INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA – INPA
Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEv)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM
Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL)

O PAPEL DAS CORREDEIRAS E DO CLIMA NO PLEISTOCENO NA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE *Prochilodus nigricans* Agassiz, 1892 (Characiformes: Prochilodontidae)

Bruna Soares

MANAUS – AMAZONAS
Maio, 2016

Bruna Soares

O PAPEL DAS CORREDEIRAS E DO CLIMA NO PLEISTOCENO NA DIFERENCIAÇÃO GENÉTICA DE *Prochilodus nigricans* Agassiz, 1892 (Characiformes: Prochilodontidae)

ORIENTADORA: DR. TOMAS HRBEK
COORIENTADOR: DR. JANSEN ALFREDO SAMPAIO ZUANON

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

MANAUS – AMAZONAS
Maio, 2016

FICHA CATALOGRÁFICA

S 676 Soares , Bruna

O papel das corredeiras e do clima no pleistoceno na diferenciação genética de Prochilodus Pigricans Agassiz, 1892 (Characiformes: Prochilodontidae) / Bruna Soares . --- Manaus: [s.n.], 2016.
34 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2016.
Orientador: Tomas Hrbek
Coorientador: Jansen Alfredo Sampaio Zuanon
Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia evolutiva

1. Curimatã . 2. Prochilodus Pigricans Agassiz . 3. Mudanças climáticas . I. Título.

CDD 597.4

Sinopse: Sinopse: Estudou-se a o papel das corredeiras e do clima no pleistoceno na diferenciação genética de *Prochilodus nigricans* utilizando o Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing – NGS*). As corredeiras dos rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins, não são barreiras totais para as populações de *Prochilodus nigricans*. Existe o fluxo gênico bidirecional entre as populações localizadas a montante e a jusante das cachoeiras. Possivelmente as alterações climáticas do Pleistoceno foram responsáveis pela separação das populações nos rios.

Palavras-chave: Amazônia, SNPs, fluxo gênico, barreiras geográficas.

À minha mãe, Enildes Soares de Araújo, pelo exemplo de coragem e fé.

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo Seu amor e cuidado nas coisas grandes e pequenas. Agradeço a minha mãe e minha irmã Larissa pelo apoio e a longas ligações em todos esses anos fora de casa. A minha grande família, meus tios, tias, primos e primas e meu avô. Em especial pelo meu tio Enóquio por sempre ser um bom exemplo.

Agradeço aos meus amigos, que se tornaram a minha família aqui em Manaus. Em especial a Graciema pela recepção na minha chegada a cidade. A Odineas pela adoção e aos meus novos irmãos Erico, Luciane e Marcone. A minha amiga Sara, pelo apoio e amizade.
E também aos amigos de Porto Velho pela ajuda na mudança de cidade. Aos Clubes de Desbravadores Escudeiros de Cristo, importantes na época do ingresso e Amazonas pelo apoio para que eu não enlouquecesse durante o mestrado.

Agradeço ao meu orientador Professor Tomas Hrbek pelos ensinamentos, pela paciência e tempo dedicados ao meu crescimento profissional. Ao Jansen Zuanon que apesar da mudança de projeto, topou permanecer como co-orientador.

Ao trio que foram fundamentais para o sucesso dessa dissertação: Sandra, Val e José. Vocês ensinaram muito. A minha turma do mestrado, Rejane companheira para todas as horas, a Robertinha, Hallana, Sabrina, Pedro, Yumi, Fernanda, Dinho e Gabriel. Aos amigos do laboratório LEGAL pela companhia.

Ao INPA e Programa de Pós-Graduação em Genética Conservação e Biologia Evolutiva pela oportunidade.
Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela bolsa durante o mestrado.

“O homem pode criar suas circunstâncias, mas as circunstâncias nunca devem criar o homem. ” Ellen G. White

RESUMO

O Pleistoceno iniciou-se há cerca de 2,5 milhões de anos e foi uma Época marcada por oscilações climáticas e glaciações. Durante o período de glaciação o nível do mar diminuía, provocando a redução dos níveis dos rios e causando a erosão dos leitos, as corredeiras ficavam mais evidentes como barreiras. Nos períodos interglaciais o nível do mar aumentava cerca de 120 m provocando inundações do rio Amazonas e seus afluentes como resultado, as barreiras deixaram de existir por um tempo, permitindo então a expansão da distribuição das espécies de peixes. Como consequência as populações de peixes foram isoladas ou expandiram sua distribuição. Alguns rios da bacia Amazônica fazem uma abrupta transição entre as bordas do Escudo Brasileiro e a planície Amazônica favorecendo a ocorrência de corredeiras e cachoeiras como ocorrem nos rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia. Alguns estudos realizados nesses rios mostram que as corredeiras influenciam o fluxo gênico e a dispersão de várias espécies. O presente estudo propôs testar se essas corredeiras afeta o fluxo gênico entre as populações de *Prochilodus nigricans* e também como o clima no Pleistoceno afetou a sua distribuição. Foi utilizado Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing – NGS*), para verificar a importância das barreiras físicas (corredeiras) e mudanças climáticas no Pleistoceno na estrutura genética da espécie *Prochilodus nigricans*. Para testar se as corredeiras no Tocantins, Xingu, Tapajós e Madeira são barreiras para fluxo gênico para populações de *Prochilodus nigricans* a jusante e a montante das corredeiras. A estimativa de grupos biológicos baseados no equilíbrio Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação foi realizada no Structure 2.3.4. A presença e direção do fluxo gênico, e o tempo de divergência entre as duas populações em cada rio, foi usando a abordagem de MCMC e um modelo coalescente de isolamento com migração, que estima as taxas de migração e tempos de divergência entre duas ou mais populações que divergiram de uma população ancestral, no programa IMa2. Os resultados mostraram que as corredeiras dos rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins, não são barreiras totais para as populações de *Prochilodus nigricans*. Existe o fluxo gênico bidirecional entre as populações localizadas a montante e a jusante das cachoeiras. Portanto a construção de hidrelétricas ou barragens podem afetar o fluxo gênico. Quanto ao tempo de divergência das populações, os resultados observados indicam que possivelmente as alterações climáticas do Pleistoceno foram responsáveis pela separação das populações nos rios Madeira com 420 mil anos, Tapajós com 375 mil anos e Xingu 539 mil anos. O resultado do rio Tocantins 239 anos, mostra que as populações ainda não estão totalmente isoladas.

Palavras-chave: Amazônia, SNPs, fluxo gênico, barreiras geográficas.

ABSTRACT

The Pleistocene began about 2.5 million years ago and was an epoch marked by climatic oscillations and glaciations. During the glaciation period the sea level diminished, causing the reduction of river levels and causing erosion of riverbeds, the rapids became more evident as barriers. In interglacial periods the sea level increased by 120 m causing inundations of the Amazon River and its tributaries, and as a result, the barriers ceased to exist for a while, thus allowing the expansion of the distribution of fish species. As a consequence the fish populations were isolated or expanded their distribution. Some rivers of the Amazon basin make an abrupt transition between the borders of the Brazilian Shield and the Amazonian plain favoring the occurrence of rapids and waterfalls such as those in the rivers Madeira, Tapajós, Xingu and Tocantins-Araguaia. Some studies in these rivers show that the rapids influence gene flow and dispersal of several species. The present study proposed to test if these rapids affect gene flow between populations of *Prochilodus nigricans* and also how the climate in the Pleistocene affected its distribution. Next Generation Sequencing (NGS) was used to verify the importance of physical barriers (rapids) and climatic changes in the Pleistocene on the genetic structure of the species *Prochilodus nigricans*. To test whether the rapids in Tocantins, Xingu, Tapajós and Madeira are barriers to gene flow for populations of *Prochilodus nigricans* downstream and upstream the rapids. Inference of biological groups based on Hardy-Weinberg equilibrium and binding disequilibrium was performed in Structure 2.3.4. The presence and direction of gene flow, and the time of divergence between the two populations in each river, was done using the MCMC approach and a coalescing model of isolation with migration, which estimates the migration rates and divergence times between two or more populations that diverged from an ancestral population in the IMa2 program. The results showed that the rapids of the Madeira, Tapajós, Xingu and Tocantins rivers are not total barriers for the populations of *Prochilodus nigricans*. There is a two-way gene flow between the populations located upstream and downstream of the waterfalls. Therefore the construction of hydroelectric dams or dams can affect gene flow. As far as the time of divergence of the populations, the observed results indicate that the climatic changes in the Pleistocene were possibly responsible for the separation of the populations in the rivers Madeira with 420 thousand years, Tapajós with 375 thousand years and Xingu 539 thousand years. The result of the Tocantins River 239 years, shows that the populations are not yet totally isolated.

Key words: Amazon, SNPs, gene flow, geographical barriers.

Sumário

RESUMO 7
ABSTRACT 8
1 INTRODUÇÃO 12
3 OBJETIVOS 17
3.1 Objetivo Geral 17
3.2 Objetivos Específicos 17
4 MATERIAL E MÉTODOS 18
4.1 Amostragem 18
4.3 Coleta dos dados 19
4.4 Análises dos dados 20
4.4.1 Edição dos dados 21
4.4.2 Análise da estrutura populacional 21
4.4.3 Quantificação e direção do fluxo gênico 21
4.4.4 Tempos de divergências entre as populações 22
5 Resultados 23
5.1 Estrutura populacional e fluxo gênico 23
5.2 Tempos de divergência 24
6 Discussão 27
6.1 Estrutura Populacional e Fluxo Gênico 27
6.2 Tempos de Divergências 29
7 Conclusão 30

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Pontos de amostragem e quantidade de indivíduos em cada bacia.

Tabela 2. Número de migrantes por geração (2*Nm*). Os rios foram analisados separadamente e o fluxo gênico foi quantificado nas duas direções. J: Jusante; M: Montante e a seta indica a direção do fluxo gênico.

Tabela 3. Tempos de divergência das populações. HiPt maior probabilidade. HPD95Hi menor densidade posterior. HPD95Lo maior densidade posterior. Resultados obtidos no programa IMa2.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Períodos glaciais e interglacais na bacia Amazônica. A) Aumento do nível do rio no início do período interglacial; B) Erosão no início do período glacial (Wesselingh & Hoorn, 2011).

Figura 2. Exemplar de *Prochilodus nigricans.* Foto: Tiago Pires.

Figura 3. Mapa da área de estudo.

Figura 4. Estrutura populacional determinada pelo *Structure* pela inferência Bayesiana. Foram analisados 10 indivíduos; à montante e 10 à jusante das corredeiras de cada rio separadamente. Gráfico de indivíduos onde cada barra vertical representa um indivíduo.

Figura 5. Tempo de divergência entre as populações a montante e jusante da corredeira de Teotônio no Rio Madeira. O valor melhor valor encontrado foi de 420 mil anos.

Figura 6. Tempos de divergência entre as populações do alto e baixo Tapajós. O tempo mais provável encontrado foi de 375 mil anos.

Figura 7. Tempos de divergência entre as populações do alto e baixo Xingu. O tempo com maior probabilidade encontrado foi de 539 mil anos.

Figura 8. Tempos de divergência entre as populações do alto e baixo Tocantins. O tempo com maior probabilidade encontrado foi de 239 anos.

1 INTRODUÇÃO

O Pleistoceno iniciou-se há cerca de 2,5 milhões de anos e foi uma Época marcada por oscilações climáticas e glaciações (Wesselingh & Hoorn, 2011). O clima da planície central da Amazônia permaneceu úmido semelhante ao atual, embora com temperaturas mais frias, cerca de 5ºC (Hooghiemstra & Hammen, 2004). A vegetação nessas áreas permanecia a floresta tropical úmida, fragmentada pela presença de savanas em locais com clima mais afetadas pela aridez (Haffer, 1969). Durante as glaciações a redução no nível do mar afetava os rios a uma distância de 4.000 km acima da foz do rio Amazonas, e nos interglaciais o rio Amazonas e seus afluentes foram inundados pelo represamento provocado pelo aumento do nível do mar, como os observados na figura 1. Esses fatores contribuíram para a atual configuração da paisagem (Hoorn, 1996) e distribuição de espécies (Hubert & Renno, 2006).

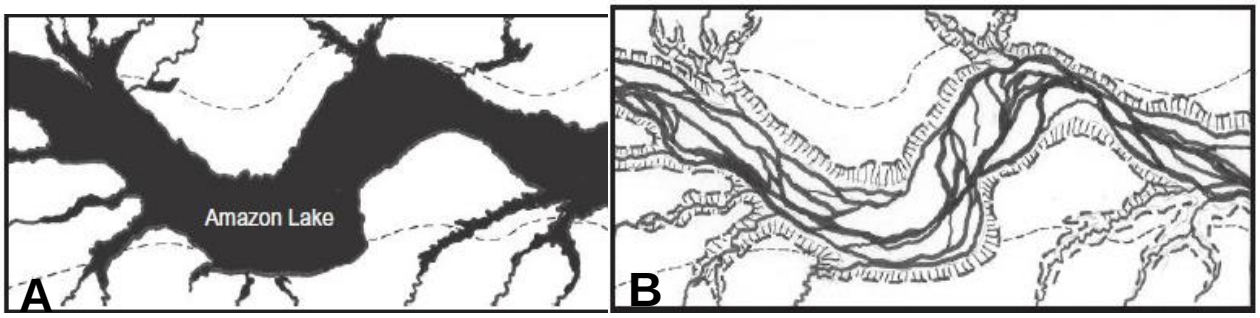

Figura 1. Períodos glaciais e interglacais na bacia Amazônica. A) Aumento do nível do rio no início do período interglacial; B) Erosão no início do período glacial (Wesselingh & Hoorn, 2011).

As alterações climáticas há cerca de 2,5 milhões de anos apontam para oscilações globais do nível do mar em cerca de 120 m, afetando diretamente as terras baixas da Amazônia. Na época do Pleistoceno os ciclos glaciais, resultaram em alterações nos leitos dos rios da Amazônia e seus afluentes (Wesselingh & Hoorn, 2011). Durante o período de glaciação o nível do mar diminuía, provocando a redução dos níveis dos rios e causando a erosão dos leitos (Irion, 2010). Nos períodos interglaciais o nível do mar aumentava provocando inundações do rio Amazonas e seus afluentes (Wesselingh & Hoorn, 2011).

Os períodos glaciais e interglaciais favoreciam as mudanças nos rios, causando as reorganizações contínuas de cursos de rios e limites das bacias hidrográficas. Como resultado as populações de peixes foram isoladas ou expandiram sua distribuição. Nos rios as corredeiras poderiam atuar como barreira, mas nesse período de aumento do nível do mar como consequência também ocorreu a elevação do nível dos rios e como resultado, as barreiras deixaram de existir por um tempo, permitindo então a expansão da distribuição das espécies de peixes. Dessa forma as incursões marinhas influenciaram profundamente a distribuição da ictiofauna (Hubert & Renno, 2006) (Wesselingh & Hoorn, 2011).

Atualmente as corredeiras são barreiras para diversos organismos aquáticos, restringindo parcial ou totalmente o fluxo gênico entre as populações a montante e a jusante das corredeiras. Entre os rios Amazônicos com corredeiras podemos citar os rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins. Na literatura encontramos vários estudos, não apenas com peixes, mostrando a influência das corredeiras como barreira para migração ou limitação parcial ao fluxo gênico, como por exemplo, estudos realizados com jacarés, *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier, 1807) (Muniz, 2012). Também para os peixes *Colossoma macropomum* (Cuvier, 1818) (Farias *et al*., 2010) *Tripotheus angulatus* (Spix & Agassiz, 1829) (Soares, 2014), *Prochilodus nigricans* (Machado, 2009), *Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior* (Martín, 2013).

Exemplos de estudos de fluxo gênico foram realizados com populações de jacaré-açu *Melanosuchus niger* (King & Burke 1989), os resultados mostraram dois grupos diferentes separados pela cachoeira de Teotônio, onde foi observado fluxo gênico unidirecional, com indivíduos apenas descendo o rio (Rangel, 2015). Outro jacaré afetado é o *Paleosuchus palprebrosus* (Cuvier, 1807) onde a corredeira limita, mas não isola totalmente as duas populações (Bolívia/Madeira), as taxas de migração são bidirecionais, mas no sentido de subida do rio Madeira é maior (Muniz, 2012). Para o peixe tambaqui *Colossoma macropomum* o fluxo gênico encontrado foi maior no sentido da sub bacia Boliviana em direção a bacia Amazônica (montante para jusante) (Farias *et al*., 2010). Para o curimatã, *Prochilodus nigricans (figura 1)* as corredeiras do rio Madeira também atuam como barreiras ao fluxo gênico (Machado, 2009). Enquanto que para as espécies de *Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior* as corredeiras não eram uma forte barreira à troca genética (Martín, 2013).

A presença do *Prochilodus nigricans* nos rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins, e sua história de vida, tornam essa espécie um perfeito modelo para testar como o clima no Pleistoceno afetou a sua distribuição, e também o efeito das corredeiras sobre o fluxo gênico da espécie**.**

Figura 2. Exemplar de *Prochilodus nigricans.* Foto: Tiago Pires.

A espécie popularmente conhecida como curimatá, *Prochilodus nigricans (figura 2),* pertence à família Prochilodontidae, um grupo de peixes migradores muito importante para a pesca e economia local (Bayley & Petrere, 1989). A família inclui 21 espécies divididas em três

gêneros: *Ichthyoelephas*, *Prochilodus* e *Semaprochilodus*, os quais estão presentes na grande maioria dos rios da bacia sul americana (Reis *et al*., 2003). Na Amazônia ocorrem três espécies do gênero *Prochilodus*, *P. nigricans* no rio Amazonas e afluentes principais, *P. rubrotaeniatus* no Alto rio Negro, rio Branco e rio Trombetas (Araújo – Lima & Ruffino, 2003) e *P. britskii* restrita a um tributário do Alto Tapajós (Castro, 1993). Algumas espécies se destacam nas pescarias por conta de sua alta importância para o consumo regional, como *Semaprochilodus* ssp. (jaraqui) que no rio Negro representam 90% da biomassa de peixes consumidos (Golding *et al.,* 1988) e *Prochilodus nigricans* (curimatã) (Ruffino *et al*., 2004). *Prochilodus nigricans* é um peixe de médio porte, chegando a 50 cm e 3 kg. Com hábitos detritívoros, alimenta-se de algas perifíticas, micro-organismos e matéria orgânica em decomposição. Na época reprodutiva forma cardumes e empreendem grandes migrações para a desova na enchente dos rios de água branca ou clara. Na fase de alevinos e jovens crescem em área de várzea (Santos *et al*., 2006).

O *Prochilodus nigricans* atinge a maturidade sexual com aproximadamente 2 anos de vida (Loubens & Panfili 1995). Para a reprodução ocorrer os indivíduos jovens e adultos bem alimentados e com grandes reservas energéticas, mas ainda com as gônadas em repouso formam cardumes durante a vazante e a seca (nos meses de setembro a dezembro) e sobem os rios de água branca a procura de local apropriado ao desenvolvimento dos ovos e das larvas para se reproduzirem. O local escolhido para reprodução são ambientes ricos em oxigênio e nutrientes. Na bacia Amazônica eles migram duas vezes ao ano para alimentação, reprodução e dispersão (Mota & Ruffino 1997). Estudos indicam que são grandes nadadores, com capacidades biológicas de realizar grandes migrações reprodutivas anuais de milhares de quilômetros de extensão (Castro 1990). O rio Madeira e o Solimões são rios de águas brancas com nascentes nos Andes (Sioli, 1951), os rios Tapajós, Xingu e Tocantins são rios de aguas claras (Sioli, 1951), na época da migração reprodutiva os cardumes de *Prochilodus nigricans* sobem esses rios para se reproduzirem.

A bacia Amazônica é composta por inúmeros rios e abrange uma área de aproximadamente 6.869.00Km, caracterizada por dois tipos de relevos, a planície e a partes dos Escudo da Guiana e Escudo Brasileiro. Alguns rios percorrem os dois relevos resultando em corredeiras e cachoeiras nas áreas de abrupta transição, dentre os quais podemos citar os rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia (Ayres, 1995).

O rio Madeira possui uma transição abrupta entre o Escudo Brasileiro e a bacia Amazônica (De Queiroz *et al.,* 2013). Nessa área possuía 18 corredeiras reconhecidas em um trecho de 290 km nos rios Madeira e Mamoré, em território brasileiro. Entre elas Teotônio, que era a maior, com queda de cerca de 7,5 m, (Cella-Ribeiro, 2013), submersa totalmente com o fechamento da barragem em 2012 pelo empreendimento hidrelétrico de Santo Antônio (http://www.santoantonioenergia.com.br/energia/energia1/) acesso em 12 de maio de 2016).

Por sua vez, o rio Tapajós possui grandes corredeiras próximas de Itaituba (Golding, 2003), sendo que existem projetos de construção de duas usinas hidrelétricas, Jatobá e São Luiz do

Tapajós, o que provocará o represamento das corredeiras (EIA RIMA SLT). O *Prochilodus nigricans*, tem sua restrição ao fluxo gênico como efeito da presença dessas corredeiras, formando dois grupos evolutivos (Machado, 2009).

O rio Xingu possui águas claras, a sua nascente é no cerrado, ou savana tropical da região central do estado do Mato Grosso, e corre em direção ao norte, na Amazônia (Castilhos, 2010). Entre as principais corredeiras podemos citar as localizadas na Volta Grande, dividindo a vida aquática entre a Bacia Amazônica e do Alto Xingu (Golding, 2003). O governo brasileiro atualmente executa um projeto de instalação de uma usina hidrelétrica no rio Xingu essa construção afetará diretamente a fauna local, principalmente a aquática. (Projeto da Usina de Belo Monte - Fatos e Dados – Ministério de Minas e Energia).

O rio Tocantins nasce no Escudo Brasileiro e percorre, em leito bastante canalizado, em direção ao Norte desaguando no rio Pará. Em todo o seu curso são encontradas corredeiras e cachoeiras, sendo que no seu curso médio a construção da represa da UHE Tucuruí submergiu algumas dessas cachoeiras (Ribeiro *et al*., 1995). O rio Araguaia nasce na Serra dos Caiapós e percorre em paralelo com o rio Tocantins por cerca de 2.600 km. Possui quatro seções de cascata, a superior repleta de cachoeiras e corredeiras, na média-superior percorrendo uma planície de relevo suave onde está a ilha do Bananal. Após a ilha, o rio Araguaia percorre um canal bem definido com presença de mais corredeiras, a sua parte final é uma planície desaguando no rio Tocantins, formando o baixo Tocantins (Mérona *et al*., 2010).

Nos estudos de estruturação populacional citados acima (Muniz, 2012; Gravena *et al*., 2014; Farias *et al.,* 2010; Soares, 2014) foram usados marcadores de microssatélites e sequenciamento de genes mitocondriais. Atualmente já foram desenvolvidos novos marcadores com maior poder estatístico e assim capaz de detectar uma maior quantidade de variações no DNA. Essa capacidade é devido à grande quantidade de informações analisadas e dessa forma é possível avaliar minuciosamente os fluxos gênicos (Elshire *et al*., 2011).

Essa nova tecnologia de sequenciamento é chamada de Sequenciamento de Nova Geração (*Next Generation Sequencing – NGS*) (Funk *et al.,* 2012). Com ele é possível determinar a estruturação da população sem conhecimento prévio do genoma ou diversidade da espécie. O Sequenciamento de Nova Geração consiste em avaliar quase todo o genoma do indivíduo, com isso aumentam as chances de localizar mais marcadores moleculares, principalmente os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNP), e assim aumentam as chances de avaliar a estrutura populacional de forma mais eficiente em comparação com os marcadores mitocondriais (Elshire *et al*., 2011).

O Sequenciamento de Nova Geração proporciona uma amostragem representativa do genoma total, assim fica mais fácil a detecção de variações no genoma entre linhagens evolutivas e ainda reduz custos e tempo em comparação com outras metodologias, além de reduzir a quantidade de amostras por ser mais sensível a encontrar as variações (Elshire *et al*., 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Verificar a importância das barreiras físicas (corredeiras) e mudanças climáticas no Pleistoceno na estrutura genética da espécie *Prochilodus nigricans*.

3.2 Objetivos Específicos

1. Testar se as corredeiras no Tocantins, Xingu, Tapajós e Madeira são barreiras para fluxo gênico para populações de *Prochilodus nigricans* a jusante e a montante.
2. Caso sejam encontradas diferenças entre as populações, estimar o fluxo gênico em cada direção, e o tempo de divergência entre as duas populações em cada rio.
3. Correlacionar os tempos de divergências observados com os tempos das mudanças climáticas ocorridas durante o Pleistoceno para cada bacia.
4. Comparar as correlações de tempo de divergências observadas com os tempos das alterações climáticas do Pleistoceno entre as bacias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Amostragem

A área de estudo representada nos pontos destacados no mapa da figura 1 corresponde às bacias dos seguintes rios: Madeira, Xingu, Tapajós e Araguaia – Tocantins. Todas as amostras foram coletadas antes das construções das UHEs, exceto para o tio Tocantins, e foram inseridas na parte do banco de tecidos do Laboratório de Evolução e Genética Animal. Foram usadas 80 amostras sendo 10 de cada localidade, distribuídas conforme a tabela 1.

Tabela 1. Pontos de amostragem e quantidade de indivíduos em cada bacia.

Bacia	Localidades	Quantidade de indivíduos
Madeira	Montante - Guaporé e Guajará Mirim	10
	Jusante - Borba	10
Xingu	Montante - Altamira	10
	Jusante - Vitória Xingu	10
Tapajós	Montante - Jacareacanga	10
	Jusante - Arapiuns	10
Tocantins-Araguaia	Montante - Pedral de Santa Isabel	10
	Jusante - Baião (rio Tocantins)	10

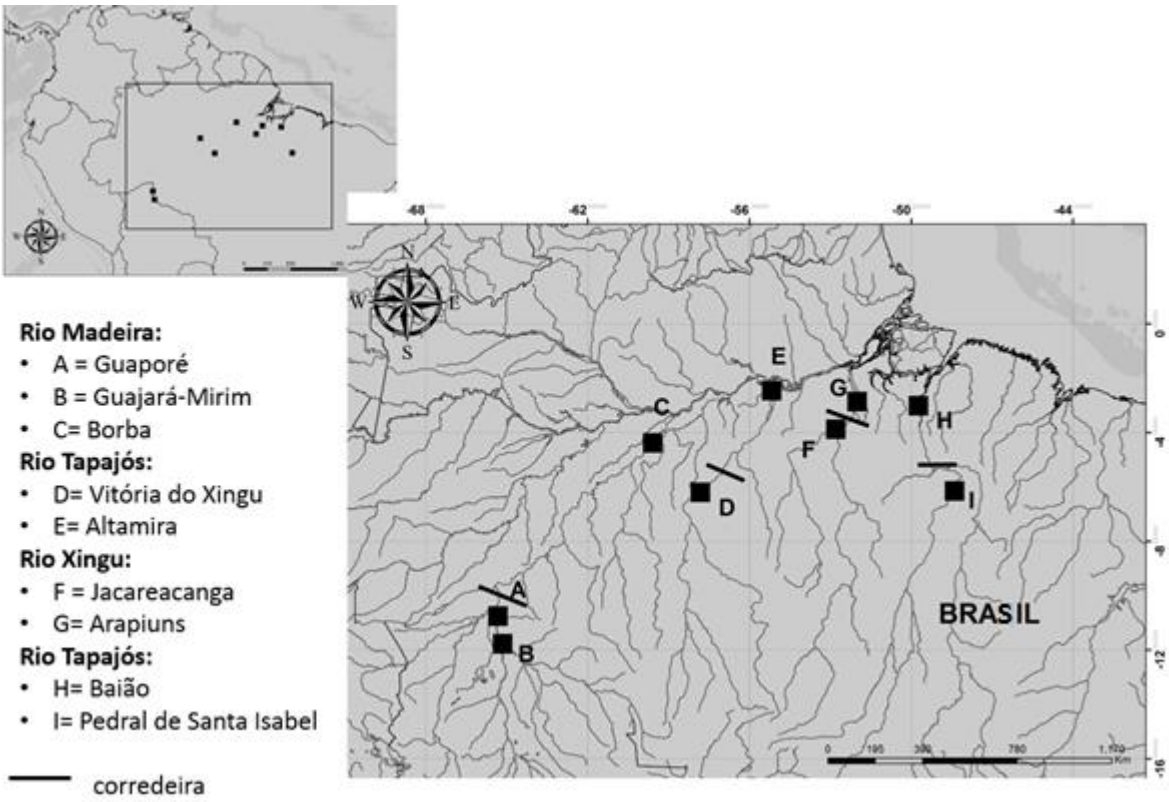

Figura 3. Mapa da área de estudo.

4.3 Coleta dos dados

A metodologia descrita a seguir é baseada em Petterson *et al.,* (2012), com modificações proposta por Martínez *et al*., (in prep.).

Extração e Preparo da Biblioteca genômica

A extração do DNA genômico das amostras coletadas foi seguindo o protocolo fenol-clorofórmio Sambrook *et al*., (1989). Foi verificado a integridade do DNA em gel de agarose 1% e também quantificado no *NanoDrop* 2000 (*Thermo Scientific*), e padronizado o cálculo para obter 200ng/µl de cada uma das amostras.

Depois de quantificado, o DNA foi cortado com as enzimas de restrição, *Csp*6I e *Sda*I que reconhecem sítios específicos de corte de 4 e 8 pares de base respectivamente, gerando fragmentos de diferentes tamanhos e composição de base, sendo esses finalmente ligados aos adaptadores, P1 e A (que possui um *barcode* por indivíduo de 10 pares de base) (Davey & Blaxter, 2010) com auxílio da T4 ligase e ATP.

Após essa etapa, foi realizada uma PCR teste para verificar se a digestão e ligação de adaptadores ocorreu adequadamente. O produto dessa PCR foi submetido a corrida em gel de agarose 1%.

Após verificado o funcionamento da digestão/ligação, uma nova PCR foi realizada com cinco réplicas para cada amostra para diminuir o desvio padrão dos alelos representativos de cada indivíduo gerado pelo viés da PCR. Esse PCR foi realizado com a *Klen Taq* (uma *Taq* de alta fidelidade que corrige possíveis erros de amplificação).

As amostras foram quantificadas no fluorômetro Qubit 2.0 (*Invitrogen*) seguindo as recomendações do fabricante. Em seguida todas as amostras foram colocadas em um único tubo (*pool)*, onde cada amostra estava representada pela mesma quantidade de DNA. Nessa etapa as amostras foram purificadas com o kit AMPure (*Agencourt*), seguindo as recomendações do fabricante.

A seleção de tamanho dos fragmentos da biblioteca (*pool* de amostras do passo anterior), foi feita no *Pippin Prep (Sage Science*), seguindo as instruções do fabricante. O tamanho médio dos fragmentos para sequenciamento foi de 415 pb, com início em 374 pb e o fim em 456 pb. Depois do corte o produto foi purificado com o kit AMPure e quantificado novamente no Qubit 2.0. (*Invitrogen*)

Depois das diluições necessárias das amostras, a biblioteca diluída foi utilizada de acordo com o protocolo do fabricante *"Prepare template-Positive Ion* PGM *Template* OT2 400 *Ion Sphere Particles (ISPs)*". Nessa etapa foram usados os reagentes e materiais dos kits "*Ion PGM Template OT2 Reagents 400*", "*Ion PGM Template OT2 Solutions 400*", "*Ion PGM Template OT2 Reactions 400*" e "*Ion PGM Template OT2 Supplies 400*". A reação de PCR clonal foi realizada no equipamento Ion OneTouch 2.

O produto da PCR clonal foi recuperado e lavado, para ser usado no enriquecimento do *template* seguindo o protocolo do fabricante "*Enrich the Template-Positive Ion PGM Template OT2 400 Ion Sphere Particles (ISPs)* ". Para essa etapa foram usados os reagentes e materiais dos kits "*Ion PGM Template OT2 Solutions 400*", "*Ion PGM Template OT2 Supplies 400*" e "*Ion PGM Enrichment Beads*". O enriquecimento foi feito no equipamento Ion OneTouch ES. Nessa etapa as *beads* magnéticas que não incorporaram fragmentos foram eliminadas.

Sequenciamento Ion Torrent

Na etapa anterior foi obtida uma amostra com as ISPs enriquecidas, usada no presente passo para o carregamento do chip Ion 318 V2 e posterior sequenciamento no sistema Ion Personal Genome Machine (PGM). Para essa parte final foram usados os reagentes e materiais dos kits "*Ion PGM Sequencing Reagents 400*", "*Ion PGM Sequencing Solutions 400*" e "*Ion PGM Sequencing Supplies 400*".

Os dados gerados foram processados pelo software *Torrent Suite* (da plataforma *Ion Torrent*, resultando em um arquivo no formato BAM transformado em FASTAQ para a edição e posteriores análises.

4.4. Análises dos dados

4.4.1 Edição dos dados

Antes das análises, os dados foram editados no programa PyRad (Eaton 2014). O PyRad utiliza uma medida de similaridade de sequência, com base em um alinhamento de sequências através do programa Vsearch. Nesse tipo de alinhamento é permitido obter *indels* entre e dentro das amostras e assim obtemos um melhor desempenho do banco de dados. Nessa edição foram identificados os genótipos de cada indivíduo, identificação dos alelos, loci e snps. No final da edição foram gerados arquivos de entrada para todas as análises. Os arquivos para todas as análises, foram considerados número mínimo de 15 indivíduos com determinada informação para ser considerada um loci a ser retido no conjunto de dados final. O número de máximo de sítios polimórficos compartilhados em um locus foram três.

4.4.2 Análise da estrutura populacional

Para atingir o objetivo específico número um o arquivo prochilodus.str foi analisado no Structure 2.3.4 (Pritchard, Stephens, & Donnelly, 2000) para obtenção dos resultados de estrutura populacional através da estimação de grupos biológicos baseados no equilíbrio Hardy-Weinberg e desequilíbrio de ligação.

Nessa etapa cada rio foi analisado separadamente, pois foram testadas se as corredeiras presentes em cada rio provocam a estruturação das populações em grupos a montante e jusante.

Para essa análise foram usados os seguintes parâmetros: 200000 gerações de "*burn-in*", 1000000 de gerações de Cadeia de Markov e Monte Carlo (MCMC) para cada *K*. As simulações foram repetidas 10 vezes para cada *K*. Esses resultados foram importados para o programa Structure Havester (Earl e von Holdt, 2012), para a determinação dos grupos biológicos pelo método de Evanno (Evanno *et al*., 2005). Os resultados foram permutados no programa Clumpp (Jakobsson & Rosenberg, 2007). Para visualização dos resultados de cada K foi usado o programa Distruct (Rosenberg, 2004)

4.4.3 Quantificação e direção do fluxo gênico

O objetivo específico dois foi alcançado com o arquivo prochilodus.alleles analisado no programa IMa2 (Hey & Nielsen, 2007) para a quantificação do fluxo, assim como a determinação da direção do fluxo. O programa IMa2 usando a abordagem de MCMC e um modelo coalescente de isolamento com migração, estima as taxas de migração e tempos de divergência entre duas ou mais populações que divergiram de uma população ancestral.

Os parâmetros para a análise do rio Madeira foram: tamanho máximo da população q= 5, taxa de migração m= 10 e tempo máximo da divisão da população t= 5 com 10800 passos de burn-in; Xingu q= 5, m= 10, t= 5 com 10800 passos de burn-in; Tapajós q= 6, m= 2, t= 2 com 10800 passos de burn-in e Tocantins q= 6, m= 2, t= 0.5 com 10800 passos de burn-in. O Modelo de mutação HKY foi utilizado para todos os rios. As analises foram feitas para os quatros rios separadamente, para posterior comparação

4.4.4 Tempos de divergências entre as populações

A última análise, respondeu aos objetivos específicos dois, três e quatro, quantificando o fluxo gênico e verificando a contribuição histórica das alterações climáticas do Pleistoceno. Para essa análise foi usado o tempo de divergência gerado pelo programa IMa2 (Hey & Nielsen, 2007), conforme os parâmetros da análise do item anterior. Foram estimados os valores a serem usados nos cálculos dos tempos de divergência.

Os valores encontrados foram transformados para escala biológica usando o tempo de geração de 2 anos (Loubens & Panfili, 1995) e taxa de mutação de -10^{-9} (Brumfield *et al*., 2003).

Os resultados encontrados referentes aos tempos de divergência foram comparados com dados da literatura referentes a períodos glaciais e interglaciais, para verificar quais desses eventos influenciaram a estrutura genética das populações de *Prochilodus nigricans* nesses rios. Essa análise inferiu o componente histórico dessa estrutura populacional, quando a população começou a divergir. O critério para determinar se existe concordância entre os tempos de divergência estimados e aqueles existentes na literatura foi a sobreposição do intervalo de confiança entre eles ou o seu equivalente. Os resultados encontrados foram comparados entre os

rios, para mostrar concordância ou não entre eles, através da observação e comparação dos resultados.

5 Resultados

Os resultados foram obtidos pelo sequenciamento de dois chips, cada um deles com 40 amostras. A média do número de leituras geradas por corrida foi de aproximadamente 6 milhões, por tanto foram produzidas cerca de 12 milhões de leituras, das quais aproximadamente 6 milhões passaram o controle de qualidade e tiveram um tamanho maior que 296 pares de bases. No programa PyRad foram processados os dados dos 80 indivíduos, determinando os locos e SNPs, usados nas análises.

5.1 Estrutura populacional e fluxo gênico

A análise no programa *Structure* identificou 2 grupos biológicos para o rio Madeira e Tapajós, marcados pela baixa mistura dos indivíduos das localidades. Também foram identificados 2 grupos biológicos para o rio Xingu com mistura de indivíduos de ambas as localidades. Para o rio Tocantins foram identificados 3 grupos biológicos distribuídos entre as duas localidades de coleta.

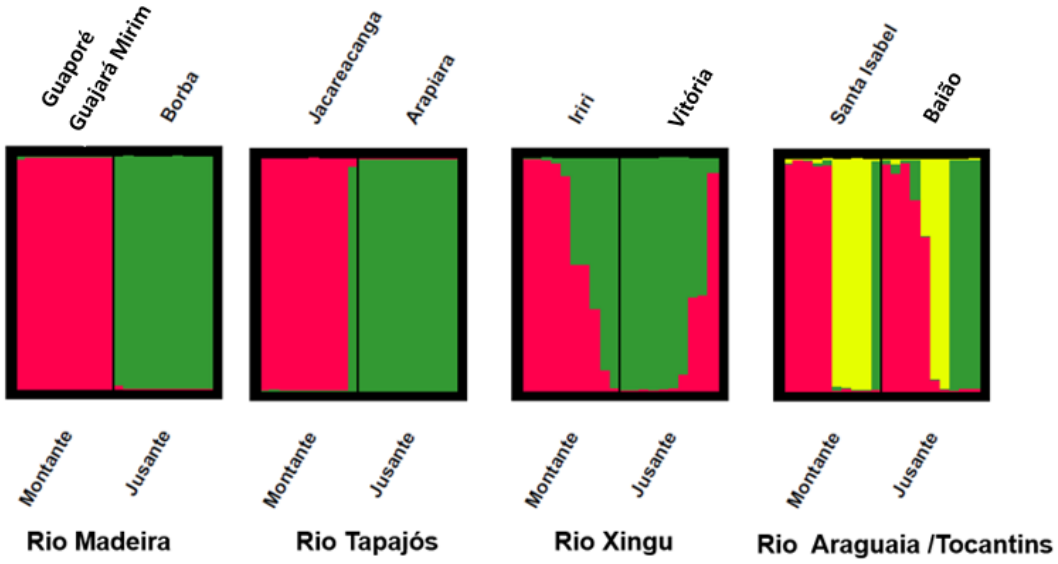

Figura 4. Estrutura populacional determinada pelo *Structure* pela inferência Bayesiana. Foram analisados 10 indivíduos; à montante e 10 à jusante das corredeiras de cada rio separadamente. Gráfico de indivíduos onde cada barra vertical representa um indivíduo.

Os fluxos gênicos bidirecionais foram determinados no Ima2. Esses resultados estão na tabela 2, destacando-se os menores valores de fluxos gênico nos rios Tapajós e Tocantins e os maiores nos rios Madeira e Xingu.

Tabela 2. Número de migrantes por geração (2*Nm*). Os rios foram analisados separadamente e o fluxo gênico foi quantificado nas duas direções. J: Jusante; M: Montante e a seta indica a direção do fluxo gênico.

	M → J	M ← J
Madeira	0,4604	1,358
Tapajós	0,4943	0,1105
Xingu	2,3320	0,5674
Tocantins	0,0001	0,0001

5.2 Tempos de divergência

Os tempos de divergência das populações em cada rio foram medidos no IMa2 e estão representados na tabela 4 e também nas figuras 6, 7, 8 e 9. O tempo médio, mais provável, para a divergência das populações a montante da população a jusante da corredeira de Teotônio no rio Madeira é 420 mil anos, o rio Tapajós também apresentou um tempo próximo 375 mil anos aproximadamente. O rio Xingu possui o tempo mais antigo em comparação aos outros rios, por volta de 539 mil anos. Enquanto que para o rio Tocantins essa separação das populações ocorreu há 239 anos, o tempo mais recente entre os quatro rios.

Tabela 3. Tempos de divergência das populações. HiPt maior probabilidade. HPD95Hi menor densidade posterior. HPD95Lo maior densidade posterior. Resultados obtidos no programa IMa2.

	Rio Madeira	Rio Tapajós	Rio Xingu	Rio Tocantins
	Tempo em anos	Tempo em anos	Tempo em anos	Tempo em anos
HPD95Lo	384.343	313.984	490.180	o
HiPt	420.336	375.046	539.728	239
HPD95Hi	462.589	447.034	586.783	1.838

Figura 5. Tempo de divergência entre as populações a montante e jusante da corredeira de Teotônio no Rio Madeira. O valor melhor valor encontrado foi de 420 mil anos.

Figura 6. Tempos de divergência entre as populações do alto e baixo Tapajós. O tempo mais provável encontrado foi de 375 mil anos.

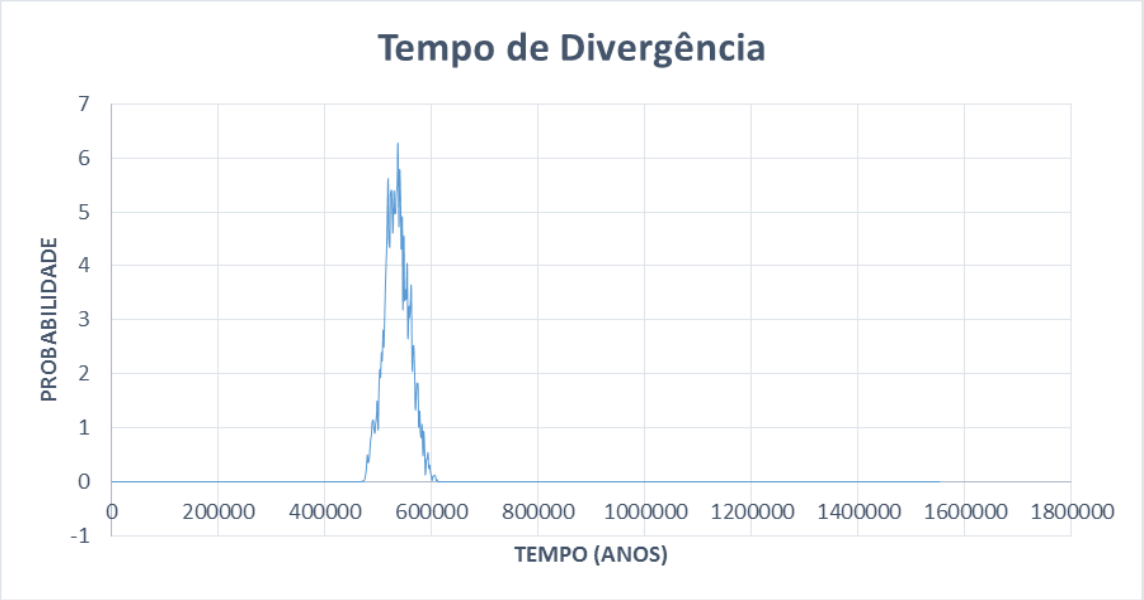

Figura 7. Tempos de divergência entre as populações do alto e baixo Xingu. O tempo com maior probabilidade encontrado foi de 539 mil anos.

Figura 8. Tempos de divergência entre as populações do alto e baixo Tocantins. O tempo com maior probabilidade encontrado foi de 239 anos.

6 Discussão

6.1 Estrutura Populacional e Fluxo Gênico

Segundo Frankham *et al.,* (2002) o número de migrantes por geração (*Nm*) maior que 1 seria suficiente para manter as frequências gênicas homogêneas e consequentemente impedir o processo de especiação. Em geral nos rios estudados os valores Nm encontrados foram baixos, quando comparados as populações a montante e jusante das corredeiras.

O rio Madeira apresentou dois grupos biológicos com a separação marcada pela antiga corredeira de Teotônio, sendo a mais alta do trecho de corredeiras com cerca de 7,5 m de queda (Cella-Ribeiro, 2013). Atualmente a corredeira foi submersa pela usina hidrelétrica de Santo Antônio, mas as amostras do presente estudo foram coletadas antes das usinas, demonstrando, portanto, o quadro natural da espécie no rio. O número de migrantes por geração foi maior em direção à montante (2Nm 1,3580 indivíduos/geração), comparado ao sentido oposto (2Nm 0,4604 indivíduos/geração). Esse valor maior pode ser explicado pelo hábito reprodutivo da espécie, que consiste em formar grandes cardumes para migração reprodutiva de subida dos rios de águas claras ou brancas, apesar da ocorrência de corredeiras (Carvalho 1986).

As corredeiras do rio Madeira também restringem o fluxo gênicos para *Melanosuchus niger*, sendo possível apenas no sentido montante-jusante (Rangel, 2015). Em outros dois casos o jacaré-paguá *Paleosuchus* palprebrosus (Muniz, 2012) e o tambaqui *Colossoma macropomum (*Farias *et al., 2010)*, o fluxo gênico é bidirecional e maior no sentido jusante-montante. Isso também foi visualizado no presente estudo.

O rio Tapajós possui 2 grupos biológicos, um identificado pela cor verde estabelecido na parte superior e o outro estabelecido a jusante das corredeiras identificado pela cor vermelha. O grupo vermelho tem um indivíduo acima, com uma pequena parte do genoma do grupo verde. O número de migrantes por geração entre as localidades é baixo nas duas direções, esses valores encontrados indicam que as corredeiras do São Luiz do Tapajós restringem parcialmente o fluxo gênico da espécie.

Os resultados corroboram com o estudo de Machado (2009), quando por meio do DNA mitocondrial foi encontrado baixo fluxo gênico nos rios Madeira e Tapajós, propondo as corredeiras como barreira parcial. A partir desses novos resultados é visível que a presença das corredeiras realmente atua como barreira parcial para a migração. O estabelecimento de barreiras artificias criadas pelo homem, como as usinas hidrelétricas podem afetar a migração existente.

O rio Xingu apresentou dois grupos biológicos com a distribuição não delimitada pelo trecho de corredeiras, o grupo identificado pela cor vermelha está presente predominantemente a montante das corredeiras e o grupo verde na parte a jusante. Os dois grupos estão presentes nas duas localidades, mas com número de migrantes diferentes nas duas direções, 2Nm 2,3320 indivíduos/geração no sentido de descida, maior valor encontrado nos quatro rios estudados. O trecho de corredeiras do rio Xingu possui aproximadamente uma extensão de 200 km e um desnível de 85 m (Pettena *et al.,* 1980), o que dificulta a possível migração do *Prochilodus nigricans*. O extenso trecho de corredeiras também favorece a descida de um número maior de indivíduos, quando comparado com a subida. O estabelecimento da hidrelétrica de Belo Monte pode alterar esse quadro natural, caso não seja implementada alguma forma de conexão entre montante e jusante.

Os rios Tocantins e Araguaia também apresentam a maior quantidade de grupos biológicos, foram no total três. Os grupos amarelo e vermelho estão presentes em maior proporção na localidade de Santa Isabel, o grupo verde possui maior representatividade na localidade de Baião, tendo apenas um indivíduo em Santa Isabel. Os valores de fluxo gênicos encontrados foram os menores, em ambas as direções. Em estudo realizado por Carvalho (*et al.,* 1986), antes do fechamento da barragem de Tucuruí, apenas com dados da pesca realizado no rio, concluiu que no quadro natural a espécie é mais abundante a montante da barragem e reproduz somente a montante da barragem e apenas ocasionalmente se reproduz a jusante. Ele também registra a subida de grandes cardumes acima das últimas corredeiras.

O fluxo gênico medido, no presente estudo, não reflete a situação natural das populações, visto que o fechamento da represa em 1984 interrompeu as migrações do curimatã, uma vez que não foi construída a escada para a subida dos peixes ou outra forma de conexão, levando a um declínio populacional a jusante, que atualmente está se recompondo segundo os registros da pesca (Barthem & Goulding 2007).

Em estudo realizado por Agostini (2015) com a tracajá *Podocnemis unifilis (*Troschel*, 1848)* nos rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins-Araguaia mostrou baixo fluxo gênico ou até mesmo a ausência associada a presença das corredeiras. Entre os rios Araguaia e Tocantins foi encontrada uma alta diferença, mostrando que as corredeiras de Santa Isabel associadas ao longo trecho encachoeirado de Itaboca submerso pela UHE Tucuruí, podem ser responsáveis pelo nível de estruturação encontrado. Essa alta diferença pode explicar os baixos fluxo gênicos encontrados no Tocantins – Araguaia para *Prochilodus nigricans.*

6.2 Tempos de Divergências

Os tempos de divergência encontrados para os rios Madeira, Tapajós e Xingu

correspondem ao Pleistoceno, Época que deu início há cerca de 2,5 milhões de anos (Wesselingh & Hoorn, 2011). Essa Época foi marcada pelas oscilações climáticas, períodos glaciais e interglaciais quando os níveis dos mares e rios eram alterados, favorecendo a distribuição das espécies de peixes (Hubert & Henno, 2006).

Os tempos de divergência dos rios Madeira 420 mil anos, Tapajós 375 mil anos e Xingu com 539 mil anos, estão próximos dos valores encontrados para a separação de outras populações. As populações do jacaré-paguá, *Paleosuchus palpebrosus* se divergiu há cerca de 300 mil anos, tempo correspondente ao Pleistoceno, quando ocorreram incursões marinhas que permitiram a colonização acima e quando o mar recuou, uma população ficou quase isolada (Muniz, 2012). O *Colossoma macropomum* passou por uma expansão populacional nos últimos 350 mil anos e 125 mil anos, influenciada pelas incursões marinhas do Pleistoceno (Farias *et al*., 2010).

O rio Tocantins apresentou o menor tempo de divergência 239 anos, junto a esse fato há também a quantidade e a distribuição dos três grupos biológicos encontrados.

7 Conclusão

As corredeiras dos rios Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins, não são barreiras totais para as populações de *Prochilodus nigricans*. Existe o fluxo gênico bidirecional entre as populações localizadas a montante e a jusante das cachoeiras. Portanto a construção de hidrelétricas ou barragens podem afetar o fluxo gênico.

Quanto ao tempo de divergência das populações, os resultados observados indicam que possivelmente as alterações climáticas do Pleistoceno foram responsáveis pela separação das populações nos rios Madeira, Tapajós e Xingu. O resultado do rio Tocantins mostra que as populações ainda não estão totalmente isoladas.

REFERÊNCIAS

Araújo-Lima, C.A.R.M. & Ruffino, M.L. 2003. Migratory Fishes of the Brasilian Amazon. In: Carolsfeld, J., Harvey, B., Ross, C., Baer, A. Migratory fishes of South America. p. 139-181

Ayres, J.M.1995. As matas de várzea do Mamirau·: Médio Rio Solimões. 2ed. Brasília, DF: CNPq; Tefé, AM: Sociedade Civil Mamirau· 124p.

Barthem, R.B.; Goulding, M. 2007. Um ecossistema inesperado: a Amazônia revelada pela pesca. Amazon Conservation Association (ACA), Sociedade Civil Mamirauá, Belém, 241 pp.

Bayley, P.B. & Petrere JR, M. 1989. Amazon fisheries: assessment methods, current status, and management options. pp. 385-398. In: Dodge, D.P. (ed.). Proceedings of the International Large River Symposium. Canadian Special Publication Fisheries Aquatic Sciences, 106.

Carvalho, J.L. & Merona, B. 1986. Estudos de dois peixes migratórios do baixo Tocantins, antes do fechamento da barragem de Tucuruí. Amazoniana. IX. 4.595-607.

Castilhos, C. Z. 2010. Delineamento da ecorregião aquática Xingu-Tapajós. Relatório Técnico/CETEM /MCT/CNPq/CT-Hidro. Rio de Janeiro.

Castro, R.M.C. 1990. Revisao taxonómica da familia Prochilodontidae (Ostariophysi: Characiformes). Tese de doutorado. Universidade de Sao Paulo, Sao Paulo. 347 p.

Castro, R. M. C. 1993. Prochilodus britskii, a new species of prochilodontid fish (Ostariophysi: Characiformes), from the rio Apiaca, rio Tapajos system, Mato Grosso, Brazil. Proceedings of the Biological Society of Washington, 106, 57–62.

Cella-Ribeiro, A.; Torrente-Vilara, G.; Hungria, D.B.; De Oliveira, M. 2013. As Corredeiras do Rio Madeira. In: De Queiroz, L.J.; Torrente-Vilara, G.; Massaharu, W.; da Silva, T.H.; Zuanon, J.; da Costa, C.R. (Eds). *Peixes do Rio Madeira*. Dialeto Latin American Documentary, São Paulo. p. 57-63.

Earl, D.A. & vonHoldt, B.M. 2012. STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conserv Genet Resour, 4(2): 359-361.

Eaton, D.A.R. (2014). PyRAD: assembly of de novo RADseq loci for phylogenetic analyses. Bioinformatics 30(13): 1844-1849. doi: 10.1093/bioinformatics/btu121.

Elshire, R.J.; Glaubitz, J.C.; Sun, Q.; Poland, J.A.; Kawamoto, K. 2011. A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. PLoS ONE 6(5): e19379. doi:10.1371/journal.pone.0019379

Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. Mol Ecol, 14: 2611-2620.

Farias, I.P.; Torrico, J.P.; Garcia-Davila, C.; Santos, M.D.C.F.; Hrbek, T.; Renno, J-F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). Mol Phylogen Evol 56: 1129-1135.

Frankhan, R.; Ballou, J. D.; Briscoe, D. A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. Cambridge University Press. 617p.

Funk, W.C.; McKay, J.K.; Hohenlohe, P.A.; Allendorf, F.W. 2012. Harnessing genomics for delineating conservation units. Trends Ecol Evol, 27(9): 489-496.

Goulding, M.; Carvalho, M. L.; Ferreira, E. G. 1988. Rio Negro: rich life in poor water: Amazonian diversity and foodplain ecology as seen through fish communities. The Hague: SPB Academic Publishing. 200 pp.

Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. 2003. The smithsonian atlas of the Amazon. Smithsonian Books. Washington and London. 253p.

Haffer, J. 1969. Speciation in Amazonian Forest Birds. Science, New Series, Vol. 165, No.3889 (Jul. 11, 1969), 131-137.

Hey, J. & Nielsen, R. 2007. Integration with the felsenstein equation for improved markov chain monte carlo methods in population genetics. Proc Natl Acad Sci U S A 104:2785–2790.

Hooghiemstra, H. & Van der Hammen, T. (2004) Quaternary ice-age dynamics in the Colombian Andes: developing an understanding of our legacy. *Philos T Roy Soc B* 359, 173–181.

Hoorn, C.; Paxton, C.G.M.; Crampton, W.G.R.; Burgess, P.; Marshall, L.G.; Lundberg, J.G.; Rasanen, M. E.; Lima, A.M. 1996. Miocene deposits in the Amazonian Foreland Basin. Science, New Series, Vol. 273, No. 5271. (Jul.5,1996), pp.122-125.

Hubert, N.; Renno, J-F. 2006. Historical biogeography of South American freshwater fishes. Journal of Biogeography (J. Biogeogr.) (2006) 33, 1414–1436.

Irion, G., & Kalliola, R. 2010. Fluvial landscape evolution in lowland Amazônia during the Quaternary. In *Amazonia, Landscape and Species Evolution*, edited by C. Hoorn and F. P. Wesselingh, 185–197. Oxford, UK: Oxford Blackwell Publishing.

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(14): 1801-1806.

Loubens, G. & Panfili, J. 1995. Biologie de Prochilodus nigricans (Teleostei: Prochilodontidae) dans le bassin du Mamore (Amazonie boliviene). Ichthyol. Explor. Freshwat. 6(1):17-32.

Machado, V. N. 2009. Análise da variabilidade genética da curimatã, *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários. Universidade Federal do Amazonas. 89p.

Martin, M. J. 2013. Análise da estrutura genética populacional de duas espécies de Characiformes (*Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior*) na região da bacia do Rio Madeira, Rondônia. Dissertação de mestrado. Universidade Estadual Paulista.

Martínez, J.G.; Hernández-Rangel, S.M.; Bertoul, F.; Farias, I.P.; Hrbek, T. (in prep). Simplifying the Construction of Subgenomics Libraries for Next Generation Sequencing: an Adaptation of ddRADs-based genotyping for Ion-Torrent in Non-model Amazonian Animal Taxas.

Mérona, B. de; Juras, A. A.; Santos, G. M. dos; Cintra, I. H. A. 2010. Os peixes e a pesca no baixo Rio Tocantins: vinte anos depois da UHE Tucuruí. 2010 – 208p. il.

Mota, S.Q. & M.L. Ruffino, 1997. Biologia e pesca do curimatá (*Prochilodus nigricans* Agassiz, 1829) (Prochilodontidae) no médio Amazonas. Rev. Unimar 19(2):493-508.

Muniz, F.L., 2012. Filogeografia e genética de populações de jacaré-paguá (*Paleosuchus palbrosus*) ao longo de rio Madeira e bacia do rio Paraguai (Pantanal). Instituto de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas.91p.

Queiroz, L. J. de; Torrente-Vilara, G.; Vieira, F.G.; Ohara W. M.; Zuanon, J.; Doria, C. R. C.2013. Fishes of Cuniã Lake, Madeira River Basin, Brazil. Check List 9(3): 540–548.

Rufino, M.L. 2004. A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira. Manaus. IBAMA/PROVÁRZEA. 265p.

Sambrook, J.; Fritsch EF; Maniatis, T.1989. Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd edn. Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Springs Harbor.

Santos, G.; Ferreira, E.; Zuanon, J. 2006. Peixes comerciais de Manaus. Ibama/AM, ProVárzea.126p.

Soares, B. 2014. Estruturação da população de sardinhas *Triportheus Angulatus* (Spix & Agassiz, 1829), na Bacia do Rio Madeira. Fundação Universidade Federal de Rondônia. 31p.

Peterson, B.K.; Weber, J.N.; Kay, E.H.; Fisher, H.S.; Hoekstra, H.E. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLOS ONE*, 7(5): e37135.

Pettena, J.L.; Barros, A. L. M.M.; Matos, W.D.; Ribeiro, A.C.O.; Carvalho, R.M. 1980. Estudos de Inventário Hidrelétrico na Amazônia: A Bacia do rio Xingu. In: Simpósio Sobre as Características Geológico-Geotectônicas da Região Amazônica. ABGE, pp. 115-136.

Pritchard J.K.; Stephens M.J.; Donnelly P. 2000. Inference of population 624 structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

Rangel, S. M. H. 2015. Dinâmica e estrutura populacional do jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) na Amazônia. Instituto de Pesquisas da Amazônia. Manaus. Amazonas. 59 p.

Reis, R. E.; Kullander,S, O.; Ferraris, JR. 2003. Check list of the freshwater of the south and central américa. Porto Alegre, EDIPUCRS. 729 pp.

Ribeiro, J.S.B. 1996. Aspectos limnológicos da UHe tucuruí. In: Magalhães, S.B.; Britto, r.de C.; Castro, e.r.de (org.). Energia na Amazônia. Vol. I. Belém MpeG/Univ. para: 259-281,.

Rosenberg, N.A. 2004. DISTRUCT: a program for the graphical display of population structure. Mol Ecol Notes, 4(1): 137-138.

Sioli, H. 1951. Alguns resultados e problemas da limnologia amazônica. Boletim técnico do Instituto Agronômico do Norte, Belém, η. 24.

Wesselingh, F. P. & HOORN, C. 2011. Geological Development of Amazon and Orinoco Basins.Historical biogeography of neotropical freshwater fishes. James S. Albert and Roberto E. Reis. (Eds). 64-65.