

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

**INFLUÊNCIA DO PALEOVALE ENTRE OS RIOS CUIEIRAS E TARUMÃ-MIRIM
SOBRE AS POPULAÇÕES DE *Apistogramma sp.***

CAROLINA SOUSA DE SÁ LEITÃO

Manaus, Amazonas

Agosto, 2019

CAROLINA SOUSA DE SÁ LEITÃO

**INFLUÊNCIA DO PALEOVALE ENTRE OS RIOS CUIEIRAS E TARUMÃ-MIRIM
SOBRE AS POPULAÇÕES DE *Apistogramma sp.***

Orientadora: VERA MARIA FONSECA DE ALMEIDA E VAL

Agências Financiadoras: FAPEAM (Edital Universal-2011) e CNPq/FAPEAM (Projeto ADAPTA)

Tese apresentada ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus, Amazonas

Agosto, 2019

Ficha Catalográfica

L533 Leitão, Carolina de Sousa de Sá

Stream capture as barrier to gene flow in the amazon cichlid
Apitogramma sp. / Carolina de Sousa de Sá Leitão. --- Manaus:
[s.n.], 2016.

80 f.: il

Tese (Doutorado) --- INPA, Manaus, 2016.

Orientador: Vera Maria Fonseca de Almeida e Val

Área de concentração: Genética, conservação e biologia evolutiva

1. Genética de populações. 2. Ciclídeos. 3. Peixes. I. Título.

CDD 575.15

Sinopse: Este estudo teve como principal objetivo verificar se o paleovalle formado entre os rios Cuieiras e Tarumã-Mirim funciona como uma barreira geográfica para o fluxo gênico, estruturação e diferenciação de duas espécies de ciclídeos neotropicais do gênero *Apitogramma* sp. utilizando marcadores moleculares.

Palavras-chave: Ciclídeos, genética de populações, evento geológico, conservação, marcadores moleculares.

Dedico esta Tese aos meus pais Aprígio Rodrigues e Risonilce Sousa, à minha irmã Cecília Sousa, aos meus sobrinhos Murilo, Júlia e Beatriz. Em especial dedico ao meu esposo Bruno Raphael e ao meu filho Lucas Raphael.

AGRADECIMENTOS

Tendo em vista que esta seção é importante, tanto acadêmica quanto pessoalmente, decidi dividi-la em duas partes: agradecimentos profissionais e agradecimentos pessoais.

Primeiramente, venho agradecer a Deus por ter me proporcionado, além das conquistas, lições que trago até hoje em minha vida. Agradeço também a Ele por me guiar e amparar nos momentos mais complicados dessa caminhada.

Agradecimentos Profissionais

À minha orientadora Dra. Vera Maria Fonseca de Almeida e Val, por ter acreditado em mim, me incentivando, dedicando o seu tempo na minha orientação e me dando forças quando eu achava que minha vida tinha virado de cabeça para baixo ao descobrir minha gravidez. Minha "mommy", "mãe científica" e exemplo de mulher no desenvolvimento da ciência no Brasil, e em especial no Estado do Amazonas.

Ao Dr. Adalberto Luis Val, por todo suporte, dedicação e atenção. Com certeza tornou-se um dos orientadores dessa tese, sempre colocando seu ponto de vista e trazendo grandes contribuições para o desenvolvimento do trabalho. Seu exemplo faz com que eu tenha a certeza que estou cercada de grandes pessoas de bom coração e mentes brilhantes.

À MSc. Maria de Nazaré Paula-Silva, por ter proporcionado não somente a mim, mas a todos os alunos do LEEM, sua ajuda e suporte na realização e resolução de variados problemas. Naza é uma pessoa fundamental neste laboratório. Agradeço por todo seu carinho e "puxões de orelha", além do feijão preto, mingau de banana (desejo de gravidez) e torta de sonho de valsa.

Aos colegas do Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular que, de certa forma, tornaram-se uma extensão de minha família. Foram mais de dez anos neste laboratório, no qual diversas pessoas passaram e contribuíram para minha vida profissional: aos egressos Ana Cristina Menezes, Christiane Oliveira, Daniel Fagundes, Givanildo Santana, Katherine Vásquez, Luciana Melhorança, Maria Angélica Laredo, Rosalina Pinheiro, Roziete Araújo, Rúbia Maelin, Sandra Brust, Hélio Osaki, Vivian Brandão, Nislantha dos Anjos; aos atuais colegas de laboratório Arlan Paz, Daiani Kochhann, Derek Campos, Fernanda Dragan, Márcio Ferreira, Marcos Lima, Ramon Baptista, Suzana Bras Mota, Vivianne Fonseca, Waldir "Dinho" Heinrichs-Caldas; aos técnicos Reginaldo Oliveira, Rogério Pereira e Thiago Luis Nascimento, e a todos os demais que, embora não citados aqui, fizeram parte desta grande família, agradeço por toda colaboração e convivência.

À Dona Raimunda Araújo e à Raquel Abecassis por nos darem o suporte administrativo e logístico além de participarem compartilharem conosco o convívio no Laboratório, o que, de forma direta ou indireta, também contribuem com a realização dessa e das demais teses do laboratório.

À D. Sônia, D. Val e ao Wanderlan "Carequinha" pelo suporte na limpeza do laboratório e por seus cafezinhos, lanches e períodos de descontração.

Aos meus amigos de laboratório (e fora dele), sem os quais não teria tido forças para seguir: Alzira Miranda, Ana Cláudia Oliveira, Carlos Henrique, Érica Martinha, Gisele Vilarinho, Helen Sadauskas, Kátia Castro, Luciana Fé, Luciana Lima, Nayara Castro, Priscila Roberta Nascimento, Rafael Mendonça, Raíssa Alves, Renan Amanajás. Vocês tornaram meus dias de trabalho mais alegres e produtivos. Sempre se é feliz quando se tem bons amigos e se faz o que se gosta. Eu não seria tão feliz se eu não tivesse vocês!

Destaco aqui a ajuda essencial do Dr. Carlos Henrique e dos mestres Érica Martinha, Gisele Vilarinho, Nayara Castro e Waldir Heinrichs-Caldas, além da Bióloga Luciana Lima e Geólogo Pedro Val, que me auxiliaram na finalização desta tese; posso dizer que sem vocês eu não teria conseguido. Tenho o prazer de compartilhá-la com vocês.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG-GCBEV) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) pela formação profissional, bem como a todos os professores do curso que, de forma direta ou indireta, enriqueceram minha formação com novos conhecimentos.

Ao Centro Universitário de Ensino Superior do Amazonas - Ciesa, e a todos os colegas e amigos que me apoiaram e deram força para a concretização deste sonho.

Gostaria de agradecer o apoio da Sra. Alcilene de Araújo e Sr. Francisco Borges do Centro Estadual de Unidades de Conservação- CEUC/ SDS pelo apoio nas coletas e ao Centro de Integração e Aperfeiçoamento em Polícia Ambiental, administrada pela Superintendência Regional da Polícia Federal do Amazonas, pelo suporte em campo no Rio Cuieiras.

Aos Doutores Camila Ribas, Efrem Ferreira, Jansen Zuanon e Ricarto Britzke pela ajuda na identificação das espécies e na discussão dos resultados.

Aos projetos ADAPTA - CNPq/FAPEAM e UNIVERSAL/FAPEAM pelo suporte financeiro e ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular- LEEM pela maravilhosa infraestrutura.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de estudos de doutorado.

Agradecimentos Pessoais

Aos meus pais Aprígio e Nice, que sempre estiveram ao meu lado, me apoiando e acreditando na realização de meus sonhos. Minha eterna gratidão, amor e carinho. "Um sonho sonhado sozinho é um sonho. Um sonho sonhado junto se torna realidade", e vocês sonharam comigo e torceram por essa realizada. Muito obrigada por tudo!

À minha irmã, minha eterna Nenti, pelo amor, carinho e principalmente paciência e companheirismo. Você cuidou do meu filho como se fosse seu, me mostrando que além de irmãs, somos grandes amigas, podendo contar uma com a outra sempre. "Onde quer que eu esteja, você está comigo". Não posso esquecer dos meus sobrinhos Murilo, Júlia e Beatriz. Foram os melhores presente que você pôde me dar. Com eles aprendi que ser tia é amar uma pessoa que não é nossa, mas a quem nós pertencemos. É algo maravilhoso, é decididamente apaixonante e fascinante.

Ao meu esposo e companheiro Bruno Raphael Leitão, pelo carinho, amor e paciência nesses últimos anos. Sempre imaginei que um dia eu iria encontrar o homem dos seus sonhos. Ele seria seu melhor amigo, minha alma gêmea, aquele que eu poderia contar meus sonhos. Ele me faria sorrir. Ele enxugaria minhas lágrimas. Ele ficaria me admirando sem falar nada. Ele me olharia no fundo dos olhos e diria: "eu acredito em você". Então, assim, eu acreditaria e teria a certeza de que esse era o homem da minha vida. E tudo isso encontrei em você. Te amo!

Meu filho Lucas Raphael Leitão, sua vinda trouxe pra minha vida mais sentido, mais força, mais coragem. Tudo que faço é pensando em você e no que melhor puder te proporcionar. Quando Deus te enviou para mim, foi pra mostrar que eu tenho mais garra do que eu imaginava ter. Filhos são anjos que Deus coloca em nossas vidas que nos ensinam a amar, a dividir, a somar. Isso é muito mais tenho aprendido com você. Com certeza é a minha mais bela produção. Não tem *qualis* nem fator de impacto das melhores revistas que se igualem à sua importância em minha vida. Meu coração bate fora de mim, fora do meu corpo. Parte desse coração tem o olhar mais lindo do mundo e o sorriso mais cativante. Não fazia ideia do quanto esse amor me transformaria. E hoje posso afirmar que é o maior amor do mundo!

As minhas amigas de toda vida Gisele Rodrigues, Kátia Castro, Kemile Abdon e Nayara Castro. A força da nossa amizade vence todas as diferenças. Estamos sempre presentes uma na vida da outra, não só nos momentos de alegria, compartilhando prazeres, mas principalmente nos momentos mais difíceis. Essa foi uma longa caminhada e agradeço a vocês por estarem comigo sempre!

Epígrafe

“Ando devagar porque já tive pressa, e levo esse sorriso porque já chorei demais. Cada um de nós compõe a sua história, e cada ser em si carrega o dom de ser capaz, de ser feliz”.

Tocando em frente- Almir Sater

RESUMO

As alterações na paisagem da Amazônia, assim como a reorganização da rede de drenagem, podem influenciar diretamente na dinâmica das populações de peixes. Como tal, elas estabelecem mecanismos que regulam a biodiversidade local e sua distribuição nos rios da Amazônia. O presente trabalho teve como objetivo relacionar a diferenciação genética de duas populações de *Apitogramma pertensis* e de *A. gephya* com a captura do fluxo dos rios Cuieiras e Tarumã-Mirim na Amazônia Central. Foram desenvolvidos 11 marcadores microssatélites e utilizados três genes do DNA mitocondrial (*16S*, *COI* e *Cytb*) para análises populacionais e investigação do tempo de divergência entre as populações. Nossos dados sugerem que a captura do rio formou um paleovalle que impôs uma barreira física entre essas populações de peixes, as quais desenvolveram uma estrutura genética e tiveram seus fluxos gênicos reduzidos. Ainda, os dados também indicam que há expansão populacional em três das quatro populações estudadas, uma vez que a população de *A. pertensis* do rio Tarumã-Mirim encontra-se com tamanho reduzido. Portanto, sugerimos que as populações de *A. pertensis* e *A. gephya* compreendem quatro Unidades Evolutivas Significativas (ESU) nos rios Cuieiras e Tarumã -Mirim.

ABSTRACT

Landscape changes in the Amazon, such as drainage network reorganization, set important boundary conditions for the evolution of fish populations. As such, they establish mechanisms that regulate local biodiversity and its distribution in Amazon Rivers. This study aimed to relate the genetic differentiation of two populations of *Apistogramma pertensis* and *A. gephyra* with the stream capture of the Tarumã-Mirim River by the Cuieiras River in Central Amazonia. We developed 11 microsatellite markers and used a mitochondrial DNA (*16S*, *COI* and *Cytb*) to perform a population analyses, and to investigate the divergence time between them. Our data suggests that the stream capture imposed a physical barrier between these fish populations, which developed a genetic structure and resulted in a decrease of gene flow. Furthermore, the data also suggest an expansion of three, out of the four populations, excepting by the population of *A. pertensis* from Tarumã-Mirim River, which has a decreased size. Therefore, we suggest that the populations of *A. pertensis* and *A. gephyra* comprise four Evolutionary Significant Units (ESU) in the Rivers Cuieiras and Tarumã-Mirim.

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 16 |
| 2 OBJETIVOS | 22 |
| 2.1 OBJETIVO GERAL | 22 |
| 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| 3 MATERIAL E MÉTODOS | 22 |
| 3.1 COLETA DAS AMOSTRAS | 22 |
| 3.2 EXTRAÇÃO DO DNA | 24 |
| 3.3 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA DE MICROSSATÉLITES | 24 |
| 3.4 AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO E GENOTIPAGEM | 25 |
| 3.5 PURIFICAÇÃO DO PRODUTO AMPLIFICADO | 26 |
| 3.6 PRECIPITAÇÃO DO DNA | 26 |
| 3.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO | 27 |
| 3.8 ANÁLISE DOS DADOS | 27 |
| 3.8.1 Microssatélites | 27 |
| 3.8.1.1 Validação dos loci de microssatélites | 27 |
| 3.8.1.2 Diversidade Genética | 28 |
| 3.8.1.3 Diversidade Alélica | 28 |
| 3.8.1.4 Diferenciação Genética | 28 |
| 3.8.1.5 Análise de Estrutura Populacional | 29 |
| 3.8.1.6 Bottleneck - Gargalo Populacional | 30 |
| 3.8.2 DNA Mitocondrial | 30 |
| 3.8.2.1 Análise Populacional | 30 |
| 3.8.2.2 Análise Filogenética | 31 |
| 3.8.2.3 Tempo de Divergência | 31 |
| 4 REFERÊNCIAS BIBLIOFRÁFICAS | 33 |

| | |
|---|-----------|
| CAPÍTULO I: Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids <i>Apitogramma</i> spp. (Perciformes: Cichlidae): Uncovering geological influence on Amazonian fish population | 38 |
| CAPÍTULO II: Dwarf cichlids of the genus <i>Apitogramma</i> reveal Late Miocene-Early Pliocene landscape change in the Amazon | 46 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS | 76 |
| ANEXO | 77 |

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL

| | |
|--|----|
| Figura 1: Representação Geográfica do local | 17 |
| Figura 2: Esquema da captura do rio pela falha de Baependi formando o paleoval e formando o Rio Cuieiras e Tarumã-Mirim. | 18 |
| Figura 3: Espécimes representantes de a) <i>Aristogramma gephya</i> e b) <i>Aristogramma pertensis</i> | 23 |

CAPÍTULO I – Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Aristogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): Uncovering geological influence on Amazonian fish population

| | |
|---|----|
| Figure 1: Location of the study site | 40 |
| Figura 2: Structure analysis, based in 11 microsatellite loci assuming K=2. Separated analysis of <i>A. gephya</i> and <i>A. pertensis</i> | 43 |

CAPÍTULO II – Dwarf cichlids of the genus *Aristogramma* reveal Late Miocene- Early Pliocene landscape change in the Amazon

| | |
|---|----|
| Figure 1. Location and topography of the study site. Color scheme denote elevations above mean sea level and was obtained from a Digital Elevation Model (<i>Shuttle Radar Topographic Mission</i> – SRTM, http://earthexplorer.usgs.gov). Locations of samples, rivers, and features in the landscape are labeled. Modern and past directions of river flow are highlighted by arrows (see legend). | 51 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Figure 2. Structure analysis. Graphs using STRUCTURE software, based on 11 microsatellite loci assuming K=2. Analysis of all populations for both species (a); the separate analysis for <i>A. gephya</i> (b) and for <i>A. pertensis</i> (c). | 57 |
|--|----|

Figure 3: Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS). Analysis of population structure in BAPS retrieved two groups corresponding to the two species, *A. gephya* and *A. pertensis* (Figure 3 a, c) to 16S and COI. For the Cytb dataset, we observed a single cluster including *A. pertensis* and *A. gephya* samples (Figure 3e). The separated analysis showed a clearer differentiation between the rivers for both species (Figure 3 b,d,f). For 16S and COI, only one cluster was recovered within the Tarumã-Mirim River for both species, while the Cuieiras River contains 2 or 3 clusters (Figure 3 b,d). The admixture seems to be clearer for the Cytb gene: two defined clusters for *A. gephya* from Cuieiras River and an admixture between those samples with the specimens from Tarumã-Mirim River. Exclusive clusters were found for *A. pertensis* from the Tarumã-Mirim River, which may be related to the lower sample size (Figure 3f)..... 60

Figure 4: Divergence Time. Divergence times estimated through a Bayesian analysis of the concatenated data set including *COI*, *16S* and *Cytb* gene regions. The divergence dating analysis based on concatenated data suggest that the two species diverged during the Late Miocene. Within *A. gephya*, intraspecific diversification starts at 7.4 Ma. and within *A. pertensis* intraspecific diversification starts at 7.36 Ma..... 61

Figure 5 Hypothetical scenarios. Hypothetical scenarios delineated to propose an explanation for the genetic structure observed between the populations of *A. gephya* and *A. pertensis* at the Cuieiras and Tarumã-Mirim rivers: (a) *A. gephya* and *A. pertensis* populations from Tarumã-Mirim River differentiated after the geographic isolation, with the lower Tarumã-Mirim River region being influenced by populations from the lower Negro River; and/or (b) the landscape changes in the course of the Cuieiras River provided a wide area of distribution and allowed some gene flow between the species, adding more complexity to the differentiation between populations, and potentially being influenced by individuals from Anavilhanas populations just west above Cuieiras River mouth..... 63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I – Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Aristogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): Uncovering geological influence on Amazonian fish population

Table 1: Table 1. Characteristics of the eleven microsatellite *loci* in *Aristogramma gephysra* and their cross-amplification in *A.pertensis*. Loci name, Genbank accession number, primer sequences (F: forward primer, R: reverse primer), repeat motif, product size range in base pairs, number of alleles (A) polymorphism information content (PIC), expected (HE) and observed heterozygosity (HO), fixation index (F_{IS}), P values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction (P-HWE): (P: 5% ≤ 0.00455), * significant, HWE: 0,00455.

42

CAPÍTULO II - Dwarf cichlids of the genus *Aristogramma* reveal Late Miocene-Early Pliocene landscape change in the Amazon

| | |
|--|----|
| Table 1. Allelic and genetic diversity within populations of <i>A. gephysra</i> and <i>A. pertensis</i> from each river. | 55 |
| Table 2. Genetic distance (upper diagonal), F_{ST} and Nm (bottom diagonal). | 56 |
| Table 3. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of <i>A. gephysra</i> and <i>A. pertensis</i> based on the 11 microsatellite <i>loci</i> | 56 |
| Table 4: Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of <i>A. gephysra</i> and <i>A. pertensis</i> based on mtDNA genes. | 58 |
| Table 5: DNA Polymorphism and neutrality tests for <i>A. gephysra</i> and <i>A. pertensis</i> populations from Cuieiras River and Tarumã-Mirim River. | 59 |

1 INTRODUÇÃO

Uma das principais causas da distribuição geográfica dos peixes tropicais está relacionada às mudanças hidrológicas (Rossetti e Toledo, 2007). Souza Filho (1999) sugeriu que eventos tectônicos tiveram papel fundamental na dinâmica fluvial nos rios da bacia amazônica e provavelmente redesenham os cursos dos rios aos dias atuais. Neste contexto, estudos já evidenciam que os eventos tectônicos têm afetado a bacia Amazônica desde o período do Quaternário e isso conferiu à região sua paisagem atual (Franzinelli e Igreja, 2002; Almeida-Filho e Miranda 2007; Rossetti et al., 2005; Silva et al., 2007). Além disso, sugere-se que as associações dos registros geológicos, geomorfológicos e tectônicos possibilitaram uma conformação nos sistemas de paleogeografia dos rios que ocasionou mudanças repentinhas nos cursos de importantes rios da região (Latrubesse e Rancy, 2000).

Considerando o conhecimento acumulado até aqui, diversas hipóteses a respeito da origem dos padrões da biodiversidade amazônica têm sido cogitadas. Uma delas enfatiza os efeitos biogeográficos de movimentos tectônicos, bem como a formação de montanhas e rios como barreiras geográficas efetivas. Por outro lado, as mudanças na composição e distribuição das comunidades de animais e plantas decorrentes das flutuações climáticas, dos efeitos dos gradientes ambientais ou da combinação destes dois fatores, tem resultado também no isolamento geográfico e na especiação de populações (Bush, 1994).

Neste âmbito, grande parte da diversificação dos peixes de água doce e outros organismos aquáticos é atribuída às mudanças nos rios e bacias de drenagem da América do Sul. Informações de dados geológicos têm ajudado a discutir melhor os modelos de mudanças na paisagem, bem como a origem e evolução dos mecanismos de regulação da diversidade biológica na bacia Amazônica para os dias atuais. Essa nova abordagem tem permitido formular estratégias de conservação para espécies e ecossistemas que tiveram influência de eventos geológicos durante seu estabelecimento ou formação. Para a bacia amazônica, os fatores históricos que provavelmente afetaram a distribuição das espécies estão ligados à evolução geológica da bacia, como por exemplo, o soerguimento dos Andes, as introgessões marinhas e as alterações no fluxo dos rios (Rossetti e Toledo, 2007; Aleixo, 2007).

Adicionalmente, a formação de barreiras (vicariância) também tem contribuído significativamente para a separação de táxons que se divergiram em linhagens distintas. A partir disso, esse processo passou a ser entendido como um dos eventos responsáveis por interromper o fluxo gênico, podendo levar até mesmo ao processo de especiação. Diante disso, as barreiras têm tido um papel importante na formação de diferentes biotas em regiões contíguas contribuído, assim, com a diminuição ou interrupção de migração entre indivíduos de diferentes populações, provocando o surgimento de novas espécies ou o confinamento de táxons em determinadas regiões (endemismo) (Aleixo, 2007).

Numa concepção local, destacamos a região entre os Rios Cuieiras e Tarumã-Mirim (afluentes do Rio Negro) como modelo recente de mudanças nas paisagem e drenagem da bacia por ação de atividade tectônica resultando na formação de um paleovalle. Nesta região está localizada a Zona conhecida como Falha de Baependi que é tida como o principal fator responsável pela mudança no fluxo do Rio Cuieiras a sudoeste, em direção ao Rio Negro, formando-se dois novos fragmentos ou rios na região, o Igarapé Cachoeira (Rio Cachoeira) e o Rio Tarumã-Mirim, que é o reflexo do fluxo capturado do Rio Cuieiras (Val et al., 2013) (Figura 1).

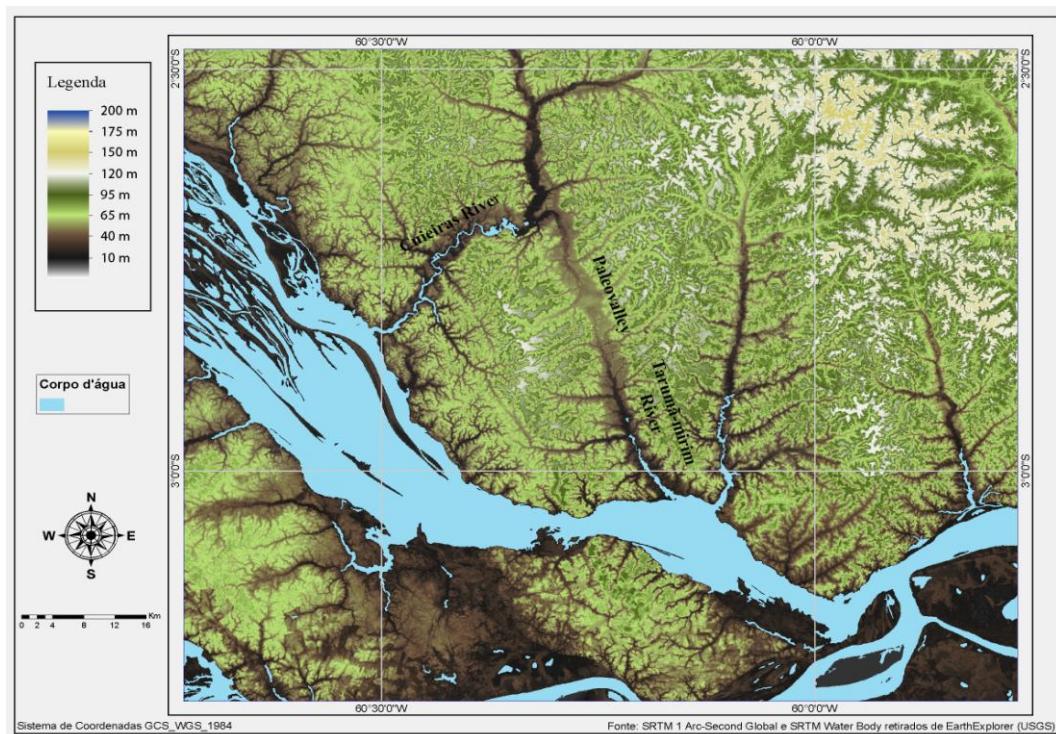


Figura 1: Representação Geográfica do local.

Fonte: Imagem creditada a Rodrigo Nahum.

Registros históricos mostram que no passado os Rios Cuieiras e Tarumã-Mirim formavam um único rio e a ação da Falha de Baependi provocou um processo de erosão que levou à captura do Rio Cuieiras formando um paleovale entre esses dois rios (Cuieiras e Tarumã-Mirim). Antes da formação do paleovale, os Rios Cuieiras e Tarumã-Mirim formavam um só rio e desembocabavam próximo à cidade de Manaus, onde hoje é a desembocadura apenas do rio Tarumã-Mirim. A Falha do Baependi ativou a captura que acabou redirecionando o Rio Cuieiras em direção ao Rio Negro deixando, com isso, restou uma cicatriz geológica ou paleovale no percurso do Rio Tarumã-Mirim (Amaral, 2009) (Figura 2).

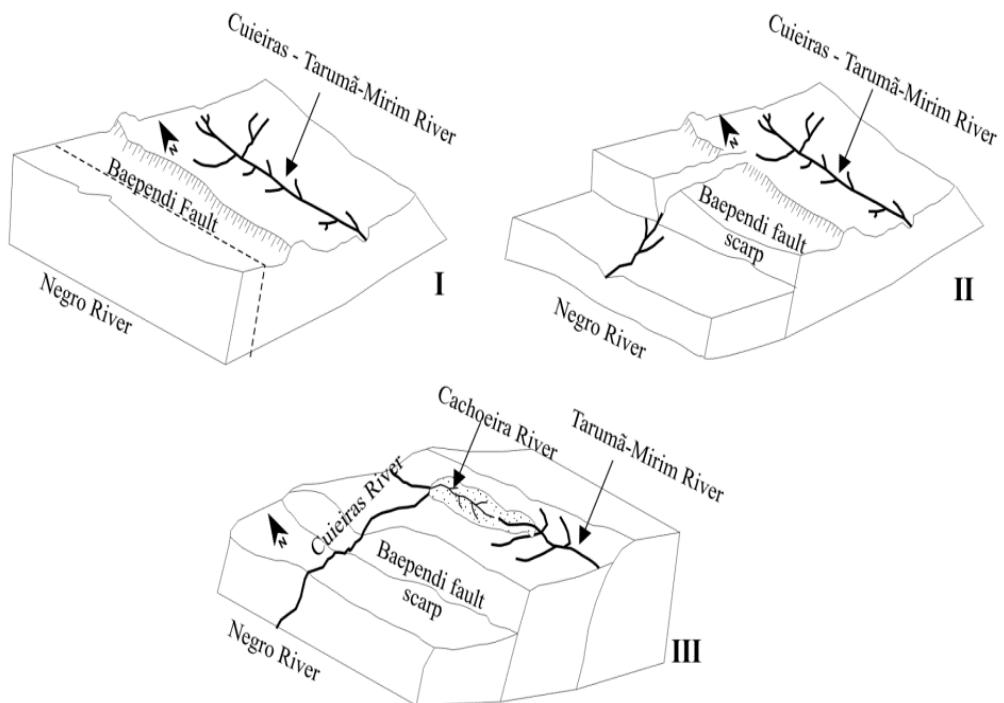


Figura 2: Esquema da captura do rio pela falha de Baependi formando o paleovale e formando o Rio Cuieiras e Tarumã-Mirim.

Fonte: Val et al. (2013).

No entanto, não se sabe como a formação do paleovale pode ter afetado ou se está afetando as populações de organismos que vivem nessa região. Diante disso, entender o efeito deste evento recente sobre populações de espécies aquáticas, como uma forma de compreendermos sua influência nas populações locais, tornou-se relevante. Para tanto, os estudos sobre modificações genéticas ocorridas nos organismos

que ali vivem pode revelar o real papel que eventos geológicos possuem na separação de populações e em processos de especiação e diversificação biológica.

Atualmente, sabe-se que determinadas espécies de peixes de pequeno porte podem apresentar desde uma ampla distribuição ou até uma restrita área de ocorrência, chegando até mesmo ao endemismo devido às alterações do ambiente onde vivem (Wise, 2011). Como exemplo podemos citar os peixes do gênero *Apistogramma*. Schmettkamp (1982) foi o primeiro autor a relatar que a maioria dos grupos de *Apistogramma* apresenta um padrão regional de distribuição e que, no geral, as espécies do gênero possuem distribuição geográfica muito limitada, sendo comum encontrar espécies endêmicas de um único rio ou de uma área alagada adjacente. Entretanto, as espécies deste gênero quase nunca são encontradas no canal principal dos grandes rios, um reflexo da história da drenagem dos rios e até mesmo da ecologia do grupo (Kullander, 2003).

Por outro lado, o gênero *Apistogramma* possui mais de 60 espécies válidas e muitas, certamente, ainda não foram descritas (Kullander, 2003; Kullander e Ferreira, 2005; Römer, 2001, 2006). A alta diversidade, o dimorfismo sexual e o dicromismo tornam a identificação das espécies de *Apistogramma* uma difícil tarefa para os taxonomistas. Diversos trabalhos já foram realizados tentando revelar as verdadeiras relações filogenéticas estabelecidas para o gênero (Kullander, 1980; Kullander, 1986; Mayland e Bork, 1997; Staek, 2003; Römer, 2001). No estudo realizado por Römer (2001), foi constatado a formação de três grupos ou linhagens de *Apistogrammas* sp., a linhagem *A. steindachneri*, a linhagem *A. agassizii* e a linhagem *A. regani*. Em cada linhagem estão incluídos diversos grupos que são subdivididos em subcomplexos ou agregados de supercomplexos, os quais são reunidos de acordo com as relações espaciais e sistemáticas estabelecidas para os membros de seus grupos.

Dados geológicos têm ajudado a compreender melhor as mudanças na paisagem. Entretanto, é necessária a escolha de ferramentas moleculares que sirvam de parâmetros para os estudos genéticos e que possam ser correlacionadas com os eventos geológicos ocorridos.

Os marcadores moleculares têm sido bastante utilizados em estudos genéticos com o objetivo de identificar linhagens de espécies, híbridos, teste de paternidade, estimativa de diversidade, fluxo gênico, taxa de cruzamento, filogenias e construção de mapas genéticos (Buso et al., 2003). Além disso, temos verificado a utilização de

marcadores moleculares em estudos genético-populacionais de diferentes organismos e estes marcadores têm sido amplamente utilizados para a elucidação de questões relativas à estruturação de populações, divergências genéticas, migração, bem como em eventos históricos (Parker et al., 1998).

Neste âmbito, os microssatélites (SSR - Standard Single Repeats) encontram-se dentre os marcadores mais utilizados atualmente em estudos populacionais, e os mesmos são bastante variáveis e encontrados ao longo do DNA ou genoma (Goldstein e Schlotterer, 1999). Os SSR são abundantes no genoma de eucariontes e procariotos, altamente polimórficos e apresentam alto conteúdo de informação por loco gênico entre todas as classes de marcadores moleculares disponíveis (Goldstein e Schlotterer, 1999). Devemos destacar também, sua elevada taxa de mutação, na ordem de 10^{-3} a 10^{-6} , por loco/gameta por geração (Schlotterer, 2000). Devido ao seu elevado nível de polimorfismo, e por apresentar herança mendeliana e apresentar um modelo evolutivo simples, os microssatélites tornaram-se os marcadores mais utilizados recentemente em estudos genético-populacionais (Matioli, 2001; Martins et al., 2002; Melo et al., 2008; Gravena et al., 2015; Santos et al., 2016).

O DNA mitocondrial (DNAm) também tem sido bastante utilizado em pesquisas de estrutura populacional, filogenias e filogeografia, pois ele tem permitido acessar facilmente um conjunto de genes ortólogos com pouca ou nenhuma recombinação e rápida taxa de evolução (taxa evolutiva do DNAm é de 5 a 10 vezes maior que a do DNA nuclear - DNAn) (Brown et al., 1979; Ballard e Rand, 2005; Chauhan e Rajiv, 2010). O genoma mitocondrial dos peixes é constituído por 13 genes codificadores de proteínas (7 subunidades da NADH desidrogenase, 3 subunidades da citocromo C oxidase, 2 subunidades da ATP sintetase e o citocromo b), 22 de RNA transportadores (RNAt), 2 de RNA ribossômicos (12S e 16S). Existe, ainda, uma região não codificadora conhecida por região controle ou alça D (*D-loop*) que contém os sítios de iniciação para replicação do DNAm e transcrição do RNA (Meyer, 1993).

Dentre os diversos genes do DNAm, o gene citocromo b (*Cyt b*) é considerado um excelente marcador, amplamente utilizado como ferramenta em filogenias moleculares, sendo provavelmente o gene mitocondrial mais conhecido em relação à estrutura e função de seu produto proteico (Eposti et al., 1993). O uso do *Cyt b* se justifica pela presença de regiões conservadas e variáveis, as quais contêm sinais que podem ser utilizados em análises filogenéticas em diferentes níveis taxonômicos. O

gene Citocromo Oxidase I (*COI*) foi escolhido como marcador universal e é responsável por codificar parte de uma enzima terminal da cadeia respiratória das mitocôndrias, apresentando baixa variação dentro da mesma espécie quando comparada com outras espécies (Ward et al., 2009). Já o gene *16S* é um dos transcritos do RNA ribossômico – rRNA que, através de suas análises, torna possível inferir a estrutura populacional, bem como diagnosticar parentescos entre os seres vivos e as mudanças evolutivas entre dois grupos que divergiram de um mesmo ramo (Damineli e Damineli, 2007).

Marcadores moleculares têm sido utilizados para a avaliação da estrutura populacional associada a estudos de eventos geológicos (Templenton et al., 1995). Os padrões de diversificação das populações e espécies na região tropical têm sido associados principalmente à influência das incursões marinhas (Hubert e Renno 2006) e dos processos paleogeográficos relacionados com os surgimento dos Andes (Hoorn et al., 2010) que datam principalmente do Mioceno, além da influência das flutuações climáticas do Pleistoceno, da demografia e da variabilidade genética entre populações (Hubert et al., 2007).

A informação da estruturação genética é um parâmetro fundamental na biologia evolutiva e conservação. Altos níveis de variação genética podem aumentar o potencial das populações em responder à seleção, assim como acentuar a adaptação dentro de um *habitat* particular e também de ampliar os limites de colonização e distribuição, possibilitando a sobrevivência em grande variedade de ambientes (Carvalho, 1993).

Em geral, as espécies de peixes não são geneticamente homogêneas, mas estruturadas em grupos de indivíduos que são relativamente isolados. A identificação de grupos geneticamente homogêneos é a unidade básica para a gestão e manejo dos peixes, conservação e uso sustentável dos recursos genéticos (Laikre et al., 2005). Em tal contexto, é claro que os níveis de estrutura genética são o tipo de informação que suporta as estratégias de gestão e manejo das unidades populacionais exploradas (Ricker, 1981). Assim, determinar e identificar as populações de peixes são tarefas importantes para distinguir uma população dentre um conjunto de sub-populações geograficamente distribuídas cuja demografia e história evolutiva são, em grande parte, independentes de outros grupos e apresentam algum grau de isolamento reprodutivo (Cadrin e Secor 2009; Santos et al., 2016).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho é verificar se o paleovalle formado entre os rios Cuieiras e Tarumã-mirim funciona como uma barreira geográfica para duas espécies de ciclídeos neotropicais do gênero *Aristogramma* sp. utilizando marcadores moleculares.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar se o paelovalle entre o rio Cuieiras e o Tarumã-Mirim é uma barreira geográfica que impede a distribuição e o fluxo gênico entre as populações das espécies *Aristogramma gephya* e *Aristogramma pertensis* e se podemos considerá-las como populações distintas;
- Comparar se as populações das duas espécies de *Aristogramma* estão geneticamente estruturadas a ponto de não mais compartilharem informação genética;
- Correlacionar, por meio das análises de genes mitocondriais, o período geológico no qual as populações se divergiram com o período aproximado de formação do paleovalle;
- Verificar se eventos geológicos como o paleovalle formado entre os rios Cuieiras e Tarumã-Mirim funcionam como matrizes para diversificação de populações de *Aristogramma*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

As populações utilizadas neste trabalho foram capturadas em três pontos do rio Cuieiras (S 02°70' W 60°38'; S 02°69' W 60°32'; S 02°68' W 60°36') e três pontos do Tarumã-Mirim (S 02°95' W 60°21'; S 02°93' W 60°22'; S 02°91' W 60°22'). Um total de 111 indivíduos foram coletados e as seguintes espécies foram capturadas:

Apistogramma gephyra (74 indivíduos) e *A. pertensis* (37 indivíduos) (Figura 3). As coletas foram realizadas utilizando a arte-de-pesca conhecida como rapiché, margeando os pequenos córregos de águas rasas, serapilheira e pequenas áreas alagadas. O esforço de coleta (local e tempo) foi o mesmo para os dois rios. Os indivíduos foram mantidos em gelo e, em seguida, realizada a secção medular. A seguir, as amostras foram colocadas em tubos esterilizados contendo álcool 70% e transportadas ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM/INPA), onde foram transferidos para um freezer -80 °C para posterior extração de DNA.



Figura 3: Espécimes representantes de a) *Apistogramma gephyra* e b) *Apistogramma pertensis*.

Fonte: Créditos das imagens para Ricardo Britzke.

As coletas dos animais foram realizadas com as licenças obtidas junto ao IBAMA (Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais), sob numeração SISBIO 34130-1 (Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade) de 14/06/2012 e do CEUA/INPA 048/2012 (Comitê de Ética no Uso de Animais/ Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia). A metodologia de coleta e eutanásia aplicada no estudo seguiram as normas do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal).

3.2 EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA genômico total foi extraído via fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) (Sambrook et al., 1989), com algumas modificações. Aproximadamente 50g do peixe foram digeridos a 65°C por 3 horas com 330 µL de tampão lise (10mM Tris-HCl, 125 mM NaCl, SDS a 10%, 10mM EDTA pH 7,5), 10µL de proteinase K (Fermentas - Thermo Fisher Scientific), 100µL de RNase (Invitrogen) e 100µL Dithiothreitol (Biosynth Chemistry and Biology Rietistr Switzerland). Após a digestão, as amostras foram lavadas com 700 µL de fenol-clorofórmio-álcool isoamílico (25:24:1) e 420µL de isopropanol gelado. Posteriormente, o *pellet* foi lavado com 250 µL de etanol a 70% e suspenso novamente em 50µL de água livre de DNase. Ao final da extração, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% corado com GelRed (Invitrogen), visualizado em equipamento transluminador de imagem molecular L-PIX (Loccus Biotecnologia) com posterior quantificação do DNA extraído no equipamento espectofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

3.3 CONSTRUÇÃO DA BIBLIOTECA GENÔMICA ENRIQUECIDA DE MICROSSATÉLITES

A construção da biblioteca genômica enriquecida de microssatélites foi realizada utilizando o DNA genômico total de um exemplar de *Apistogramma gephyra* proveniente do rio Cuieiras e a metodologia utilizada para a construção da biblioteca foi descrita por Billotte et al. (1999), com algumas modificações. Abaixo segue a descrição da técnica empregada para construção da biblioteca:

O DNA genômico foi digerido utilizando a enzima de restrição *Rsa* I (GT↓AC; 10 u/µL) e incubado “overnight” (durante uma noite) a 37°C, onde foram gerados fragmentos de tamanhos adequados (300 – 1.200 pb). A ligação dos fragmentos digeridos a dois adaptadores – *Rsa*21 (5'-CTCTTGCTTACGCGTGGACTA-3'; 10 µM) e *Rsa*25 (5'-TAGTCCACGCGTAAGCAAGAGCACA-3'; 10 µM) foi realizada com o objetivo de garantir que todos os fragmentos digeridos apresentassem uma terminação comum e conhecida. Após a ligação dos adaptadores foi realizada uma PCR (Reação em Cadeia de Polimerase) para aumentar a quantidade de fragmentos e garantir que a ligação ocorresse, utilizando para isso o adaptador *Rsa*21 como iniciador na reação. O

produto da PCR foi então purificado utilizando o kit de purificação (Quiaquick PCR purification kit - Qiagen cat. nº 23106) e, em seguida, a seleção dos fragmentos contendo microssatélites foi realizada utilizando-se, para isso, *beads* magnéticas e oligonucleotídeos de microssatélites biotinilados (Biotina – IIII(CT)₈ e IIII(GT)₈; 50 µM). Após a seleção dos fragmentos foi realizada uma reação de PCR com o intuito de gerar fitas duplas e garantir uma grande quantidade de produto amplificado para posterior purificação. Após essa etapa, foi realizada a ligação dos fragmentos amplificados via PCR ao vetor de clonagem pGEM-T (Promega), sendo em seguida o produto desse processo inserido em células competentes de *Escherichia coli* (XL1-BLUE) em meio sólido LB, contendo X-galactosidase (X-Gal; 30µg/mL), Isopropil β-D-tiogalactopiranosidase (IPTG; 30µg/mL) e ampicilina (100 µg/mL). Para manutenção dos clones utilizamos placas ELISA com fundo em U, contendo meio de cultura 2YT-HMFM (200 µL) e ampicilina (100 µg/mL) e incubados “overnight” a 37°C para o crescimento dos clones. Em seguida, foi realizada a amplificação dos insertos clonados para garantir que realmente os clones transformados contivessem os mesmos. A etapa seguinte foi isolar o DNA plasmidial das colônias recombinantes e preparar a reação de sequenciamento utilizando BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems) e os *primers* T7 (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3') e SP6 (5'-GATTAGGTGACACTATAG-3'). Para finalização, um total de 96 clones foi selecionado e sequenciado em um sequenciador de DNA automático Applied Biosystems 3130 xl Genetics Analyzer.

3.4 AMPLIFICAÇÃO DO PRODUTO E GENOTIPAGEM

A caracterização de 11 locus de microssatélites da espécie *Apistogramma gephyra* foram testados e realizado a transferibilidade para a espécie co-gênero *A. pertensis*

Reações em Cadeia de Polimerase (PCR) foram realizadas utilizando o equipamento 96- Well Veriti Thermal Cycler (Applied Biosystems- Life Technologies- Grand Island, NY) com uma solução final de 10µL. Cada reação continha 2.0µL do DNA genômico (50ng/µL), 1.0µL do primer forward (iniciador 5'-3') (0.5mM), 1.5µL primer reverse (iniciador 3'-5') (0.5mM), 1.0µL do primer fluorescente

FAM com cauda M13 (0.5mM) e 4.5 µL de PCR Master Mix 2X (Fermentas - Thermo Fisher Scientific) contendo Taq DNA Polymerase (0.05U), MgCl₂ (1.5mM) e dNTPs (0.4mM). As condições de amplificação foram: 94°C por 3 min; 20 ciclos a 94°C por 20s, 47°C a 65°C por 20s e 68°C por 30s; 25 ciclos a 94°C por 20s, 53°C por 20s e 68°C por 30s, e uma extensão final a 72°C por 10 min. Os produtos amplificados foram confirmados em eletroforese em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Invitrogen), visualizando em equipamento transluminador de imagem molecular L-PIX (Loccus Biotecnologia). As amostras foram genotipadas no sequenciador de DNA automático ABI 3130 xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems) utilizando o GeneScan Liz-500 (-250) como matriz. Para a determinação do tamanho dos fragmentos e tamanho dos alelos foi utilizado o programa GeneMapper v4.0 (Applied Biosystems).

3.5 PURIFICAÇÃO DOS PRODUTOS AMPLIFICADOS

As bandas específicas de cada gene foram purificadas pelo sistema de eletroforese em tempo real E-Gel®CloneWell (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. O sistema Sybr Safe permite que o produto amplificado seja automaticamente purificado no decorrer da corrida eletroforética e as bandas visualizadas em luz azul. A concentração do gel de agarose foi de 2% e cerca de 20 µL de amostra de PCR (450 ng/µL) foram inseridos no gel, juntamente com um marcador de peso molecular. Cada produto purificado foi, em seguida, quantificado em espectrofotômetro (Nanodrop 2000 - Thermo Fisher Scientific).

3.6 PRECIPITAÇÃO DO DNA

A precipitação do DNA foi realizada em placa com 96 poços, com a adição de 2,5 µL de EDTA (125 mM) em cada poço. Em seguida foram adicionados 30 µL de Etanol absoluto (Merck), tendo a placa permanecido em temperatura ambiente por 15 minutos. A centrifugação por 30 minutos a 2.000 rpm ocorreu a seguir, com temperatura de 4°C. Em seguida a placa invertida foi centrifugada por um minuto a 100 rpm. Após a centrifugação, adicionou-se 30 µL de Etanol (Merck) a 70% em cada poço com centrifugação por 15 minutos a 1.650 rpm, e 4 °C. Inverteu-se a placa, a qual foi

centrifugada novamente por um minuto a 100 rpm e, após secar ao abrigo da luz, foram adicionados 10 µL de formamida Hi-Di a cada poço.

3.7 REAÇÃO DE SEQUENCIAMENTO

Os genes do DNA mitocondrial (DNAm_t) foram amplificados e sequenciados. *16S*, citocromo *b* (*Cytb*) e citocromo oxidase I (*COI*), utilizando iniciadores sintetizados para cada gene, em um volume total de 25 µL, incluindo 2,5 µL de Tampão de PCR 10x, 1,0 µL de MgCl₂ (50 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM de cada nucleótido), 0,3 µL de Taq DNA polimerase Platinum® (Invitrogen), 0,3 µL de cada iniciador (10 µM), e 1 µL de DNA (100 ng / µL), sendo o volume completado com água livre de DNase. As amplificações foram realizadas com o seguinte perfil de PCR: desnaturação inicial a 94 °C durante 2 min, seguido de 35 ciclos com desnaturação a 94 °C durante um min, anelamento a 50-51 °C durante um min, a extensão a 72 °C durante um min, e uma extensão final a 72 °C durante 5 min. As amostras foram sequenciadas no sequenciador de DNA automático ABI 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems).

3.8 ANÁLISE DOS DADOS

3.8.1 Microssatélites

3.8.1.1 Validação dos locos microssatélites

Para a validação dos novos locos de microssatélites utilizamos o programa MICRO-CHECKER v2.3 (van Oosterhout et al., 2004) que avaliou a possível presença de alelos nulos, erros de “scoring” relacionados à retirada de alelos grandes e ao pico de gaguejo ou “stutter”. O programa GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al., 2004) foi utilizado para medir a diversidade genética a partir do número de alelos por locos (\bar{A}), heterozigosidade observada (\hat{H}_O) e esperada (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o índice de fixação (f). O conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) foi calculado pelo programa CERVUS v3.0.3 (Kalinowski et al. 2007) que relaciona a heterozigocidade esperada (\hat{H}_e) para cada loco. O teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) e o desequilíbrio de ligação (LD) foram calculados utilizando o programa

FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001) por meio de comparações múltiplas simultâneas (Rice, 1989) ao nível de significância de 5%, aplicando-se a correção de Bonferroni para todos os locos.

3.8.1.2 Diversidade genética

A estimativa da diversidade genética foi analisada utilizando a estimativa da frequência alélica, o número de alelos por locos (\hat{A}), número efetivo de alelos por locos (\hat{A}_e), heterozigosidade observada (\hat{H}_O) e esperada (\hat{H}_e) em equilíbrio de Hardy-Weinberg, o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC) e o índice de fixação (f). O número efetivo de alelos por locos (\hat{A}_e) foi calculado utilizando a seguinte fórmula matemática: $\hat{A}_e = 1 / (1 - \hat{H}_e)$. Todas estas análises, exceto o número efetivo de alelos por locos (\hat{A}_e) e o conteúdo de informação de polimorfismo (PIC), foram realizadas utilizando o programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001), GDA v1.1 (Lewis e Zaykin, 2000) e GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al., 2004). O PIC foi calculado utilizando o programa CERVUS v3.0.3 (Kalinowski et al., 2007). O número de alelos privados e raros foram calculados utilizando o programa GDA v1.1 com aplicação para cada locos e população. Hartl e Clark (2010) relatam que para se considerar a presença de um alelo raro em uma população é necessário que sua frequência esteja abaixo de 0,005.

3.8.1.3 Diversidade Alélica

A diversidade alélica foi determinada pelo programa GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al., 2004) determinando o tamanho amostral (N), número total de alelos (TNA), número médio de alelos (MNA), número de alelos efetivos (NEA), número de alelos privados (NPA) e riqueza alélica (RA).

3.8.1.4 Diferenciação genética

Como forma de quantificar o efeito de endocruzamento da subdivisão populacional em organismos naturais, nós aplicamos o índice de fixação (Wright, 1921)

que equaliza a redução na heterozigosidade esperada com o cruzamento aleatório em qualquer nível populacional hierárquico relativo a outro nível mais inclusivo na hierarquia. Esse índice é um indicador útil de diferenciação genética, pois permite uma comparação objetiva do efeito geral da estrutura populacional entre diferentes organismos, sem entrar em detalhes nas frequências alélicas e nos níveis de heterozigosidade observada (Hartl e Clark, 2010).

Portanto, os níveis de diferenciação genética entre todos os sítios de amostras foram analisados utilizando a estatística F de Wright (F_{IT} , F_{IS} e F_{ST} ; Weir e Cockeham, 1984) usando o programa FSTAT v2.9.3.2 (Goudet, 2001). Em outra ordem de investigação da estrutura genética nas amostras, aplicamos o índice F_{ST} , que assume o modelo de alelos infinitos (IAM, *Infinite Allele Model*), e o R_{ST} (Slatkin, 1995), que assume o modelo de mutação escalonada (SMM, *Stepwise Mutation Model*), ambos índices foram calculados para todos os locos utilizando o programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) foi realizada com o software ARLEQUIN v3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

3.8.1.5 Análise de estrutura populacional

Nas análises da estrutura populacional, nós aplicamos o modelo de mistura (*Admixture*) ancestral que correlaciona a frequência gênica entre as populações utilizando o programa STRUCTURE v2.3.1 (Pritchard et al., 2000; Falush et al., 2003), com um “burn-in” (repetições) de 50.000 seguido por 200.000 passos pelo teste de Monte Carlo em Cadeia de Markov (MCMC). Nós também aplicamos o valor do ΔK (sugerido por Evanno et al., 2005) para identificar o mais alto nível de hierarquia de divisão genética, no qual dividimos as populações e repetimos as análises para cada divisão. Uma corrida para cada análise foi realizada para $K = 1$ e $K = \text{número de amostras de populações} + 2$, com dez réplicas para cada K . Para complementação das análises de estruturação das populações, aplicamos uma análise de correspondência factorial – FCA (*Factorial Correspondence Analysis*; Benzecri, 1973) utilizando o programa GENETIX v4.05.2 (Belkhir et al., 2004), que referencia a distância genética entre as populações, podendo, com isso, detectar possíveis indivíduos fora do grupo “*outliers*”.

3.8.1.6 Bottleneck – Gargalo Populacional

Foram analisados possíveis sinais de gargalos populacionais recentes (excesso de heterozigotos) dentro dos grupos estudados utilizando o programa BOTTLENECK (Cornuet e Luikart, 1996; Piry et al., 1999). Esta análise foi aplicada para detectarmos gargalos populacionais de não mais do que $2N_E$ - $4N_E$ por gerações no passado, dependendo da gravidade do gargalo e da taxa de mutação dos locos analisados. Para tanto, o programa utiliza três modelos de mutação os quais são: (1) modelo de alelo infinito (IAM); (2) modelo de mutação escalonada (SMM); e (3) modelo de duas fases de evolução (TPM, um intermediário entre o IAM e SMM). Contudo, não utilizamos o modelo de IAM, pois os modelos SMM e TPM são os mais adequados para avaliar os dados de microssatélites (di Rienzo et al., 1994). Dessa forma, nós aplicamos 95% (SMM) e 5% (TPM) para várias etapas das mutações, com uma variação de 12% entre os vários passos, como recomendado por Piry et al. (1999).

3.8.2 DNA Mitocondrial

A qualidade das sequências dos genes mitocondriais foi verificada a partir da visualização do eletroferograma gerado pelo sequenciador. O alinhamento das sequências foi feito usando o programa Clustal W associado ao programa Geneious R7.1.8 (Lakin et al., 2007; Biomatters Ltd).

3.8.2.1 Análise Populacional

Estimativas da diversidade genética dos genes mitocondriais incluem o número total de haplótipos (N), a diversidade haplotípica (h) e nucleotídica (P) (Nei 1987). Essas estimativas foram obtidas usando o programa DNAsp v5.10.1 (Librado e Rozas 2009). O teste de Tajima - “Tajima's D” (Tajima, 1989) e o teste de Fu - “FS de Fu” (Fu, 1997) foram realizados para verificar a ocorrência de expansão populacional recente em populações de *Aristogramma*, usando DNAsp V5.10.1 (Librado e Rozas, 2009).

Foi também realizada uma Análise Molecular de Variância (AMOVA) utilizando a estrutura hierárquica da população com o programa ARLEQUIN v3.5 (Excoffier & Lischer, 2010). Também realizamos uma análise populacional para

verificar a variação intraespecífica e interespecífica, utilizando abordagens Bayesianas utilizando o BAPS 4.14 (Corander et al., 2007) no qual o número de grupos foi definido por meio de um algoritmo que estima a distribuição de frequências de haplótipos de todas as populações testadas.

3.8.2.2 Análise Filogenética

Para as análises filogenéticas, verificamos qual o modelo de substituição de DNA foi mais apropriado para cada gene separadamente utilizando o programa JMODELTEST v.2.1.5 (Darriba et al., 2012; Gascuel e Guindon, 2003). Para testar os genes concatenados foi utilizado o programa PARTITIONFINDER v.1.1.1 (Lanfear et al., 2012). As análises de Máxima Verossimilhança (ML) foram realizadas no programa RaxML v.8.1 (Stamatakis, 2014), utilizando o modelo pré-selecionado GTR+CAT, com 100 árvores iniciais e 1000 réplicas de bootstrap (Felsenstein, 1985). Para as análises de inferência Bayesiana (IB) foi utilizado o programa MrBayes v.3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001), com quatro corridas independentes executadas por 4×10^6 gerações, sendo que as árvores foram amostradas a cada 1.000 gerações; 72.512 árvores foram utilizadas para construir a árvore de consenso estrito com burn-in de 0.25. A árvore foi visualizada pelo programa FigTree v.1.4.2 (Rambaut 2014).

3.8.2.3 Tempo de Divergência

O tempo de divergência foi estimado usando os genes do DNAm (COI, 16S e Cytb) com inferência Bayesiana, realizada pelo programa BEAST v.1.8.2 (Drummond et al., 2012), excluindo amostras com falhas no sequenciamento e escolhendo amostras com a sequência completa. Seguimos a calibração por fóssil proposta por Genner et al., (2007): (a) a primeira calibração foi feita utilizando os ciclídeos Africanos e Neotropicais com 40.0 milhões de anos; e (b) a segunda calibração com o grupo dos *Aristogramma* que datam de 15.0 milhões de anos atrás. As árvores, modelos de substituição e relógio molecular estavam ligados entre as partições. Usamos como parâmetros iniciais o modelo de substituição HKY, empírico, com o modelo de heterogeneidade de gamma; relógio relaxado não relacionado com distribuição lognormal; e modelo de especiação de Yule. Foram realizadas quatro cadeias MCMC

com comprimento de 5×10^7 e amostragem a cada 3.5×10^2 gerações. A convergência das cadeias foi verificada no programa TRACER v.1.6.0 (Rambaut et al., 2013) que leva em consideração o efeito do tamanho da amostragem (ESS). O TREE ANNOTATOR v1.8.2 (Rambaut e Drummond, 2015) foi utilizado para compilar a árvore de consenso, visualizada posteriormente pelo FIGTREE v.1.4.2 (Rambaut, 2014).

4 REFERÊNCIAS

1. Aleixo, A.; Rossetti, D.F. 2007. Avian gene trees, landscape evolution, and geology: towards a modern synthesis of Amazonian historical biogeography? *Journal of Ornithology*, 148(2):S443-S453.
2. Almeida-Filho, R.; Miranda, F.P. 2007. Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: Evidences in SRTM digital elevation model. *Remote Sens Environ* 110: 387-392.
3. Amaral, F.R.; Silva, C.L.; Maia, T.F.A.; Val, P.F.A.; Ribeiro, O.L.; Morales, N. 2009. *Controle neotectônico no paleocanal do Tarumã-Mirim, noroeste de Manaus (AM)*. In: Simpósio Nacional de Estudo Tectônico, XII, Ouro Preto (MG). Anais do Simpósio Nacional de Estudo Tectônico- Ouro Preto: SBG 56.
4. Ballard, J.W.O.; Rand, D.M. 2005. The population biology of mitochondrial DNA and its phylogenetic implications. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 36:621-42.
5. Belkhir, K.; Borsig P.; Chikhi L.; Raufaste N.; Bonhomme, F. 2004. *GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations*. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5171, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
6. Benzecri, J.P. 1973. *L'Analyse des donnees. vol 2: L'Analyse des Correspondances* Dunod, Paris.
7. Billotte, N.; Lagoda, P.J.R.; Risterucci, A.M.; Baurens, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54, 277–288.
8. Brown, W. M.; George, M.J.R.; Wilson, A.C. 1979. Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci.* 76: 1967-1971.
9. Bush, B.M. 1994. Amazonian speciation: a necessary complex model. *Journal of Biogeography*, 21: 5-17
10. Buso, G.S.C.; Ciampi, A.Y.; Moretzsohn, M.C.; Amaral, Z.P.S. 2003. Protocolo para desenvolvimento de marcadores microsatélites. *Circular Técnica, 20. 1º Edição. Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia*, Brasília, Distrito Federal, 11pp.
11. Cadrin, SX; Secor, DH. 2009. Accounting for spatial population structure in stock assessment: past, present, and future. Pp. 405–425 in R. J. Beamish, B. J. Rothschild, eds., *The future of fisheries science in North America, Fish & Fisheries Series, Chapter 22. Springer Science Business Media B.V.*, New York, USA
12. Carvalho, G.R. 1993. Evolutionary aspects of fish distribution: genetic variability and adaptation. *J. Fish Biol.* 43: 53-73.

13. Chauhan, T.; Rajiv, K. 2010. Molecular markers and their applications in fisheries and aquaculture. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 1: 281-291.
14. Cornuet, J.M.; Luikart, G. 1996. Description and power analysis of two tests for detecting recent population bottlenecks from allele frequency data. *Genetics*, 144: 2001-2014.
15. Damineli, A. Damineli, D. S. C. 2007. *Origens da Vida*. Estudos avançados vol.21 n. 59 São Paulo Jan./Apr.
16. Esposti, D.M.; De Vries, S.; Crimi, M.; Ghelli, A.; Patarnello, T.; Meyer, A. 1993. Mitochondrial cytochrome b: evolution and structure of theprotein. *Biochim Biophys Acta*, 1143:243–271.
17. Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to performance populations genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 564-567.
18. Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. 2003. Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164: 1567-1587.
19. Franzinelli, E.; Igreja, H.L.S. 2002. Modern sedimentation in the lower Negro River. Amazonas state, Brazil. *Geomorphology* 44: 259-271.
20. Goldstein, D.B.; Schlotterer, C. 1999. Microsatellites: Evolution and Applications. *Oxford University Press*, 352p.
21. Goudet, J. 2001. *FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3)*. Available from <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>.
22. Hartl, D.L.; Clark, A.G. 2010. *Princípios de genética de populações*. In: Utz LRP, Borges-Osório MR, Fagundes NJR. (tradutores). 4º edição, Porto Alegre: Artmed, 660p.
23. Hoorn, C.; Wesselingh, F.P.; Steege, H.T.; Bermudez, M.A.; Mora, A.; Sevink, J.; Sanmartín, I.; Sanchez-Meseguer, A.; Anderson, C.L.; Figueiredo, J.P.; Jaramillo, C.; Riff, D.; Negri, F.R.; Hooghiemstra, H.; Lundberg, J.; Stadler, T.; Särkinen, T.; Antonelli, A. 2010. Amazonia Through Time: Andean Uplift, Climate Change, Landscape Evolution, and Biodiversity. *Science*. 330: 927. DOI: 10.1126/science.1194585.
24. Kalinowski, S.T.; Taper, M.L.; Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106.
25. Kullander, S.O. 1980. A taxonomical study of the genus *Apistogramma regan*, with a revision of Brazilian and Peruvian species (Teleostei: Percoidei: Cichlidae). *Bonner Zoologische Monographien*, 14: 1-152.

26. Kullander, S.O. 1998. *A phylogeny and classification of the South American Cichlidae (Teleostei: Perciformes)*. In: Malabarba, LR, Reis RE, Vari RP, Lucena ZM, Lucena CAS. Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes, Part 5. Edipucrs. RS, Brasil.
27. Kullander, S.O. 2003. *Family Cichlidae*. In: Reis RE, Kullander SO, Ferraris Junior CJ Check List of the Freshwater Fishes of South and Central America. Porto Alegre: EDPUCRS 605-654.
28. Kullander, S.O.; Ferreira, E.J.G. 2005. Two new species of *Apistogramma regan* (Teleostei: Cichlidae) from the rio Trombetas, Pará State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3(3): 361-371.
29. Laikre, L; Palm, S; Ryman, N. 2005. Genetic population structure of fishes: implications for coastal zone management. *Ambio* 34:111–119.
30. Latrubblesse, E.M.; Rancy, A. 2000. Neotectonic influence on tropical rivers of southwestern Amazon during the late Quaternary: the Moa and Ipixuna river basins, Brazil. *Quaternary International*, 72: 67-72. In: Silva, C.L.S.; Rossetti, D.F. 2009. História geológica dos rios Na Amazônia. *Ciência e Cultura*, São Paulo, 61(3):24-26.
31. Lewis, P.O.; Zaykin, D. 2000. *Genetic Data Analysis: computer program for the analysis of allelic Data*, Version 1.0. (d15). University of Connecticut, Storrs, Connecticut.
32. Martins, C.; Porto-Foresti, F.; Wasko, A. P.; Leitão, G. R.; Oliveira, C.; Foresti, F. 2002. Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura. *Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento*, 28:12-15.
33. Matioli, S.R. Biologia Molecular e Evolução. 2008. Ed. Holos, Ribeirão Preto, SP, Brasil.
34. Mayland, H.J.; Bork, D. 1997. South American dwarf cichlids. *Apistogramma Crenicara Microgeophagus*. Hannover: Verlag; A.C.S. Glaser, 188pp.
35. Melo, D. C.; D. Oliveira, A. A.; Seerig, A., Carvalho, D. C. 2008. Aplicações práticas de marcadores microssatélites na caracterização genética e identificação de plantéis de tilápia. *Revista Brasileira de Reprodução Animal*. 32(4):220-224.
36. Meyer, A. 1993. Evolution of mitochondrial DNA in fishes. *Biochemistry and Molecular Biology of Fishes*, 2:1-38.
37. Parker, P.G.; Snow, A.A.; Schug, M.D.; Booton, G.C.; Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, Durham. 79: 361-382.
38. Piry, S.; Luikart, G.; Cornuet, J.M. 1999. Bottleneck: a computer program for detecting recent reductions in the effective population size using allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90: 502-503.

39. Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
40. Ricker, WE. 1981. Changes in the average size and average age of Pacific salmon. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 38:1636– 1656.
41. Romer, U. 2001. *Cichlid Atlas: natural history of South American dwarf cichlids*. Melle: Mergus-Publishers
42. Romer, U. 2006: *Cichlids Atlas: natural history of South American dwarf cichlids*. Melle Mergus- Publishers v.2
43. Rossetti, D.F.; Toledo, P.M.; Góes, A.M. 2005. New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Res* 63:78-89.
44. Rossetti, D.F.; Toledo, P.M. 2007. Environmental changes in Amazonia as evidenced by geological and paleontological data. *Revista Brasileira de Ornitologia*. 15: 251-264.
45. Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, New York
46. Schlotterer, C. 2000. The evolution of molecular markers. - Just a metter of fashion? *Nature Reviews. Genetics*. London 5: 63-69.
47. Schmettkamp, W. 1982. *Die Zwergcichliden Südamerikas Landbuch-Verlag GmbH Hannover*, 176pp
48. Silva, C.L.; Morales, N.; Crósta, A.P.; Costa, S.S.; Jimenez-Rueda, J.R. 2007. Analysis of tectonic-controlled fluvial morphology and sedimentary processes of the western Amazon basin: an approach using satellite images and digital elevation model. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 79: 693-711.
49. Slatkin, M.A. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 130: 457-462.
50. Souza- Filho, P.W.M.; Quadros, M.L.E.S.; Scandolara, J.E.; Silva, E.P.; Reis, M.R. 1999. Compartimentação morfoestrutural e neotectônica do sistema fluvial Guaporé-Mamoré-Alto Madeira, Rondônia-Brasil. *Revista Brasileira de Geociências*, 29(4): 469-476. In: Silva, C.L.S., Rossetti, D.F. 2009. História geológica dos rios Na Amazônia. *Ciência e Cultura*, São Paulo, São Paulo, 61(3):24-26.
51. Staech, W. 2003. *Cichliden-Lexicon. Ettlingen: Dähne Verlag*, Südamerikanische Zwergbunt-barsch 3, 219p.
52. Toffoli, D; Hrbek, T; Araujo, M.L.G.; Almeida, M.P.A. Charvet-Almeida, P; Farias, I.P. 2008. A test of the utility of DNA barcoding in the radiation of the freshwater stingray genus Potamotrygon (Potamotrygonidae, Myliobatiformes) - *Genetics and Molecular Biology*, 31(1), 324-336.

53. Val, P.F.A.; Silva, C.L.; Harbor, D.; Morales, N.; Amaral, F.R.; Maia, T.F.A. 2013. Erosion of an active fault scarp leads to drainage capture in the Amazon region, Brazil. *Earth Surf Proc Land.* 39: 1062–1074
54. van Oosterhout, C.; Hutchinson, W.F.; Wills, D.P.M.; Shipley, P. 2004. Micro-Checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.
55. Ward, R.D.; Zemlak, T.S.; Innes, B.H.; Last, P.R.; Hebert, P.D.N. 2005. DNA barcoding Australia's fish species. *Philosophical transactions of The Royal Society B*, 360: 1847–1857.
56. Weir, B.S.; Cockerham, C.C. 1984. Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution: International Journal of Organic Evolution*, 38: 1358–1370.
57. Wise, M. 2011. *A description of Apistogramma species-groups*. Available <http://apisto.sites.no/page.aspx?PageId=116>.
58. Wright, S. 1921. Systems of mating. *Genetics*, 6: 111–178.

CAPÍTULO I

Submit to

"Journal of Applied Ichthyology"

Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Apistogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): Uncovering geological influence on Amazonian fish population

Carolina S. S. Leitão, Carlos H. A. Santos, Érica M. S. Souza, Gisele C. C. Vilarinho, Maria N. Paula-Silva, Pedro Val, Adalberto L. Val, Vera M. F. de Almeida-Val

Title: Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Aristogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): uncovering geological influence on amazonian fish population

Short-running title: Microsatellite loci in cichlids *Aristogramma* spp.

Carolina S. S. Leitão¹, Carlos H. A. Santos^{1,2}, Érica M. S. Souza¹, Gisele C. C. Vilarinho¹, Maria N. Paula-Silva¹, Pedro Val³, Adalberto L. Val^{1,2}, Vera M. F. de Almeida-Val^{1,2}

¹ Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Av. André Araújo, 2936, Aleixo, Manaus, 69060-001, Brazil

² Universidade Nilton Lins, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação Aquicultura. Avenida Professor Nilton Lins, 3259. Parque das Laranjeiras, Manaus, 69058-030, Brazil

³ Scripps Institution of Oceanography. University of California, San Diego, La Jolla, CA 92093

Correspondence

Carolina S. S. Leitão Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Amazonas, Brazil

Email: kcaufs@gmail.com

Funding information

Universal Project from FAPEAM (021/2011) and INCT-ADAPTA from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPQ) (CNPQ, 573976/2008-2 and FAPEAM, 3159/08).

INTRODUCTION

Aristogramma is the richest genus of Neotropical cichlids, with more than 100 valid species and probably species not described (Römer, 2006). The *Aristogramma* species live near on river banks, which have an extensive amount of woody debris and a thick leaf layer ("serrapilheira"), an adequate place to establish their breeding nest (Engelking et al., 2010). Also, these dwarf cichlids occur in all types of water (clear, black and white waters) in nearly the entire Neotropical lowland region (Römer, 2006). As one of the occurrence area of *Aristogramma*, Cuieiras and Tarumã-mirim rivers

arise during the Pleistocene (~ 1.3 Ma), these two rivers were a single river during the past and after an stream capture on the ancient river occurred the paleovalley formation which provide the rise to the two rivers (Val et al., 2014). Thus, the paleogeographic history of the Cuieiras and Tarumã-Mirim rivers constitute an ideal study area to investigate the geological and anthropogenic effects on the genetic structure. In addition, the development of species-specific molecular markers (microsatellites) has become crucial for application in genetic-population studies in target species. Quéroutil et al. (2015) developed the first microsatellites for *Apistogramma*, however, remaining a gap for a species-specific marker. Therefore, we proposed the development of microsatellites with transferability between species, and it will be important tools for future population studies of *Apistogramma* from Amazonian.

MATERIALS AND METHODS

We collected 74 individuals of *A. gephyra* (34 from Cuieiras River - RC, and 40 from Tarumã-Mirim River - TM) and 39 individuals of *A. pertensis* (27 from RC and 12 from TM) (Figure 1).

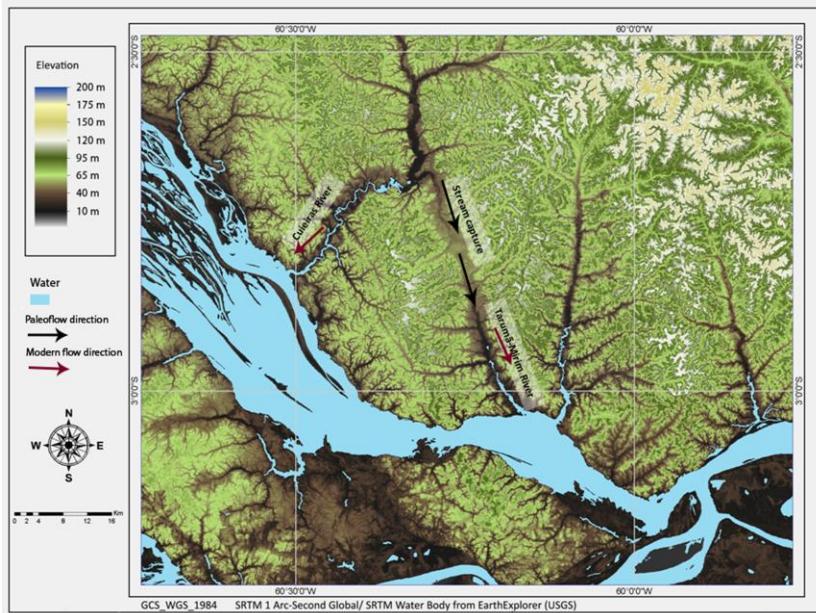


Fig. 1. Location of the study site.

Landscape of the Cuieiras and Tarumã-Mirim rivers caused by a stream capture that resulted in the paleovalley between them.

The microsatellite loci were developed from the enriched genomic library (Billotte et al., 1999). DNA genomic was extracted and the PCR reaction were performed using 50 ng of DNA, forward and M13 Label primer (FAM) at 0.4 μ M, reverse at 0.8 μ M, and PCR Master Mix (Fermentas®). We used Applied Biosystems 3130xl platform to analyze the products (GeneScan Liz-500 (-250) and scored the alleles by Genemapper v4.0. We developed primers flanking 11 microsatellite loci for *A. gephysra*, which cross-amplified in *A. pertensis*. We tested the occurrence of null alleles by Micro-checker v2.2 (van Oosterhout et al., 2004), the Hardy–Weinberg (HWE) and Linkage Disequilibrium (LD) using Fstat v2.9.3.2 (Goudet 2001). The total number of alleles (A), estimate of the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosity, structuring index (F_{ST}), and fixation index (F_{IS}) by Genetix v4.05.2 (Belkhir et al., 2004). The polymorphism information content (PIC) was calculated using Cervus v3.0.3 (Kalinowski et al., 2007). We applied the mixture model (Admixture) which correlates the gene frequency among the populations, using Structure v2.3.1 (Pritchard et al., 2000).

RESULTS

The 11 pairs of microsatellite loci were polymorphic and successfully cross-amplified on *A. pertensis* (Table 1). We did not detect linkage disequilibrium and null alleles between the microsatellite loci. The number of alleles per locus varied from two to eleven for *A. gephysra* and from three to eleven for *A. pertensis*. The PIC ranged from 0.475 to 0.784 (*A. gephysra*) and from 0.434 to 0.810 (*A. pertensis*). For *A. gephysra*, the H_O and H_E varied, respectively, from 0.267 to 0.966 and from 0.402 to 0.819; and for *A. pertensis*, they varied from 0.115 to 0.963 and from 0.110 to 0.842, respectively. The F_{IS} values ranged from -0.572 to 0.351 for *A. gephysra*, and from -0.706 to 0.489 for *A. pertensis*. Two loci for *A. gephysra* (APG07 and APG23), and three loci for *A. pertensis* (APG07, APG20, and APG23) deviated significantly from HWE.

Table 1. Characteristics of the 11 microsatellite loci in *Apistogramma gephyra* and cross-amplification in *A. pertensis*

| Locl | GenBank accession | Primer sequence (5'-3') | Repeat motif | Allele size (bp) | <i>Apistogramma pertensis</i> | | | | | | <i>A. geophyra</i> | | | | |
|-------|-------------------|---|--|------------------|-------------------------------|----------------|----------------|-----------------|--------|---------|--------------------|----------------|----------------|-----------------|--------|
| | | | | | PIC | H _E | H _O | F _{IS} | HWE | A | PIC | H _E | H _O | F _{IS} | |
| APG07 | KJ372869 | F: GACTACATATCCCATCT R: AGCTGTGGATTCATTTC | (GT) ₆ | 198 | 3 | 0.652 | 0.536 | 0.929 | 0.706 | 0.0001* | 3 | 0.672 | 0.596 | 0.900 | 0.497 |
| APG18 | KJ372870 | F: TGAAGATTAGAACACCG R: TGAACCACTAGACATGATG | (GT) ₉ | 151 | 7 | 0.472 | 0.253 | 0.276 | 0.072 | 0.5709 | 7 | 0.475 | 0.402 | 0.267 | 0.351 |
| APG21 | KJ372871 | F: ACAGAAACACACACTG R: ACACCATCCAGAACACAAAT | (CT)CA ₆ | 82 | 9 | 0.810 | 0.842 | 0.900 | -0.052 | 0.5546 | 11 | 0.736 | 0.772 | 0.733 | 0.067 |
| APG23 | KJ372872 | F: TCACCAACTGGCTCTG R: AGATTAACCACTGGCTTA | (GT) ₃ TT(GT) ₆ | 164 | 3 | 0.524 | 0.523 | 0.897 | -0.705 | 0.0001* | 3 | 0.512 | 0.523 | 0.828 | 0.572 |
| APG24 | KJ372873 | F: TTAACTCCACTAGTCAG R: GAAAGCAAGTGAGTGAG | (CA) ₂ TA(CA) ₇ | 167 | 11 | 0.810 | 0.836 | 0.931 | -0.096 | 0.1517 | 9 | 0.693 | 0.775 | 0.966 | 0.230 |
| APG08 | KJ372874 | F: GTATGACAGTTAAAGTGGAT R: CTAAACAAAGAACCTCACACA | (GG) ₉ | 164 | 3 | 0.562 | 0.421 | 0.500 | -0.169 | 0.2986 | 4 | 0.540 | 0.603 | 0.800 | -0.312 |
| APG11 | KJ372875 | F: CATAAGGTGTGGGGAGA R: TGTGCTGGAGACTGATCAT | (TG)TG(TG)TC (TG) ₂ | 197 | 9 | 0.809 | 0.79 | 0.857 | -0.055 | 0.3617 | 8 | 0.784 | 0.819 | 0.767 | 0.082 |
| APG16 | KJ372876 | F: TGAAGAAAGTGGAGATGAG R: CTGATGAGGCCCTACAG | (GT) ₃ GA(GT) ₆ | 293 | 8 | 0.642 | 0.615 | 0.679 | -0.086 | 0.2970 | 7 | 0.635 | 0.565 | 0.733 | -0.282 |
| APG14 | KJ372877 | F: CAGAGGTGATTGTAGTC R: CATCACAAAGAGGTAGCC | (CA)CG(CA) ₆ | 210 | 3 | 0.434 | 0.110 | 0.115 | -0.027 | 0.9455 | 4 | 0.587 | 0.650 | 0.586 | 0.115 |
| APG15 | KJ372878 | F: AACCTGAATATCTGGAGGG R: TACTGTGCTCCATCTTGC | (TG) ₆ TT(G) ₂ | 286 | 4 | 0.574 | 0.359 | 0.190 | 0.489 | 0.9992 | 2 | 0.340 | 0.475 | 0.556 | -0.153 |
| APG20 | KJ372879 | F: AGGATTCGGAGGTAACTG R: GGTTCTAGATGCCATTCT | (CA)CG(CG) ₆ (GG)CA ₆ | 284 | 7 | 0.737 | 0.669 | 0.963 | -0.423 | 0.0003* | 7 | 0.620 | 0.596 | 0.643 | -0.060 |

Number of alleles (A) polymorphism information content (PIC), expected (HE) and observed heterozygosity (HO), fixation index (F_{IS}), P values for the HWE test, significance threshold adjusted using Bonferroni correction (P-HWE): (P: 5% ≤ 0.00455), * significant, HWE: 0,00455.

The F_{ST} was 0.228 in *A. pertensis* and 0.128 in *A. gephysra*. The structure showed that $K = 2$ and a separation between the species analyzed (Figure 2).

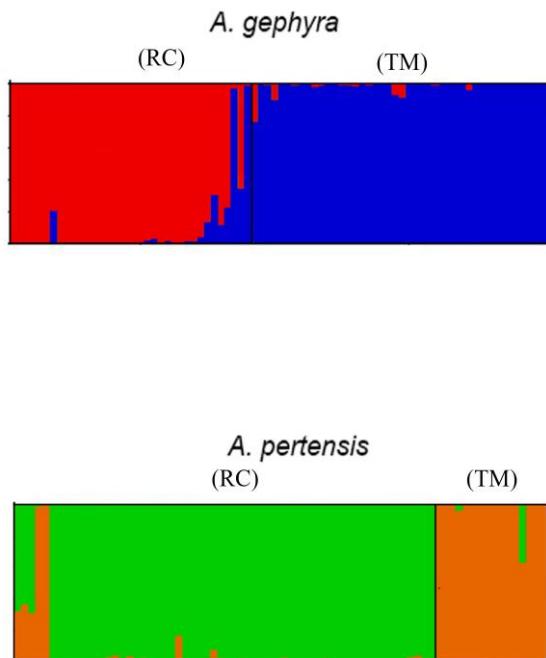


Fig. 2. Structure analysis, based in 11 microsatellite loci assuming K=2.
Separated analysis of *A. gephysra* and *A. pertensis*.

DISCUSSION

The results for allelic and genetic diversity confirm the low gene flow between the same species from different rivers. We found a low average number of alleles and a high number of private alleles (Table 1) and the structure data (Figure 2) which demonstrate a higher reproductive isolation and a diversification among the studied populations (Slatkin 1995). The mixture absent of the same species collected in different streams was interpreted as a geographic isolation between the rivers caused by the drainage capture event, which reduced the gene flow between them (Figure 1). Montoya-Burgos (2003) suggest that the geographic isolation contributed significantly to the high differentiation among the analyzed populations and affected small populations more than selection itself. Although, in time scale, how landscape change affect the population and species differentiation? In our case, when the population differentiation occur, before or after the stream capture? Herein, we detected that the eleven polymorphic microsatellite loci are highly variable and potentially useful tools for

genetic research in the Amazonian dwarf cichlid's populations. In conclusion, this is the first set of species-specific microsatellite loci developed for species of Amazonian dwarf cichlid *A. gephya* with successful cross-amplification in the species congener *A. pertensis*, which analysis resulted in a clear evidence of population structure and vicariance effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank colleagues for assistance in collecting and providing specimens, and R. Britzke for the genetic identification.

REFERENCES

- Belkhir, K., Borsa P., Chikhi, L., Raufaste, N., Bonhomme F. 2004. GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France).
- Billotte, N., Lagoda, P.J.R., Risterucci, A.M., Baurens, F.C. 1999. Microsatellite-enriched libraries: applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits* 54, 277– 288.
- Engelking, B., Römer, U., Beisenherz, W. 2010. Intraspecific colour preference in mate choice by female *Aistogramma cacatuoides* HOEDEMAN, 1951 (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Vertebr. Zool.*, 60:3: 199-208.
- Goudet, J. 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. (version 2.9.3.2). Available from <http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.html>. Updated from: Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *J. Hered.*86, 485–486.
- Kalinowski, S.T., Taper, M.L., Marshall, T.C. 2007. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Mol. Ecol.* 16, 1006-1099.
- Montoya-Burgos, J.I. 2003. Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Mol. Ecol.* 12: 1855–1867.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., Shipley, P. 2004. Microchecker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Mol. Ecol. Notes* 4:535–538.

- Pritchard, J. K., Stephens, M., Donnelly, P. J. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*. 155:945–959.
- Quéroutil, S., Vela Diaz, A., García-Dávila, C., Römer, U., Renno, J. F. 2015. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in neotropical fish of the genus *Aristogramma* (Perciformes: Labroidei: Cichlidae). *J. Appl. Ichthyol.*, 31(S4), 52-56.
- Römer, U. 2006. Cichlids Atlas: natural history of South American dwarf cichlids. MelleMergus- Publishers v.2.
- Slatkin, M.A. 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*. 130: 457-462
- Val, P., Silva, C., Harbor, D., Morales, N., Amaral, F., & Maia, T. (2014). Erosion of an active fault scarp leads to drainage capture in the Amazon region, Brazil. *Earth Surface Processes and Landforms*, 39(8), 1062-1074.

CAPÍTULO II

Submit to

"*Freshwater Biology*"

Dwarf cichlids of the genus *Apistogramma* reveal Late Miocene-Early Pliocene landscape change in the Amazon

Carolina Sousa de Sá Leitão; Carlos Henrique dos Anjos dos Santos; Érica Martinha Silva de Souza; Pedro Val; Camila Cherem Ribas; Adalberto Luis Val; Vera Maria Fonseca de Almeida-Val

Dwarf cichlids of the genus *Apistogramma* reveal Late Miocene-Early Pliocene landscape change in the Amazon

Short running title: Dwarf cichlids reveal landscape change in the Amazon

Carolina Sousa de Sá Leitão^{1*}; Carlos Henrique dos Anjos dos Santos; Érica Martinha Silva de Souza^{1,3}; Pedro Val²; Camila Cherem Ribas¹; Adalberto Luis Val¹; Vera Maria Fonseca de Almeida-Val¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Amazonas, Brazil

²Universidade Federal de Ouro Preto, Departamento de Geologia, Escola de Minas, Ouro Preto, Minas Gerais, Brazil

³Universidade Estadual de Campinas, Departamento de Genética, Evolução, Microbiologia e Imunologia, São Paulo, Brazil

Correspondence

Carolina Sousa de Sá Leitão, Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, 69060-001, Manaus, Amazonas, Brazil.

Abstract

1. Landscape changes in the Amazon such as drainage network reorganization influence the distribution range and connectivity of aquatic populations and, therefore, their evolution. This study estimates the influence of a river capture involving two tributaries of the lower Negro River through molecular dating based on the divergence time between populations of two dwarf cichlids, *Apistogramma pertensis* and *A. gephyra* in the Cuieiras and Tarumã-Mirim river basins in the eastern Amazon.
2. Genetic differentiation among populations and divergence time were inferred based on 11 microsatellite markers and three mitochondrial genes (*Cytochrome b*, *Cytochrome Oxidase subunit I*, and *16S ribosomal RNA*). The data were analyzed

using computational packages for genetic analysis of microsatellites and genes (mitochondrial or genomic).

3. Population analyses suggest an isolation between rivers, although this result is not clear in the phylogenetic analyses. These analyses were performed with concatenated data; often the amount of missing data is related to the difference between the results of these analyses. Molecular dating analysis points to median population divergence ages of approximately 7.4 million years ago. The results suggest that the studied populations comprise Evolutionary Significant Units (ESU) that have been isolated by the river capture event. These findings provide evidence of a mechanistic link between isolation and differentiation of fish populations and river network evolution, indicating that a dynamic geologic history in this region can cause diversification. Lastly, these results are beneficial to conservation assignments.

Keywords: microsatellite, mitochondrial genes, fish, Amazon, vicariance

Introduction

Uplift of the Andes, marine introgressions, and broad modifications in river networks are some of the most significant changes in the Amazonian landscape since the Paleogene (*Rossetti & Toledo, 2007; Hoorn et al., 2010*). The past climatic and geologic events played important roles in building the modern biogeography and biodiversity observed in Amazonia (*Rull, 2011*). Nonetheless, the biotic consequences of local landscape changes that occurred in response to the regional and continental landscape changes such as the formation of the transcontinental Amazon River remain poorly understood.

Geological processes continuously modify the configuration of the drainage network in the Amazon Basin and constitute one of the main causes of Amazonian paleogeographic evolution (e.g. *Hoorn et al., 2010; Stokes, Goldberg, & Perron, 2018*). The continental extension of the rivers constitute local barriers that prevent gene flow in many terrestrial species (*Ribas, Aleixo, Nogueira, Miyaki, & Cracraft 2012; Naka, Bechtoldt, Henriques, & Brumfield 2012; Boubli et al., 2015*). As the position of rivers changed during the geologic past, new barriers emerged and resulted in the structuring or speciation of the isolated populations (*Ribas, Aleixo, Nogueira, Miyaki, &*

Cracraft 2012; Fernandes, Cohn-Haft, Hrbek, & Farias, 2015; Boubli et al., 2015; Alfaro et al., 2015).

Changes in the Amazonian landscape were drastic from the late Miocene through the early Pleistocene, a period of multiple evolutionary stages of the Amazon drainage (*Figueiredo, Hoorn, van der Ven, & Soares, 2009; Hoorn et al., 2010, 2017; van Soelen et al., 2017*). Continental and marine sedimentologic and stratigraphic data indicate that Neogene Andean tectonism and Plio-Pleistocene climatic fluctuations contributed to biotic and landscape changes in Amazon (*Hoorn et al., 2017*). Despite a broad understanding of the continental landscape changes, the timing of regional and landscape changes remain poorly constrained in Amazonia. As the evolution of the biotas is directly influenced by the landscape (*Ribas, Aleixo, Nogueira, Miyaki, & Cracraft 2012; Fernandes, Cohn-Haft, Hrbek, & Farias, 2015; Escobar, Andrade-López, Farias, & Hrbek, 2015; Gravena, Silva, Silva, Farias, & Hrbek, 2015*), estimating the timing of divergence among endemic taxa may inform when specific changes to the landscape happened.

Spatial patterns of aquatic biodiversity in the Amazon region are particularly promising in the investigation of barrier-induced interruption of gene flow, especially because the aquatic organisms are limited by the environments where they live, more so than terrestrial or aerial species. Although the evolutionary and ecological forces underlying the formation of this diversity are incompletely understood, the molecular analyses would significantly increase our ability to test models and hypotheses that address the complex relationship between biological evolution and paleogeographic history in the Amazon drainage basin (*Lovejoy, Willis, & Albert, 2010*).

Dwarf cichlids of genus *Apistogramma* are small fishes (typically 20 to 60 mm, standard length (SL), >100 species) belonging to the tribe Geophagini (*Römer, 2006; Tougard et al., 2017*) and, represent an excellent group in which to study the biological evolution and the paleogeographic history of Amazon basin. Most *Apistogramma* species have distribution restricted (endemic), although they occupy nearly the entire Neotropical region east of the Andes (*Römer, 2000; Kullander& Ferreira, 2005*). According to *Römer* (2006), the seasonal or geological water-level fluctuations may have played an important role in *Apistogramma* speciation events by isolating populations and favoring the establishment of reproductive barriers. Although many species of *Apistogramma* still remain undetected, new species have been discovered in

the Amazon basin in recent years (see *Kullander & Ferreira, 2005; Varella & Pérez, 2014; Britzke, Oliveira, & Kullander, 2014; Staeck & Schindler, 2016*). Endemic fish populations may have been isolated from widely distributed ones due to landscape changes (*Wise, 2011a,b; Albert, Schoolmaster-Junior, Tagliacollo, & Duke-Sylvester, 2017*), which makes them an ideal target to study speciation related to geologic drivers of landscape change.

These cichlids occur in all types of river waters (clear, black, and white) and are hardly found in the main channels (*Kullander, 2003*). Also, there are many cryptic species in the genus and its richness is underestimated (*Quérout, Diaz, García-Dávila, Römer, & Renno, 2015*). Their territoriality provides a low migration rate among populations in the environment, increasing the genetic structuring between them. Also, this group is considered a good bioindicator for conservation biology, since it rapidly responds to changes in the environment (*Römer, 2006*).

The Cuieiras and Tarumã-Mirim rivers were once a single south-flow channel that was captured by a tributary of the Negro River, forming two drainage basins now separated by the former river valley (i.e. physical barrier) (*Val et al., 2014*) (see Figure 1). The causes for events of drainage capture in the Amazon region are not well understood. Arguably, the Cuieiras and Tarumã-Mirim rivers are a typical example of drainage capture in the Amazon region, possibly caused by tectonic factors, which culminated in an erosive process across an active fault-scarp (a topographic step) lead to stream capture and separation of what was once an integrated drainage basin (*Val et al., 2014*) (Figure 1).

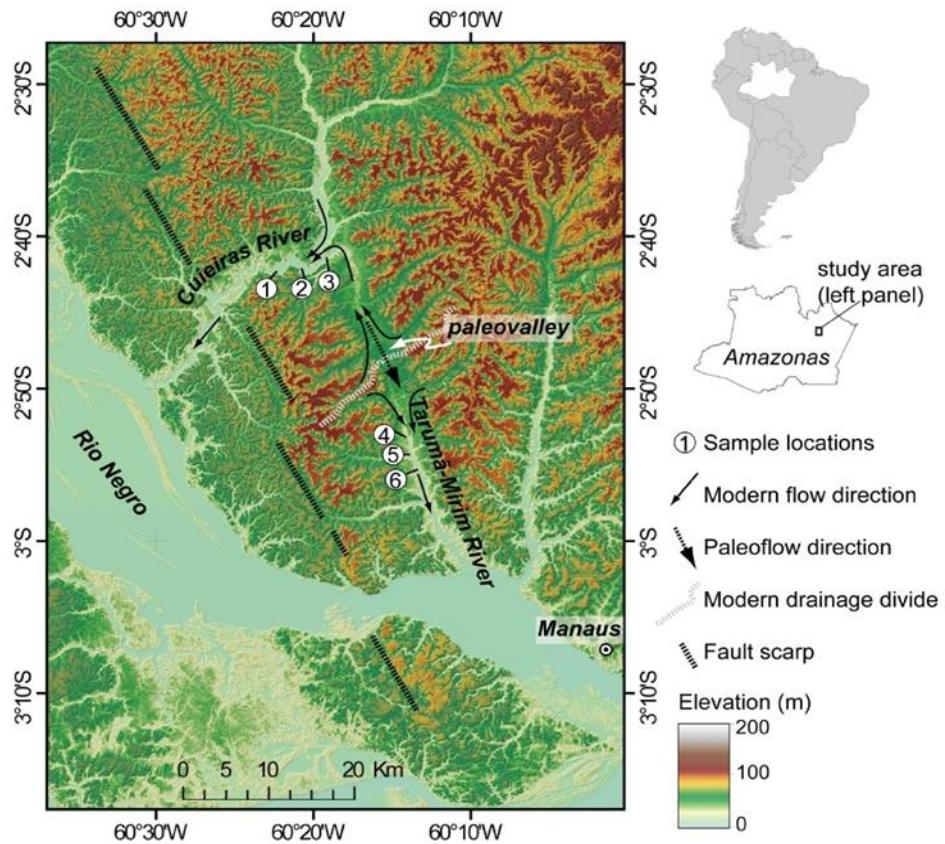


Figure 1 Location and topography of the study site. Color scheme denotes elevations above mean sea level and was obtained from a Digital Elevation Model (*Shuttle Radar Topographic Mission – SRTM*, <http://earthexplorer.usgs.gov>). Locations of samples, rivers, and features in the landscape are labeled. Modern and past directions of river flow are highlighted by arrows (see legend).

The aim of this study is to estimate the influence of the Cuieiras river capture through divergence time between the populations of two species of genus *Apistogramma* (*A. gephyra* and *A. pertensis*) that inhabit the Cuieiras and Tarumã-Mirim Rivers. We also characterize the spatial distribution of genetic variation in the two species of the dwarf cichlids using microsatellite markers and mitochondrial genes. This study constitutes a natural experiment with the potential to link a specific geologic process and biological diversification in Amazonia. Furthermore, it has implications for understanding the mechanisms that have generated the current pattern of high species diversity and endemism (e.g. *Albert, Schoolmaster-Junior, Tagliacollo, & Duke-Sylvester, 2017*).

Materials and Methods

Sampling and genetic amplification data

We collected 74 individuals of *Apistogramma gephyra* (34 from Cuieiras River – RC, and 40 from Tarumã-Mirim River – TM) and 39 individuals of *A. pertensis* (27 from RC and 12 from TM) at three localities in the Cuieiras River (RC) and Tarumã-Mirim (TM) Rivers (Figure 1). We used a hand net as a fishing device in the shallow area of the investigated bodies of water. Sample collection efforts were the same at all locations, but each locality had different species abundance. The specimens were euthanized with a sharp blow to their head according to the Brazilian Guidelines for Ethical Care and Use of Animals (CONCEA, 2013) and, subsequently immersed in alcohol 70% and transported to the Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular - LEEM/INPA in Manaus - AM. Three individuals of each species/river were collected and deposited in the ichthyological collection of INPA. Sampling permission was provided by Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMBio, number 34130-1). Sampling was carried out according to the Brazilian guidelines for animal care and authorized by the Committee on the Ethics of Animal Use and Care – CEUA of the Brazilian National Institute for Research of the Amazon- INPA (number 048/2012).

The total DNA was extracted with the phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol (Sambrook, Fritsch, & Maniatis, 1989). We used 11 microsatellite primers for *A. gephyra* and *A. pertensis* amplified as suggested by Leitão *et al.* (2017). We also amplified and sequenced the following mitochondrial DNA genes: *16S ribosomal RNA*, *Cytochrome b* (*Cyt-b*), and *Cytochrome Oxidase subunit I* (*COI*) using previously designed primers (see Table Supplementary 1) in a 25 µL total volume, including 2.5 µL of 10 × PCR buffer, 1.0 µL of MgCl₂ (50 mM), 0.5 µL of dNTP mixture (10 mM for each nucleotide), 0.3 µL of Platinum® Taq DNA polymerase (Invitrogen, Waltham, MA), 0.3 µL of each primer (10 µM), and 1 µL of DNA template (100 ng/µL). All the amplifications were performed with the following PCR profile: initial denaturation at 94°C for 2 min, followed by 35 cycles with denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 51°C for 1 min, polymerization at 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 5 min.

Data Analysis

Microsatellite DNA

We analyzed the allelic diversity of *Apistogramma gephyra* and *A. pertensis* populations according to: the total number of alleles (TNA), mean number alleles (MNA), number of private alleles (NPA) ran in GDA v1.1 (*Lewis & Zaykin, 2002*), allelic richness (AR) ran by FSTAT v2.9.3.2 (*Goudet, 2001*), and number of effective alleles (Ae) calculated by the mathematical model: $NEA = 1/(1-H_E)$. In addition, we estimated the genetic diversity by the observed and expected heterozygosity (H_O and H_E respectively) in Hardy–Weinberg equilibrium, fixation index (F_{IS}) ran in GENETIX v4.05.2 (*Belkhir et al., 2009*).

The levels of genetic differentiation were analyzed using Wright's F-statistics (F_{IS} and F_{ST} , *Weir & Cockerham, 1984*) ran in ARLEQUIN v3.5 (*Excoffier & Lischer, 2010*). We calculated the number of migrants (Nm) between populations applying the F_{ST} values and the molecular variance (AMOVA) using the ARLEQUIN v3.5 at the significance level of 5%.

We applied the mixture model (Admixture) ancestor to analyze the populations' structures, which correlate the gene frequency among the studied populations, using STRUCTURE v2.3.1 (*Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000; Falush, Stephens, & Pritchard, 2003*), with a burn-in of 50,000 followed by 200,000 steps using the Markov chain Monte Carlo's method (MCMC). Each analysis was repeated 10,000 times from a different randomly selected starting point, and convergence between independent runs was assessed via examination of α values and profile of posterior probabilities. The Q values from each of the 10 independent runs for each K scenarios were extracted using the program STRUCTURE HARVESTER 0.6.92 (*Earl & von Holdt, 2011*) and summarized in the program CLUMPP 1.1.2 (*Jakobsson & Rosenberg, 2007*). Results were visualized in the program DISTRUCT 1.1 (*Rosenberg, 2003*). We applied the value of ΔK suggested by *Evanno, Regnaut, & Goudet (2005)* to identify the highest level of genetic division hierarchy.

Mitochondrial DNA

The sequences were edited and aligned using Geneious R7.1.8 (Biomatters Ltd, Auckland, New Zealand) using the Clustal W algorithm (*Lakin et al.*, 2007). The genetic diversity was obtained using DnaSP v5.10.1 (*Librado & Rozas*, 2009) and the parameters investigated were the total number of haplotypes (NH), the haplotype diversity (h) and the nucleotide diversity (π) (*Nei*, 1987). Tajima's D test (*Tajima*, 1989) and Fu's FS (*Fu*, 1997) were used to verify the occurrence of recent population size changes.

We also carried out an analysis of molecular variance (AMOVA) performed in ARLEQUIN v3.5. Population structure analysis was performed using the Bayesian approach implemented in BAPS 4.14 (*Corander, Gyllenbergs, & Koski*, 2007), in which the number of clusters was defined using an algorithm that estimates the distribution of haplotype frequencies of all populations tested.

We defined the best partition scheme and DNA substitution models using PARTITIONFINDER v.1.1.1 (*Lanfear, Calcott, Ho, & Guindon*, 2012), after which we estimated divergence times in BEAST v1.8.3 (*Drummond, Suchard, Xie, & Rambaut*, 2012) using the following species as outgroups: *Ptychochromis oligacanthus*, *Oxylapiapolli*, *Astronotus ocellatus*, and *Geophagus steindachneri*. These species were chosen because the genus *Apistogramma* is not clearly resolved phylogenetically, since there are many cryptic species, and the use of other representatives of the same genus would make it impossible to reach a real conclusion for a study of population genetics. We calibrated the nodes based on *Genner et al.* (2007), that seek distant fossils as calibration points: (a) the split between African and Neotropical cichlids based on the fossil *Mahengechromis*[†] sp. 46.30-45.70 Million year ago (Ma), and (b) the origin of Neotropical cichlids by the fossil cf. *Geophagini* 23.03-5.33 Ma.

The site models, molecular clock, and tree models were linked among the partitions. We used the HKY substitution model with gamma site heterogeneity, a lognormal uncorrelated relaxed clock and the Yule Speciation Process. Four independent runs with MCMC chain length of 6×10^7 were performed, sampling every 3.5×10^3 generations. Convergence of the chains to the stationary distribution was checked using TRACER v.1.6.0 (*Rambaut, Suchard, Xie, & Drummond*, 2013) evaluating effective sample size (ESS) scores and the consistency of results. We used

the TREE ANNOTATOR v1.8.2 (*Rambaut & Drummond, 2015*) to combine the posterior samples of trees and FIGTREE v.1.4.2 (*Rambaut, 2014*) to visualize the consensus.

Results

Microsatellite DNA

The analysis of allelic and genetic diversity between the populations of *A. gephysra* and *A. pertensis* from the Cuieiras River (RC) and the Tarumã-Mirim River (TM) revealed a similar average number of alleles (MNA) (Table 1). The number of private alleles (NPA) ranged from 5 to 9 for *A. pertensis* and *A. gephysra* from the Cuieiras River, and 13 to 25 for *A. pertensis* and *A. gephysra* from the Tarumã-Mirim River, respectively.

Table 1. Allelic and genetic diversity within populations of *A. gephysra* and *A. pertensis* from each river.

| Species | Rivers | Allelic Diversity | | | | | | Genetic Diversity | | | |
|---------------------|--------|-------------------|----|-----|-------|-------|-----|-------------------|-------|-------|--------|
| | | A | N | TNA | MNA | NEA | NPA | RA | He | Ho | Fis |
| <i>A. gephysra</i> | RC | 6 | 30 | 69 | 6.273 | 2.725 | 9 | 4.803 | 0.633 | 0.662 | -0.047 |
| | TM | 7 | 44 | 79 | 7.182 | 3.021 | 25 | 5.101 | 0.669 | 0.631 | 0.058 |
| <i>A. pertensis</i> | RC | 6 | 25 | 62 | 5.636 | 2.967 | 5 | 4.601 | 0.663 | 0.742 | -0.123 |
| | TM | 5 | 12 | 53 | 4.818 | 2.577 | 13 | 4.545 | 0.612 | 0.664 | -0.089 |

A: number of alleles per locus; N: sample size; TNA: number of total alleles; MNA: number of medium alleles; NEA: effective number of alleles; NPA: number of private alleles; RA: allelic richness; He: heterozygosity expected; Ho: observed heterozygosity; Fis: fixation index; RC: Cuieiras River; TM: Tarumã-Mirim River.

The genetic distance between populations is comparable with the expected result for the Genetic Differentiation Index (F_{ST}), and higher values are described between *A. pertensis* populations from the two rivers (0.228 genetic distance, and $0.285F_{ST}$) compared to *A. gephysra* populations from the two rivers (0.120 and 0.128, respectively). The number of migrants (Nm) was 0.85 between *A. pertensis* from Tarumã-Mirim River and Cuieiras River, and interestingly, 1.83 between *A. gephysra* from the two rivers (Table 2).

Table 2. Genetic distance (upper diagonal), F_{ST} and Nm (bottom diagonal)

| | | <i>A.gephyra</i> | | <i>A.pertensis</i> | |
|--------------------|----|-----------------------|-----------------------|-----------------------|---------|
| | | RC | TM | RC | TM |
| <i>A.gephyra</i> | RC | - | 0.12005 | 0.06131 | 0.30251 |
| | TM | 0.1279* (1.83) | - | 0.17561 | 0.29286 |
| <i>A.pertensis</i> | RC | 0.0633* (3.83) | 0.1931* (1.17) | - | 0.22769 |
| | TM | 0.3603* (0.58) | 0.3465* (0.60) | 0.2584* (0.85) | - |

F_{ST} : structuring index; Nm: migrate number; RC: Cuieiras River; TM: Tarumã-Mirim River. * Indicates a significant difference at $P < 0.05$

The AMOVA results (Table 3) indicates that there is significant difference among individuals of the same population and between different populations for both species.

Table 3. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of *A. gephysra* and *A. pertensis* based on the 11 microsatellite loci.

| <i>A. gephysra</i> and <i>A. pertensis</i> | | | | | |
|--|----------------|---------|---------------------|----------------|---------|
| Source variation | Sum of Squares | % Var | Component Variances | Standard error | p-value |
| Whitin individuals | 387.500 | 85.3328 | 3.7176 | 0.1790 | 0.0002* |
| Between individuals | 336.488 | -2.9846 | -0.1300 | -0.0155 | 0.7797 |
| Between population | 121.545 | 17.6518 | 0.7690 | 0.1916 | 0.0000* |

These results are consistent with the F_{ST} values, which show structure among different populations, as corroborated by significant genetic structure when all sampled individuals were analyzed using STRUCTURE (Table 2 and Figure 2).

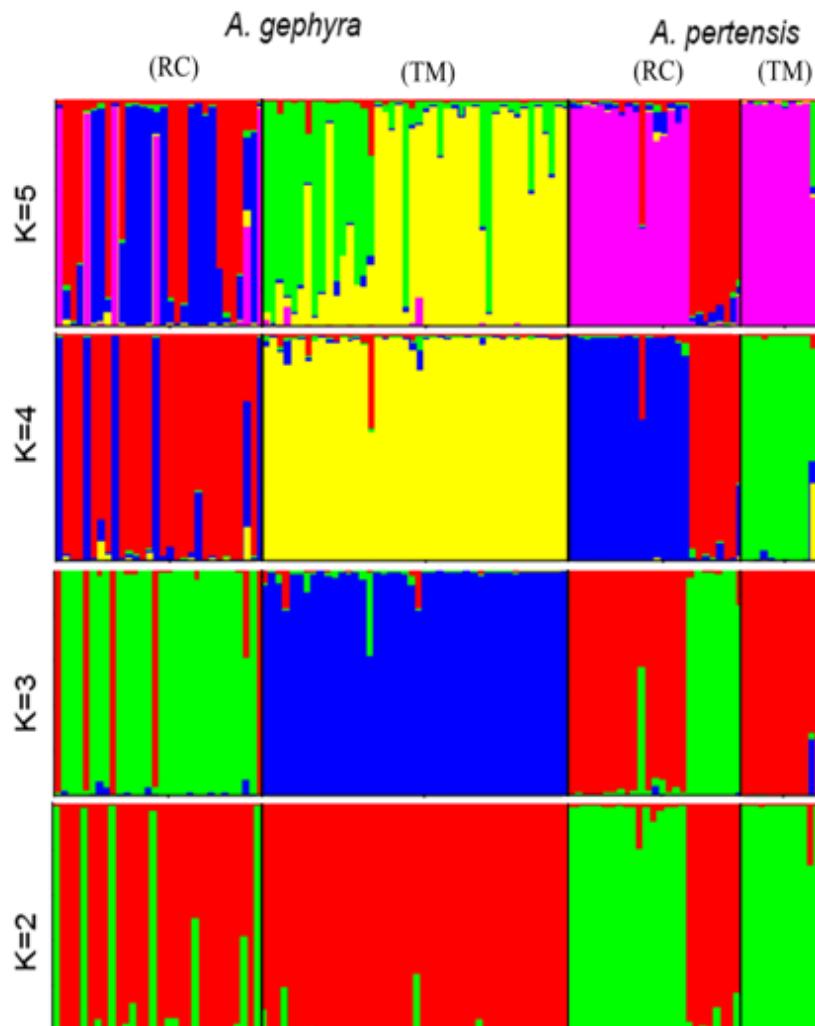


Figure 2 Structure analysis. Graphs using STRUCTURE software, based on 11 microsatellite loci assuming K=2. Analysis of all populations for both species show structure among different populations.

Mitochondrial DNA

The number of sequences obtained for the three mitochondrial genes were unequal among populations: 77 sequences for *16S*, 62 for *COI*, and 112 for *Cyt b*. Due to this unequal sampling caused by amplification difficulties, we performed population analysis for each mitochondrial gene separately. The result of Molecular Variance (AMOVA, $P < 0.001$) for both species (*A. gephya* and *A. pertensis*) indicates high variation within species (Table 4), confirming that populations from both rivers are structured within each species.

Table 4. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) of *A. gephysra* and *A. pertensis* based on mtDNA genes.

| Genes | Source variation | <i>A. gephysra</i> | | | <i>A. pertensis</i> | | |
|-------------|-------------------|--------------------|-------|--------|---------------------|-------|--------|
| | | Component Var. | % Var | Fst | Component Var. | % Var | Fst |
| <i>16S</i> | Among population | 0,8925 | 55.64 | 0.556* | 1,8440 | 51.52 | 0.515* |
| | Within population | 0,7116 | 44.36 | | 1,7353 | 48.48 | |
| <i>COI</i> | Among population | 2,4277 | 30.37 | 0,304* | 0.3035 | 7.39 | 0.074 |
| | Within population | 5,5651 | 69.63 | | 3,8022 | 92.61 | |
| <i>Cytb</i> | Among population | 1,1678 | 35.27 | 0,352* | 0,3105 | 33.93 | 0,339* |
| | Within population | 2,1436 | 64.73 | | 0,6047 | 66.07 | |

*Indicates a significant difference at $p < 0.001$

The results for pairwise genetic differentiation index (F_{ST}) among populations showed significant statistical values ($P < 0.001$). The indexes for genes *16S*, *COI*, and *Cyt b* were, respectively, 0.556, 0.304, and 0.352, for *A. gephysra* from Cuieiras River and Tarumã-Mirim River, and 0.515, 0.074 and 0.339 for *A. pertensis* from Cuieiras and Tarumã-Mirim rivers. This result also indicates high levels of population genetic structure between them.

Haplotype diversity (h) in *Cyt b* and *COI* genes was similar for *A. gephysra* and *A. pertensis* in the two rivers. For the *16S* gene, lower values (0.209 and zero) were observed for the populations of *A. gephysra* and *A. pertensis*, respectively, in the Tarumã-Mirim River compared to the Cuieiras River. However, all the genes showed similar levels of nucleotide diversity (π) for the populations of both species (*A. pertensis*, 0 – 0.014 and *A. gephysra*, 0.002 – 0.032; see Table 5).

Table 5. DNA Polymorphism and neutrality tests for *A. gephysra* and *A. pertensis* populations from Cuieiras River and Tarumã-Mirim River.

| Species | Gene | Population | Index of molecular diversity | | | | Neutrality tests | | |
|---------------------|-------------|------------|------------------------------|----|-------|-------|------------------|--------|--------|
| | | | N | NH | H | π | D | F_s | P |
| <i>A. pertensis</i> | <i>16S</i> | RC | 8 | 4 | 0.643 | 0.014 | -1.193 | -1.164 | P<0.02 |
| | | TM | 11 | 1 | 0 | 0 | | | |
| | | RC | 20 | 7 | 0.584 | 0.010 | -2.441 | -3.890 | P<0.02 |
| | | TM | 5 | 2 | 0.600 | 0.001 | | | |
| | <i>COI</i> | RC | 27 | 5 | 0.578 | 0.002 | -0.673 | 0.415 | P<0.10 |
| | | TM | 6 | 5 | 0.933 | 0.006 | | | |
| | <i>Cytb</i> | RC | 5 | 4 | 0.900 | 0.014 | -2.376 | -3.405 | P<0.02 |
| | | TM | 45 | 4 | 0.209 | 0.002 | | | |
| <i>A. gephysra</i> | <i>16S</i> | RC | 22 | 14 | 0.874 | 0.032 | -1.592 | -0.842 | P<0.02 |
| | | TM | 15 | 4 | 0.619 | 0.002 | | | |
| | | RC | 65 | 3 | 0.528 | 0.008 | -0.461 | -0.758 | P<0.10 |
| | | TM | 14 | 11 | 0.967 | 0.013 | | | |

N: sample size; NH: number of haplotypes; S: polymorphic sites; h: haplotypes diversity; π : nucleotide diversity; D: Tajima's index; F_s : Fu's index, and P: significance of the F_s value. Significance level (P<0.05)- DNAsP

Analysis of population structure in BAPS based on *16S* and *COI* retrieved clusters according to the two species, *A. gephysra* and *A. pertensis* (Figure 3 a, c). For the *Cytb* dataset, we observed a single cluster including all *A. pertensis* samples and several clusters in *A. gephysra* (Figure 3e). Considering these results, we analyzed the species separately, and the results showed a more evident differentiation between the rivers for both species (Figure 3 b, d, f). For *16S* and *COI*, only one cluster was recovered within the Tarumã-Mirim River for both species, while the Cuieiras River contains 2 or 3 clusters (Figure 3 b, d). The admixture seems to be clearer for the *Cytb* gene: two defined clusters for *A. gephysra* from Cuieiras River and an admixture between those samples with the specimens from Tarumã-Mirim River. We found exclusive clusters for *A. pertensis* from the Tarumã-Mirim River (Figure 3f).

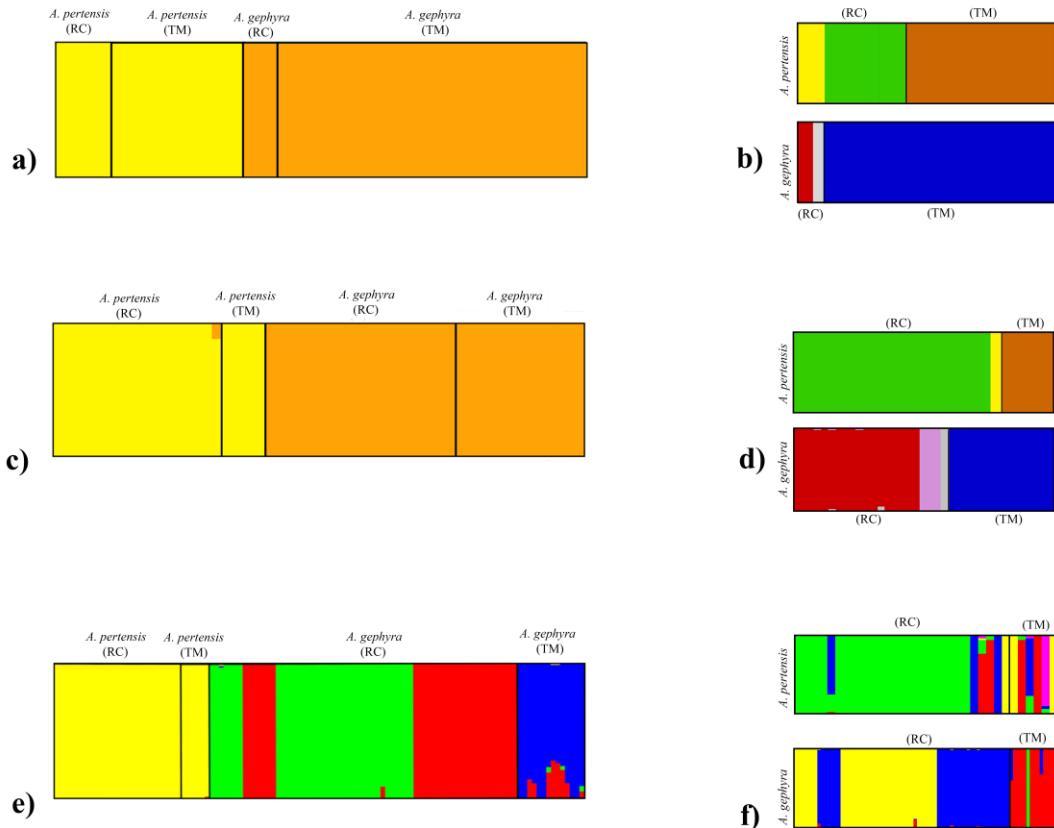


Figure 3 Bayesian Analysis of Population Structure (BAPS). Analysis of population structure in BAPS retrieved two groups corresponding to the two species, *A. gephysra* and *A. pertensis* (Figure 3 a, c) to 16S and COI. For the Cytb dataset, we observed a single cluster including *A. pertensis* and *A. gephysra* samples (Figure 3e). The separated analysis showed a clearer differentiation between the rivers for both species (Figure 3 b,d,f). For 16S and COI, only one cluster was recovered within the Tarumã-Mirim River for both species, while the Cuieiras River contains 2 or 3 clusters (Figure 3 b,d). The admixture seems to be clearer for the Cytb gene: two defined clusters for *A. gephysra* from Cuieiras River and an admixture between those samples with the specimens from Tarumã-Mirim River. Exclusive clusters was found for *A. pertensis* from the Tarumã-Mirim River, which may be related to the lower sample size (Figure 3f).

The divergence dating analysis based on concatenated data suggest that the two species diverged during the Late Miocene (Median age = 10 Million years ago- Ma) (Figure 4). The diversification of *A. gephysra* occurred during the Late Miocene – Pliocene (Median age = 7.4 Ma). We did not find a clear separation age with two clades from the Cuieiras River populations and one from Tarumã-Mirim River. The RC populations are not monophyletic, and one of them has significant support (posterior probability = 1) for a median age of 3.2 Ma. For *A. pertensis* the diversification median age was similar to *A. gephysra* at 7.4 Ma. Here, the results did not show monophyletic

clades across the rivers; there are three clades well supported ($pp > 0.90$). Nonetheless, we did not find a pattern that could explain the diversification of this species. Lastly, within *A. pertensis*, intraspecific diversification starts at 7.36 Ma and we recovered two well-supported clades both including individuals from RC and TM (Figure 4).

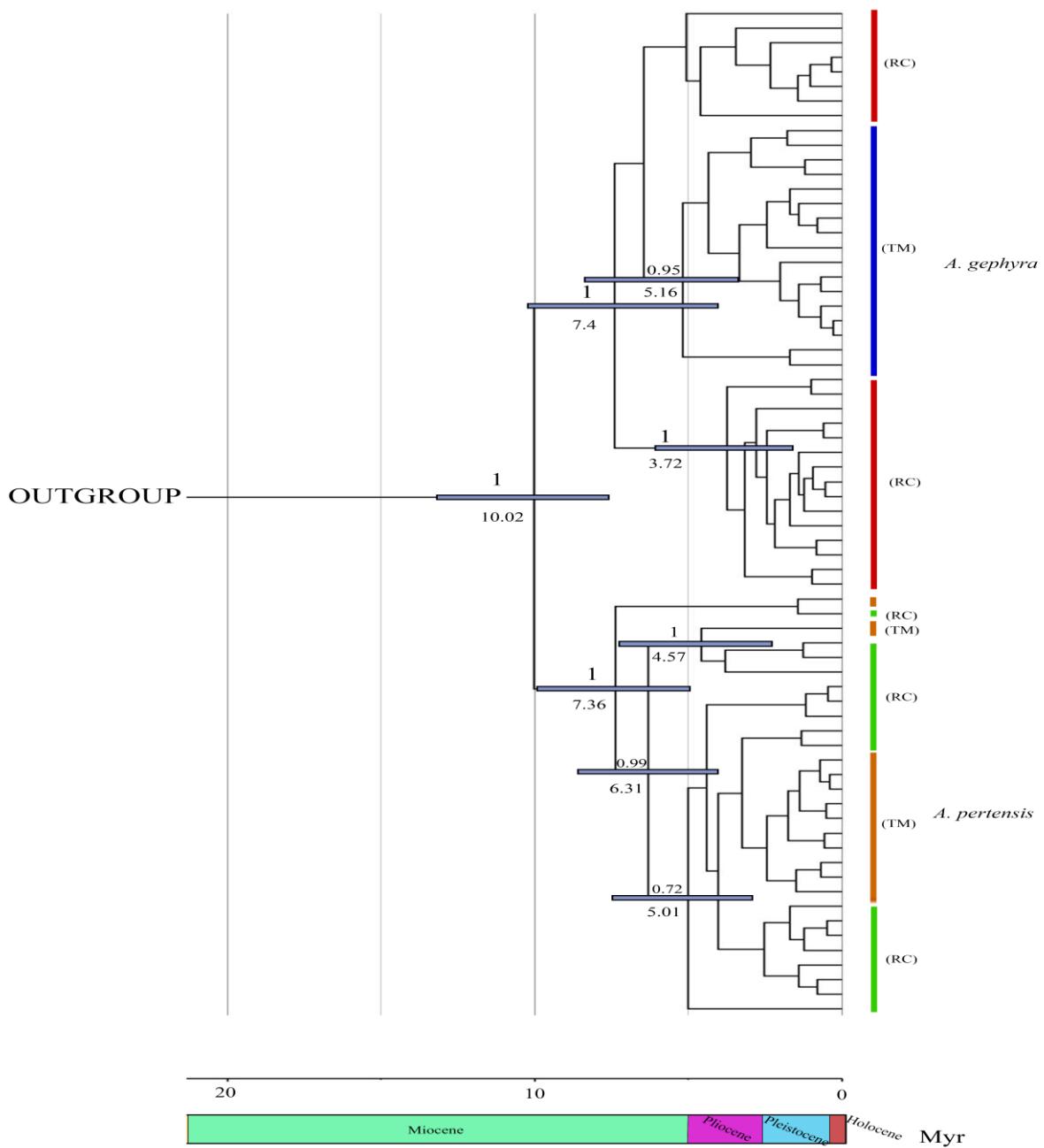


Figure 4 Divergence Time. Divergence times estimated through a Bayesian analysis of the concatenated data set including *COI*, *16S* and *Cytb* gene regions. The divergence dating analysis based on concatenated data suggest that the two species diverged during the Late Miocene. Within *A. gephysra*, intraspecific diversification starts at 7.4 Ma. and within *A. pertensis* intraspecific diversification starts at 7.36 Ma.

Discussion

Population structure affected by landscape changes

Geological events have been important for *Apistogramma* diversification, as well as its biology and habitat characteristics (Römer, 2006). Understanding the genetic structure is not only important for evolutionary studies but also to conservation biology to verify, for example, possible reproductive isolation (Santos, Leitão, Paula-Silva, & Almeida-Val, 2016).

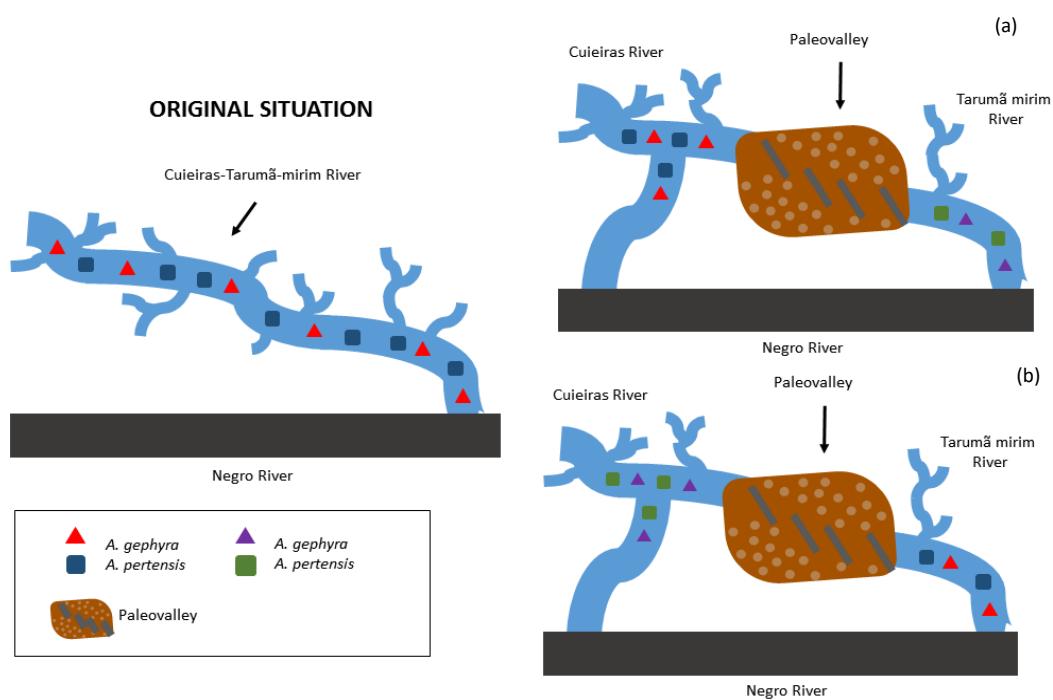
The results from microsatellite data indicate low levels of gene flow between populations, which suggest diversification among populations within each species, followed by local adaptive processes (Table 1). Also, the nuclear data indicate genetic similarity and gene flow between populations of the two species in the Cuieiras River. This pattern, however, is not seen in the mtDNA data. In population analysis, there is shared information only between the same species from different rivers. Also, the phylogeny did not show any signal of hybridization.

When analyzing each species separately, the mtDNA showed differences between different rivers. Only *Cytb* from *A. pertensis* did not show a clear structure (Fig. 3f). The absence of hybridization signal suggests genus biased gene flow occurring the Cuieiras River, with hybridization affecting only the nuclear genome, not the maternally inherited mtDNA. The lack of support for intraspecific clades in mtDNA may be due to a slow rate of this marker, while the nuclear microsatellites show intraspecific differentiation corresponding to the different drainage systems. Another explanation would be periodic connectivity or delayed disconnection among the Tarumã-Mirim and Cuieiras Rivers, as observed in ongoing drainage captures elsewhere in the Amazon (Stokes, Goldberg, & Perron, 2018). This would allow gene flow among sub-populations.

Tajima's D test drops to negative values after a recent bottleneck, and negative values in this test indicate population expansion (Fu, 1997). The Fs statistical values are also very sensitive to deviations from neutrality promoted by demographic changes. Herein, they resulted in negative values under most conditions and were positive only for the *A. pertensis* (*Cyt b*).

The population analysis show an isolation between the population from *A. gephyra* and *A. pertensis* of different rivers, suggesting that the river capture even also

separated the aquatic biota (Figure 1). As the river capture promoted a wider species range in the Cuieiras River, it probably contributed to greater gene flow among populations of this new river and the Negro River. The populations in the Tarumã-Mirim River potentially remained similar to the species' original populations (prior to the river capture) and the populations of the Cuieiras River diverged since then (Figure 5, bottom). Thus, river captures may be considered as a mechanism promoting fish biodiversity, particularly in non-migratory fish species, and contributing to the genetic diversity at the population level as observed in the present case (*Albert, Schoolmaster-Junior, Tagliacollo, & Duke-Sylvester, 2017*). This is an important finding with implications for understanding biodiversity of aquatic fauna in this region. In addition, our study suggests that sub-catchment modifications that ensue due to those major landscape changes can contribute to speciation and, eventually, species enrichment. Thus, even at smaller spatial scales, local landscape changes are important in creating



biodiversity.

Figure 5 Hypothetical scenarios. Hypothetical scenarios delineated to propose an explanation for the genetic structure observed between the populations of *A. gephya* and *A. pertensis* at the Cuieiras and Tarumã-Mirim rivers: (a) *A. gephya* and *A. pertensis* populations from Tarumã-Mirim River differentiated after the geographic isolation, with the lower Tarumã-Mirim River region being influenced by populations from the lower Negro River; and/or (b) the landscape changes in the course of the Cuieiras River provided a wide area of distribution and allowed some gene flow between the species, adding more

complexity to the differentiation between populations, and potentially being influenced by individuals from Anavilhanas populations just west above Cuieiras River mouth.

Conservation Assignments

The integration of analyses about species distribution, landscape change, and population genetics can contribute to the implementation of management and conservation strategies (*Santos, Sousa, Paula-Silva, Val, & Almeida-Val, 2011, Santos, Leitão, Paula-Silva, & Almeida-Val, 2016; Escobar, Andrade-López, Farias, & Hrbek, 2015; Gravena, Silva, Silva, Farias, & Hrbek, 2015*). The knowledge of a species' biology is vital to define a conservation strategy, especially in areas subjected to environmental pressure. Most species of the genus *Aistogramma* can be restricted to a single river or adjacent wetland and almost never found in the main river channel (*Kullander, 2003; Römer, 2006*).

Thus, understanding population structure is crucial for management actions for Evolutionary Significant Units (ESU). The low migration rate and the high population structure imply that *A. gephya* and *A. pertensis* populations from Cuieiras and Tarumã-Mirim Rivers should be managed separately, each as an independent ESU (*Avise, 2000; Baker, Smith, & Pichler, 2002*). This operational concept is often used to guide short-term management issues, as it refers to current population structure and allele frequencies (*Moritz, 1994*). Further studies will clarify the ongoing fragmentation of *A. gephya* at Cuieiras River to better explain the influence of other surrounding geological events such as the influence of the main channel (Negro River) in the contribution of new genetic information to this species.

Conclusion

Two dwarf cichlid species (*A. gephya* and *A. pertensis*) were analyzed in two rivers that were separated by a river capture event. Based on our results, we suggest that the drainage divide that now separates the Cuieiras and Tarumã-Mirim river basins (i.e. the former river valley) contributed to locally interrupt gene flow, leading to the development of structured populations for both species. These results support the notion that geologically driven changes in the river courses may cause genetic diversification

in aquatic fauna. Moreover, given that events resulting in landscape changes such as the one studied here are common throughout the Amazon Basin since the Miocene (*Rossetti, Toledo, & Góes, 2005; Hoorn et al., 2010; Almeida-Filho & Miranda, 2007; Hayakawa, Rossetti, & Valeriano, 2010; Hayakawa & Rossetti, 2015*), we suggest that geologic processes capable of producing vicariant events in Amazonia should be discretely considered within the complex framework of biodiversity triggers in the Amazon Basin.

Acknowledgements

We thank Jansen Sampaio Zuanon, Efrem Ferreira, Maria de Nazaré Paula da Silva from INPA (Brazilian National Institute for Research of the Amazon), and Ricardo Britzke from Universidad Técnica de Machala. The presente work was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). CSSL was the recipient of a PhD fellowship from CNPq and thanks the Centro Universitário de Ensino Superior do Amazonas (CIESA). CHAS is the recipient of a research fellowship from PCI-INPA/CNPq. PV was the recipient of a Doctoral Fellowship from CAPES/Science Without Borders (Project #0515-12-4). EMSS was the recipient of a Technical Development Level (DTI) fellowship from FAPEAM, and CCR, ALV and VMFAV are the recipients of a Research Fellowships from CNPQ. This work was part of INCT ADAPTA (CNPQ, 573976/2008-2 and FAPEAM, 3159/08) coordinated by ALV, and project UNIVERSAL/FAPEAM (#021/2011), coordinated by VMFAV.

Conflict of interests

We declare that we have no conflict of interest.

References

- Albert, J. S., Schoolmaster-Junior, D. R., Tagliacollo, V., & Duke-Sylvester, S. M. (2017). Barrier displacement on a neutral landscape: towards a theory of continental biogeography. *Systematic Biology*, 66, 167-182. <http://doi.org/10.1093/sysbio/syw080>

Albert, J. S., Craig, J. M., Tagliacollo, V. A., & Petry, P. (2018). Upland and lowland fishes: a test of the river capture hypothesis. In C. Hoorn, A. Perrigo & A. Antonelli (Eds.), *Mountains, Climate and Biodiversity* (pp. 273-294), Chapter 19. New York, NY: John Wiley & Sons Ltd.

Alfaro, J. W. L., Boubli, J. P., Paim, F. P., Ribas, C. C., Silva, M. N. F., Messias, M. R., Röhe, F., ... Farias, I. P. (2015). Biogeography of squirrel monkeys (genus *Saimiri*): South-central Amazon origin and rapid pan-Amazonian diversification of a lowland primate. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 436-454.

<http://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.004>

Almeida-Filho, R., & Miranda, F. P. (2007). Mega capture of the Rio Negro and formation of the Anavilhanas Archipelago, Central Amazônia, Brazil: evidences in SRTM digital elevation model. *Remote Sensing of Environment*, 110, 387-392.

<https://doi.org/10.1016/j.rse.2007.03.005>

Avise, J. C. (2000). *Phylogeography: the history and formation of species*. Cambridge: Harvard University Press.

Baker, A. N., Smith, A. N. H., & Pichler, F. B. (2002). Geographical variation in Hector's dolphin: recognition of new subspecies of *Cephalorhynchus hectori*. *Journal of the Royal Society of New Zealand*, 32, 713-727. <http://doi.org/10.1080/03014223.2002.9517717>

Belkhir, K. (2009). *GENETIX Version 4.05.2, logiciel sous WindowsTM pour la génétique des populations*. LaboratoireGénome, Populations. Interactions CNRS UMR 5000. France: Université de Montpellier II.

Boubli, J. P., Ribas, C. C., Alfaro, J. W. L., Alfaro, M. E., Silva, M. N. F., Pinho, G. M., & Farias, I. P. (2015). Spatial and temporal patterns of diversification on the Amazon: a test of the riverine hypothesis for all diurnal primates of Rio Negro and Rio Branco in

Brazil. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 82, 400-412.

<http://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.09.005>

Britzke, R., Oliveira, C., & Kullander, S. O. (2014). *Apistogrammaortegai* (Teleostei: Cichlidae), a new species of cichlid fish from the Ampiyacu River in the Peruvian Amazon basin. *Zootaxa*, 3869, 409-419. <http://dx.doi.org/10.11646/zootaxa.3869.4.5>

CONCEA. (2013). *Diretrizes da prática de eutanásia do Concea*. Brasília: MCTI.

Corander, J., Gyllenberg M., & Koski T. (2007). Random partition models and exchangeability for Bayesian identification of population structure. *Bulletin of Mathematical Biology*, 69, 797-815. <https://doi.org/10.1007/s11538-006-9161-1>

Drummond, A. J., Suchard, M. A., Xie, D., & Rambaut, A. (2012). Bayesian phylogenetics with BEAUTi and the BEAST 1.7. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1969-1973. <https://doi.org/10.1093/molbev/mss075>

Earl, D. A., & von Holdt, B. M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4, 359-361. <http://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7>

Escobar, M. D. L., Andrade-López, J., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2015). Delimiting evolutionarily significant units of the fish, *Piaractusbranchypomus* (Characiformes: Serrasalmidae), from the Orinoco and Amazon River basins with insight on routes of historical connectivity. *Journal of Heredity*, 106, 428-438.
<https://doi.org/10.1093/jhered/esv047>

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14, 2611-2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>

Excoffier, L., & Lischer, H. (2010). Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10, 564-567. <http://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2010.02847.x>

Falush, D., Stephens, M., & Pritchard, J. K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164, 1567-1587

Fernandes, A., Cohn-Haft, M., Hrbek, T., & Farias, I. P. (2015). Rivers acting as barriers for bird dispersal in the Amazon. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 22, 363-373.

Figueiredo, J., Hoorn, C., van der Ven, P., & Soares, E. (2009). Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology*, 37, 619-622. <http://doi.org/10.1130/G25567A.1>

Fu, Y. X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147, 915-925.

Genner, M. J., Seehausen, O., Lunt, D. H., Joyce, D. A., Shaw, P. W., Carvalho, G. R., & Turner, G. F. (2007). Age of cichlids: new dates for ancient lake fish radiations. *Molecular Biology and Evolution*. 24, 1269-1282.
<https://doi.org/10.1093/molbev/msm050>

Gorini, C., Haq, B. U., Reis, A. T., Silva, C. G., Cruz, A., Soares, E., & Grangeon, D. (2014). Late Neogene sequence stratigraphic evolution of the Foz do Amazonas Basin, Brazil. *Terra Nova*, 26, 179-185. <http://doi.org/10.1111/ter.12083>

Goudet, J. (2001). FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Updated from Goudet J. (1995). FSTAT, a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485-486. Available:
<http://www.unil.ch/izea/softwares/fstat.?html>

Gravena, W., Silva, V. M. F., Silva, M. N. F., Farias, I. P., & Hrbek, T. (2015). Living between rapids: genetic structure and hybridization in botoes (Cetacea: Iniidae: Inia spp.) of the Madeira River, Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*, 114, 764-777. <https://doi.org/10.1111/bij.12463>

Hayakawa, E.H., Rossetti, D. F., & Valeriano, M. M. (2010). Applying DEM-SRTM for reconstructing a late Quaternary paleodrainage in Amazonia. *Earth and Planetary Science Letters*, 297, 262-270. <https://doi.org/10.1016/j.epsl.2010.06.028>

Hayakawa, E. H., & Rossetti, D. F. (2015). Late quaternary dynamics in the Madeira river basin, southern Amazonia (Brazil), as revealed by paleomorphological analysis. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 87, 29-49. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520130506>

Hoorn, C., Wesselingh, F. P., Steege, H. T., Bermudez, M. A., Mora, A., Sevink, J., ... Antonelli, A. (2010). Amazonia through time: andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330, 927-931. <http://doi.org/10.1126/science.1194585>.

Hoorn, C., Bogotá, A. G. R., Romero-Baez, M., Lammertsma, E. I., Flantua, S. G., Dantas, E. L., ... Chemale, F. (2017). The Amazon at sea: onset and stages of the Amazon River from a marine record, with special reference to Neogene plant turnover in the drainage basin. *Global and Planetary Change*, 153, 51-65. <https://doi.org/10.1016/j.gloplacha.2017.02.005>

Horbe, A. M. C., Queiroz, M. M. D. A., Moura, C. A. V., & Toro, M. A. G. (2013). Chemistry of waters of the middle and lower Madeira River and its main tributaries - Amazonas - Brazil. *Acta Amazonica*, 43, 489-504. <http://dx.doi.org/10.1590/S0044-59672013000400011>

Jakobsson, M., & Rosenberg, N. A. (2007). CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of

population structure. *Bioinformatics*, 23, 1801-1806.

<http://dx.doi.org/10.1093/bioinformatics/btm233>

Kullander, S.O. (2003). Family Cichlidae. In R. E. Reis, S. O. Kullander, C. J. Ferraris-Junior (Eds.), *Check list of the freshwater fishes of South and Central America* (pp. 605-654). Porto Alegre, PA: Editora da PUC do Rio Grande do Sul.

Kullander, S.O., & Ferreira, E. J. G. (2005). Two new species of *Apistogrammarenigan* (Teleostei: Cichlidae) from the rio Trombetas, Pará State, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, 3, 361-371. <http://dx.doi.org/10.1590/S1679-62252005000300003>

Lanfear, R., Calcott, B., Ho, S. Y. W., & Guindon, S. (2012). PartitionFinder: combined selection of partitioning schemes and substitution models for phylogenetic analyses. *Molecular Biology and Evolution*, 29, 1695-1701.

<https://doi.org/10.1093/molbev/mss020>

Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., & McWilliam, H. (2007). ClustalversãoWeClustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm404>

Latrubblesse, E. M., Cozzuol, M., Silva-Caminha, S. A. F., Rigsby, C. A., Absy, M. L., & Jaramillo, C. (2010). The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth-Science Reviews*, 99, 99-124.

<https://doi.org/10.1016/j.earscirev.2010.02.005>

Leitão, C. S. S., Santos, C. H. A., Souza, E. M. S., Vilarinho, G. C. C., Paula-Silva, M. N., Val, P., ... Almeida-Val, V. M. F. (2017). Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Apistogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): uncovering geological influences on amazonian fish population. *Journal of Applied Ichthyology*. 33, 1196-1199. <http://doi.org/10.1111/jai.13490>

Lewis, P. O., & Zaykin, D. (2002). *GDA User's manual*. Last updated January 7. 45p.

Librado, P., & Rozas, J. (2009). DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.

<https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp187>

Lovejoy, N. R., Willis, S. C., & Albert, J. S. (2010). Molecular signatures of Neogene biogeographical events in the Amazon fish fauna. In C. Hoorn C & F. P. Wesselingh (Eds.), *Amazonia, Landscape and Species Evolution: A Look into the Past* (pp. 405-417), Chapter 25. New York, NY: Blackwell Publishing Ltd, John Wiley & Sons Ltd.

Moritz, C. (1994). Defining ‘Evolutionarily Significant Units’ for conservation. *Trends in Ecology & Evolution*, 9, 373-375. DOI:
<http://doi.org/10.1016/01695347.1994.900574>

Naka, L. N., Bechtoldt, C. L., Henriques, L. M. P., & Brumfield, R. T. (2012). The role of physical barriers in the location of avian suture zones in the Guiana Shield, Northern Amazonia. *The American Naturalist*, 179, 115-132. <https://doi.org/10.1086/664627>

Nei, M. (1987). *Molecular evolutionary genetics*. New York, NY: Columbia University Press.

Nogueira, A. C. R., Silveira, R., & Guimarães, J. T. F. (2013). Neogene–Quaternary sedimentary and paleovegetation history of the eastern Solimões Basin, Central Amazon region. *Journal of South American Earth Sciences*, 46, 89-99.

<https://doi.org/10.1016/j.jsames.2013.05.004>

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945-959.

Quérout, S., Diaz, A. V., García-Dávila, C., Römer, U., & Renno, J. -F. (2015). Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in neotropical fish of the genus *Aristogramma* (Perciformes: Labroidei: Cichlidae). *Journal of Applied Ichthyology*, 31, 52-56. <https://doi.org/10.1111/jai.12975>

Rambaut, A. (2014). *FigTree v1.4.2: tree figure drawing tool*. <http://tree.bio.ed.ac.uk>.

Rambaut, A., & Drummond A. J. (2015). *TreeAnnotator v1.8.2: MCMC output analysis*. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

Rambaut, A., Suchard, M. A., Xie, W., & Drummond, A. J. (2013). *Tracer v.1.6.0: MCMC trace analysis tool*. <http://beast.bio.ed.ac.uk>.

Ribas, C. C., Aleixo, A., Nogueira, A. C. R., Miyaki, C. Y., & Cracraft, J. (2012). A paleobiogeographic model for biotic diversification within Amazonia over the past three million years. *Proceedings of the Royal Society Biological Sciences*, 279, 681-689.
<http://doi.org/10.1098/rspb.2011.1120>

Römer, U. (2000). *Cichlid atlas: natural history of South American dwarf cichlids*. Volume 1. Melle: Mergus Verlag

Römer, U. (2006). *Cichlid atlas: natural history of South American dwarf cichlids*. Volume 2. Melle: Mergus Verlag

Rosenberg, N. A. (2003). DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. *Molecular Ecology Notes*, 4, 137-138.
<https://doi.org/10.1046/j.1471-8286.2003.00566.x>

Rossetti, D. F., Toledo, P. M., & Góes, A. M. (2005). New geological framework for Western Amazonia (Brazil) and implications for biogeography and evolution. *Quaternary Research*, 63, 78-89. <https://doi.org/10.1016/j.yqres.2004.10.001>

Rossetti, D. F., & Toledo, P. M. (2007). Environmental changes in Amazonia as evidenced by geological and paleontological data. *Revista Brasileira de Ornitologia*, 15, 251-264.

Rossetti, D. F., Molina, E. C., & Cremon, E. H. (2016). Genesis of the largest Amazonian wetland in northern Brazil inferred by morphology and gravity anomalies.

Journal of South American Earth Sciences, 69, 1-10.

<http://doi.org/10.1016/j.jsames.2016.03.006>

Rull, V. (2011). Neotropical biodiversity: timing and potential drivers. *Trends in Ecology & Evolution*, 26, 508-513. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2011.05.011>

Rull, V. (2013). Palaeoclimates and Amazon biodiversity. *Journal of Biogeography*, 40, 1413-1414. <https://doi.org/10.1111/jbi.12141>

Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Santos, C. H. A., Sousa, C. F. S., Paula-Silva, M. N., Val, A. L., & Almeida-Val, V. M. F. (2011). Genetic diversity in *Cichlamonoculus* (Spix and Agassiz, 1931) populations: implications for management and conservation. *American Journal of Environmental Sciences*, 8, 35-41. <https://doi.org/10.3844/ajessp.2012.35.41>

Santos, C. H. A., Leitão, C. S. S., Paula-Silva, M. N., & Almeida-Val, V. M. F. (2016). Genetic differentiation in red-bellied piranha populations (*Pygocentrusnattereri*, Kner, 1858) from the Solimões-Amazonas River. *Ecology and Evolution*, 6, 4203-4213. <https://doi.org/10.1002/ece3.2195>

Silva, C. L., Morales, N., Crósta, A. P., Costa, S. S., & Jimenez-Rueda, J. R. (2007). Analysis of tectonic-controlled fluvial morphology and sedimentary processes of the western Amazon basin: an approach using satellite images and digital elevation model. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 79, 693-711. <http://dx.doi.org/10.1590/S0001-37652007000400010>

Staeck, W., & Schindler, I. (2016). *Aristogrammasororcula*, a new dwarf cichlid (Teleostei: Cichlidae) from the drainage of the rioGuaporé in Bolivia and Brazil. *Vertebrate Zoology*, 66, 141-150.

- Stokes, M. F., Goldberg, S. L., & Perron, J. T. (2018). Ongoing river capture in the Amazon. *Geophysical Research Letters*, 45, 5545-5552.
<https://doi.org/10.1029/2018GL078129>
- Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism, *Genetics*, 123, 585-595.
- Tougard, C., Dávila C. R. G., Römer, U., Duponchelle, F., Cerqueira, F., Paradis, E., Guinand, B., ... Renno, J. -F. (2017). Tempo and rates of diversification in the South American cichlid genus *Aristogramma* (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *PLoS ONE*, 12, e0182618. <https://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0182618>
- Val, P., Silva, C. L., Harbor, D., Morales, N., Amaral, F. R., & Maia T. F. A. (2014). Erosion of an active fault scarp leads to drainage capture in the Amazon region, Brazil. *Earth Surface Processes and Landforms*, 39, 1062-1074.
<https://doi.org/10.1002/esp.3507>
- van Soelen, E. E., Kim, J. -H., Santos, R. V., Dantas, E. L., Almeida, F. V., Pires, J. P., ... Damsté, J.S.S. (2017). A 30 Ma history of the Amazon River inferred from terrigenous sediments and organic matter on the Ceará Rise. *Earth and Planetary Science Letters*, 474, 40-48. <http://doi.org/10.1016/j.epsl.2017.06.025>
- Varella, H. R., & Pérez M. H. S. (2014). A titan among dwarfs: *Aristogramma kullanderi*, new species (Teleostei: Cichlidae). *Ichthyological Exploration of Freshwaters*, 25, 243-258.
- Weir, B. S., & Cockerham, C. C. (1984). Estimating F statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38, 1358-1370. <https://doi.org/10.2307/2408641>
- Wise, M. (2011a). *A description of Aristogramma species-groups*. Published electronically at: <http://apisto.sites.no/page.aspx?PageId=116>.

Wise, M. (2011b). Apistogrammaspecies list by species-groups/complexes, as of august 2011. Published electronically at: <http://apisto.sites.no/page.aspx?PageId=118>

CONSIDERAÇÕES FINAIS

As duas espécies de ciclídeos *Aristogramma gephyra* e *A. pertensis* foram analisadas em duas redes de drenagem que foram separadas por um evento geomorfológico. Com isso, pode-se concluir que paleovalle entre o rio Cuieiras e o Tarumã-Mirim funciona como uma barreira geográfica que reduz o fluxo gênico entre as populações das espécies *A. gephyra* e *A. pertensis*, podendo considerá-las como populações distintas;

Com base nos resultados obtidos com microssatélites e genes do DNA mitocondrial, sugerimos que o paleovalle entre os rios Cuieiras e Tarumã-Mirim contribuíram para a estruturação e diferenciação genética das populações das duas espécies de *Aristogramma*;

Verificamos que a idade provável de separação entre as espécies é de cerca de 7MYA e que as populações se separam a partir de 5MYA, o que pode representar o início da formação do paleovalle. Ainda, uma terceiradivisão populacional na espécie *A. gephyra* pode ter se iniciado no Rio Cuieiras a partir de 3MYA, o que será objeto de novas investigações.

Sugerimos que os processos geológicos que atuam como agentes de mudanças na paisagem, tais como capturas de rios por erosão, funcionam como fonte para a diversificação da biodiversidade de populações de *Aristogramma* na Bacia Amazônica.

ANEXO

Received: 30 May 2017 | Accepted: 3 August 2017
 DOI: 10.1111/jai.13490

SHORT COMMUNICATION

WILEY 

Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Aristogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): Uncovering geological influence on Amazonian fish population

C. S. S. Leitão¹  | C. H. A. Santos¹ | É. M. S. Souza¹ | G. C. C. Vilarinho¹ |
 M. N. Paula-Silva¹ | P. Val² | A. L. Val¹ | V. M. F. de Almeida-Val¹

¹Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Aleixo, Manaus, Brazil

²Scripps Institution of Oceanography, University of California, San Diego, CA, USA

Correspondence

C. S. S. Leitão, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Aleixo, Manaus, Brazil.
 Email: kcaufs@gmail.com

Funding Information

Universal Project from FAPEAM (021/2011) and INCT-ADAPTA from Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Amazonas (FAPEAM), and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) (CNPQ, 573976/2008-2 and FAPEAM, 3159/08)

1 | INTRODUCTION

Aristogramma is the richest genus of Neotropical cichlids, with more than 100 valid species and probably species not described (Römer, 2006). The *Aristogramma* species live near river banks containing extensive amounts of woody debris and normally a thick leaf layer ("serapilheira"), which provide an adequate location to establish their breeding nest (Engelking, Römer, & Beisenherz, 2010). These dwarf cichlids inhabit all types of Amazonian river water (clear, black and white waters) in nearly the entire Neotropical lowland region (Römer, 2006). *Aristogramma* inhabit the Cuiéiras and Tarumã-mirim rivers northwest of the city of Manaus (Figure 1). These two rivers once integrated a single catchment potentially during the Pleistocene (~1.3 million years ago). Their current configuration as two separate catchments resulted from a stream capture, a geomorphological event in which a small stream erodes into the valleys of neighboring catchments and diverts the river flow into a new channel. Where the ancient river used to flow, a paleovalley scar is formed separating these two rivers (Val et al., 2014). The paleogeographic history of the Cuiéiras and Tarumã-Mirim rivers provides an ideal study area to investigate the geological effects on the genetic structure of the *Aristogramma*. We proposed the development of microsatellites with transferability between species, which will provide important tools for future genetic-population studies of *Aristogramma* from Amazonian.

2 | MATERIALS AND METHODS

We collected 74 individuals of *Aristogramma gephrya* (34 from Cuiéiras River – RC, and 40 from Tarumã-Mirim River – TM) and 39 individuals of *Aristogramma pertensis* (27 from RC and 12 from TM) (Figure 1), which we stocked at ~80°C. We constructed the genomic library enriched for (CT)_n and (GT)_n motifs from a single *A. gephrya* sample (Billotte, Lagoda, Risterucci, & Baurens, 1999). We developed pairs of primers using Oligo Explorer v1.2 (Gene Link, Inc.) with M13 sequence tails added at the 5' end of each forward primer to follow the fluorescent labeling protocol suggested by Schuelke (2000). The total genomic DNA was extracted from white muscle using phenol-chloroform-isoamyl alcohol protocol as described by Sambrook, Fritsch, and Maniatis (1989). The PCR reactions were performed using 50 ng of DNA, 0.4 μM of forward M13 Label primer (FAM), 0.8 μM of reverse primer, and PCR Master Mix (Fermentas®). The cycling reaction was performed with an initial denaturation at 94°C for 1 min, followed by: 25 cycles at 94°C (20 s), 50–59 °C (20 s) (see Table 1), and 68°C (30 s); 20 cycles at 94°C (20 s), 53°C (20 s), 68°C (30 s); a final extension for 7 min at 72°C. We used the Applied Biosystems 3130xl platform to analyze the products (GeneScan Liz-500 (-250)) and scored the alleles using Genemapper v4.0. We tested the occurrence of null alleles by Micro-checker v2.2 (van Oosterhout, Hutchinson, Wills, & Shipley,

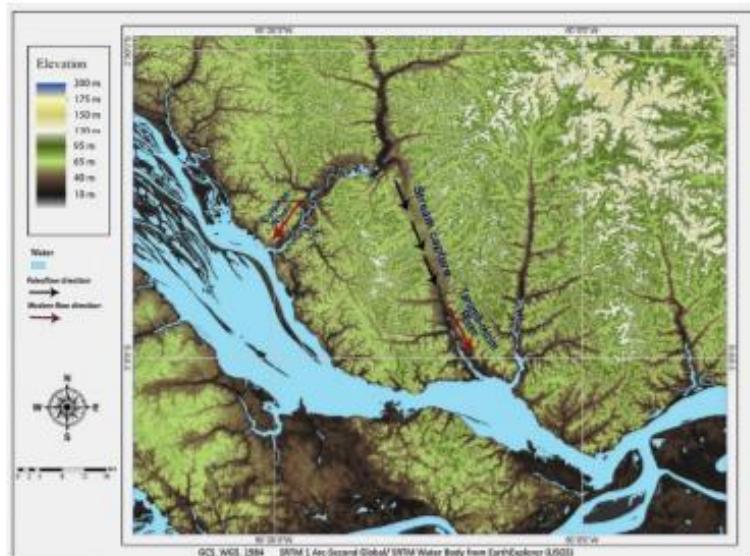


FIGURE 1 Landscape of the Culeiras and Tarumá-Mirim rivers caused by a stream capture that resulted in the paleovalley between them

2004), the Hardy–Weinberg (HWE) and Linkage Disequilibrium (LD) using Fstat v2.9.3.2 (Goudet, 2001). The total number of alleles (A), estimate of the observed (H_O) and expected (H_E) heterozygosities, structuring index (F_{ST}), and fixation index (F_{IS}) were determined according to Genetix v4.05.2 (Belkhir, Borsig, Chikhi, Raufaste, Bonhomme, 2004). The polymorphism information content (PIC) was calculated using Cervus v3.0.3 (Kalinowski, Taper, & Marshall, 2007). We applied the mixture model (Admixture) which correlates the gene frequency among the populations, using Structure v2.3.1 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000).

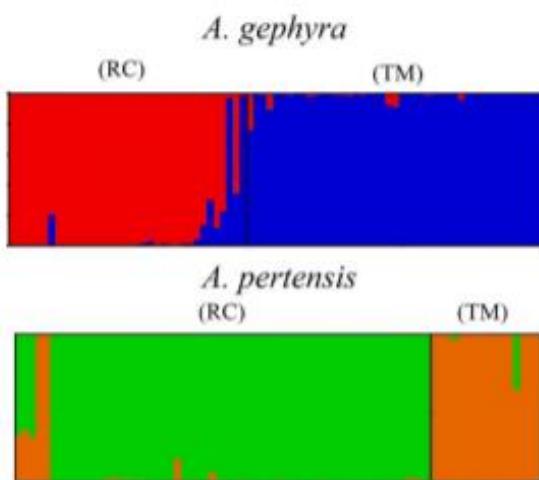


FIGURE 2 Assignment analysis assuming $K = 2$. The assignment was calculated in STRUCTURE based on eleven microsatellites

3 | RESULTS

The enrichment success for the clones with repeats was 80%; 30 clones amplified and 11 microsatellite loci were polymorphic in both species and successfully cross-amplified in *A. pertensis* (Table 1). We did neither detect null alleles nor linkage disequilibrium between loci. The number of alleles per locus varied from two to eleven for *A. gephysra* and from three to eleven for *A. pertensis*. The PIC ranged from 0.475 to 0.784 (*A. gephysra*) and from 0.434 to 0.810 (*A. pertensis*). For *A. gephysra*, the H_O and H_E varied, respectively, from 0.267 to 0.966 and from 0.402 to 0.819; and for *A. pertensis*, they varied from 0.115 to 0.963 and from 0.110 to 0.842, respectively. The F_{IS} values ranged from -0.572 to 0.351 for *A. gephysra*, and from -0.706 to 0.489 for *A. pertensis*. Two loci for *A. gephysra* (APG07 and APG23), and three loci for *A. pertensis* (APG07, APG20, and APG23) deviated significantly from HWE. The F_{ST} was 0.228 in *A. pertensis* and 0.128 in *A. gephysra*. The assignment test produced evidence for $K = 2$ as most likely number of populations (Figure 2).

4 | DISCUSSION

The result of genetic analyses confirms the low gene flow between different rivers. We found a low average number of alleles and a high number of private alleles (Table 1). Paired with the structure data (Figure 2), these results demonstrate a higher reproductive isolation and a diversification among the studied populations (Slatkin, 1995). The absence of mixture between the same species collected in different streams was interpreted as a geographic isolation between the rivers caused by the stream capture event, which reduced the gene flow between them (Figure 1). Montoya-Burgos (2003) suggests that geographic isolation contributes significantly to a high differentiation

TABLE 1 Characteristics of the 11 microsatellite loci in *Apis florea* gynandromorphs and cross-amplification in *Apis florea* peritarsis

| Loci | GenBank accession | Primer sequence (5'-3') | Repeat motif | Tm (°C) | Allele size (bp) | | A. peritarsis | | A. gynandromorph | | | | | | | | |
|-------|-------------------|--|---|---------|------------------|-----|----------------|----------------|------------------|--------|---------|-----|----------------|-------|-------|--------|---------|
| | | | | | A | PIC | H _E | H _O | F _E | HWE | A | PIC | H _E | | | | |
| APG07 | KT372869 | F: GACTAACACTATCCCATCT R: AGCTGTGGATTGAGTTTC | (GT) ₁₆ | 50 | 198 | 3 | 0.652 | 0.536 | 0.929 | -0.706 | 0.0001* | 3 | 0.672 | 0.596 | 0.900 | -0.497 | 0.0001* |
| APG18 | KT372870 | F: TGAAGCAATTAGAMACACGG R: TGAGCACTAGACACTGAAATG | (GT) ₉ | 56 | 151 | 7 | 0.472 | 0.253 | 0.276 | -0.072 | 0.5709 | 7 | 0.475 | 0.402 | 0.267 | 0.351 | 0.9997 |
| APG21 | KT372871 | F: ACAGGAAAACCACACTTG R: ACACCATCCAGAACACAAAT | (CT) ₆ (CA) ₆ | 56 | 82 | 9 | 0.810 | 0.842 | 0.900 | -0.052 | 0.3546 | 11 | 0.736 | 0.772 | 0.733 | 0.067 | 0.8675 |
| APG23 | KT372872 | F: TCACTCAACTTGCCTCTG R: AGATTACACCACCTGCTTA | (GT) ₅ TT(GT) ₁₀ | 56 | 164 | 3 | 0.524 | 0.523 | 0.897 | -0.705 | 0.0001* | 3 | 0.512 | 0.523 | 0.828 | -0.572 | 0.0001* |
| APG24 | KT372873 | F: TTACTCCCACCTAAGTCAG R: GAAGCAAGTTGAGTTGAAG | (CA) ₂ TA (CA) ₂ | 56 | 167 | 11 | 0.810 | 0.836 | 0.931 | -0.096 | 0.1517 | 9 | 0.693 | 0.775 | 0.966 | -0.230 | 0.0050 |
| APG08 | KT372874 | F: GTATGACAGTAAAGGGAT R: CTAACAAACGAACCTCCACA | (GA) ₆ | 56 | 164 | 3 | 0.562 | 0.421 | 0.500 | -0.149 | 0.2986 | 4 | 0.540 | 0.603 | 0.800 | -0.312 | 0.0085 |
| APG11 | KT372875 | F: CATAAAGGTG TGCGGGAAAGA R: TGTGCCCTGAGACTGATCAT | (TG) ₃ TCT(G) ₁₀ | 59 | 197 | 9 | 0.809 | 0.799 | 0.857 | -0.055 | 0.3617 | 8 | 0.784 | 0.819 | 0.767 | 0.082 | 0.8842 |
| APG16 | KT372876 | F: TGAGGAAAGTGAGGATGAAAG R: CTGATGAAGGCCCTCACAG | (GT) ₃ (GA(GT) ₁₀ | 56 | 293 | 8 | 0.642 | 0.615 | 0.679 | -0.086 | 0.2970 | 7 | 0.635 | 0.565 | 0.733 | -0.282 | 0.0168 |
| APG14 | KT372877 | F: CAGAGGTGTTGATGTTAGTGC R: CATCACAAAAGAGGTAGCC | (CA) ₂ CG(CA) ₅ | 59 | 210 | 3 | 0.434 | 0.110 | 0.115 | -0.027 | 0.9435 | 4 | 0.587 | 0.650 | 0.586 | 0.115 | 0.8735 |
| APG15 | KT372878 | F: AACTTTGATAATCTGGAGGG R: TACTGTGTCTCCATCTTGC | (TG) ₁₁ TT(TG) ₂ | 50 | 286 | 4 | 0.574 | 0.359 | 0.190 | 0.489 | 0.9992 | 2 | 0.340 | 0.475 | 0.556 | -0.153 | 0.3495 |
| APG20 | KT372879 | F: AGGATTCCGGAGGTTACTG R: GGGTAGTATGCCATTCT | (CA) ₃ (CG) ₃ TG (CG) ₃ (CA) ₆ | 51 | 284 | 7 | 0.737 | 0.669 | 0.963 | -0.423 | 0.0003* | 7 | 0.620 | 0.596 | 0.643 | -0.060 | 0.4170 |

*Means significant differences.

Melting Temperature (Tm), Number of alleles (A), polymorphism information content (PIC), expected (HE) and observed heterozygosities (HO), fixation index (F_E), p values for the HWE test we assumed at 5% ≤ 0.00055 significance with the threshold adjusted using Bonferroni correction.

among analyzed populations and affects small populations more than selection itself. Herein, we detected that the eleven polymorphic microsatellite loci are highly variable and potentially useful tools for genetic research in the Amazonian dwarf cichlid's populations. In conclusion, this is the first set of species-specific microsatellite loci developed for species of Amazonian dwarf cichlid *A. geophyra* with successful cross-amplification in the species congener *A. pertensis* and clear evidence of population structure and vicariance effects.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank colleagues at INPA for assistance in collecting and providing specimens, R. Britzke for the genetic identification, Centro Universitário de Ensino Superior do Amazonas (CIESA), and an anonymous reviewer for helpful comments.

ORCID

C. S. S. Leitão  <http://orcid.org/0000-0001-6475-4686>

REFERENCES

- Belkhir, K., Borsig, P., Chikhi, L., Raufaste, N., & Bonhomme, F. (2004). GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Montpellier, France: Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II.
- Billotte, N., Lagoda, P. J. R., Risterucci, A. M., & Baurens, F. C. (1999). Microsatellite-enriched libraries: Applied methodology for the development of SSR markers in tropical crops. *Fruits*, 54, 277–288.
- Engelking, B., Römer, U., & Beisenherz, W. (2010). Intraspecific colour preference in mate choice by female *Apistogramma cacatuoides* HOEDEMAN, 1951 (Teleostei: Perciformes: Cichlidae). *Vertebrate Zoology*, 60, 199–208.
- Goudet, J. 2001. FSTAT: a program to estimate and test gene diversities and fixation indices. (version 2.9.3.2). Retrieved from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>. Updated from: Goudet, J. 1995. FSTAT (version 1.2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 86, 485–486.
- Kalinowski, S. T., Taper, M. L., & Marshall, T. C. (2007). Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16, 1006–1099.
- Montoya-Burgos, J. I. (2003). Historical biogeography of the catfish genus *Hypostomus* (Siluriformes: Loricariidae), with implications on the diversification of Neotropical ichthyofauna. *Molecular Ecology*, 12, 1855–1867.
- Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. J. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155, 945–959.
- Römer, U. (2006). Cichlids Atlas: Natural history of South American dwarf cichlids. Melle, Germany: Mergus-Publishers v.2.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual, 2nd ed.. New York, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schuelke, M. (2000). An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18, 233–234.
- Slatkin, M. A. (1995). A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, 130, 457–462.
- Val, P., Silva, C., Harbor, D., Morales, N., Amaral, F., & Maia, T. (2014). Erosion of an active fault scarp leads to drainage capture in the Amazon region, Brazil. *Earth Surface Processes and Landforms*, 39, 1062–1074.
- van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). Micro-checker: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4, 535–538.

How to cite this article: Leitão CSS, Santos CHA, Souza ÉMS, et al. Development and characterization of microsatellite loci in Amazonian dwarf cichlids *Apistogramma* spp. (Perciformes: Cichlidae): Uncovering geological influence on Amazonian fish population. *J Appl Ichthyol*. 2017;33:1196–1199. <https://doi.org/10.1111/jai.13490>