente utilizados nos estudos de diversidade genética, devido a sua ampla distribuição pelo genoma e por ser a forma mais simples de variação genética (DESALLE; AMATO, 2004). Assim, a maneira mais eficaz, rápida e econômica de se obter as sequências que contêm SNP de um organismo é pela metodologia de RAD*tags (Restriction-Site Associated DNA)*. São geradas bibliotecas genômicas (amostragem reduzida do genoma), a partir da fragmentação do DNA por meio de enzimas de digestão associadas a um sítio de restrição (PETERSON et al., 2012). Nossa biblioteca genômica gerada foi então sequenciada de maneira representativa por meio de NGS.

4.4 Preparação da biblioteca genômica

O material biológico utilizado foi retirado de pequenos pedaços de tecido epitelial da região da nadadeira dorsal ou caudal dos animais, e fazem parte da Coleção de Tecidos de Genética Animal (CTGA) da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). Todos os animais amostrados na coleção foram capturados usando a metodologia descrita por da Silva e Martin (2000).

As etapas laboratoriais foram realizadas no Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) da Universidade Federal do Amazonas. O DNA de cada espécime foi extraído via protocolo CTAB 2% (DOYLE; DOYLE, 1987). A extração do DNA consiste em etapas de digestão com a enzima proteinase K e sucessivas lavagens com clorofórmio-álcool isoamílico, isopropanol e álcool 70%. O *pellet* seco em temperatura ambiente foi ressuspendido em 50µL de água destilada e deionizada (ddH2O). O DNA após remoção de proteínas e outros componentes celulares encontram-se guardados em freezer à temperatura de -20ºC.

O DNA extraído foi quantificado no equipamento *NanoDrop 2000 Spectrophotometer* (Thermo Scientific), e diluído para concentração de 200ng/µL de cada amostra. Antes do sequenciamento, o DNA deve ser fragmentado aleatoriamente, para que se tenha uma cobertura uniforme do genoma, biblioteca genômica, em que todo o DNA é amostrado, mas de maneira compacta (CHEVREUX et al., 2004).

O processo de fragmentação do DNA pode ser de forma químico, mecânico ou enzimático. Neste projeto, seguiu o protocolo de Peterson et al. (2012) com modificações, em que a fragmentação do DNA é feita enzimaticamente por meio de duas enzimas de digestão associadas a sítio de restrição, uma de corte raro (SdaI) e a segunda de corte frequente (Csp6I). Simultaneamente foi realizada a reação de ligação de adaptadores.

Os adaptadores são sequências artificiais conhecidas incorporados por meio de ligação fosfodiéster nas extremidades 5'e 3' dos fragmentos de DNA. Foram construídos dois grupos de adaptadores (adaptador A e P1) formados por uma sequência de 22 e 23 pares de bases (pb) complementar aos *primers forward* e *reverse* de sequenciamento (P1 e A_amp), respectivamente (Figura 5 modificado de RANGEL, 2015). Para que cada indivíduo fosse identificado após o sequenciamento, uma vez que são agrupados em *clusters*, o adaptador A recebe uma sequência de 6 pb chamada de *barcode* (Figura 5). No presente trabalho foram construídos 20 *barcodes* distintos e cada amostra recebeu um par de adaptadores com um *barcode* exclusivo.

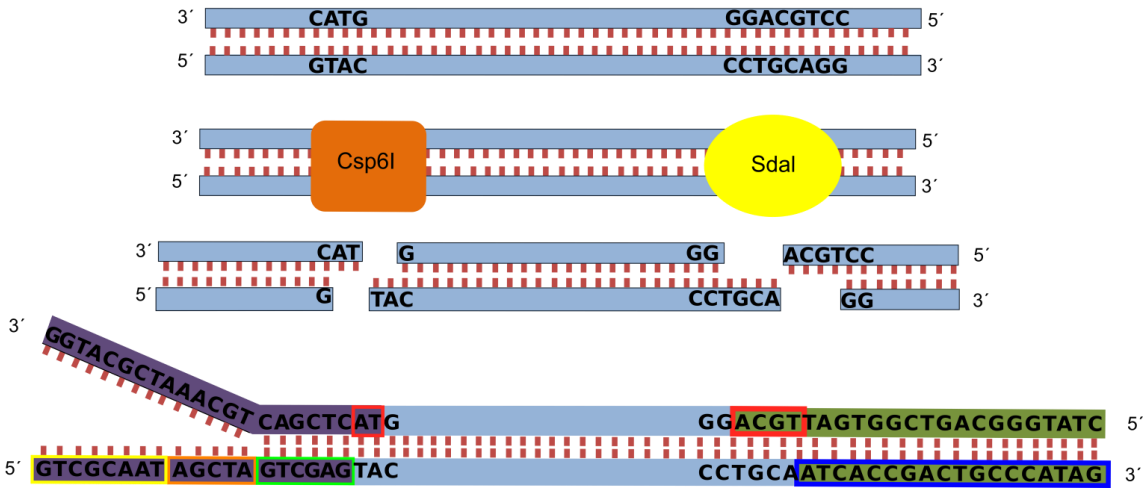


Figura 5: Digestão e ligação dos adaptadores. As enzimas de restrição SdaI e Csp6 fragmentam o DNA em sítios de reconhecimentos específicos. Os adaptadores A e P1 são ligados nas extremidades dos fragmentos. Cada adaptador é composto pelos sítios de reconhecimento das enzimas (vermelho) e sítio de anelamento aos *primers forward* e *reverse* da PCR teste da ligação e sequenciamento (amarelo e azul). No adaptador A existe ainda a sequência *barcode* (laranja), exclusiva para cada amostra, e o *linker* (verde) (Fonte: modificado de RANGEL, 2015).

A incorporação dos adaptadores aos fragmentos foi realizada por uma reação de digestão e ligação que consistiu em incubar por 3 horas a 37°C seguida de inativação da enzima T4 DNA Ligase a 68°C por 15 minutos. Esta reação foi composta por: 1,0µL de

DNA e 49,0µLdo mix de reagentes (38,8µL de ddH2O; 5,0µL do tampão TANGO10X; 2,0µL de um adaptador A; 2,0µL do adaptador P1;0,1µL da enzima SdaI; 0,1µL da enzima Csp6I; 0,5µL de T4 DNA ligase e 0,5 µL de ATP).

Como demonstrado na figura 5, a estrutura dos fragmentos de DNA ligados ao adaptador A não forma uma dupla fita de DNA totalmente complementar. O *barcode* e a região de anelamento de um dos *primers* não são complementares, por isso a extremidade fica "solta" formando uma estrutura em Y. Para que os fragmentos de DNA sejam totalmente complementares, e que pudéssemos sequenciar em ambos os sentidos 5' e 3', o produto da ligação seguiu para uma etapa de amplificação *in vitro*, a PCR teste de ligação.

Assim, o *primer* P1 faz a amplificação do fragmento no primeiro ciclo desta PCR, complementar a região em azul na figura 5. Nos ciclos seguintes o *primer* A_amp é idêntico a sequência destacada em amarelo na figura 5 do adaptador A, sendo reverso complemento para a fita sentido 3'- 5'. Desta forma, a partir dos ciclos seguintes, os *primers* se anelam em ambas as extremidades do fragmento e amplificam a região gerando fragmentos totalmente complementares.

Nesta PCR teste, foram feitas cinco réplicas para cada amostra, a fim de minimizar o desvio padrão dos alelos representativos gerado pelo viés da PCR. As condições desta PCR e mix de reagentes seguiram: 12,4µL de ddH2O; 2,0µL de MgCl2 25mM; 2,0µL de dNTPs 2,5 mM; 2,5µL de tampão 10X (750mM Tris-HCl, 200mM (Na4)2SO4); 2,5µL do *primer* P1; 2,5µL do *primer* A_amp; 0,1µL de KlenTaq (uma Taq de alta fidelidade que corrige erros de amplificação) e 1,0µL do produto da digestão e ligação. As condições desta PCR seguiram pré-aquecimento a 68°C por 60 segundos; seguidos de desnaturação a 93°C por 10 segundos, anelamento a 52°C por 35 segundos e extensão a 68°C por 90 segundos, por 18 ciclos; e uma extensão final a 68°C por 7 minutos.

As cinco réplicas desta PCR teste da ligação foram unidas em um *pool* amostral de cada indivíduo. Antes do sequenciamento é importante que este *pool* amostral tenha os mesmos tamanhos, por isso foi realizada uma seleção de tamanho dos fragmentos no Pippin Prep (*Sage Science*) com cassetes de agarose 2% *dye-free, internal standard mix*, seguindo as instruções do fabricante. Foi determinada a faixa de corte mediante uma

simulação de corte enzimático do genoma mais próximo à espécie de estudo e em que a média do tamanho foi maior que 400pb. Por fim, a biblioteca foi coletada, purificada utilizando o kit *AMPure* (Invitrogen) e quantificada no fluorômetro Qubit 2.0 (Invitrogen). A partir da quantificação, foi feito o cálculo da diluição para a concentração indicada pelo fabricante para o sequenciamento.

4.5 Amplificação da biblioteca

Esta etapa tem por objetivo gerar milhares de cópias de cada fragmento de DNA, a fim de aumentar o sinal iônico que será detectado no sequenciamento. O processo de amplificação utilizado foi o de PCR de emulsão ou clonal, e consiste em amplificar os fragmentos em micro-reatores formados por emulsão em óleo. Nos reatores estão contidos os reagentes de uma PCR normal e pequenas esferas chamadas de *Ion Spheres Particles* – ISP. As esferas ISP estão cobertas com a sequência do *primer* de sequenciamento P1 (complementar ao adaptador P1), e servem como *primer* da reação de PCR e sítio de anelamento para os fragmentos clonados (VARUZZA, 2013).

A PCR de emulsão seguiu protocolo e os reagentes do fabricante (*Prepare Template-Positive* Ion PGM *Template OT2 400 ISP*), realizada no equipamento *Ion One Touch 2*. Posterior a PCR de emulsão, os produtos foram usados para enriquecimento dos fragmentos seguindo novamente protocolo do fabricante (*Enrich the Template-Positive* Ion PGM *Template OT2 400ISP*), o enriquecimento foi realizado no equipamento *Ion One Touch ES*.

4.6 Sequenciamento de Nova Geração

As tecnologias de NGS consistem em várias estratégias que combinam a preparação dos fragmentos (biblioteca genômica), sequenciamento, alinhamento do genoma e métodos de montagem do banco de dados (METZKER, 2010). Entre tantas tecnologias disponíveis, a plataforma utilizada no presente trabalho foi Ion PGM (*Personal Genome Machine*) da Ion Torrent. Lançada no final de 2010 a plataforma chegou reduzindo a complexidade do equipamento e custo da reação por ter o primeiro sequenciador a detectar a incorporação dos nucleotídeos por meio de um semicondutor (VARUZZA, 2013).

Os nossos fragmentos de DNA ligados aos adaptadores, purificados, quantificados, diluídos e enriquecidos foram usados para o carregamento do chip Ion 318 V2. No sistema Ion PGM a leitura das bases é realizada em uma placa semicondutora utilizando um transistor ISFET[1] que detecta variações de pH do meio. Esta variação de pH gera naturalmente um H^{+3} durante a reação de polimerização da sequência. O servidor *Ion Torrent* detecta esse próton cada vez que uma base é incorporada na sequência crescente e determina a sequência da molécula em estudo, que transforma o sinal químico em sinal digital (VARUZZA, 2013).

Posterior ao sequenciamento a triagem de dados seguiu com etapas de separação das amostras por *barcodes*; agrupamento das sequências de cada indivíduo para obter os alelos das regiões amplificadas; e montagem do banco de dados para análises.

4.7 Análises dos dados

4.7.1 Edição dos dados

As leituras do sequenciamento obtidas foram processadas pelo *software Torrent Suite* (da plataforma *Ion Torrent*) e exportadas para um formato BAM (versão binária do formato SAM – *Sequence Alignment/Mapping*). O arquivo BAM foi convertido para um formato FastaQ, a partir da ferramenta *SAMtools*, em que continha todas as sequências brutas e os valores de qualidade.

O arquivo FastaQ foi analisado no *pipeline pyRAD* (EATON, 2014). Este *pipeline* é escrito em linguagem de programação *Python*, destinado a maximizar a informação filogenética através de dados *RADseq* (EATON, 2014). Os componentes do *pipeline* foram usados para limpar as sequências brutas e detectar haplótipos em cada indivíduo, seguindo sete passos de edição.

Passo 1: as leituras foram demultiplexadas. Nesta etapa foi usado as informações do arquivo FastaQ para separar as sequências em arquivos individuais. *Passo 2:* filtragem dos dados. Verificação da qualidade das sequências, de acordo com o índice de qualidade *Phred* dado no arquivo FastaQ, e remoção das sequências dos *barcodes* e adaptadores. Leituras com sítios de baixos valores de qualidades foram alterados para "N" e leituras com mais do que o número de "N" permitido foram descartadas. *Passo 3:* agrupamento. Colapsa as réplicas de sequências individuais,

mantendo o número total de ocorrências. *Passo 4:* estimativas de taxa de erro e heterozigosidade. Esta etapa usou a equação de máxima verossimilhança (LYNCH, 2008) para estimar conjuntamente a taxa de erro e heterozigosidade média das contagens de bases de cada sítio em todos os agrupamentos. *Passo 5*: criação de uma sequência consenso. Os valores da heterozigosidade média e taxa de erros foram usados para calcular a probabilidade binominal de um sito ser homozigoto ou heterozigoto (LI; LU; ORTÍ, 2008) e gerou uma sequência consenso. *Passo 6*: As sequências consenso foram então agrupadas usando as mesmas configurações do passo 3. Por fim, *passo 7*: alinhamento. Os agrupamentos resultantes foram alinhados e filtrados novamente e então exportatos para vários formatos familiares (Fasta, *Phylip*, Nexus), como loco individuais ou concatenados.

4.7.2 Estrutura populacional

A fim de testar a existência de distintos grupos biológicos (*K*) dentro das populações de boto que compõem nossa área amostral, foi utilizado o programa STRUCTURE 2.3.4 (PRITCHARD et al., 2000). O programa calcula a probabilidade posterior para os diferentes números de grupos usando o modelo de mistura e frequências alélicas correlacionadas.

Os pressupostos aderidos no programa seguiram 100,000 gerações descartadas como "*burn-in*" e 1,000,000 de gerações de Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC). Foram assumidos até seis *K*, e para cada *K* foram feitas dez réplicas. O resultado de convergência foi verificado pelos valores de delta *K* e pela visualização das probabilidades posteriores.

Os resultados obtidos de cada *K* foram então comprimidos e importados para o programa STRUCTURE HARVESTER (EARL; VONHOLDT, 2012), em que o número mais provável de *K* foi determinado pelo método de Evanno (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005). As dez corridas de cada *K* foram resumidas no programa CLUMPP 1.1.2 (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007) e os resultados visualizados no programa DISTRUCT 1.1 (c).

4.7.3 Parâmetros genéticos

A partir dos agrupamentos considerados no STRUCTURE foi realizado a Análise de Variância Molecular (AMOVA). A AMOVA é um método utilizado para estimar a diferenciação populacional diretamente de dados moleculares e testar hipóteses sobre essa diferenciação (EXCOFFIER; SMOUSE; QUATTRO, 1992).

A estimativa do nível de estruturação entre as populações foi realizada através de comparações par a par dos valores do coeficiente de endogamia (F_{IS}) e índice de fixação (F_{ST}). A endogamia é o evento de acasalamentos entre indivíduos aparentados frequente em populações pequenas ou fragmentadas. O coeficiente de endogamia mede então a probabilidade de que um indivíduo possua alelos idênticos por descendência, e esta varia de 0 em indivíduos exôgamicos até 1 em indivíduos completamente endogâmicos (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

O efeito da fragmentação populacional sobre a endogamia é medido então pelo índice de fixação, e a diferenciação entre os fragmentos está diretamente relacionada com as taxas de fluxo gênico. O índice de fixação também é medido de 0 até 1, em que 0 indica nenhuma diferenciação entre as populações (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

Os cálculos do coeficiente de endogamia e índice de fixação, assim como as comparações para a par foram inferidas no programa ARLEQUIN 3.5.1.3 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010). Os resultados dos parâmetros genéticos obtidos com os dados de NGS foram usados também para comparações com os dados de microssatélites previamente obtido por Gravena et al. (2015).

4.7.4 Parâmetros demográficos

Os parâmetros demográficos, como tempo de divergência entre as populações, taxa de migração e tamanho efetivo populacional foram inferidos pelo *software* G-PhoCS (*Generalized Phylogenetic Coalescent Sampler*). Nessa análise, a inferência dos parâmetros foi realizada usando o modelo Bayesiano, baseado na teoria coalescente utilizando o modelo MCMC (GRONAU et al., 2011). O arquivo de saída foi visualizado no *Tracer v1.6*.

O G-PhoCS consiste em testar uma filogenia previamente conhecida para comparar as divergências genéticas e as taxas de migração entre as populações. Desta forma, foram testados três cenários para as populações de boto na bacia do rio Madeira. Os três modelos de cenários foram corridos usando fluxo gênico entre as populações e sem o fluxo gênico, para testar se os valores de tempo de divergência (τ) e tamanho efetivo populacional (θ) encontrado seriam influenciados pela migração entre as populações. Também, foram corridos no programa pelo menos três vezes, para que existisse confiança nos resultados obtidos.

4.7.5 Reconstrução das relações filogenéticas

A reconstrução da árvore foi realizada a partir do *pipeline PyRAD* (EATON, 2014), em que o agrupamento dos dados é dado pela similaridade das sequências através do programa USEARCH, uma ferramenta de análise de sequências (EDGAR, 2010). Como na leitura do NGS são obtidas várias sequências por indivíduo, o programa concatena as sequências usando um método hierárquico de agrupamento até obter uma única sequência por indivíduo (EDGAR, 2010).

O arquivo de saída, *Phylip*, foi usado para gerar a árvore filogenética inferida no *software IQ-Tree*, baseada no modelo de máxima verossimilhança (NGUYEN et al., 2015). O modelo de máxima verossimilhança na análise filogenética determina a probabilidade de que cada árvore filogenética possível ocorra dentro de um modelo evolutivo especificado (FELSENSTEIN, 1981).

Para determinar o melhor modelo evolutivo que representa os dados, foi usado o *software ModelFinder* (KALYAANAMOORTHY et al., 2017).

5 Resultados

Neste trabalho foi sequenciado um chip Ion 318 V2 com 12 amostras de indivíduos das duas espécies de *Inia*, mais dois indivíduos de *Pontoporia blainvillei* como grupo externo.

Na corrida do NGS os 12 indivíduos sequenciados geraram 1.079.451 leituras, destas, 302.928 passaram nos filtros de qualidade. Após a triagem de dados no *pipeline pyRAD* foram obtidos 1.111 locos contendo sítios variáveis, em que foram recuperados 468 SNP não ligados.

5.1 Estrutura populacional

No programa STRUCTURE foi realizada a análise de agrupamento, baseado no modelo bayesiano. A abordagem bayesiana é um método de inferência estatística que usa uma informação a *priori* para testar a probabilidade que vários parâmetros podem explicar um dado em particular (FREELAND, 2005).

A análise bayesiana providencia múltiplas probabilidades que são comparadas simultaneamente, e os dados utilizados em nossa análise foram testados com até seis agrupamentos possíveis. De acordo com os resultados do programa STRUCTURE foi identificado, no entanto, cinco grupos biológicos com melhor probabilidade posterior de Ln Pr (X|K= 5) = -1714.38 e valor de delta *K*= 2 (ΔK) = 689.360.156 (Figura 6 e Tabela 1).

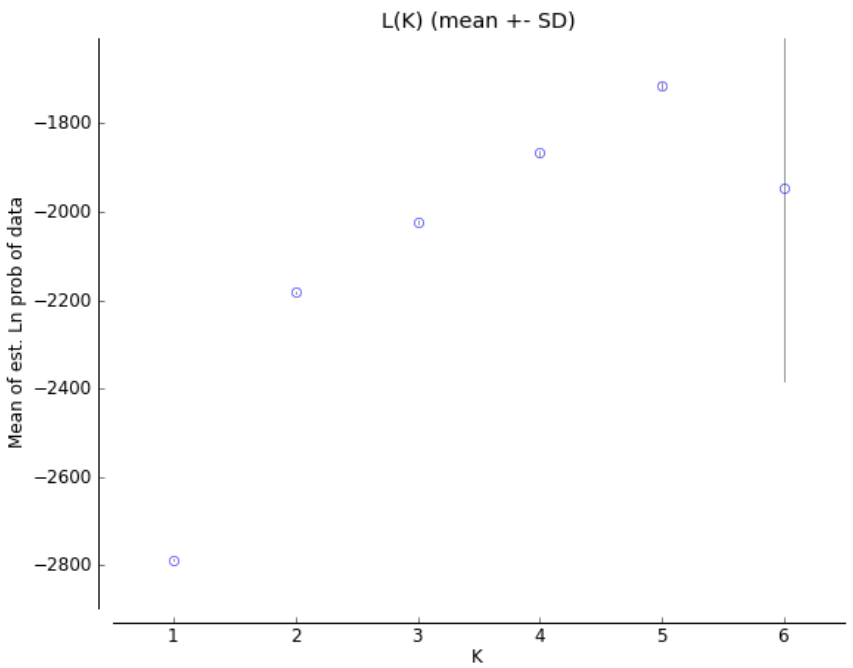


Figura 6: Gráfico das probabilidades (L(K)) de agrupamentos testados. Na horizontal, os números de grupos biológicos - *K*, testados nas 10 réplicas. Na vertical a média das probabilidades posteriores Ln(P) dos dados (Fonte: figura gerada pelo *website* e programa para visualização STRUCTURE HARVESTER (EARL; vonHOLDT, 2012)).

A inferência do melhor *K* é dada pelo valor da probabilidade mais próximo de um número verdadeiro e com menor desvio padrão (Stdev) (ROSENBERG et al., 2001), ou pelo maior valor de delta *K*, calculado por ΔK = [L”(K)]/ Stdev (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

Os agrupamentos recuperados pelo programa, mostrados na figura 7, representam: um grupo biológico para as duas populações da Bolívia (*I. boliviensis*), (cor rosa), enquanto que os indivíduos de *I. geoffrensis* são formados por quatro agrupamentos alélicos, que são representados pelas cores amarela, verde, vermelha e azul.

Tabela 1:Valores da média das probabilidades posteriores, desvio padrão e delta *K*. Foram testados até seis agrupamentos, em negrito está o agrupamento com melhor probabilidade e maior número de delta *K* (Fonte: tabela resumida gerada pelo *website* e programa para visualização STRUCTURE HARVESTER (EARL; vonHOLDT, 2012)).

K	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Delta *K*
1	-27.878.600	0.9789	-
2	-21.823.200	0.6477	**689.360.156**
3	-20.233.000	3.3563	0.485660
4	-18.659.100	5.0030	1.171.300
5	**-17.143.800**	5.8036	66.270.931
6	-19.474.600	436.3476	-

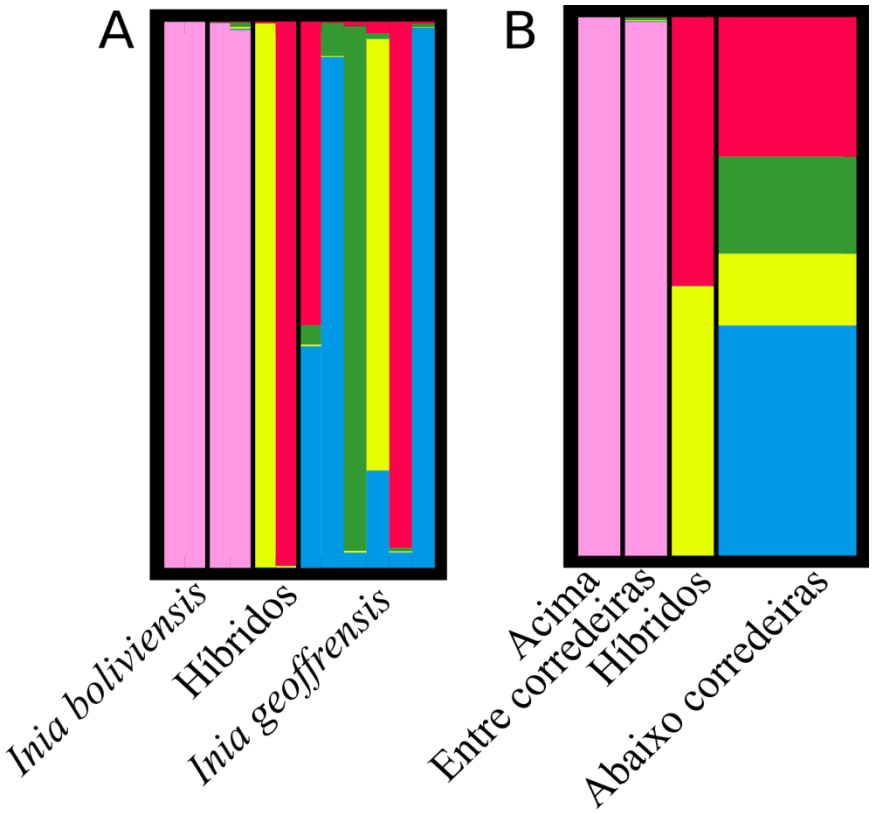


Figura 7: Gráficos de ancestralidade. A) gráfico de ancestralidade na composição de cada indivíduo. B) gráfico de ancestralidade que compõe cada população. Nomes das populações a qual cada indivíduo pertence abaixo. ***Acima*** e ***Entre corredeiras*** são *I. boliviensis*. ***Híbridos*** e ***Abaixo*** são as amostras de *I. geoffrensis* (Fonte: gráfico gerado pelo programa DISTRUCT 1.1 (ROSENBERG, 2004)).

As populações assumidas, listadas abaixo da figura 7, representam: ***Acima*** e ***Entre corredeiras*** – referente às duas unidades de manejo da espécie *I. boliviensis* encontrados por Gravena et al. (2015) e são separadas entre acima de todas as corredeiras do rio Madeira e dentro das corredeiras, respectivamente; ***Híbridos*** – aos indivíduos encontrados abaixo da cachoeira Teotônio até o município de Borba, onde foi descrito como zona hibrida; ***Abaixo*** – para os indivíduos de *I. geoffrensis* abaixo de todas as corredeiras, na localidade Boca do Madeira; mais os cinco indivíduos amostrados fora do rio Madeira, os quais foram usados como grupo controle dessa espécie.

Como pressuposto desta análise foi utilizado o modelo de mistura, em que podemos assumir que cada indivíduo pode ter herdado frações de genomas dos seus ancestrais (valor de *q*) (PRITCHARD et al., 2000). Assim, é possível visualizar na figura 7 que um indivíduo pode ser composto por mais de um agrupamento biológico, dado que a origem de cada alelo é independente.

Desta forma, todos os indivíduos coletados *A**cima*** e ***Entre corredeiras*** não mostraram evidências de misturas, sendo compostos por um único grupo biológico (rosa) e atribuídos a espécie *I. boliviensis*, com valores de *q* entre 0,98 e 0,99.

Por outro lado, os demais indivíduos mostraram maior variação na média dos valores de *q* (0,17 a 0,99), tendo indivíduos com os outros quatro grupos biológicos em seu genoma e possuem maior probabilidade de pertencerem à espécie de *I. geoffrensis*.

Devido ao nível de mistura encontrado em *I. geoffrensis*, foram realizadas corridas adicionais no STRUCTURE. A fim de verificar qual população estaria contribuindo com maior diversidade genética.

Primeiro, foram testados apenas os indivíduos de *I. geoffrensis*, populações ***Híbridos*** e ***Abaixo***. Por segundo, foi analisado só os indivíduos do rio Madeira, assumindo as quatro populações, mas excluindo os indivíduos dos rios Negro, Solimões, Putumayo e Ucayali.

Nessas corridas independentes, os valores das probabilidades foram de Ln Pr (X|K= 6) = -998.3100 para os indivíduos de *I. geoffrensis*, e Ln Pr (X|K= 5) = -80.1600

na corrida com apenas os indivíduos do rio Madeira, este último corroborando com o valor de probabilidade igual ao resultado da corrida com todo o banco de dados.

No entanto, os valores de delta *K* foram inversamente proporcionais aos valores de probabilidade de melhor agrupamento. Sendo os maiores valores de ΔK = 19.401.375 para *I. geoffrensis*, e ΔK = 250.681.052 para os indivíduos exclusivos do rio Madeira, ambos com *K* = 2. Mas no caso dos indivíduos de *I. geoffrensis*, as diferenças nas médias de melhor probabilidade posterior de *K* = 2 a *K* = 5 foram mínimas, e mesmo sendo o melhor *K*= 6, o menor desvio padrão esteve na Ln Pr (X|K= 2) = -14.128.600 (Tabela 2).

Tabela 2: Valores da média das probabilidades posteriores, desvio padrão e delta *K*. Foram testados até seis agrupamentos nas duas corridas adicionais. Em negrito, as médias de melhor probabilidade de *K* e o maior de delta *K* (Fonte: tabela resumida gerada pelo *website* e programa para visualização STRUCTURE HARVESTER (EARL; vonHOLDT, 2012)).

Iniageoffrensis			
K	**Mean LnP(K)**	**Stdev LnP(K)**	**Delta *K***
1	-14.819.700	30.689	-
2	-14.128.600	54.048	**19.401.375**
3	-14.486.100	892.866	2.010.940
4	-13.048.100	3.059.629	1.000.742
5	-14.672.000	8.228.896	0.767150
6	**-9.983.100**	132.791	-
Rio Madeira			
1	-13.754.500	15.522	-
2	-10.600.300	0.8056	**250.681.052**
3	-9.465.600	529.998	1.937.179
4	-9.357.600	1.415.820	1.022.729
5	**-7.801.600**	307.616	5.994.480
6	-8.089.600	2.937.416	-

5.2 Parâmetros genéticos e árvore filogenética

A partir dos agrupamentos biológicos encontrados pelo STRUCTURE foi realizada a AMOVA. Esta analise encontrou, entre as quatro populações, que a maior diversidade genética está presente entre indivíduos dentro das populações, com 53,41% de variância. Seguido de 34,74% de variação entre as populações, e 11,85% de variação dentro dos indivíduos.

As médias das comparações par a par dos valares do F_{IS} e F_{ST} para as quatro populações foram de F_{IS} = 0,81 e F_{ST} = 0,34, e valor de p significativo ($p < 0,05$). O F_{ST} = 0,34 indica significativa estruturação entre as populações.

Os valores de F_{ST} são inversamente proporcionais a habilidade de dispersão de uma determinada população, assim, uma matriz com os valores de F_{ST} e fluxo gênico (N*m* = número de migrantes por geração) é mostrada da tabela 3.

Tabela 3: AMOVA. Valores de F_{ST} de cada população (diagonal abaixo) e fluxo gênico (N*m*) (diagonal acima) obtido com os dados de NGS. Na população ***Abaixo*** é considerada todos os indivíduos de *I. geoffrensis* (Fonte: Valores de F_{ST} e N*m* calculados no programa ARLEQUIN (EXCOFFIER; LISCHER, 2010)).

F_{ST}/ Nm	*Acima*	*Entre corredeiras*	*Híbridos*	*Abaixo*
Acima	-	1	1	2,9
Entre corredeiras	0,33	-	1	8,6
Híbridos	0,33	0,33	-	1,4
Abaixo	0,14	0,054	0,25	-

Posteriormente foi realizada a reconstrução das relações filogenéticas inferida pelo modelo de verossimilhança a partir do programa *online* IQ-Tree (NGUYEN et al., 2015), e o melhor modelo evolutivo foi o GTR+I+G4 (Figura 8).

Como teste de consistência da árvore, foi utilizado o método de *bootstreap* com 1000 réplicas de amostragem e os valores de suporte de cada ramo está representado antes de cada nó. Como grupo externo foi usado o gênero sul-americano *Pontoporia blainvillei*, pois de acordo com (DE MUIZON, 1982) esse é taxa irmão de *Inia*.

5.3 Parâmetros demográficos

As inferências demográficas usando o *software* G-PhoCS foram modeladas a partir de três cenários possíveis de filogenia para as quatro populações de botos assumidas (Figura 9). Cada cenário assumido foi testado modelos com migração e sem migração. Para que existisse confiança nos resultados obtidos, cada cenário com e sem migração, foi testado pelo menos três vezes.

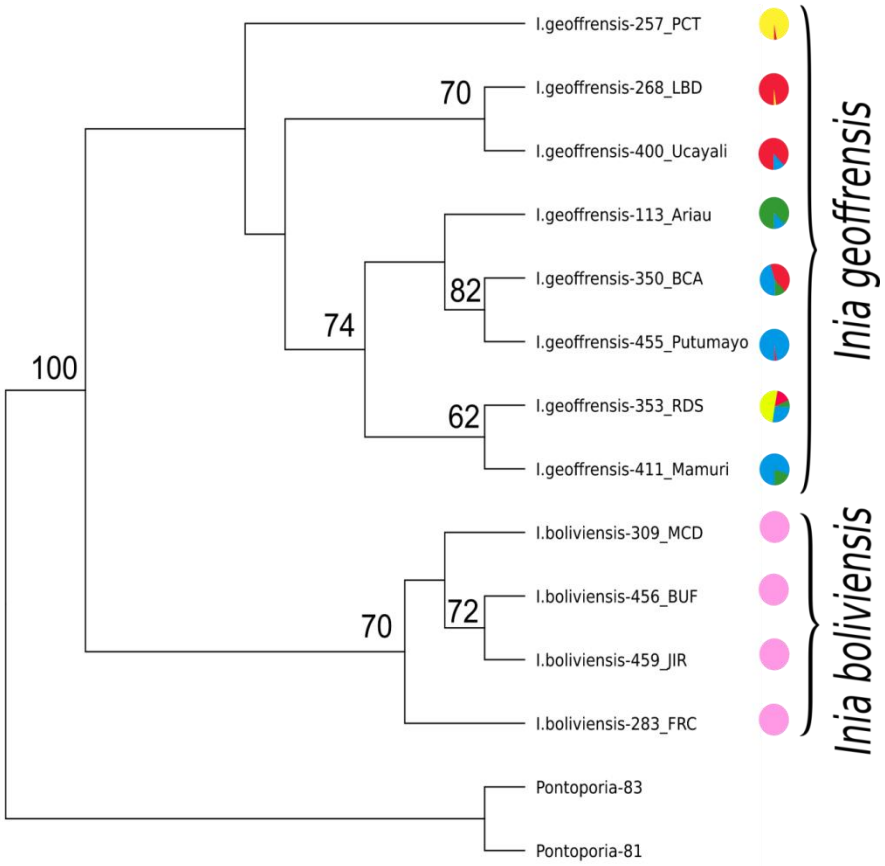
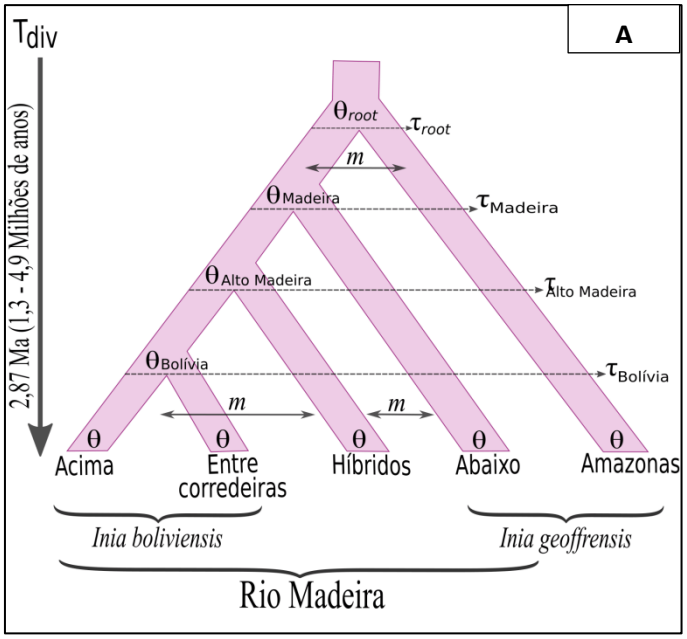
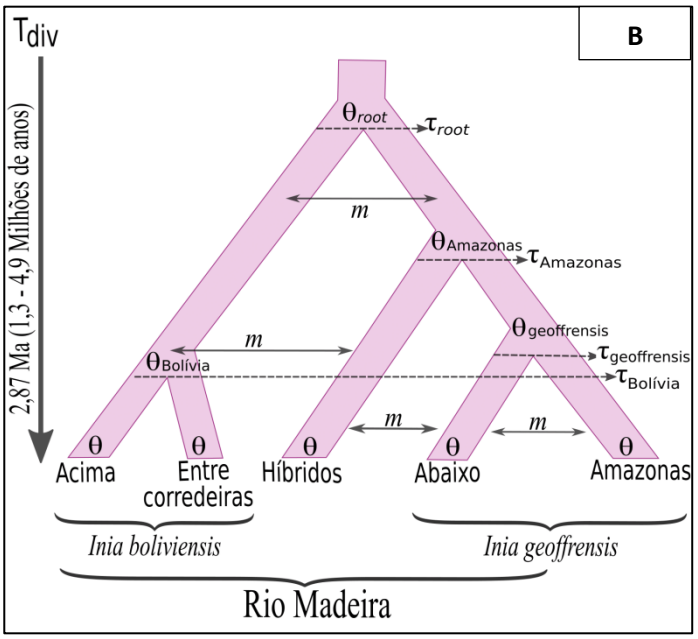


Figura 8: Árvore filogenética. Reconstrução filogenética inferida pelo método de máxima verossimilhança, gerada no programa *online IQ-Tree* (Nguyen *et al*., 2015). Valores menores que 60% de suporte não amostrado. Legenda: ***Acima***– Lago Mercedes (MCD), Porto França (FRC); ***Entre corredeiras*** – Ilha do Búfalo (BUF), Abaixo de Jirau (JIR); ***Híbridos*** – Enseada Paracanatuba (PCT), Igarapé Liberdade (LBD); ***Abaixo*** – Boca do Madeira (BCA).





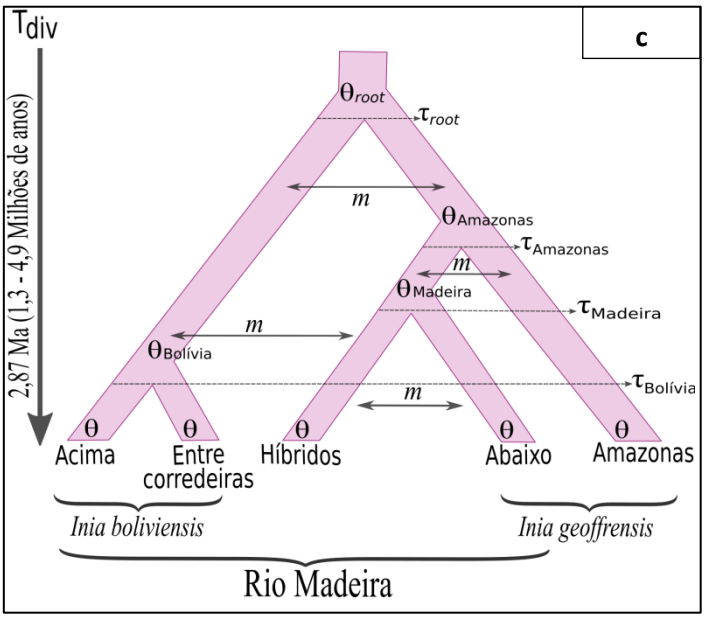


Figura 9: Modelos genealógicos testados na inferência demográfica. As filogenias populacionais foram assumidas com genoma diplóide por população. Os parâmetros assumidos incluíram quatro tempos de divergência (τ) e nove tamanhos efetivo populacional (θ), todos expressados em unidade mutacional esperada por sítio. Para a obtenção de tempo de divergência absoluta (em anos), e tamanho efetivo populacional (em números de indivíduos) foi assumido o tempo de divergência genômica entre os botos da Bolívia e Amazonas de 2,8 milhões de anos, e tempo de geração de 10 anos.

A população ***Abaixo*** foi separada entre o indivíduo de *I. geoffrensis* da localidade Boca do Madeira dos demais indivíduos amostrados fora do rio Madeira, os quais chamamos de populações ***Abaixo*** e ***Amazonas***.

Cada cenário assumido foi baseado nas relações filogenéticas possíveis entre as populações de botos. Os eventos de migração, destacados em setas na figura 9, correspondem sempre entre as mesmas populações, e testam basicamente a migração entre os híbridos e as espécies parentais, bem como entre as duas espécies. Entre os três cenários testados o que melhor correspondeu com as relações filogenéticas encontradas atualmente, foi o modelo demonstrado na figura 9C, com melhor probabilidade posterior (Data-Id-in) de -282.518 (Tabela 4).

O modelo representado na figura 9C descarta que todas as populações sejam parafiléticas (Figura 9A), ou que os híbridos sejam uma população mais antiga que a população ***Abaixo***, da localidade Boca do Madeira (Figura 9B).

Nas comparações entre as corridas com e sem migração, a melhor probabilidade sempre esteve entre os cenários com migração, indicando que as taxas de migração foram determinantes nas relações filogenéticas.

Tabela 4: Probabilidades dos modelos genealógicos. Três cenários evolutivos foram testados na análise G-PhoCS. Cada cenário foi testado com e sem a migração. Para determinar que um cenário seja o melhor modelo genealógico foi utilizado o valor de probabilidade posterior mais próximo de um número real. Em amarelo, destaca o modelo de melhor probabilidade e assumindo a migração entre as populações.

	Data - Id - in	
	Migração	**Sem migração**
Modelo 1	-300,18	-303,27
Modelo 2	-283,58	-301,96
Modelo 3	-282,52	-300,92

A calibração de T_{div} = 2.8 milhões de anos foi assumida a partir da estimativa de divergência entre as espécies de *Inia* calculada por Hrbek et al. (2014), e implicou em uma taxa de mutação por par de base por ano (μ) de 1,24 x10^{-9}. O cálculo da taxa de mutação (μ) é dado por $\mu = \tau_{div}/T_{div}$, onde $\tau_{div} = \tau_{root} + {}^{1/2}\,\theta_{root}$. Assim, podemos calcular o $T = \tau/\mu$ para cada população. Para obter o número efetivo de indivíduos (N_e) foi utilizada a média de tempo de geração igual de 10 anos, sugerida para os botos por (TAVERA et al., 2010).

Cada análise no G-PhoCS continha um arquivo com o alinhamento das sequências e um arquivo de controle, em que foi definido a filogenia populacional e os parâmetros de entrada, de acordo com o padrão descrito por Gronau et al. (2011). Exceto o MCMC que seguiram 1,000,000 de gerações e 100,000 gerações descartadas como "*burn-in*". O arquivo de saída foi visualizado no *Tracer* em que são dadas em unidade mutacional as estimativas de tamanho efetivo populacional (θ), o tempo de divergência (τ), e as bandas de migração, com 95% de intervalo de confiança.

Definindo como o cenário três a filogenia provável e considerando o fluxo gênico entre as populações, as estimativas de tamanho efetivo populacional (θ) e o tempo de divergência (τ) estão representados na tabela 5.

Tabela 5: Parâmetros demográficos. Tamanho efetivo populacional, tempos de divergências e intervalos de confiança estimados pelo G-PhoCS. Para conversão de tempo de divergência absoluta (em anos), e tamanho efetivo populacional (em números de indivíduos) foi assumido o tempo de divergência genômica entre os botos da Bolívia e Amazonas de 2,8 milhões de anos, e tempo de geração de 10 anos.

	Teta (95% CI)	Ne (95% CI)	Tau (95% CI)	Tau (anos) (5%CI)
Acima	0,64 (0,21 – 1,02)	2555,04 (834 – 4114)	-	-
Entre corredeiras	1,02 (0,33 – 1,660	4097,70 (1311 – 6653)	-	-
Híbridos	1,13 (0,68 – 1,61)	4527,56 (2723 - 6476)	-	-
Abaixo	0,84 (0,23 – 1,36)	3358,51 (909 – 5471)	-	-
Amazonas	2,25 (1,50 – 3,01)	9031,01 (6018 - 12101)	-	-
Bolívia	4,29 (3,47 – 5,14)	17247 (13932 - 20657)	0,30 (0,09 - 0,50)	24.345 (7.360 - 40.238)
Madeira	2,18 (0,01 – 5,00)	8754 (40 - 20082)	0,50 (0,30 - 0,70)	40.495 (24.426 - 56.564)
Amazonas	2,90 (1,93 – 3,95)	11650 (7759 - 15869)	0,56 (0,36 - 0,76)	44.753 (28.885 - 60.839)

5.3.1 Taxa de migração

A habilidade de dispersão dos indivíduos também pode ser medida a partir da inferência de taxas de migração (*m*) realizada no G-PhoCS. A hipótese da existência de migração foi testada uma vez que já havia sido evidenciada com o uso de outros marcadores moleculares (GRAVENA et al., 2014a, 2015).

Para isso, foram assumidas oito possíveis direções de fluxo gênico, entre as populações, mostradas em setas nas figuras 11 e 12. As duas populações ***Acima*** e ***Entre corredeiras*** foram unidas em apenas um grupo de *I. boliviensis*, pois segundo a análise de agrupamento, não existe essa subestruturação.

Considerando que o fluxo gênico encontrado com microssatélites seguiu o sentido alto para baixo rio Madeira, o mesmo foi assumido nesta análise. Mesmo que o sentido oposto tenha sido observado em menor frequência, mantivemos essa comparação com os dados genômicos.

Cada banda de migração (S para T), em que S (*Source* – fonte) é a população de onde saem os migrantes, e T (*Target* – alvo) a população alvo, é uma versão de mutação escalonada da taxa de migração instantânea (M_{ST}). Gronau et al. (2011) define M_{ST} como a proporção de indivíduos na população T que chegaram por migração da população S, e o fluxo gênico é modelado como um processo de taxa constante (BEERLI; FELSENSTEIN, 1999).

Em resumo, pode ser observada migração bidirecional entre as populações, em que a taxa de migração foi convertida para número de migrantes por geração (Figura 10). Para fornecer medidas significativas de taxa de migração foi utilizado a equação $\boldsymbol{m_{ST}}$ **x** $\boldsymbol{\theta_T}$, em que m_{ST} é a taxa total de migração e θ_T o tamanho efetivo populacional da população alvo, e representa a probabilidade de uma linhagem da população alvo se originar da população fonte (KUHLWILM et al., 2016).

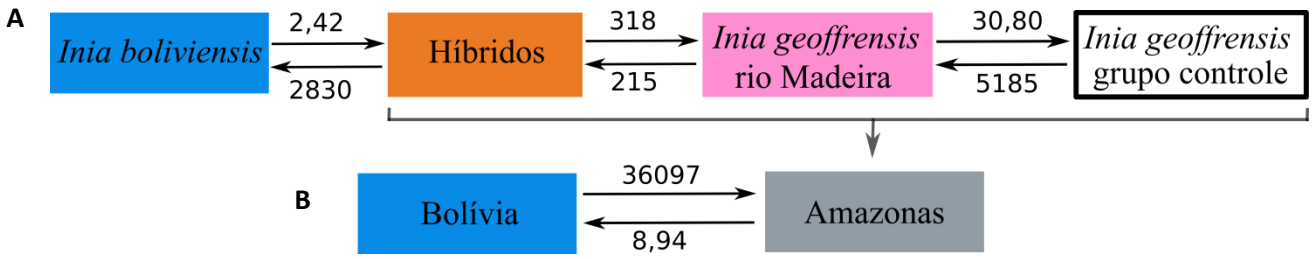


Figura 10: Representação esquemática de migração. Estimativa da proporção de indivíduos que chegaram por migração em uma população alvo. As setas indicam as direções do fluxo gênico inferidos na análise. A) migração entre as populações do rio Madeira. B) migração entre os dois clados assumidos: Bolívia para *I. boliviensis* e Amazonas para *I. geoffrensis*.

6 Discussão

Primeiramente, precisamos lembrar que foram usados poucos indivíduos por localidade, no geral, duas amostras para cada local. Mas a escassez de amostragem não significa necessariamente que seja um viés para os resultados. Na verdade, a metodologia NGS permite sequenciar genomas inteiros, e segundo Gronau et al. (2011) mesmo usando um pequeno número de genomas atuais, estes representam muitos genomas ancestrais que foram misturados e divididos/sorteados aleatoriamente pelo processo de recombinação.

Desta forma, foi possível sequenciar 468 *loci* (SNP) de evolução neutra para extrair informações sobre o tamanho efetivo populacional, tempos de divergência e as

taxas de migração a partir dos padrões de variação nas genealogias. De uma maneira geral, fornecendo maior compreensão sobre os parâmetros genéticos e demográficos de *I. geoffrensis*, *I. boliviensis* e os híbridos na bacia do rio Madeira.

6.1 Evidências genéticas de *Inia boliviensis*

De acordo com a Sociedade de Mamíferos Aquáticos, *I. boliviensis* é dada como espécie provisoriamente não listada (COMITÊ DE TAXONOMIA, 2014) por consequência, para IUCN não possui classificação sobre seu *status* de conservação.

No entanto, da Silva (1994) realizando um dos primeiros trabalhos baseado em análises morfológicas de cetáceos amazônicos (gêneros *Inia* e *Sotalia*), descreveu que as populações de *Inia* eram claramente separadas em duas espécies diferentes. Mas essa classificação não foi aceita e estudos baseados em análises genéticas seriam necessários para ter evidências suficientes de que os botos da Bolívia seriam uma espécie diferente das populações da bacia Amazônica.

Hamilton et al. (2001) e Banguera-Hinestroza et al. (2002), por sua vez, realizaram os primeiros trabalhados baseados em dados genéticos, ao sequenciarem três porções distintas do DNA mitocondrial. Ambas as inferências de reconstruções filogenéticas encontraram que a população da Bolívia formava um clado, com altos valores de suportes, separados do restante das populações de *Inia*.

Análises genéticas com genoma nuclear foram primeiramente realizadas por Hrbek et al. (2014). Esses autores genotiparam dez *loci* de microssatélites de *I. boliviensis*, *I. geoffrensis* e *I. araguaiaensis*, e assim como os dados de DNA mitocondrial, analisado no mesmo trabalho, encontraram divergências entre *I. boliviensis* e *I. geoffrensis.*

Recentemente, Gravena et al. (2017), analisaram cariótipos de machos e fêmeas de *I. boliviensis*, e encontraram diferenças significativas na fórmula cariotípica e nos bandeamentos de heterocromatina constitutiva em relação ao que já foi descrito por Bonifácio et al. (2012) para *I. geoffrensis*.

Nossos resultados chegam às mesmas conclusões, pois, na análise de agrupamento realizada pelo STRUCTURE, os botos da Bolívia formaram um grupo biológico exclusivo, homogêneo e separado de *I. geoffrensis*. A média dos valores de

ancestralidades (*q*) mostrou que todos os indivíduos de *I. boliviensis* pertencem ao mesmo grupo biológico, com valores de *q* entre 0,99 e 0,98 e esse agrupamento não se mostrou presente nos demais indivíduos do restante do rio Madeira.

Igualmente, a reconstrução das relações filogenéticas inferida pelo modelo de máxima verossimilhança separa nossa amostragem em dois clados. Com 100% no valor de *bootstrap*, um dos clados inclui todos os indivíduos das populações ***Acima*** e ***Entre corredeiras***, os quais são identificados como *I. boliviensis*. O segundo clado inclui todos os indivíduos do restante do rio Madeira e da bacia Amazônica, descritos como *I. geoffrensis*. De acordo com os critérios filogenéticos de espécies, *I. boliviensis* representa uma linhagem geneticamente distinta de *I. geoffrensis* (CRACRAFT, 1985; ROSEN, 1979).

Todos esses trabalhos fornecem evidências genéticas e morfológicas para *I. boliviensis* ter classificação de espécie. Ainda, Hrbek et al. (2014) estimaram que o tempo de divergência entre as duas espécies seria de 2,87 milhões de anos. Farias (2015) ao incluir em sua análise a linhagem de botos da bacia do Orinoco, recuperam similar tempo de divergência, 2,82 milhões de anos.

Com essa estimativa podemos assumir que a separação entre as duas espécies é mais antiga que a formação das corredeiras no rio Madeira, uma vez que estas tem datação estimada muito mais recente, entre o Plioceno ou Pleistoceno, ou ainda cerca de 1,5 milhões de anos (LOVEJOY; TUCK; SCHERTZER, 2010). Seria mais possível que a separação entre as espécies tenha ocorrido em algum momento posterior ao soerguimento do arco Fitzcarrald (que se deu entre 4 a 3 milhões de anos), que teria afetado a dinâmica hidrológica do atual rio Madeira (GRAVENA, 2013).

Mesmo encontrando tempos de divergências entre os botos bolivianos e os amazônicos mais antigo que entre algumas espécies da família Delphinidae (*Cephalorhynchus eutropia* e *C. commersonii* divergiram a 0,82 milhão de anos, *Globicephala melas* e *G. macrorhynchus*a 0,67 milhão de anos, e entre *Delphinus delphis* e *D. capensis* a 0,66 milhão de anos (MCGOWEN; SPAULDING; GATESY, 2009).

A estimativa de migração obtida pelo G-PhoCS indicou pronunciado fluxo gênico entre as populações. Portanto, é mais provável que as cachoeiras do rio Madeira

possam ter atuado restringindo a dispersão das espécies por um determinado tempo, mas com o aumento do nível da água, os animais vindos da Bolívia tenham conseguido ultrapassar as corredeiras, mantendo relativo fluxo gênico entre as populações abaixo (GRAVENA, 2013). No entanto, o fluxo gênico reportado não se demonstrou suficiente para limitar as divergências genéticas entre as duas espécies de *Inia*.

6.2 Migração

A figura 10 mostra um fluxo gênico bidirecional ente às populações de botos na bacia do rio Madeira. O fluxo gênico indica a migração de genes entre populações, e assim como a mutação, deriva genética e seleção natural representa um fator evolutivo determinístico para a geração e manutenção da diversidade genética (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

No entanto, o fluxo gênico está associado como um mecanismo que pode reduzir o tamanho populacional, como o efeito fundador, efeito gargalo ou a própria flutuação demográfica. As consequências do fluxo gênico são dependentes de onde ocorre a migração, as diferenças nas frequências gênicas das duas populações e a proporção de indivíduos migrantes. Se ocorrer entre indivíduos de uma mesma população pode introduzir ou reintroduzir genes, aumentando sua variação genética. Mas se ocorre entre populações distintas, pode homogeneizá-las geneticamente e reduzir as chances de especiação, pois esta caracteriza a introdução de genes de outra população igualando as frequências gênicas entre essas duas populações (FUTUYMA, 2009; RIDLEY, 2006).

Nem sempre a migração pode representar uma consequência negativa. Por exemplo, se a introgressão de genes confere uma vantagem adaptativa à população alvo, a seleção natural pode atuar a favor de aumentar a frequência desses genes introgredidos (RIDLEY, 2006). A seleção natural pode atuar também mantendo as populações distintas mesmo quando o fluxo gênico é continuo. Isso ocorre quando a força seletiva é mais intensa que o fluxo gênico, e neste caso, a adaptação pode explicar a divergência entre as populações e não o fluxo gênico (BECKER et al., 2013).

Entre as populações de botos a migração poderia igualar as frequências gênicas, e por consequência, diminuir as diferenças genéticas entre as populações. No entanto o oposto foi observado, de forma que a estruturação entre as populações pode estar sendo apoiada por pressões seletiva maior que a frequência do fluxo gênico. Simões *et al*.

(2012) registraram redução na diversidade genética e déficit de heterozigosidade em áreas adjacentes à zona de contato entre duas espécies de anuros (*Allobates hodli* e *A. femoralis*), e também atribuíram a pressões seletivas que impedem o fluxo gênico além da zona híbrida.

O fluxo gênico bidirecional reportado é corroborado com os dados de microssatélites. Gravena et al. (2015) encontraram principalmente altas taxas de migração no sentido acima das corredeiras para a região abaixo, e apesar de encontrarem frequência de migração no sentido oposto, esses valores são menos significativos. Os dados com SNPs por sua vez, demonstraram valores de migração superiores ao de Gravena et al. (2015), e quando comparados apenas entre as populações (Figura 10A), o sentido de baixo para cima do rio Madeira é discordante do demonstrado na figura 10B.

O cenário encontrado pode ser respondido pelo modelo de isolamento por distância, em que fluxo gênico ocorre entre as populações locais. Assim, há maior probabilidade dos híbridos se relacionarem com as espécies parentais, devido à proximidade, e através de um gradiente ambiental promovem a descontinuidade biológica. Atualmente a conexão reportada entre as populações não existe mais, uma vez que a construção das UHE Jirau e Santo Antônio interrompeu o fluxo gênico por completo (GRAVENA et al., 2014b).

De um modo geral, seria mais provável que os botos da Bolívia tenham maior facilidade de transpor as barreiras (GRAVENA et al., 2014a), mas que não necessariamente o sentido oposto seja um evento nulo (Figura 10B). Corrobora também com o cenário descrito por Gravena (2013), em que sugere que botos da Bolívia tenham colonizado o rio Madeira.

O baixo valor de migração entre o indivíduo puro de *I. geoffrensis* da localidade Boca do Madeira e os botos do restante da bacia Amazônica pode ser influência da discrepância entre o número de amostragem. Uma vez que foram amostrados cinco indivíduos do grupo controle contra apenas um da região Boca do Madeira. No entanto, a maior migração no sentido contrário pode ser beneficiada pelo período de cheia, em que as águas do rio Amazonas invadem o rio Madeira, permitindo a conexão entre essas populações.

A evidência de fluxo gênico sugere que o tempo de separação foi insuficiente para a criação de barreiras pré e pós zigóticas, permitindo que através de um contato secundário as duas espécies intercruzassem gerando descendentes híbridos. Para Dobzhansky (1940) e Mayr (1943), este tipo de contato ocorre em populações que se diferenciaram por alopatria, e em algum momento de suas histórias voltam a se encontrar devido às modificações em sua área de ocorrência, transformando a estrutura das populações.

6.3 Estrutura populacional

A análise de agrupamentos encontrou o melhor número de grupos biológicos, de acordo com a média da probabilidade posterior igual a cinco (Ln Pr (X|K= 5)= -1714.38), e com base no valor de delta *K* igual a dois (ΔK = 689.360.156). A discordância quanto ao real número de agrupamentos biológicos, pode ser devido à habilidade do algoritmo não ter sido testada em um cenário que os padrões de dispersão entre as populações não são homogêneos (EVANNO; REGNAUT; GOUDET, 2005).

Nesse caso, EVANNO; REGNAUT; GOUDET, (2005) mostraram que o valor modal de ΔK detecta melhor o número de grupos, mas também enfatiza que este não deve ser assumido como único critério de detecção, simultaneamente devemos comparar o valor de probabilidade *L*(*K*), valor de α, e os padrões de atribuição individual. Desta forma, a análise de agrupamento foi realizada de três maneiras independentes.

Primeiro, utilizando todo o banco de dados, podemos assumir que o número de grupo biológico é igual a dois, usando o valor modal de delta *K* (ΔK = 689.360.156). Esta primeira estruturação pode ser atribuída às espécies, em que encontramos um grupo biológico mais homogêneo, atribuído a espécie *I. boliviensis*. O segundo grupo heterogêneo, composto por todas as demais amostras, e que atribuímos a *I. geoffrensis*.

Para testar se a heterogeneidade de ancestralidades encontrada no segundo grupo (*I. geoffrensis*) seria devido às localidades distintas que agrupamos como uma única população foi realizada o segundo teste de agrupamento. Nesta corrida, utilizamos apenas as amostras do rio Madeira, e o valores de probabilidade posterior e delta *K* novamente foram igualmente discordantes (Ln Pr (X|K= 5)= -7.801.600; ΔK = 2 = 250.681.052). No entanto, o valor de menor desvio padrão (tabela 2), assim como a

média da taxa de alteração da distribuição de verossimilhança (Ln'(K) = 315.420) e a média do valor absoluto da taxa de alteração de 2ª ordem da distribuição da probabilidade (|Ln"(K)| = 201.950), indica o real número de grupos biológicos igual a dois, concordantes com o delta *K* desta corrida e ao teste de agrupamento usando todo o banco de dados.

Gravena et al. (2015) também encontraram tal estruturação, em que os dados de microssatélites são separados em dois grandes agrupamentos, e se referem as duas espécies de botos (*I. boliviensis* e *I. geoffrensis*). Assim, utilizando o valor de *K* que melhor representa nossos dados, temos o número de grupos biológicos igual a dois.

Dentro de *I. geoffrensis* existia uma miscigenação de grupos biológicos, por isso, realizamos a terceira análise de agrupamentos com apenas esses indivíduos, e que separamos em três populações (híbridos, *I. geoffrensis* do Boca do Madeira, e *I. geoffrensis* do grupo controle). O valor de melhor probabilidade mostrou *K* = 6 (Ln Pr (X|K= 6) -9.983.100; tabela 2), no entanto, esse valor de *K* não condiz com a situação real dos botos na região. O valor de delta *K*, por outro lado, mostrou *K* = 2 (ΔK = 19.401.375; tabela 2), e é mais condizente com nossos dados. Podemos observar que esses dois grupos dentro de *I. geoffrensis* são separados nos indivíduos híbridos (menos heterogêneo), e nos demais indivíduos (*I. geoffrensis* do Boca do Madeira, e *I. geoffrensis* do grupo controle), mostrado na figura 7B.

A atribuição de dois grupos biológicos dentro de *I. geoffrensis* pode ser devido ao indivíduo da localidade Boca do Madeira ter maior conectividade ao restante dos botos da bacia Amazônica. Já os híbridos estão mais restritos ao rio Madeira, por isso menos heterogêneo. Assim, podemos assumir que todos possuem genoma nuclear de *I. geoffrensis*, mas estão estruturados em duas populações, corroborando com o cálculo do índice de fixação entre essas duas populações (F_{ST} = 0,25; tabela 3).

Geneticamente os híbridos possuem alelos nucleares das duas espécies, variando apenas na porcentagem de sua composição, de acordo com os microssatélites (GRAVENA et al., 2015). O mesmo, no entanto, não foi observado com os dados genômicos de SNPs, pois, a análise de agrupamento não encontrou evidências de misturas com o genoma nuclear de *I. boliviensis*, sendo seu genoma composto por dois dos quatros agrupamentos encontrado para *I. geoffrensis* (Figura 7B).

O fato de não encontrarmos evidencias de genoma nuclear de *I. boliviensis* nos híbridos, pode ser devido aos cruzamentos que se sucederam entre híbridos, tenha eliminado qualquer sinal de genoma da espécie introgredida (GOOD et al., 2008; KELLER et al., 2010). A ausência de sinal do genoma nuclear de *I. boliviensis* pode ser ao fato que as duas espécies tenham diferentes tamanho efetivo populacional (N_e), e que por deriva genética, os alelos introgredidos de *I. boliviensis* tenham se perdidos apenas devido ao acaso.

Em contrapartida, sabemos que o genoma mitocondrial desses indivíduos é exclusivamente de *I. boliviensis* (GRAVENA et al., 2014a), e, portanto, podem ser considerados híbridos (STEBBINS, 1959), uma vez evidenciado a introgressão de genoma mitocondrial.

Portanto, podem ser identificadas três populações dentro do rio Madeira: *I. boliviensis*, da bacia da Bolívia até a cachoeira Teotônio; híbridos, abaixo da cachoeira Teotônio; e *I. geoffrensis*, Boca do rio Madeira e demais localidades.

6.4 Dinâmica populacional e hibridização

O sequenciamento genômico tem se tornado uma ferramenta poderosa na reconstrução das relações filogenéticas de linhagens que possuem complexas histórias evolutivas, principalmente na detecção de eventos de hibridização (VONHOLDT et al., 2018). Arnold (2015) relata que a hibridização tem um importante papel nos processos evolutivos e especiação, e que na verdade, o fluxo gênico entre *taxa* é mais frequente do que imaginamos.

Por exemplo, Meier et al. (2017) encontraram múltiplos eventos de radiação adaptativa em ciclídeos de geração *hybridswarm*[1], que tiveram introgressão de uma variação funcional a partir de uma antiga mistura de genomas. Larsen et al. (2010) encontraram em uma espécie caribenha de morcegos (*Artibeus schwartzi*) uma mistura de genoma nuclear de duas espécies (*A. jamaicensis* e *A. planirostris*) e genoma mitocondrial de uma terceira espécie extinta ou de gênero não classificado. Demonstrando que ainda que raro, o fenômeno de especiação por hibridização pode ser possível na natureza.

No rio Madeira *I. boliviensis* e *I. geoffrensis* também geram híbridos, e foram registrados pela primeira vez por Gravena *et al*. (2015), mas não representam um caso isolado em cetáceos. Na verdade, mais de 20% das espécies da ordem Cetacea são conhecidas por hibridizarem (CROSSMAN; TAYLOR; BARRETT-LENNARD, 2016), tantos em grupos de vida livre quanto naqueles que vivem em cativeiro (NASCIMENTO; LOPES; DE OLIVEIRA, 2012).

Mas a hibridização, para alguns autores, pode representar uma ameaça à integridade genética das espécies (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008), pois pode "eliminar" as espécies por homogeneização do genoma, principalmente quando são espécies raras ou ameaçadas de extinção (MAYR, 1963; RHYMER; SIMBERLOFF, 1996).

A hibridização observada entre os botos no rio Madeira, por sua vez, não tem diminuído a diferenciação genética entre as duas espécies. Quando calculamos o índice de fixação, por exemplo, a média dos valores indicou alta estruturação entre as populações (F_{ST}= 0,34). Assim, podemos sugerir que a introgressão de variações possa estar ocorrendo em regiões gênicas que não estão sofrendo seleção, ou não interfiram na função adaptativa, ou ainda são sejam importantes para a diversificação das espécies.

Na verdade, a AMOVA mostrou significativos valores de estruturação entre as populações de ***Híbridos*** e ***Abaixo*** (F_{ST} = 0,25; tabela 3), e ***Híbridos***, ***Acima*** e ***Entre corredeiras*** (F_{ST} = 0,33; tabela 3). As comparações par a par, sugerem um indicativo que os híbridos são diferenciados das populações parentais.

Cahill et al. (2015) também encontraram fluxo gênico entre urso polar e pardo, mas nesse caso o fluxo foi reportado apenas do urso polar para o pardo. Essas espécies possuem substanciais diferenças morfológicas, comportamental e ecológica, mesmo assim compartilham relações evolutivas muito próximas. Por isso, são capazes de produzir híbridos viáveis e férteis (PREUSS et al., 2009; STIRLING, 2011), no entanto, o urso polar não apresenta ancestralidade comum com o urso pardo, sendo o contato entre as espécies restrito a algumas áreas de contato e eventual, e que uma barreira ao fluxo gênico não identificada esteja prevenindo que híbridos tenham sucesso no

[1] "uma população de indivíduos em que a introgressão ocorreu em vários níveis, variando o número de gerações de retrocruzamento para um ou ambos os taxa parental, além do acasalamento entre os próprios indivíduos híbridos – Rhymer e Simberloff, 1996".

cruzamento com a população de urso polar (CAHILL et al., 2015).

Portanto, a compreensão de que muitos *taxa* experimentaram fluxo gênico e introgressão ao longo de suas histórias evolutivas (ARNOLD, 2015; VONHOLDT et al., 2018), nos permite considerar a hibridização como um processo evolutivo e em ações de conservação que se concentrem na identificação do papel ou função ecológica das espécies (VONHOLDT et al., 2018). Principalmente é preciso uma compreensão detalhada das contribuições positivas e negativas da hibridização nos impactos à biodiversidade (BECKER et al., 2013), e a diversidade genética da própria espécie.

6.4.1 Estimativas populacionais

Com base nas três populações destacadas, podemos medir também o tamanho efetivo populacional e tempo de divergência, em unidade de mutação esperada por sítio que foi convertida para número de indivíduos e em anos, assumindo uma calibração estimada de 2,87 milhões de anos, a partir de um tempo médio de divergência genômica entre *I. boliviensis* e *I. geoffrensis* de 1,3 – 4,9 milhões de anos (HRBEK et al., 2014), e taxa de mutação de $1,24 \times 10^{-9}$.

Gravena et al. (2014a) estimaram o tempo de divergência de 122 mil anos entre os botos da Bolívia e os botos do rio Madeira. A partir da análise G-PhoCS encontramos que recentes tempos de divergências entre as populações do rio Madeira (40,4 mil anos entre os híbridos e *I. geoffrensis* da Boca do Madeira; e 44,7 mil anos entre a população do rio Madeira e botos do restante da bacia Amazônica – tabela 4 Gronau et al. (2011) haviam notado um reduzido poder para tempos de divergência recentes, por isso a acurácia nessas estimativas pode ser limitada.

Quanto às estimativas populacionais, estudos que se estendam por toda a área de distribuição, são de fundamental importância para a avaliação do *status* de conservação das espécies (IBAMA, 2001). No entanto, os estudos sobre densidade e abundância existentes refletem apenas partes da sua distribuição, como por exemplo, (ARAÚJO, 2010), (TAVERA et al., 2010), (ALIAGA-ROSSEL; QUEVEDO SANDRA, 2011), (ARAÚJO; DA SILVA, 2014) e, (BEST; SILVA, 1989).

As estimativas de densidades e abundância podem ainda ser diferentes dependendo da área geográfica e período sazonal que foi realizada a contagem

(TAVERA et al., 2010). O que torna ainda mais difícil estimar e a comparar os dados obtidos, mas devido aos níveis de ameaças em grande parte da distribuição de *Inia*, é importante continuar a avaliação da abundância, principalmente em áreas com projetos de desenvolvimento (TAVERA et al., 2010).

Contudo, as estimativas citadas refletem o tamanho populacional absoluto (*N*), ou de censo, que devido à razão nascimento e mortalidade podem variar amplamente. Do ponto de vista genético, o número de indivíduos que de fato estão contribuindo para as gerações seguintes (tamanho populacional efetivo - N_e), determina a taxa de deriva genética e pode ser reduzido se a proporção sexual for desbalanceada (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008; FUTUYMA, 2009).

No rio Madeira, Gravena et al. (2014a) encontram que o N_e dos botos abaixo das corredeiras é maior (131.000) do que o observado para a região da Bolívia (102.000). Enquanto que Tavera et al. (2010) haviam estimado um censo populacional de apenas ~80.000 indivíduos para região da Bolívia.

Em nossos resultados, a maior estimativa de N_e obtida no G-PhoCS encontra-se no grupo controle (9.031), condizendo com o maior número de genomas sequenciados para esse grupo. Por outro lado, a menor estimativa foi observada entre o grupo ***Acima*** das corredeiras (2.555), região da Bolívia, sendo inferior ao observado para o grupo ***Abaixo*** das corredeiras (3.358), Boca do Madeira.

No entanto, as estimativas de N_e das populações atuais são muito inferiores as estimativas do N_e das populações ancestrais (tabela 4 – Bolívia; Madeira; Amazonas). A fragmentação populacional ou efeito gargalo (*bottleneck*) pode resultar na redução no N_e (FUTUYMA, 2009), e sugerem um sinal de declínio populacional o qual não seria possível detectar apenas com as técnicas tradicionais de censo (HUANG et al., 2012).

Gargalos podem ser detectados também a partir da perda da diversidade genética, e corroboram com Banguera-Hinestroza et al. (2002) que reportaram baixa diversidade nucleotídica na Região Controle e *Citocromo b* (DNA mitocondrial) para *Inia* das bacias dos rios da Bolívia, Amazônia Colombiana e Brasileira, em comparação com os botos da bacia Orinoco.

6.5 Conservação

Como discutido acima, a Sociedade de Mamíferos Aquáticos não lista as espécies *I. boliviensis* e *I. araguaiaensis* (COMITÊ DE TAXONOMIA, 2014). Portanto, *I. geoffrensis* recebe a distribuição das três espécies, e assim como *Pontoporia blainvillei* e *Platanista gangetica*, está entre os cetáceos mais ameaçados, devido principalmente por ocorrerem em áreas de grande ocupação humana (REEVES; LEATHERWOOD, 1994; VIDAL et al., 1997).

Mesmo assim, a IUCN classifica *I. geoffrensis* como dados insuficientes (*Data Deficient* – DD). Em contrapartida, o Plano de Ação para os Mamíferos Aquáticos do Brasil classifica a espécie como *Vulnerável* (IBAMA, 2001) e na Bolívia, para o *Ministerio de Medio Ambiente y Agua* (MMAyA), *I. boliviensis* também é classificada como *Vulnerável* à extinção (MMAyA, 2011).

Para ambos, a classificação de vulnerável de *I. geoffrensis* e *I. boliviensis* se devem aos impactos causados das atividades humanas em suas áreas de distribuição. Uma vez que exercem forte pressão nos ecossistemas aquáticos devido à perda e degradação de habitats, poluição e competição por recursos naturais (REEVES, 2003; REEVES; LEATHERWOOD, 1994).

No rio Madeira, por exemplo, onde foi descrito ocorrer pelo menos três populações de *Inia* (*I. boliviensis*, híbridos e *I. geoffrensis*), na porção que existia a série de corredeiras, duas usinas hidrelétricas (UHE) foram construídas como parte central do Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) do governo brasileiro. As UHE Jirau e Santo Antônio, ambas no estado de Rondônia, e de acordo com o 4º balanço do PAC 2015-2018 já estão com todas as 50 turbinas em operação.

Quando a UHE Santo Antônio foi construída, alguns indivíduos híbridos ficaram restritos a parte alta do rio Madeira, onde são encontrados os indivíduos puros de *I. boliviensis*. Conforme discutido, as populações de botos naturalmente podem se hibridizar, e no geral, cetáceos tem histórico de hibridização (CROSSMAN; TAYLOR; BARRETT-LENNARD, 2016), assim, em um primeiro momento podemos concluir que essa acidental introdução de indivíduos não represente um problema.

No entanto, não podemos prever quais as consequências futuras para a espécie, principalmente porque ainda não sabemos quais as forças seletivas estão atuando que mantém a estruturação entre as populações. Por isso, uma introdução de espécies, ou mesmo indivíduos aparentados, sempre deverão ser estudadas e devidamente monitoradas. Considerando que tradicionalmente, em um cenário que envolve espécies ameaçadas, as medidas de conservação estarão sempre no sentido de prevenir a mistura (ALLENDORF et al., 2001; WAYNE; SHAFFER, 2016).

Outro agravante para essas populações de botos foi que as construções das duas barragens, isolaram as populações que ainda mantinham fluxo gênico, limitando drasticamente a habilidade de dispersão dos animais, sendo que a fragmentação de populações pode comprometer a diversidade genética, aumentar o nível de endogamia, e até levar ao risco de extinção (FRANKHAM; BALLOU; BRISCOE, 2008).

O baiji (*Lipotes vexillifer*), por exemplo, ocorria no rio Yangtze, na China. Mas devido às grandes modificações em seu habitat, como resultado da destruição dos ambientes naturais, a pesca elétrica ilegal, as explosões para criações de canais navegáveis, tráfego de embarcações pesadas, a poluição no rio e a construção de barragens (LIU; WANG; ZHOU, 2000; PEIXUN; YUANYU, 1987; ZHANG et al., 2003), foi declarado extinto,em 2007 (TURVEY et al., 2007). Mesmo depois de Zhou (2000) ter estimado que houvesse apenas 100 indivíduos vivos na região, os elevados níveis de alteração no habitat não permitiram que planos de conservação fossem capazes de recuperar essa espécie.

A degradação e fragmentação do habitat são aspectos considerados pela IUCN. Mas a justificativa da avaliação sobre o *status* de conservação de *I. geoffrensis* está na limitação dos estudos sobre os parâmetros populacionais, pois são, no geral, restritos a apenas algumas partes de sua área de distribuição (IUCN, 2017). Por isso, é compreendido que a classificação das espécies não signifique necessariamente que não sejam alvo de ameaças e sim, que mais dados sobre parâmetros populacionais em toda a sua extensão de ocorrência são necessários

De igual forma, o Plano de Ação dos Mamíferos do Brasil propôs algumas medidas gerais para atender as necessidades de mais estudos sobre os parâmetros populacionais dos botos da Amazônia (IBAMA, 2001). Tais como:

“**C.6.1** – Estudos sobre dinâmica populacional da espécie visando fornecer subsídios para conservação e manejo.

C.6.2 – Obtenção de estimativas populacionais, aplicando diferentes métodos para confirmação de resultado e atentando para a comparação e a variação populacional em diferentes áreas e tipos de habitats. [...]

C.6.6 – Avaliação e monitoramento de possíveis impactos decorrentes de atividades antrópicas em geral (ecoturismo, barragens, atividades petroleiras, poluição por mercúrio, projetos individuais, etc).”

Este trabalho, em complemento a muitos outros trabalhos já descritos para as espécies de *Inia*, fornece novos dados sobre a dinâmica e estrutura populacional dos botos no rio Madeira, atendendo aos requisitos listados acima.

Assim como outros cetáceos, *I. boliviensis* e *I. geoffrensis*, e mesmo os híbridos descritos, merecem *status* de conservação diante da degradação contínua de habitat e diminuição dos recursos naturais.

No entanto, sabemos que as diretrizes da IUCN excluem qualquer consideração de híbridos. Jackiw et al. (2015) observaram que no geral, as agências federais ainda consideram os híbridos como uma ameaça as espécies dignas de proteção. Mas se nos apegarmos a uma visão desatualizada de que a hibridização é algo invariavelmente "ruim”, muitas espécies em risco de extinção sofrerão (VONHOLDT et al., 2018).

Becker et al. (2013) estudando, por meio de um modelo matemático, hibridização em plantas do gênero *Pachycladon*, mostraram que quando a hibridização aumenta o potencial adaptativo das espécies, para a conservação da biodiversidade é mais viável proteger espécies que são proximamente relacionadas e hibridizam do que espécies que são isoladas geneticamente.

Portanto, podemos tomar como partida para as medidas de conservação duas maneiras de acomodar a hibridização, sugerida por vonHoldt et al. (2018): “reconhecer que uma espécie ou subespécie pode ser o resultado da hibridação ou refletir a hibridização passada ou em progresso; e permitir que a hibridização natural seja um dos fatores que tornam a população de vertebrados distinta”. Assim, podemos atribuir um

valor, nem sempre negativo, a hibridização, e nos permite estender planos de conservação às espécies ameaçadas e híbridas.

7 Conclusões

1 – Acrescentando o uso de marcadores genômicos, *Inia boliviensis* novamente mostrou evidências genéticas de pertencer a uma linhagem evolutiva distinta de *Inia geoffrensis*, por isso merece reconhecimento como espécie sob o critério filogenético de espécie.

2 – O fluxo gênico bidirecional foi observado entre as populações de botos no rio Madeira. Como resultado, a hibridização entre as espécies de *Inia*, torna-se um evento natural assim como outros casos documentados de híbridos entre os cetáceos.

3 – O modelo de isolamento por distância explica a descontinuidade na distribuição biológica. O contato apenas na zona de hibridização permite que as espécies nas áreas adjacentes mantenham suas histórias de vida independentes.

4 – Fragmentação das populações. As construções das UHE Jirau e Santo Antônio isolaram as populações de botos no rio Madeira, populações essas que ainda mantinham fluxo gênico. Ainda que essas populações já tenham histórias evolutivas distintas, o isolamento entre as populações pode aumentar o nível de endogamia, principalmente entre os indivíduos que permaneceram restritos aos reservatórios formados com as construções.

5 – Declínio populacional. Devido à fragmentação e degradação contínua de habitat e diminuição dos recursos naturais, as populações de *Inia* ao longo do rio Madeira mostraram uma redução do tamanho efetivo populacional, sugerindo um sinal que as populações tenham passado por gargalos populacionais.

6 – Conservação. Diante dos níveis de ameaças às espécies de botos que se distribuem por áreas de grande modificação, planos de conservação estendidos aos híbridos descritos, para *I. boliviensis* e *I. geoffrensis*, considerando-os como entidades independentes, devem ser avaliadas por agências de conservação.

8 Referências

ALIAGA-ROSSEL, E. **Situación actual del delfín de río (Inia geoffrensis) en Bolivia Current situation of the river dolphin (Inia geoffrensis) in Bolivia**. [s.l: s.n.], 2003.

ALIAGA-ROSSEL, E.; QUEVEDO SANDRA, A. The Bolivian river dolphin in the Tijamuchi and Ibare rivers (Upper Madeira basin) during the rainy season in "La Niña" event. **Mastozoología neotropical**, v. 18, n. 2, p. 293–299, 2011.

ALLENDORF, F. W. et al. The problems with hybrids: Setting conservation guidelines. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 16, n. 11, p. 613–622, 2001.

ANDERSON, S. Mammals of Bolivia, taxonomy and distribution. **Bulletin of the American Museum of Natural History**, n. 231, p. 1–568, 1997.

ARAÚJO, C. C. Distribuição e estimativas populacionais do boto Inia geoffrensis (De Blainville, 1817)(Iniidae) no médio rio Araguaia (Brasil Central). 2010.

ARAÚJO, C. C.; DA SILVA, V. M. F. Spatial distribution of river dolphins, Inia geoffrensis (Iniidae), in the Araguaia River (central Brazil). **Mammalia**, v. 78, n. 4, p. 481–486, 2014.

ARNOLD, M. L. **Divergence with genetic exchange**. [s.l.] OUP Oxford, 2015.

BANGUERA-HINESTROZA, E. et al. Molecular identification of evolutionarily significant units in the Amazon river dolphin Inia sp. (Cetacea: Iniidae). **Journal of Heredity**, v. 93, n. 5, p. 312–322, 2002.

BECKER, M. et al. Hybridization may facilitate in situ survival of endemic species through periods of climate change. **Nature Climate Change**, v. 3, n. 12, p. 1039–1043, 2013.

BEERLI, P.; FELSENSTEIN, J. Maximum-likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. **Genetics**, v. 152, n. 2, p. 763–773, 1999.

BEST, R. C.; DA SILVA, V. M. F. Inia geoffrensis. **Mammalian Species**, n. 426, p. 1, 1993.

BEST, R. C.; SILVA, V. M. F. DA. Amazon river dolphin, Boto. **Handbook of marine Mammals, pgs. 1-23**, 1989.

BLAINVILLE, H. M. D. Bursatella. In: CUVIER, F. (Ed.). . **Dictionnaire des sciences naturelles**. Paris: Levrault, Strasbourg & Le Normant, 1817. v. 5p. 138.

BONIFÁCIO, H. L. et al. Molecular cytogenetic characterization of the Amazon River dolphin Inia geoffrensis. **Genetica**, v. 140, n. 7–9, p. 307–315, set. 2012.

BOURREL, L.; PHILLIPS, L.; MOREAU, S. The dynamics of floods in the Bolivian Amazon Basin. **Hydrological Processes**, v. 23, n. 22, p. 3161–3167, 2009.

CAHILL, J. A. et al. Genomic evidence of geographically widespread effect of gene flow from polar bears into brown bears. **Molecular Ecology**, v. 24, n. 6, p. 1205–1217, 2015.

CAPPARELLA, A. P. Effects of riverine barriers on genetic differentiation on Amazonian forest undergrowth birds. **Department of Zoology and Physiology**, p. 96, 1987.

CASINOS, A.; OCAÑA, B. A craniometrical study of the genus Inia d'Orbigny, 1834 (Cetacea,

Platanistoidea). **Saugetierkunde Mitteilung**, v. 27, p. 194–206, 1979.

CELLA-RIBEIRO, A. et al. As corredeiras do Rio Madeira. **Peixes do rio Madeira.**, v. 1, p. 56– 63., 2013.

CHEVREUX, B. et al. Using the miraEST assembler for reliable and automated mRNA transcript assembly and SNP detection in sequenced ESTs. **Genome Research**, v. 14, n. 6, p. 1147–1159, 2004.

COHN-HAFT, M. A case study in Amazonian biogeography: vocal and DNA-sequence variation in Hemitriccus flycatchers Ph.D. Thesis, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana. 2000.

COMITÊ DE TAXONOMIA. **List of marine mammal species and subspecies**. Disponível em: <www.marinemammalscience.org>. Acesso em: 28 maio. 2017.

CRACRAFT, J. Historical Biogeography and Patterns of Differentiation within the South American Avifauna: Areas of Endemism. **Ornithological Monographs**, n. 36, p. 49–84, 1985.

CRACRAFT, J.; PRUM, R. O. Patterns and processes of diversification: speciation and historical congruence in some neotropical birds. **Evolution**, v. 42, n. 3, p. 603–620, 1988.

CROSSMAN, C. A.; TAYLOR, E. B.; BARRETT-LENNARD, L. G. Hybridization in the Cetacea: Widespread occurrence and associated morphological, behavioral, and ecological factors. **Ecology and Evolution**, v. 6, n. 5, p. 1293–1303, 2016.

D'ORBIGNY, P. M. A. **Notice sur un nouveau genre de cetacé des rivieres du centre de l'Amerique meridionale**. [s.l.] J. Didot, 1834. v. 3

DA SILVA, M. N. F. Four New Species Of Spiny Rats Of The Genus Proechimys (Rodentia: Echimyidae) From The Western Amazon Of Brazil. **Proceedings of The Biological Society of Washington**, v. 111, n. June, p. 436–471, 1997.

DA SILVA, V. M. F. **Aspects of the biology of the Amazonian dolphins genus Inia and Sotalia fluviatilisBiology**University of Cambridge, , 1994.

DA SILVA, V. M. F. Encyclopedia of Marine Mammals. In: PERRIN, W. F.; WURSING, B.; THEWISSEN, J. G. M. (Eds.). . **Encyclopedia of Marine Mammals**. London, U.K.: [s.n.]. p. 18–20.

DA SILVA, V. M. F. Boto-cor-de-rosa. In: CLAUDIA CAVALCANTE ROCHA-CAMPOS; CÂMARA, I. DE G.; PRETTO, D. J. (Eds.). . **Plano de ação nacional para a conservação dos mamíferos aquáticos: pequenos cetáceos**. Brasília: Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade, ICMBio, 2011. p. 17–20.

DA SILVA, V. M. F.; BEST, R. C. Tucuxi, Sotalia fluviatilis (Gervais, 1853). In: RIDGWAY, S. H.; HARRISON, R. (Eds.). . **Handbook of marine mammals**. Volume 5 ed. London, U.K.: ACADEMIC PRESS, 1994. p. 43–69.

DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R. A study of the boto, or Amazon River dolphin (Inia geoffrensis), in the Mamirauá Reserve, Brazil: operation and techniques. **Biology and Conservation of Freshwater Cetaceans in Asia. Occasional Paper of the IUCN Species Survival Commission No 23**, n. 23, p. 121–131, 2000.

DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R. Family Iniidae (Amazon River Dolphins). **Handbook of The Mammals of the World**, p. 364–379, 2014.

DA SILVA, V. M. F.; MARTIN, A. R. Amazon river dolphin: Inia geoffrensis. In: **Encyclopedia of marine mammals**. [s.l.] Elsevier, p. 21–24, 2018.

DE MUIZON, C. Les relations phylogénétiques des Delphinida (Cetacea, Mammalia). **Annales de paléontologie (1982)**, v. 74, n. 4, p. 159–227, 1982.

DESALLE, R.; AMATO, G. The expansion of conservation genetics. **Nature Reviews Genetics**, v. 5, n. 9, p. 702–712, 2004.

DOBZHANSKY, T. Speciation as a Stage in Evolutionary Divergence. **The American Naturalist**, v. 74, n. 753, p. 312–321, 1940.

DOYLE, J. J.; DOYLE, J. L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. 1987.

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

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

EDGAR, R. C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST. **Bioinformatics**, v. 26, n. 19, p. 2460–2461, 2010.

ELSHIRE, R. J. et al. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. **PLoS ONE**, v. 6, n. 5, p. e19379, 2011.

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

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

EXCOFFIER, L.; SMOUSE, P. E.; QUATTRO, J. M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. **Genetics**, v. 131, n. 2, p. 479–491, 1992.

FARIAS, J. G. Filogeografia E Genética De Populações De Inia Geoffrensis (Cetartiodactyla: Iniidae) Nos Rios Negro E Branco E Evidência De Linhagem Evolutiva Independente Na Bacia Do Orinoco. 2015.

FELSENSTEIN, J. Evolutionary trees from DNA sequences: A maximum likelihood approach. **Journal of Molecular Evolution**, v. 17, n. 6, p. 368–376, 1981.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. Fundamentos de genética da conservação. **Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto**, 2008.

FREELAND, J. R. **Molecular Ecology**. Southern Gate: John Wiley Sons, 2005.

FUTUYMA, D. Evolution . Sunderland, Massachusetts, USA: Sinauer Associations. **Inc. Publishers**, 2009.

GOOD, J. M. et al. Ancient hybridization and mitochondrial capture between two species of chipmunks. **Molecular Ecology**, v. 17, n. 5, p. 1313–1327, 2008.

GOULDING, M.; BARTHEM, R.; FERREIRA, E. The Smithsonian atlas of the Amazon. p. 255, 2003.

GRABERT, H. (Possible migration and phylogeny of the South American Iniidae: Cetacea, Mammalia)). **Amazoniana**, v. 8, n. 3, p. 365–374, 1984.

GRAVENA, W. O boto vermelho (Inia spp.) nos rios Madeira, Mamoré e Guaporé: distribuição, evolução e estrutura populacional. p. 157, 2013.

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, 2014a.

GRAVENA, W. et al. **Madeira River Dams and the Boto: Possible Impacts on Population Structure**. X Congreso de La Sociedad Latinoamericana de especialistas en Mamíferos Acuáticos. **Anais**...2014b

GRAVENA, W. et al. Living between rapids: Genetic structure and hybridization in botos (Cetacea: Iniidae: Inia spp.) of the Madeira River, Brazil. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 114, n. 4, p. 764–777, 2015.

GRAVENA, W. et al. Caracterização citogenética do Boto da Bolívia (Inia boliviensis): mais uma ferramenta de diferenciação entre as espécies. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1supl, p. 115, 2017.

GRONAU, I. et al. Bayesian inference of ancient human demography from individual genome sequences. **Nature Genetics**, v. 43, n. 10, p. 1031–1035, 2011.

HAFFER, J. Foreword on Species Concepts and Species Limits in Ornithology. **Handbook of the birds of the world**, v. 4, p. 679, 1997.

HAMILTON, H. et al. Evolution of river dolphins. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 268, n. 1466, p. 549–556, mar. 2001.

HRBEK, T. et al. A new species of river dolphin from Brazil or: How little do we know our biodiversity. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

HUANG, S. L. et al. Common pattern of population decline for freshwater cetacean species in deteriorating habitats. **Freshwater Biology**, v. 57, n. 6, p. 1266–1276, 2012.

IBAMA. **Mamíferos Aquáticos do Brasil: Plano de Ação - Versão II. Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis.** [s.l: s.n.].

IUCN. **The IUCN Red List of Threatened Species. Version 2017-1.** Disponível em: <www.iucnredlist.org>. Acesso em: 28 maio. 2017.

JACKIW, R. N.; MANDIL, G.; HAGER, H. A. A framework to guide the conservation of species hybrids based on ethical and ecological considerations. **Conservation Biology**, v. 29, n. 4, p. 1040–1051, 2015.

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**, v. 23, n. 14, p. 1801–1806, 2007.

KALYAANAMOORTHY, S. et al. ModelFinder: Fast model selection for accurate phylogenetic estimates. **Nature Methods**, v. 14, n. 6, p. 587–589, 2017.

KELLER, C. et al. Introgressive hybridization in Southern African baboons shapes patterns of mtDNA variation. **American Journal of Physical Anthropology**, v. 142, n. 1, p. 125–136, 2010.

KUHLWILM, M. et al. Ancient gene flow from early modern humans into Eastern Neanderthals. **Nature**, v. 530, n. 7591, p. 429–433, 2016.

LARSEN, P. A.; MARCHÁN-RIVADENEIRA, M. R.; BAKER, R. J. Natural hybridization generates mammalian lineage with species characteristics. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 107, n. 25, p. 11447–11452, 2010.

LI, C.; LU, G.; ORTÍ, G. Optimal data partitioning and a test case for ray-finned fishes (Actinopterygii) based on ten nuclear loci. **Systematic Biology**, v. 57, n. 4, p. 519–539, 2008.

LIU, R.; WANG, D.; ZHOU, K. Effects of water development on river cetacean in China. **Biology and conservation of freshwater cetaceans in Asia**, v. 23, p. 40–42, 2000.

LOVEJOY, S.; TUCK, A. F.; SCHERTZER, D. Horizontal cascade structure of atmospheric fields determined from aircraft data. **Journal of Geophysical Research Atmospheres**, v. 115, n. 13, 2010.

LYNCH, M. Estimation of nucleotide diversity, disequilibrium coefficients, and mutation rates from high-coverage genome-sequencing projects. **Molecular Biology and Evolution**, v. 25, n. 11, p. 2409–2419, 2008.

MARTIN, A. R.; DA SILVA, V. M. F. Sexual dimorphism and body scarring in the boto (Amazon river dolphin) Inia geoffrensis. **Marine Mammal Science**, v. 22, n. 1, p. 25–33, 2006.

MAYR, E. Animal species and evolution. **Animal species and evolution.**, 1963.

MCGOWEN, M. R.; SPAULDING, M.; GATESY, J. Divergence date estimation and a comprehensive molecular tree of extant cetaceans. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 53, n. 3, p. 891–906, 2009.

MEIER, J. I. et al. Ancient hybridization fuels rapid cichlid fish adaptive radiations. **Nature Communications**, v. 8, n. 1, p. 1–11, 2017.

METZKER, M. L. Sequencing technologies—the next generation. **Nature reviews genetics**, v. 11, n. 1, p. 31–46, 2010.

MMAYA. **PLAN NACIONAL PARA LA CONSERVACION DEL BUFEO BOLIVIANO (Inia boliviensis) EN BOLIVIA**, 2011.

MORITZ, C. Defining 'evolutionarily significant units' for conservation. **Trends in ecology & evolution**, v. 9, n. 10, p. 373–375, 1994.

NASCIMENTO, M. S.; LOPES, F. R. V.; DE OLIVEIRA, L. R. Hybridization phenomenon in cetacean and pinniped species. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 7, n. 3, p. 199–209, 2012.

NGUYEN, L.-T. et al. IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies. **Molecular biology and evolution**, v. 32, n. 1, p. 268–274, 2015.

PEIXUN, C.; YUANYU, H. Projected impacts of the Three Gorges Dam on the baiji, Lipotes

vexillifer, and needs for conservation of the species. **A collection of articles on the impacts of the Three-Gorges Dam project on aquatic ecosystem along the Changjiang and research on their countermeasures**, p. 30–41, 1987.

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, 2012.

PILLERI, G.; GIHR, M. **Observations on the bolivian (*Inia boliviensis* d'Orbigny, 1834) and the amazonian bufeo (*Inia geoffrensis* de Blainville, 1817) with description of a new subspeccies (*Inia geoffrensis humboldtiana*)**. [s.l.] Verlag nicht ermittelbar, 1977.

PREUSS, A. et al. Bear-hybrids: behaviour and phenotype. **Zoologische**, v. 78, n. 4, p. 204–220, 2009.

PRITCHARD, J. K. et al. Association mapping in structured populations. **American Journal of Human Genetics**, v. 67, n. 1, p. 170–181, 2000.

RANGEL, S. M. H. **Dinâmica e estrutura populacional do jacaré-açu (Melanosuchus niger) na Amazônia**. [s.l.] Instituto Nacional de pesquisas da Amazônia - INPA, 2015.

REEVES, R. R. et al. **Dolphins, whales and porpoises: 2002-2010 conservation action plan for the world's cetaceans**. [s.l.] IUCN, v. 58, 2003.

REEVES, R. R.; LEATHERWOOD, S. Dams and river dolphins: Can they co-exist? **Ambio**, v. 23, n. 3, p. 172–175, 1994.

RHYMER, J. M.; SIMBERLOFF, D. Extinction by hybridization and introgression. **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 27, n. 1, p. 83–109, 1996.

RICE, D. Marine mammals of the world, systematics and distribution (Special publication Society for Marine Mammalogy 4). **Society of Marine Mammalogy, Lawrence, Kans**, p. 1–231, 1998.

RIDLEY, M. Evolução. 3ª edição. **Porto Alegre: Artmed**, 2006.

ROSEN, D. E. Fishes from the uplands and intermontane basins of Guatemala: Revisionary studies and comparative geography. **Natural History**, v. 162, p. 267–376, 1979.

ROSENBERG, N. A. et al. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. **Genetics**, v. 159, n. 2, p. 699–713, 2001.

S., W. L.; MAYR, E. **Systematics and the Origin of Species from the View-Point of a Zoologist**. [s.l.] Harvard University Press, v. 102, 1943.

SICILIANO, S. et al. New genetic data extend the range of river dolphins Inia in the Amazon Delta. **Hydrobiologia**, v. 777, n. 1, p. 255–269, set. 2016.

STEBBINS, G. L. The role of hybridization in evolution. **Proceedings of the American Philosophical Society**, v. 103, n. 2, p. 231–251, 1959.

STIRLING, A. Pluralising progress: From integrative transitions to transformative diversity. **Environmental Innovation and Societal Transitions**, v. 1, n. 1, p. 82–88, 2011.

TAVERA, G. et al. Distribution and conservation status of the Bolivian river dolphin Inia

boliviensis (d ’ Orbigny 1832). **The Action Plan for South American Dolphins 2010-2020. WWF, Fundación Omacha, WDS, WDCS, Solamac**, v. 2020, p. 249, 2010.

TURVEY, S. T. et al. First human-caused extinction of a cetacean species? **Biology Letters**, v. 3, n. 5, p. 537–540, 28 fev. 2007.

VARUZZA, L. **Introdução à análise de dados de nova geração**. Disponível em: <ivaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf>. Acesso em: 19 abr. 2015.

VIDAL, O. Aquatic Mammal Conservation in Latin America: Problems and Perspectives. **Conservation Biology**, v. 7, n. 4, p. 788–795, 1993.

VIDAL, O. et al. Distribution and abundance of the Amazon river dolphin (Inia geoffrensis) and the tucuxi (Sotalia fluviatilis) in the upper Amazon River. **Marine Mammal Science**, v. 13, n. 3, p. 427–445, 1997.

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, n. 3, p. 275–305, 2002.

VONHOLDT, B. M. et al. Redefining the Role of Admixture and Genomics in Species Conservation. **Conservation Letters**, v. 11, n. 2, p. e12371, 2018.

WAYNE, R. K.; SHAFFER, H. B. Hybridization and endangered species protection in the molecular era. **Molecular ecology**, v. 25, n. 11, p. 2680–2689, 2016.

YAÑES, M. **Etología, ecología y conservación del delfín Inia geoffrensis en los ríos Iténez y Paraguá del Parque Nacional Noel Kempff Mercado**. [s.l: s.n.], 1999.

ZHANG, X. et al. The Yangtze River dolphin or baiji (Lipotes vexillifer): Population status and conservation issues in the Yangtze River, China. **Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems**, v. 13, n. 1, p. 51–64, 2003.

ZHOU, K. Baiji. In: PERRIN, W. F.; WÜRSIG, B.; THEWISSEN, J. G. M. (Eds.). . **Encyclopedia of marine mammals**. San Diego, CA, USA: Academic Press, p. 58–61, 2000.