



PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO  
**PPG GCBEV**  
GENÉTICA, CONSERVAÇÃO E BIOLOGIA EVOLUTIVA



INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZONIA – INPA

Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (GCBEv)

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS – UFAM

**Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL)**

Análise de adaptação local em *Prochilodus nigricans* (Agassiz, 1929) para diferentes tipos de água

Rejane Medeiros da Silva

Manaus, AM

REJANE MEDEIROS DA SILVA

Análise de adaptação local em *Prochilodus nigricans*  
(Agassiz, 1929) para diferentes tipos de água

ORIENTADOR: Dr. Tomas Hrbek

COORIENTADOR (A): Dr. José Gregório Martinez; Dra Maria da Conceição Freitas Santos

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.

**Apoio:** Laboratório de Evolução e Genética Animal – LEGAL

**Financiamento:** CNPq-UNIVERSAL

## FICHA CATALOGRÁFICA

S586 Silva, Rejane Medeiros da  
Análise de adaptação local em *Prochilodus nigricans*  
(Agassiz, 1929) para diferentes tipos de água / Rejane  
Medeiros da Silva. --- Manaus: [s.n.], 2016.  
54 f.: il.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2016.  
Orientador: Tomas Hrbek  
Coorientador: José Gregório Martínez  
Área de concentração: Genética, conservação e biologia  
evolutiva

1. Curimatã. 2. Seleção Natural. 3. Genética. I. Título.

CDD 597.5

### **Sinopse:**

Estudou-se adaptação local para os diferentes tipos de água: barrenta e clara em populações de *Prochilodus nigricans* nas bacias amazônica e Araguaia-Tocantins, utilizando marcadores SNPs. Foram identificados alguns *loci* com valores significativos associados aos tipos de água, sendo classificados como *loci* candidatos a seleção.

**Palavras-Chave:** Seleção divergente, seleção natural, SNPs, plasticidade fenotípica

*À minha família, em especial minha prima, Thais Medeiros, que estará para sempre em meu coração.*

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual do Amazonas (UFAM), que por meio do Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL) forneceu a estrutura necessária para desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu Coorientador José Gregório, pelo carinho, suporte, compaixão, por me tranquilizar nos momentos de desespero, por me fazer acreditar que é possível existir bons profissionais que entende que o conhecimento deve ser passado adiante.

À minha Coorientadora Concy, por se mostrar sempre disposta a me ajudar, mesmo depois de toda alteração ocorrida no meu projeto.

Ao Professor Tomas e Izeni, por terem me recebido no LEGAL, mesmo não me conhecendo.

À Bruna por ter aceitado compartilhar parte dos seus dados genômicos comigo após modificações ocorridas no meu projeto inicial, para que eu pudesse ter dados e concluir o mestrado com sucesso.

À Dina por sempre estar apoiando, ajudando, seja com material, horas de trabalho doadas para que pudéssemos terminar com sucesso nosso trabalho.

À minha mãe, pela confiança, amor, apoio, por me perdoar por estar sempre partindo e por nunca me deixar desistir.

Às minhas irmãs, Ariadne Medeiros e Patrícia Medeiros, pelo carinho, apoio, por todas as idas e vindas ao aeroporto, por me tranquilizar nos momentos mais difíceis.

Meu cunhado, Rondinele de Lima e meu Padrasto por toda torcida e apoio e suporta sempre que precisei.

À minha Família Manauara, Camilla Martins, Giulliana Appel, André Holanda, Alessandro, Monika Facury, por terem feito a estadia menos dolorosa.

Aos novos amigos que fiz nesses dois anos, em especial a minha morena flor, Roberta Cunha, por todos os cafés, maçãs, conversas, fugas ao shopping/cinema, planos

compartilhados. Por oferecer toda ajuda que precisei para não desistir do mestrado, enfim por ser uma irmã que a vida me deu de presente.

Aos meus colegas de laboratório que sempre se dispuseram a me ajudar no que fosse preciso, em especial a Sandra pela paciência, humildade e disposição para me ensinar e ir inúmeras vezes para bancada comigo, a Juliana Vieira, pelo carinho, preocupação, compreensão, inúmeras caronas e por sempre me motivar a continuar.

Às minhas amigas de sempre e para sempre: Célia Regina, Adriana Menezes, Chrstiane Matiazzo, Thais Biude e Bruna Rechiutti por estarem presentes, me aconselhando e muitas vezes enxugando minhas lágrimas.

A toda minha família, primos, tios que sempre torceram pelo meu sucesso.

A todos aqueles que cruzaram meu caminho e que de algum modo contribuíram para minha evolução pessoal e profissional.

A vocês minha eterna gratidão!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas”. Carl Sagan

## RESUMO

A região amazônica é caracterizada pela presença de rios com diferentes origens geológicas que conferem a suas águas características físico-químicas distintas, tais como pH, teor de bicarbonato e transparência. Muitas espécies são capazes de sobreviver em mais de um tipo de água, um exemplo é a espécie *Prochilodus nigricans* (Curimatã). Populações que persistem em ambientes heterogêneos sofrem diferentes pressões de seleção levando-os à adaptação local. Esse trabalho teve por objetivo identificar *loci* sob seleção divergente e estrutura populacional associada a água clara e água barrenta. Para isso foi utilizada uma população de *P. nigricans* do baixo rio Madeira como representante de água barrenta e populações do Tapajós, Xingu e Tocantins como representantes de água clara. Foram desenvolvidas bibliotecas genômicas a partir do método *ddRAD seq* (DNA associado a sítios de restrição, dupla digestão) e feito sequenciamento de nova geração na plataforma *Ion Torrent PGM*. Foi realizada genotipagem *denovo* de *SNPs* utilizando o programa *PyRAD*. O programa *Structure* foi empregado para identificar os grupos biológicos, *Bayescan*,  $F_{ST}$  de Wright e Teste exato de Fisher para identificar *loci* sob seleção, diferenciação por *loci* e associação genótipo e fenótipo. Os resultados mostraram que cada população amostrada constitui um grupo biológico podendo estar relacionado a outros fatores diferentes a seleção (variação neutra), como por exemplo, isolamento histórico entre as localidades e padrão de migração da espécie. Mesmo o *Bayescan* não detectando *loci* sob seleção, o Teste exato de Fisher indicou a presença de alguns *loci* associados ao tipo de água. Acreditamos que a impossibilidade de detectar *loci* sob seleção de forma contundente pode estar associado a uma deficiência do método na captura mais abrangente destas regiões no genoma de *P. nigricans* e a respostas adaptativas da espécie que podem estar relacionadas a plasticidade fenotípica não sendo possível a identificação de *loci* sob seleção com a metodologia empregada.



## ABSTRACT

The Amazon region is characterized by the presence of rivers with different geological origins that give their waters different physical and chemical characteristics, such as pH, bicarbonate content and transparency. Many species are able to survive in more than one type of water; one example is *Prochilodus nigricans* Curimatã species. Populations that persist in heterogeneous environments suffer different selection pressures leading them to local adaptation. This study aimed to identify loci under divergent selection and population structure associated with clear water and muddy water. For this, we used a population of *P. nigricans* of the lower Rio Madeira as representatives of muddy water and populations of Tapajós, Xingu and Tocantins as representatives of clear water. Genomic libraries were developed from ddRAD Seq method (DNA associated with restriction sites, double digestion) and made new generation sequencing of the *Ion Torrent PGM* platform. Genotyping SNPs was carried out again using PyRAD program. The Structure program was used to identify biological groups, Bayescan, FST Wright and Fisher's exact test to identify *loci* under selection, differentiation by *loci* and association genotype and phenotype. The results showed that each sampled population is a biological group may be related to other factors different to selection (neutral variation), such as historical isolation between localities and migration pattern of the species. Even Bayescan not detecting *loci* under selection, Fisher's exact test indicated the presence of some *loci* associated with the type of water. We believe that the inability to detect *loci* under selection forcefully can be associated with a deficiency in the method of capture of wider regions in the genome of *P. nigricans* and adaptive responses of species may be related to phenotypic plasticity not being possible the identification of *loci* under selection with the methodology employed.

# SUMÁRIO

RESUMO .....	viii
ABSTRACT.....	ix
SUMÁRIO.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xii
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 Caracterização dos SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) .....</b>	<b>4</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>5</b>
2.1 Objetivo geral .....	5
2.2 Objetivos específicos .....	5
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>6</b>
3.1 Área de Estudo .....	6
3.1.1 Bacia Araguaia-Tocantins.....	6
3.1.2 Bacia Amazônica .....	7
3.2 Construção da biblioteca para obtenção dos ddRADs.....	9
3.3 Sequenciamento .....	12
<b>4. ANÁLISE DE DADOS.....</b>	<b>13</b>
4.1 Dados genômicos .....	13
4.2 Análise bayesiana para determinar a estrutura populacional.....	14
4.3 Análise de diferenciação por locus via $F_{ST}$ de Wright e associação genótipo e fenótipo (tipos de água).....	15
4.5 Isolamento por distância.....	15
4.6 Identificação de <i>loci</i> sob seleção divergente.....	15
<b>5. RESULTADOS .....</b>	<b>16</b>
5.1 Estrutura populacional .....	17
5.2 Isolamento por distância (teste de Mantel) .....	19
5.3 Análise de diferenciação por locus via $F_{ST}$ e associação genótipo e fenótipo .....	20
5.4 Teste exato de Fisher.....	25
5.6 Identificação de <i>loci</i> sob seleção divergente.....	26
<b>6. DISCUSSÃO .....</b>	<b>28</b>

6.1 Estrutura populacional associada à água clara e água barrenta.....	28
6.2 Evidência de <i>loci</i> sob seleção divergente.....	31
6.3 Diferenciação por locos no genoma de <i>P. nigricans</i> .....	32
<b>7. CONCLUSÃO .....</b>	<b>33</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>34</b>

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Representação esquemática de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, Single Nucleotide Polymorphism). Fonte: (<http://slideplayer.com.br/>). ..... 5
- Figura 2. Áreas de coleta *Prochilodus nigricans*. Círculos vermelhos representam as localidades de coleta em rios de água clara. Círculo marrom representa a localidade de coleta em rio de água barrenta. As coordenadas geográficas de cada localidade são: A: Borba - 4° 23'18.07"S / 59° 35'40.15"O; B: Arapiuns - 2° 27'41.67"S / 55° 11'00.69"O; C: Vitória do Xingu - 2° 52'10.21"S / 52° 00'58.75"O e D: Baião - 3° 01'00.88"S / 49° 44'31.05"O..... 8
- Figura 3. Gel da amplificação da digestão/ligação. .... 10
- Figura 4. PCR clonal ou de emulsão: os fragmentos são ligados às IonSpheres (pequenas esferas) através de primers P1 (sequências complementares ao adaptador P1) na superfície das esferas. Um único fragmento se liga a uma determinada esfera. Elas são capturadas individualmente em gotículas oleosas (microreatores) onde a PCR em emulsão ocorre. Nesse processo, são geradas milhares de cópias de cada fragmento. Fonte:(CARVALHO; SILVA, 2010). ..... 11
- Figura 5.a) as ISPs são incorporadas nos poços do chip Ion 318 V2. Uma ISP entrará por cada poço (esq.). b) durante o sequenciamento, a Taq polimerase incorpora uma base e é liberado um fosfato e um H<sup>+</sup> que é detectado por um pHmêtro que transforma a mudança de pH em um sinal elétrico (dir.). Fonte:(SHENDURE; JI, 2008; VARUZZA, 2013). ..... 12
- Figura 6. Chips de sequenciamento com o carregamento da deposição das *ISPs* e resultados do sequenciamento. O carregamento é representado por uma escala de cores onde as regiões em laranja e vermelho representam alta densidade.....17
- Figura 7. Gráfico do logaritmo natural e das probabilidades posteriores para formação de grupos biológicos (*Ks*) para os 40 indivíduos amostrados de *Prochilodus nigricans* nas localidades do rio Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins. As barras verticais representam o desvio padrão com base em 10 réplicas. Ilustração gerada no programa Harvester. .... 18
- Figura 8. Estrutura populacional fornecida pelo programa Structure mediante inferência Bayesiana (*K=4*). Foram analisados 1674 SNPs de 40 indivíduos de 4 localidades. A maior probabilidade posterior está associada com 4 grupos biológicos. a) Gráfico de ancestralidade de indivíduos. Cada coluna representa a probabilidade de atribuição individual b) gráfica de ancestralidade de populações. Ilustração gerada no programa *Distruct*. ..... 19

- Figura 9. Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação de ambos tipos de água. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos. .... 20
- Figura 10. Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Madeira x Xingu. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos. .... 21
- Figura 11. Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Madeira x Xingu. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos. .... 21
- Figura 12. Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Tocantins x Xingu. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos. .... 22
- Figura 13. Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Tocantins x Tapajós. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos. .... 22
- Figura 14. Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Madeira x Tocantins. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos. .... 23
- Figura 15. Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Xingu x Tapajós. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos. .... 23
- Figura 16. Valores de FST por loco, realizado no software Bayescan considerando duas populações distintas, uma população de água clara e outra de água barrenta. ....27

# 1. INTRODUÇÃO

Variações neutras e adaptativas são responsáveis pela diversidade genética. As variações adaptativas terão efeito direto no *fitness*, pois são nelas que a seleção natural vai agir (HOLDEREGGER; KAMM; GUGERLI, 2006). A seleção natural age sobre os organismos alterando o *pool* gênico de modo a aumentar o *fitness* dessa população, denominando esse processo como adaptação (TEMPLETON, 2011)

Adaptação é o processo evolucionário pelo qual as espécies tornam-se aptas a sobreviver em ambientes instáveis. Uma vez adaptadas a determinado habitat exibirão características adaptativas únicas que podem ser: estrutural, características morfológicas (por exemplo, bicos nos tentilhões de Darwin), comportamental, conjunto de ações desenvolvidas pelo indivíduo para aumentar suas chances de sobrevivência e reprodução (por exemplo, postura antipredatória agressiva em pássaros) e fisiológica, que compreende a resposta de uma espécie a um estímulo particular (por exemplo, adaptação local de Arenque do Atlântico para gradientes de salinidade no mar Báltico) (LAMICHHANEY, 2016).

Quando os organismos estão submetidos a ambientes heterogêneos sofrem diferentes pressões de seleção que pode resultar em respostas plásticas ou divergências adaptativas levando à adaptação local (BLANQUART *et al.*, 2013).

O processo de adaptação local envolve a divergência genética de *loci* específicos em populações que habitam diferentes ambientes. A interação genótipo/ambiente pode causar o aumento local na frequência de alelos vantajosos, como consequência, pode-se identificar esses *loci* adaptativos ao detectar aqueles que exibem maior diferenciação entre as populações, quando comparado com o resto do genoma (KAWECKI; EBERT, 2004; FANG *et al.*, 2013).

Para estudar adaptação local é preciso considerar um gradiente ambiental que seja heterogêneo, e é dentro desse contexto que se insere a bacia Amazônica.

A bacia Amazônica pode ser classificada em quatro morfo-estruturas principais, de acordo sua estrutura geológica: Escudos pré-cambrianos/ou cristalinos, Amazônia central, Área subandina e cordilheiras dos Andes (GAILLARDET *et.al*, 1997; STALLARD;

EDMOND,1983; LANDIM *et al.*,1983).

Escudos pré-cambrianos/ou cristalinos (das guianas ao norte, escudo brasileiro ao sul), são de formações geológicas antigas, formadas desde o pré-cambriano a partir de Granito e Gnaiss. Amazônia central formada a partir da era cenozoica com sedimentos dos escudos cristalinos e montanhas andinas, apresenta declividade de 20mm/km que associada com a descarga de água favorece o surgimento de rios meândricos (rios sinuosos, com muitas curvas). Já área subandina e cordilheiras dos Andes, são regiões recentes de sedimentos quaternários, sofrem bastante processos provocados pelas fortes chuvas que levam sedimentos para os sistemas fluviais (GAILLARDET *et.a.l.*,1997; STALLARD; EDMOND, 1983; LANDIM *et al.*,1983).

Essas estruturas, por sua vez, vão apresentar processos geoquímicos diferenciados, gerando vegetação, solo e águas com características físico-químicas distintas. Sioli (1964) classificou os rios da bacia Amazônica de acordo com sua característica físico-química, em rios de águas brancas (barrenta), pretas e de águas claras.

A cor diferenciada dessas águas e conseqüente variação físico-química deve-se a formação geológica distinta. As águas barrentas são influenciadas pelas montanhas Andinas onde há erosão e origem de sedimentos ricos em minerais, os rios de águas claras e negras, tem origem geológica no escudo guianense e do Brasil central, regiões com processo erosivo menor, logo, apresentam menos sedimentos em suspensão e conseqüentemente as águas são mais claras (SIOLI, 1964).

Desta forma, os rios Solimões/Amazonas, Madeira, Purus e Juruá, por exemplo, são de águas brancas ou barrenta, cuja transparência está entre 10 cm a 60 cm, de acordo com o rio e estação, o teor de bicarbonato varia de 8,8 mg a 17,3 mg e o pH de 6,2 a 7,2. São ricos em solutos dissolvidos e extremamente turvos devido à alta taxa de sedimento em suspensão (ARIDE; ROUBACH; VAL, 2007; SIOLI, 1964).

Rios de águas pretas, como por exemplo, o rio Negro, a transparência varia de 1 m a 2 m, o teor de bicarbonato é 0,00 e o pH está entre 3,8 a 4,9. São de água ácida, ricos em material húmico e pobres em nutrientes com baixo sedimento em suspensão (ARIDE; ROUBACH; VAL, 2007; SIOLI 1964, ARAÚJO-LIMA; GOULDING, 1998).

O Tapajós, Xingu e Tocantins são rios de águas claras, portanto, são mais

transparentes, indo de 60 cm a 4 m de transparência, bicarbonato em torno de 3,1 a 5,2 e pH 4,5 a 7,8 (ARIDE; ROUBACH; VAL, 2007; SIOLI 1964).

A descontinuidade hidroquímica da bacia Amazônica atuando como agente seletivo para as espécies foi identificado em estudo feito por Cooke, Chao e Beheregaray (2012a), os autores relatam que para a Sardinha (*Triportheus albus*) a estrutura populacional genética e elevada seleção na interface desses tipos de água são mais poderosos na geração de diversidade dessa espécie do que o arranjo espacial e história biogeográfica dos sistemas fluviais. Outro estudo também conduzido por Cooke, Chao e Beheregaray (2012b) detectaram evidência de seleção natural divergente associada aos tipos de água para o baiacu-amazônico (*Colomesus asellus*), sendo detectada mais fortemente na confluência do rio Tapajós com Amazonas e ainda que reduzida na confluência do rio Negro.

Considerando então que a seleção divergente está presente nos rios da bacia amazônica, um exemplo de espécie que pode ser usada para estudos de adaptação local é o *Prochilodus nigricans* (curimatã), pois estão presentes em rios da bacia Amazônica e Tocantins, tanto naqueles de águas pretas e claras como também nos rios de águas brancas (SANTOS *et al.*, 2006; ARAUJO-LIMA; RUFFINO, 2003).

O curimatã é de grande importância econômica na região amazônica. Ocupou o terceiro lugar em desembarque pesqueiro na cidade de Manaus entre os anos de 1976 e 2003, o que equivale a 12% do total desembarcado neste período. Já em 1977 o desembarque de curimatã correspondia a 19% em Porto Velho e no médio Tocantins, *Prochilodus nigricans* é responsável por 66% das 614 toneladas capturadas na região de Imperatriz (MOUNIC-SILVA; LEITE, 2013; SAINT-PAUL; BAYLEY 1979; ELETRONORTE/THEMAG, 1989).

Mota e Ruffino, (1997); Catarino *et al.*, (2014) relatam que 70% dos peixes capturados tem o tamanho menor que 26,5 cm, uma estimativa mais baixa do que a feita há 10 anos na mesma área geográfica, que era de 35,4 cm, indicando que essa espécie passou por processo de intensa exploração.

Assim sendo, estudar adaptação local faz-se importante, pois ela pode contribuir tanto para propósitos de conservação, como também para fins comerciais. Sob a ótica comercial, as pressões seletivas são direcionadas para melhorar características



comercialmente importantes (BOURRET *et al.*, 2011). Já no âmbito da conservação, uma vez identificado esses *loci* adaptativos, em populações de espécies ameaçadas ou que tenham passado por intensa exploração, eles podem ser usados em propostas de conservação, delimitando unidades de conservação, por exemplo, unidades adaptativas além de compreender os mecanismos pelos quais esse organismo se adapta a ambientes específicos (HENRY; RUSSELLO, 2013).

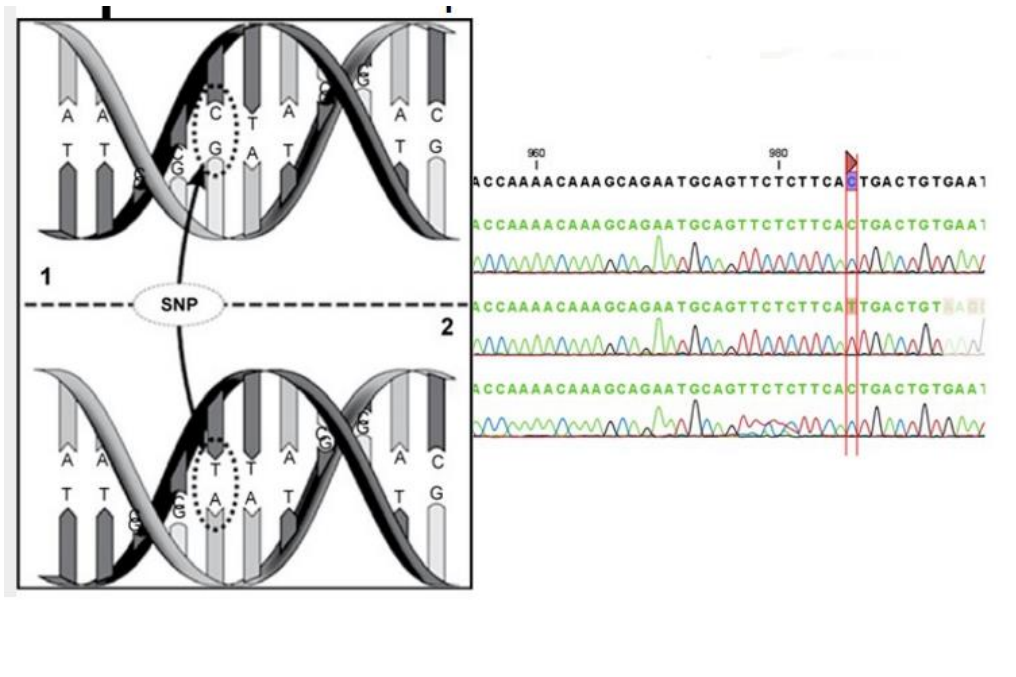
Os métodos de genética populacional baseados nos índices de fixação ( $F_{ST}$ ) podem ser empregados para pesquisar *loci* adaptativos. Tais métodos consistem em genotipar inúmeros marcadores moleculares, incluindo *Single Nucleotide Polymorphisms* (SNP) e procurar por *loci outliers*. Espera-se que diferentes regiões genômicas exibam diferentes níveis de diferenciação genética, variando de regiões com pouca diferenciação para regiões com elevado nível de diferenciação entre as populações (DUFORÉ-FREBOURG; BAZIN; BLUM, 2014; FANG *et al.*, 2013).

### 1.1 Caracterização dos SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

Recentemente tem aumentado o uso do marcador genético SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Trata-se de um marcador que proporciona uma cobertura mais ampla do genoma e rápido desenvolvimento em espécie não-modelo (FUNK *et al.*, 2012)

SNPs, se caracterizam por trocas ocorridas no DNA onde um nucleotídeo é trocado por outro (A/T, A/G, A/C, G/C, G/T), mesmo sendo possível a presença de qualquer uma das quatro bases na sequência de DNA, na prática os SNPs são bialélicos, ou seja, existem duas alternativas ou possíveis nucleotídeos (Figura 1). Essas modificações pontuais nas sequências de DNA são encontradas tanto nas regiões do genoma codificante de proteínas (éxons) quanto nas não codificantes (íntrons) (BAIRD *et al.*, 2008)

Para que essa região seja considerada um SNP é necessário que o alelo menos frequente esteja presente na população numa frequência igual ou superior a 1%. Os SNPs, possuem um modelo de evolução simples baseado em transições e transversões (BROOKES, 1999; VIGNAL *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Representação esquemática de um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*). Fonte: (<http://slideplayer.com.br/>).

Dentre as diferentes formas de obtenção dos SNPs, as tecnologias avançadas, como o sequenciamento de nova geração, têm se mostrado como uma vantagem metodológica para o uso desse marcador, além do oferecimento de informações integradas de *loci* neutros e adaptativos, diretamente relacionados com respostas a processos como mudanças ambientais, de grande importância para a conservação (FUNK *et al.*, 2012).

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar se os diferentes tipos de água presentes na bacia Amazônica (barrenta e clara) funcionam como um agente seletivo para distribuição da espécie *Prochilodus nigricans*, levando-a à adaptação local.

### 2.2 Objetivos específicos

- Identificar *loci* sob seleção divergente.
- Identificar estrutura populacional associado aos tipos de água, utilizando marcador SNPs.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Área de Estudo

##### 3.1.1 Bacia Araguaia-Tocantins

A bacia Araguaia-Tocantins é considerada por alguns especialistas como um ambiente independente da bacia amazônica, para esse trabalho, também foi considerado como uma unidade independente. Drena uma área de 767 km<sup>2</sup>, sendo 343.00km<sup>2</sup> pertencentes ao rio Tocantins, 382.00km<sup>2</sup> ao rio Araguaia e 42.00km<sup>2</sup> ao rio Itacaiúnas. Tem descarga média de 11.00m<sup>3</sup> s<sup>-1</sup> sendo 50% correspondente ao rio Tocantins, 45% ao Araguaia e 5% ao rio Itacaiúnas, englobando os estados de Goiás, Maranhão, Mato Grosso e Pará (MÉRONA *et.al.*, 2010).

O rio Araguaia é um rio de planície, com baixa densidade de drenagem. Sua geologia constitui-se de rochas pré-cambrianas do escudo brasileiro, rochas paleozóicas e mesozóicas da bacia sedimentar do Paraná, sedimentos terciários e depósitos quaternários. No curso superior o relevo é mais abrupto com elevações de até 1.000m, com predomínio de cachoeiras e corredeiras. No curso médio o rio está sobre uma planície de relevo suave, dominada por praias e ilhas de areia, incluindo ilha do Bananal e inúmeras lagoas de várzea, no curso baixo do rio, apesar da presença de corredeiras e poços, ele flui através de uma planície suave (7cm/km) até a confluência com o rio Tocantins, onde formará o baixo Tocantins (MÉRONA *et.al.*, 2010; LATRUBESSE; STEVAUX, 2006).

O rio Itacaiúnas é o maior afluente do sistema Araguaia-Tocantins que drena ambientes tipicamente amazônicos. Ele nasce na Serra dos Carajás, a 700 m e flui sobre gradiente íngreme até sua foz, próximo à confluência dos rios Tocantins e Araguaia (MÉRONA *et.al.*, 2010)

O rio Tocantins, no curso superior, é formado pela junção de dois tributários principais: Paranã e Maranhão. Nasce no Escudo Brasileiro e flui sobre terrenos sedimentares até desaguar no rio Pará (MÉRONA *et.al.*, 2010). Apresenta estreita planície de inundação, corredeiras e cachoeiras são os habitats mais comuns ao longo do curso superior, sendo presentes de forma esparsa no curso médio e inferior. A região amostrada compreende o baixo Tocantins, onde, apesar de raro, há lagos de várzea que interagem com as planícies de inundação (RIBEIRO; PETRERE; JURAS, 1995).

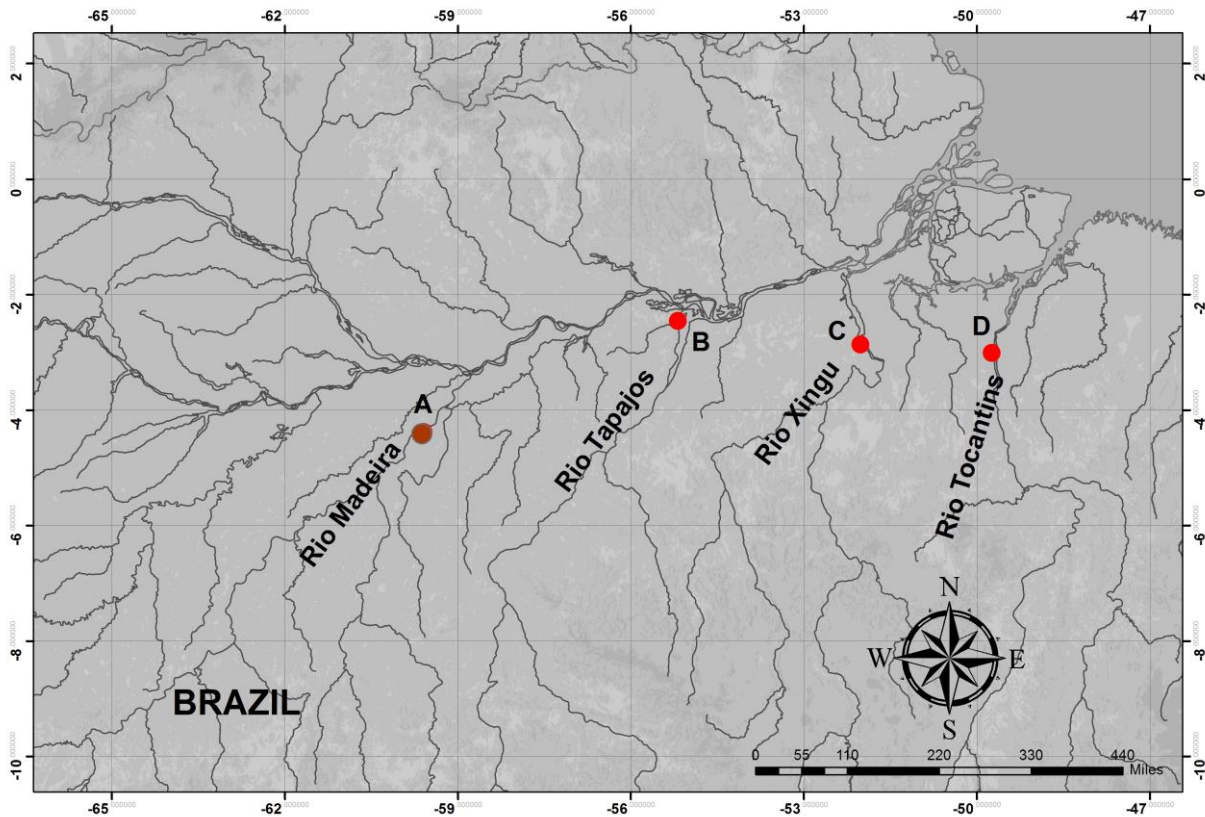
### 3.1.2 Bacia Amazônica

A bacia Amazônica, situada na América do Sul, tem aproximadamente 6.000.000 km<sup>2</sup>. Ao Norte está limitada pelo planalto das Guianas, ao sul, pelo planalto Brasileiro, a oeste pela Cordilheira dos Andes, e a leste, pelo Oceano Atlântico. Abrange países como o Brasil (63%), Peru (17%), Bolívia (11%), Colômbia (5,8%), Equador (2,2%), Venezuela (0,7%) e Guiana (0,2%) (MORTATTI; VICTÓRIA; TARDY, 1997).

Os rios que tem origem na região Andina são denominados rios de água branca por apresentar turbidez, elevada concentração de sedimentos em suspensão, e condutividades elevadas, além de pH próximo do neutro como consequência do bicarbonato diluído na água que funciona como um tampão (SIOLI, 1964).

As regiões dos Escudos (Guianas e do Brasil) são responsáveis pela coloração clara dos rios originados nessas áreas, recebem essa denominação por possuírem grande transparência e pouco sedimento em suspensão. Quimicamente são rios heterogêneos em relação ao pH e condutividade elétrica, mas de modo geral são considerados rios de águas pobres com condutividade baixa (BARTHEM; FABRÉ, 2004)

As áreas amostradas correspondem ao baixo Tapajós, Xingu, Madeira e Tocantins (Figura 2).



**Figura 2.** Áreas de coleta *Prochilodus nigricans*. Círculos vermelhos representam as localidades de coleta em rios de água clara. Círculo marrom representa a localidade de coleta em rio de água barrenta. As coordenadas geográficas de cada localidade são: A: Borba - 4° 23'18.07"S / 59° 35'40.15"O; B: Arapiuns - 2° 27'41.67"S / 55° 11'00.69"O; C: Vitória do Xingu - 2° 52'10.21"S / 52° 00'58.75"O e D: Baião - 3° 01'00.88"S / 49° 44'31.05"O.

Foram coletados nas seguintes localidades: Borba (rio Madeira), Arapiuns (rio Tapajós), Vitória do Xingu (rio Xingu), e Baião (rio Tocantins) compreendendo 40 indivíduos de 4 populações (Tabela 1). De cada indivíduo foi retirado tecido da nadadeira peitoral e muscular que foram mantidos em tubo eppendorf contendo álcool 95% até o momento da extração do DNA.

**Tabela 1.** Informação sobre o *N* amostral usado para a obtenção dos dados genéticos

Rio	Localidade	N amostral	Tipo de água
Madeira	Borba	10	Barrenta
Tapajós	Arapiuns	10	Clara
Xingu	Vitória do Xingu	10	Clara
Tocantins	Baião	10	Clara
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>40</b>	<b>2</b>

### 3.2 Construção da biblioteca para obtenção dos ddRADs

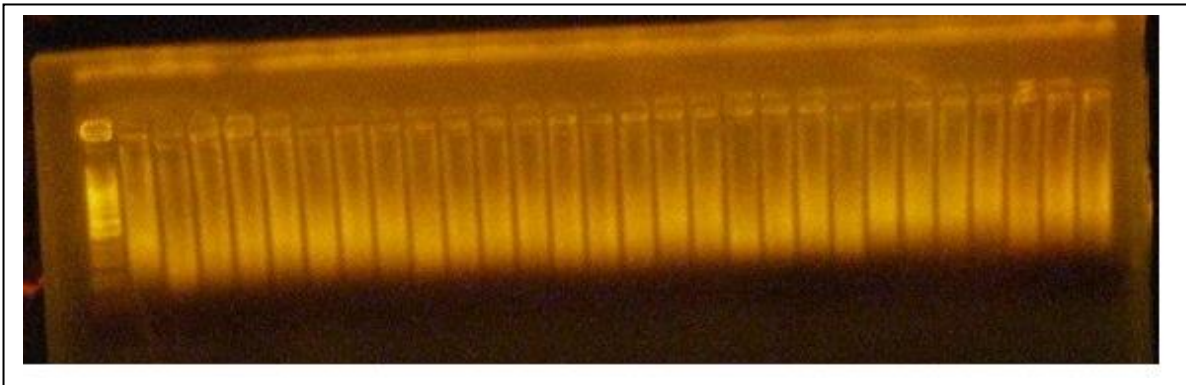
O método foi baseado no protocolo proposto por Peterson *et al.*, (2012) com adaptação simplificada e algumas modificações da metodologia proposta por Martínez *et al.*, (2015).

Iniciou-se o processo com a extração de DNA, seguindo o protocolo modificado de CTAB 2% (NaCl, EDTA 0,5M, Tris HCL 1M, PVP polivinil) (DOYLE; DOYLE, 1987). Em seguida verificou-se a concentração de DNA das amostras utilizando o equipamento NanoDrop 2000 *Spectrophotometer* (Thermo Scientific). Após quantificação, foi feito cálculo para obter 200ng/ $\mu$ l de DNA de cada amostra, quantidade necessária para as próximas etapas. A qualidade da extração foi analisada através da eletroforese em gel de agarose 1%.

O DNA extraído foi submetido a digestão com as enzimas de restrição *SdaI* (corte raro: ~1 a cada 65.536 pares de bases) e *Csp6I* (corte frequente: ~1 a cada 256 pares de bases), e simultaneamente foram ligados os adaptadores A1 (com barcode de 10 pares de base para diferenciação de indivíduos) e P1. Para cada reação de digestão/ligação foi usado um volume final de 50  $\mu$ L contendo: 5  $\mu$ L do tampão TANGO, 2  $\mu$ L do adaptador P1, 2  $\mu$ L de um adaptador A (um diferente para cada amostra), 0,1  $\mu$ L de *SdaI*, 0,1  $\mu$ L de *Csp6I*, 0,5  $\mu$ L de DNA T4 ligase, 0,5  $\mu$ L de ATP e 38,8  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O. As condições da reação foram: 37 °C por 2 horas e 68 °C por 15 minutos.

O produto da digestão/ligação foi submetido a uma PCR de enriquecimento (seleção de fragmentos apenas com ambos os tipos de adaptadores: A-P1), com cinco réplicas para cada amostra com a finalidade de diminuir o desvio padrão dos alelos representativos de cada indivíduo gerado pelo viés da PCR. A reação teve um volume final de 25  $\mu$ L contendo: 12,4  $\mu$ L de ddH<sub>2</sub>O, 2  $\mu$ L de MgCl<sub>2</sub> 25mM, 2  $\mu$ L de dNTPs 2,5 mM, 2,5  $\mu$ L de tampão 10X (750mM Tris-HCl, 200mM (Na<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), 2,5  $\mu$ L do *primer* P1, 2,5  $\mu$ L do *primer* A-amp, 0,1  $\mu$ L de *KlenTaq* (uma *Taq* de alta-fidelidade que corrige erros de amplificação) e 1  $\mu$ L do produto da digestão/ligação. Os ciclos de amplificação foram: preaquecimento a 68°C por 60 seg., seguido de 18 ciclos de desnaturação a 93°C por 10 seg., anelamento a 52°C por 35 seg. e extensão a 68°C por 90 seg.; e uma extensão final a 68°C por sete minutos. As cinco réplicas por amostra foram unidas e visualizadas em

gel de agarose 1% para verificar a reação, onde o padrão esperado é um rastro como na Figura 3.



**Figura 3.** Gel da amplificação da digestão/ligação.

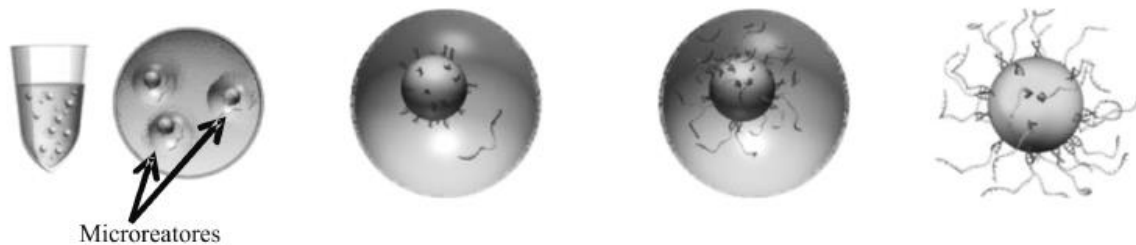
Após a PCR, as amostras foram quantificadas individualmente no fluorímetro Qubit 2.0 (Invitrogen) e em seguida feito um *pool* das amostras, colocando a mesma quantidade de DNA de cada uma. O *pool* equimolar de amostras foi purificado com o kit de purificação *AMPure* (Agencourt) em uma proporção de 0,8V *AMPure beads*:1V DNA e posteriormente levado a seleção de fragmentos.

A seleção da fração representativa de fragmentos da biblioteca genômica para sequenciamento no *Ion Torrent* foi feita de maneira automatizada no Pippin Prep (Sage Science) com *cassetes* de agarose 2% *dye-free*, *internal standard mix*, seguindo as instruções do fabricante. A faixa de corte escolhida foi determinada mediante uma simulação de corte enzimático do genoma mais próximo à espécie de estudo, para conhecer a distribuição dos tamanhos dos fragmentos depois do corte e assim determinar a faixa mais apropriadas para ser sequenciada (aquela que permite a obtenção de maior número de *loci* com maior cobertura de alelo). A média do tamanho foi de 374pb a 456pb (pares de base). Ao finalizar a corrida, a fração selecionada da biblioteca foi coletada, purificada com o kit *AMPure* em uma proporção de 0.7V *AMPure beads*: 1V DNA e quantificada novamente no Qubit 2.0. Com base nesse valor, foi feito o cálculo da diluição necessária para a preparação do *template* (cada um dos fragmentos da biblioteca genômica que são usados no sequenciamento de nova geração).

O preparo do *template* e PCR clonal do *template* foi realizado seguindo o protocolo do fabricante “*Prepare Template-Positive Ion PGM Template OT2 400 Ion Sphere*

*Particles (ISPs)* ". Foram utilizados 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.

A PCR clonal ou PCR de emulsão tem por objetivo gerar muitas cópias de cada fragmento da biblioteca. Nesse processo, cada fragmento é amplificado em microreatores formados por emulsão em óleo, os quais contêm os reagentes de PCR e pequenas esferas (*IonSpheres Particles - ISPs*) ou *beads* cobertas com o *primer* P1 (sequência complementar ao adaptador P1), que servem para fixar os clones do *template* (Figura 4).



**Figura 4.** PCR clonal ou de emulsão: os fragmentos são ligados às *IonSpheres* (pequenas esferas) através de *primers* P1 (sequências complementares ao adaptador P1) na superfície das esferas. Um único fragmento se liga a uma determinada esfera. Elas são capturadas individualmente em gotículas oleosas (microreatores) onde a PCR em emulsão ocorre. Nesse processo, são geradas milhares de cópias de cada fragmento. Fonte:(CARVALHO; SILVA, 2010).

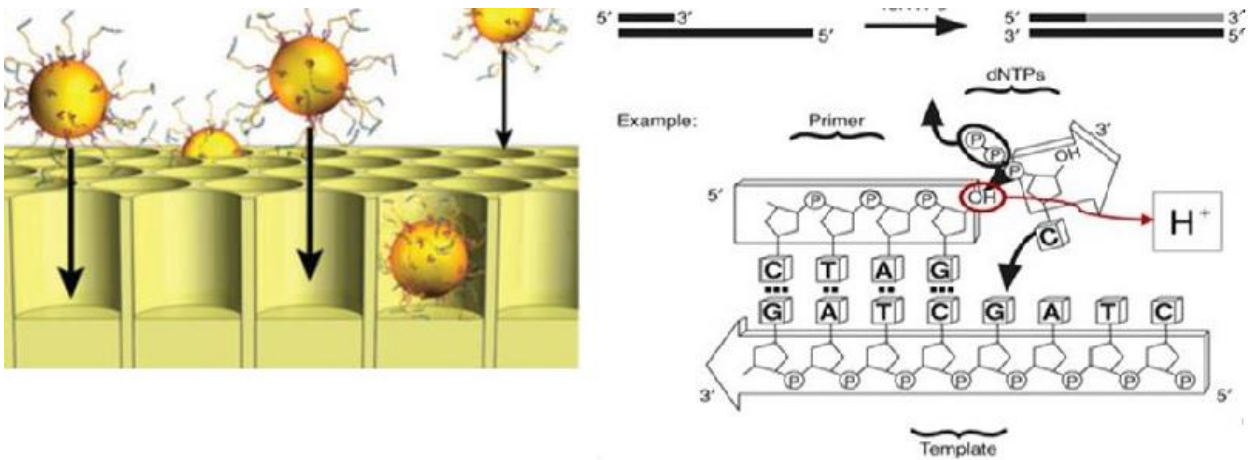
Ao finalizar a PCR de emulsão o produto é resgatado e lavado, para ser usado no enriquecimento do *template* seguindo o protocolo do fabricante "*Enrich the Template-Positive Ion PGM Template OT2 400 Ion Sphere Particles (ISPs)* ". Foram utilizados reagentes e materiais dos kits "*Ion PGM Template OT2 Solutions 400*", "*Ion PGM Template OT2 Supplies 400*" e "*Ion PGM Enrichment Beads*". O enriquecimento foi feito no equipamento *Ion OneTouch ES*. Nessa fase, as esferas que incorporaram fragmentos durante a PCR clonal hibridizam com *beads* magnéticas ocorrendo a separação daquelas que não incorporaram fragmentos, estas são eliminadas durante a lavagem restando assim apenas as esferas hibridizadas.



### 3.3 Sequenciamento

Após o enriquecimento, ficaram apenas as esferas hibridizadas com os fragmentos, sendo estes utilizados para o carregamento do chip Ion 318 V2 e posterior sequenciamento no sistema Ion Personal Genome Machine (PGM). Para esse procedimento foram usados os reagentes e materiais dos kits “*Ion PGM Sequencing Reagents 400*”, “*Ion PGM Sequencing Solutions 400*” e “*Ion PGM Sequencing Supplies 400*”.

Uma vez feito o carregamento, as esferas enriquecidas são incorporadas individualmente em um dos poços do chip onde será realizado o sequenciamento (Figura 5 a.). No Ion PGM, a reação de polimerização gera naturalmente um  $H^+$  (próton) (Figura 5 b) que altera o pH do meio, o que é detectado diretamente por um transistor, que converte a alteração em um sinal elétrico. Cada poço tem seu pHmêtro e a detecção é dada por fluxos contínuos das bases, onde a injeção de cada uma se dá individualmente seguida de uma lavagem (VARUZZA, 2013).



**Figura 5.** a) as ISPs são incorporadas nos poços do chip Ion 318 V2. Uma ISP entrará por cada poço (esq.). b) durante o sequenciamento, a *Taq* polimerase incorpora uma base e é liberado um fosfato e um  $H^+$  que é detectado por um pHmêtro que transforma a mudança de pH em um sinal elétrico (dir.). Fonte: (SHENDURE; JI, 2008; VARUZZA, 2013).

## 4. ANÁLISE DE DADOS

### 4.1 Dados genômicos

Os dados genômicos (leituras) obtidos a partir do sequenciamento foram processados pelo *software Torrent Suite* (da plataforma *Ion Torrent*) e colocado no formato BAM, um formato binário para armazenamento de sequências. Este arquivo foi transformado em FASTAQ com todas as sequências brutas e seus scores de qualidade. Posteriormente, o arquivo FASTAQ foi processado, retirando as leituras menores de 200 pb mediante um *script* na linguagem de programação *Python*.

O arquivo FASTAQ foi analisado no *pipeline pyRAD* (EATON, 2014). Este *pipeline* é destinado para uso em bibliotecas baseadas em sítio de restrição associado ao DNA (*Restriction site associated DNA, RADs*). Permite o alinhamento *denovo* de *loci* (tags de sequências) para análises em nível populacional ou filogenético. Para agrupar os dados ele utiliza similaridade de sequências com base em um alinhamento global de sequências através do programa VSEARCH.

O *pyRAD* separou as sequências dos 40 indivíduos utilizando identificador molecular específico, barcode, para cada amostra, que foram adicionadas durante o preparo da biblioteca. Em seguida foi feita a combinação de sequências replicadas, aquelas leituras com mais de 4 bases com *phred quality scores* (medida de qualidade de identificação das bases geradas durante o sequenciamento) abaixo de 20 foram descartadas. As leituras foram agrupadas dentro de cada indivíduo e os *clusters (loci)* formados de acordo com limite de similaridade (0.88) e para cada indivíduo foi exigido uma cobertura mínima de 5 leituras idênticas para formar um *loci*. Este mesmo limite (0.88) foi utilizado para criar *clusters* através dos indivíduos e sequência consenso de cada indivíduo. Foram descartados *clusters* com sítios heterozigoto em mais de 3 indivíduos para evitar a inclusão de *loci* parálogos.

Para organização dos dados para análises seguintes foi criado um banco de dados dos 40 indivíduos submetidos ao sequenciamento. As amostras foram divididas de acordo com a área geográfica amostrada, que compreende os quatro rios: Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins, bem como as combinações entre essas localidades e de acordo com o tipo de água: barrenta e clara.

## 4.2 Análise bayesiana para determinar a estrutura populacional

Os Agrupamentos biológicos foram determinados através do software *STRUCTURE* v. 2.3.4 (PRITCHARD *et al.*, 2000), trata-se de um *software* que investiga a estrutura populacional usando dados de genótipos multi-*loci*. Esse *software* identifica grupos biológicos atribuindo indivíduos, probabilisticamente, às populações com base na frequência alélica de cada locus. Supõe-se que dentro das populações os *loci* estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg e equilíbrio de ligação, ou seja, os indivíduos são atribuídos às populações até atingir o equilíbrio (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2010).

Essa estimativa é feita mediante um algoritmo de agrupamento baseado em um modelo Bayesiano que calcula a probabilidade posterior para diferente número de grupos usando o modelo de mistura (*admixture model*) e frequências alélicas correlacionadas (*correlated allele frequencies*). No *admixture model* admite-se que os indivíduos podem ter uma ancestralidade mista, sendo sua herança genética proveniente de indivíduos de diferentes populações, já o modelo *correlated allele frequencies* considera que as frequências alélicas de populações relacionadas, são similares (PRITCHARD; WEN; FALUSH, 2010).

O programa foi executado com os seguintes parâmetros: 100.000 gerações de "*burn-in*", 1.000.000 de gerações de cadeias de Markov Monte Carlo (MCMC) para cada *K-grupo* testados. As simulações foram repetidas dez vezes para cada *K*, calculando a proporção de atribuição (Q) das localidades amostradas nos grupos detectados e o coeficiente individual de agrupamento ( $q$ : proporção do genoma ancestral em cada indivíduo no grupo). Esses resultados foram importados para o programa *STRUCTURE HARVESTER* (EARL; VONHOLDT, 2012), onde o número ótimo de grupos biológicos (K) foi determinado de acordo com a probabilidade posterior e método de Evanno (EVANNO *et al.*, 2005). Os resultados foram permutados no programa *CLUMPP* (JAKOBSSON; ROSENBERG, 2007). Por fim, as matrizes de cada valor de *K* foram visualizadas no programa *DISTRUCT* (ROSENBERG, 2003).

Uma vez identificado o melhor *K*, foi observado qual a distribuição dos indivíduos explicaria mais adequadamente a estrutura genética observada: tipos de água ou geográfica (localidade amostrada).

### 4.3 Análise de diferenciação por locus via $F_{ST}$ de Wright e associação genótipo e fenótipo (tipos de água)

Utilizando cada agrupamento, tipo de água e combinação entre rios, foram calculadas as diferenças genéticas por loco via  $F_{ST}$  de Wright e associação fenótipo genótipo através do teste exato de Fisher (FISHER, 1922). Essas análises foram realizadas no *software* estatístico R, com auxílio dos pacotes específicos Adegenet, Ade4 e Pegas (JOMBART; AHMED, 2011; DRAY; DUFOUR, 2007; PARADIS, 2010). O valor de  $p \leq 0,001$  foi considerado significativo.

### 4.5 Isolamento por distância

O arquivo do *Structure* foi transformado para o formato específico ARP para análise no *software Arlequin 3.5* (LISCHER; EXCOFFIER, 2010) com auxílio do *software PGDSpider* (LISCHER; EXCOFFIER, 2012). A hipótese de isolamento por distância (IBD) foi testada mediante análise da relação entre distâncias genéticas ( $F_{ST}$ ) e geográficas (calculadas no GoogleEarth seguindo o curso do rio), utilizando o teste de Mantel (MANTEL, 1967). A ausência de IBD permitirá descartar qualquer efeito da distância geográfica sobre a fixação diferencial de alelos entre os grupos comparados. Essa análise foi conduzida, mas a correlação com apenas quatro localidades não é adequada o ideal seria a partir de cinco localidades.

### 4.6 Identificação de *loci* sob seleção divergente

A análise de *loci* sob seleção foi realizada no *software* Bayescan (FOLL; GAGGIOTTI, 2008; FISCHER *et al.*, 2011). Este *software* calcula o valor de  $F_{ST}$  de cada loco e, a partir das diferenças nas frequências alélicas entre as populações, realiza uma análise bayesiana para identificar aqueles *loci* potencialmente sob seleção. A seleção é introduzida por decompor o  $F_{ST}$  em uma componente população específica (beta), compartilhado por todos os *loci* e um componente loco específico (alpha) compartilhado por toda a população. A saída de um dado *loci* da neutralidade é assumida quando o componente locus específico é necessário para explicar o padrão de diversidade, ou seja, alpha diferente de zero. O programa foi executado de acordo com os seguintes

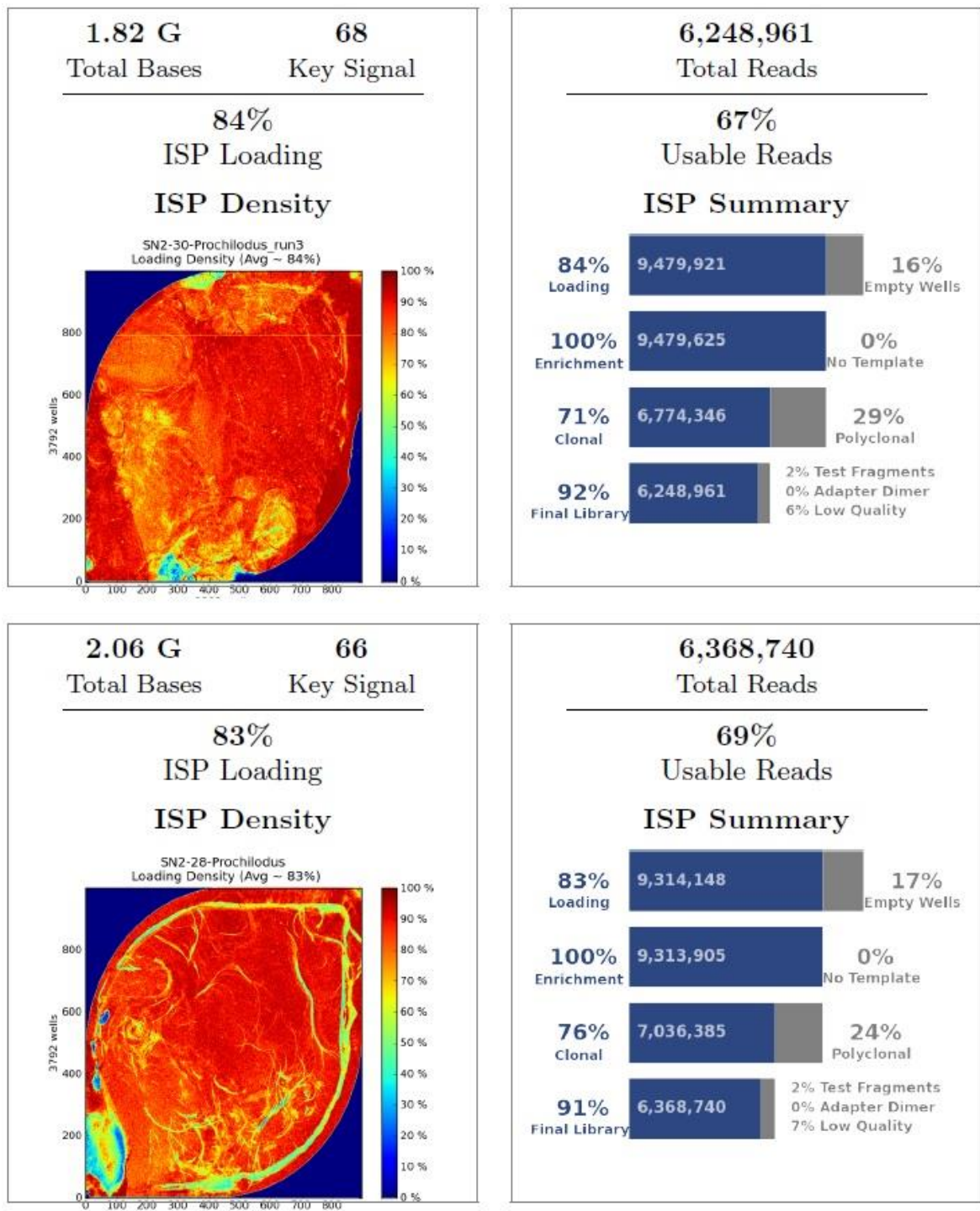
parâmetros: *ndp* 20 *pilot runs* de 5000 interações, *thinning* intervalo de tamanho de 10, *burn-in* de 500.000 interações e FDR (False Discovery Rate), que corresponde a proporção esperada de falso positivo entre os marcadores *outliers* de 5% (FOLL, 2012). Para essa análise os indivíduos foram divididos em duas populações *a priori*, os indivíduos de água clara compuseram uma população e os indivíduos de água barrenta outra população.

## 5. RESULTADOS

### Dados genômicos

Foram sequenciados dois Chips (figura 6) cada um contendo 40 amostras, (para esse trabalho foram utilizadas apenas 40 amostras) os quais produziram 12.671,701 de leituras das quais aproximadamente 6 milhões passaram no controle de qualidade e tiveram um tamanho maior que 200pb. Após processar os dados dos 40 indivíduos no programa *pyRAD*, foram obtidos um total de 36,902 *loci* com sítios variáveis.

Para gerar os arquivos para análises posteriores, como alguns *loci* são sequenciados para poucos indivíduos foi estabelecido que para um *loci* fazer parte do banco de dados tinha que estar presente em pelo menos 10 indivíduos. Ao final obtivemos 1674 *loci* contendo SNPs.

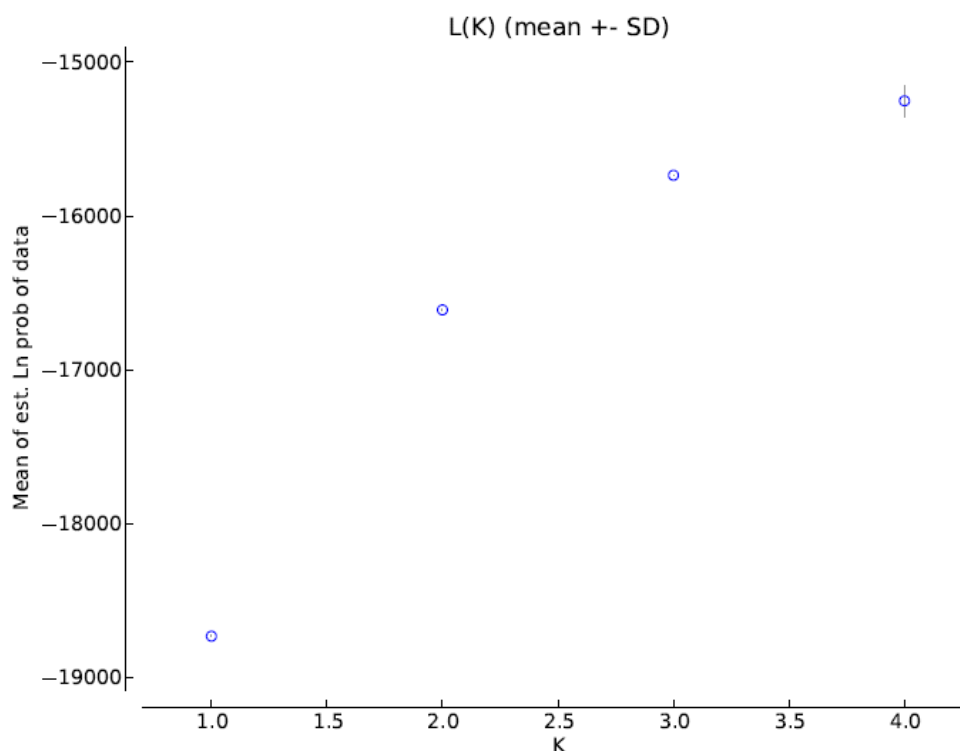


**Figura 6.** Chips de sequenciamento com o carregamento da deposição das *ISPs* e resultados do sequenciamento. O carregamento é representado por uma escala de cores onde as regiões em laranja e vermelho representam alta densidade.

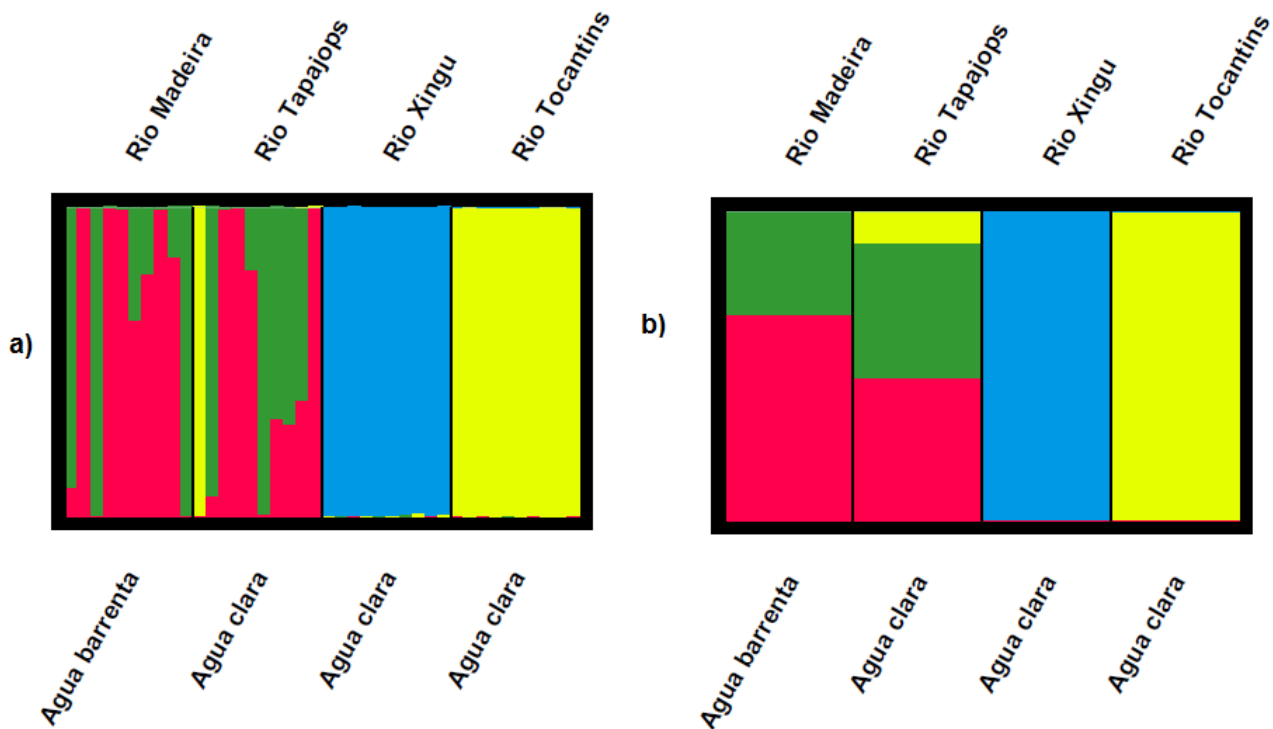
## 5.1 Estrutura populacional

As análises foram conduzidas inicialmente com todas as localidades juntas, como populações independentes determinadas *a priori*. Após o resultado, foram feitas novas

análises fazendo a combinação par a par das localidades entre elas, para verificar se o padrão de agrupamento dos indivíduos se mantinha, para isso foi determinado  $K=4$  e  $K=3$ , respectivamente. Foram analisados 1674 *loci* e os grupos biológicos foram determinados baseados na probabilidade posterior e método de Evanno. De acordo com o método probabilidade posterior a maior probabilidade de ocorrência de grupos biológicos correspondeu a 4 ( $\ln \Pr (X|K=4) = -15000$ ), indicando a ocorrência de 4 grupos biológicos de acordo com as localidades amostradas (Figura 7). As populações amostradas nos rios Tocantins e rio Xingu são grupos biológicos puros (rio Tocantins:  $q > 0,99$  representado na cor amarela; rio Xingu:  $q > 0,98$  representado na cor azul). As populações do rio Madeira e Tapajós apresentam mistura entre elas (rio Madeira:  $q > 0,69$  representado na cor vermelha e rio Tapajós  $q > 0.63$  representado na cor verde) (Figura 8). As análises das combinações entre as localidades apresentaram o mesmo padrão de agrupamento das localidades analisadas juntas.



**Figura 7.** Gráfico do logaritmo natural e das probabilidades posteriores para formação de grupos biológicos ( $K_s$ ) para os 40 indivíduos amostrados de *Prochilodus nigricans* nas localidades do rio Madeira, Tapajós, Xingu e Tocantins. As barras verticais representam o desvio padrão com base em 10 réplicas. Ilustração gerada no programa *Harvester*.



**Figura 8.** Estrutura populacional fornecida pelo programa *Structure* mediante inferência Bayesiana ( $K=4$ ). Foram analisados 1674 SNPs de 40 indivíduos de 4 localidades. A maior probabilidade posterior está associada com 4 grupos biológicos. a) Gráfico de ancestralidade de indivíduos. Cada coluna representa a probabilidade de atribuição individual b) gráfico de ancestralidade de populações. Ilustração gerada no programa *Distrupt*.

## 5.2 Isolamento por distância (teste de Mantel)

As distâncias entre as localidades variaram de 533,32 a 1614,22 Km (Tabela 2). O teste de correlação entre distância geográfica e genética apresentou coeficiente de correlação baixo ( $r = 0,43$ ) e não foi significativo ( $P=0,16$ ) para todas as localidades analisadas juntas, demonstrando ausência de isolamento por distância entre as localidades.

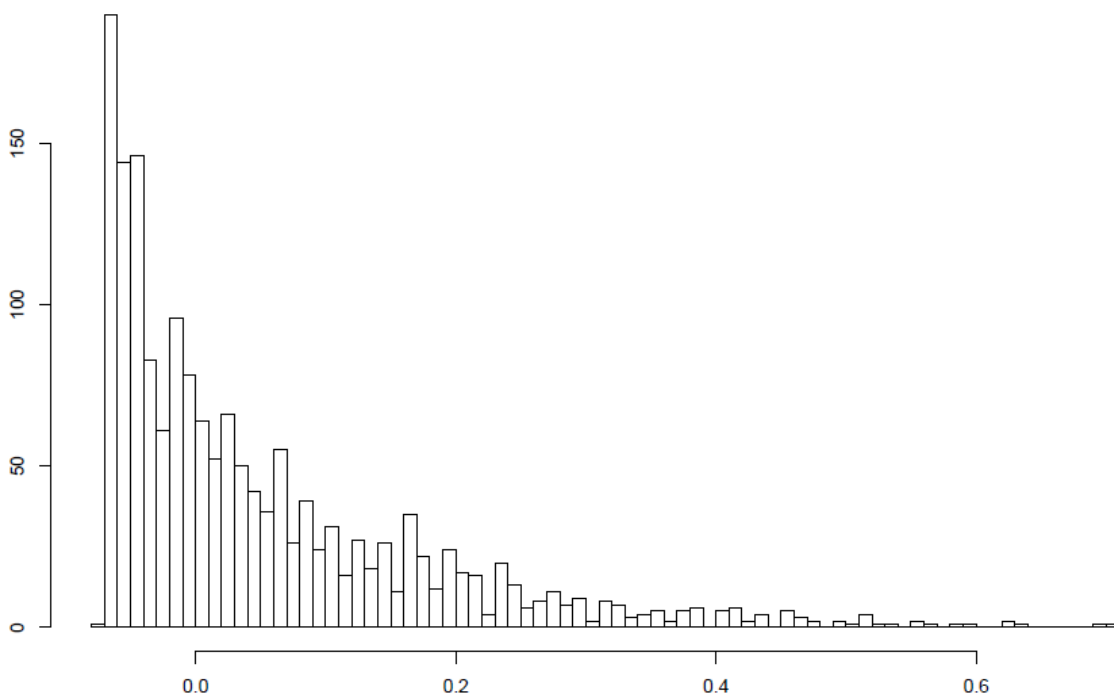
**Tabela 2.** Valores em quilômetros (Km) das distâncias geográficas entre as populações de *P. nigricans*.

	Rio Madeira	Rio Tapajós	Rio Xingu	Rio Tocantins
Rio Madeira				
Rio Tapajós	723,70			
Rio Xingu	1.225,44	533,32		
Rio Tocantins	1.614,22	928,98	721,21	

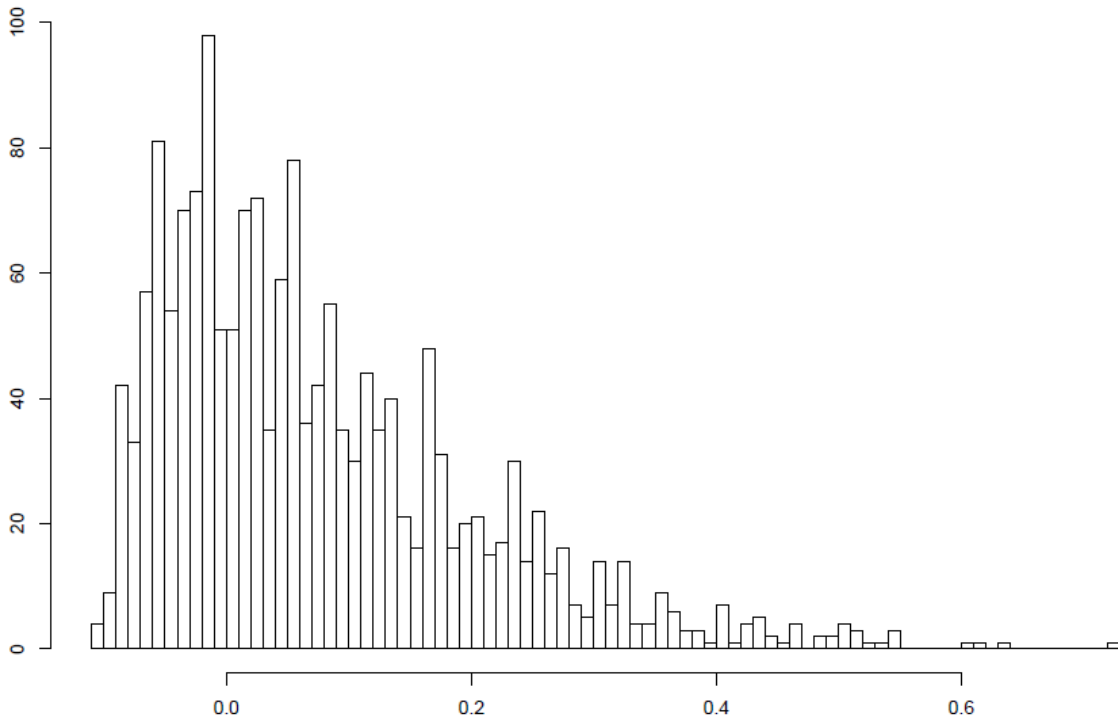


### 5.3 Análise de diferenciação por locus via $F_{ST}$ e associação genótipo e fenótipo

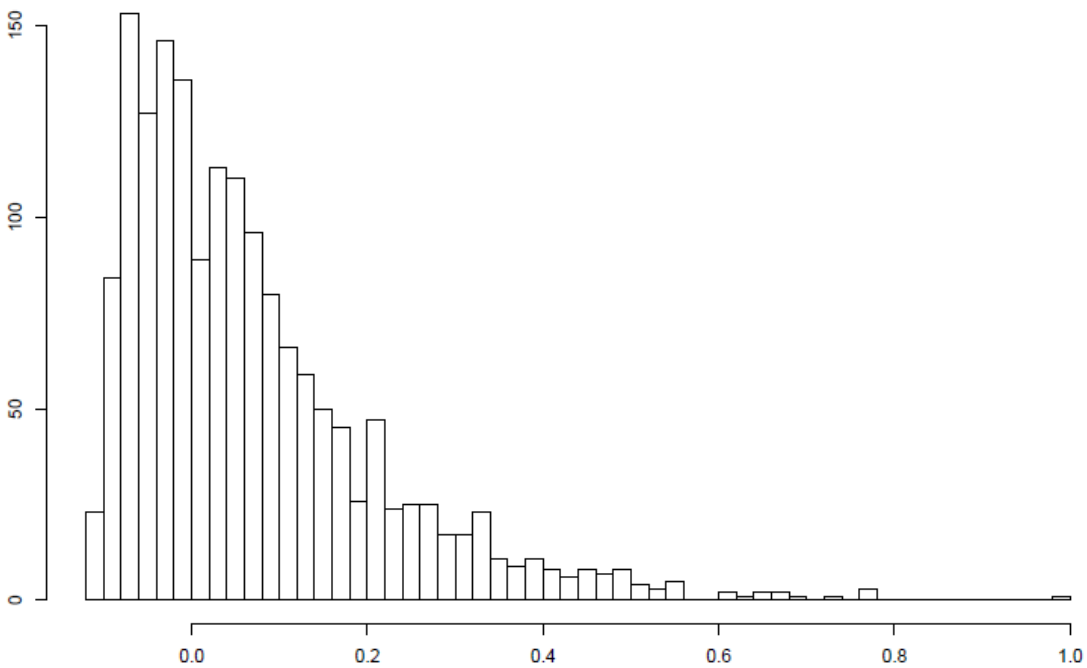
As análises de diferenciação por loco mostraram que, para a comparação entre os tipos de água e a combinação entre os rios, a maior parte do genoma não apresentou diferenciação genética pronunciada, poucos locus foram diferenciados, sendo 17 para combinação tipos de água, 8 para combinação Tocantins x Tapajós, Xingu x Tapajós e 12,13,14 e 9 para as combinações Madeira x Tapajós, Madeira x Xingu, Tocantins x Xingu e Madeira x Tocantins respectivamente (Tabelas 3 e 4). A frequência dos valores de  $F_{ST}$  apresentou uma distribuição normal, com alguns *loci* com diferenciação elevada dos demais (Figuras 9 10, 11, 12, 13, 14 e 15).



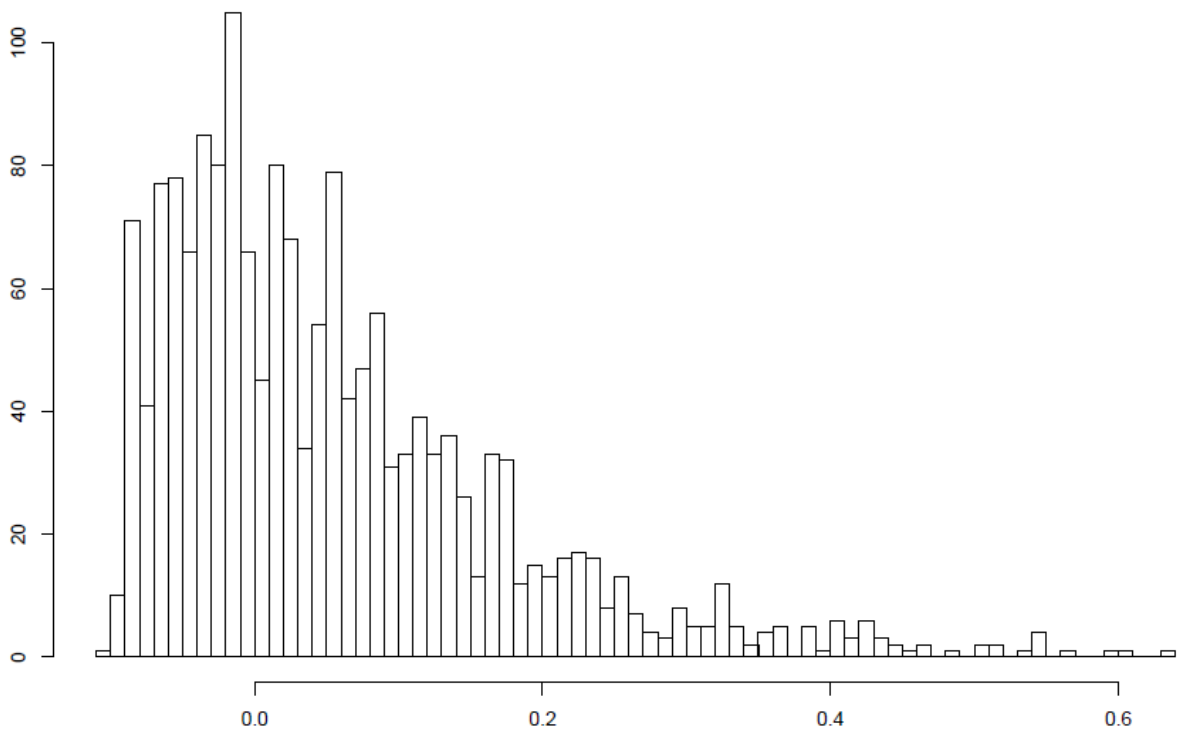
**Figura 9.** Distribuição de frequências das médias dos valores de  $F_{ST}$  por loco, na comparação de ambos tipos de água. No eixo X estão os valores de  $F_{ST}$  e no eixo Y o número de locos.



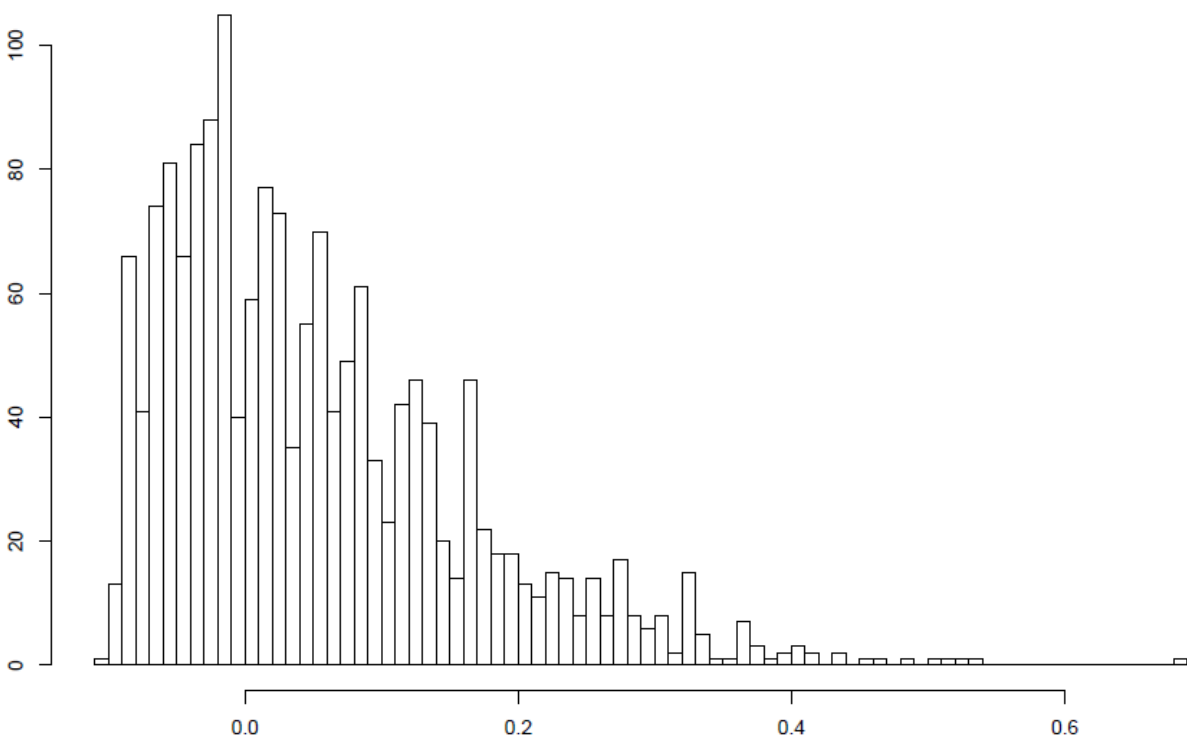
**Figura 10.** Distribuição de frequências das médias dos valores de  $F_{ST}$  por loco, na comparação entre rio Madeira x Xingu. No eixo X estão os valores de  $F_{ST}$  e no eixo Y o número de locos.



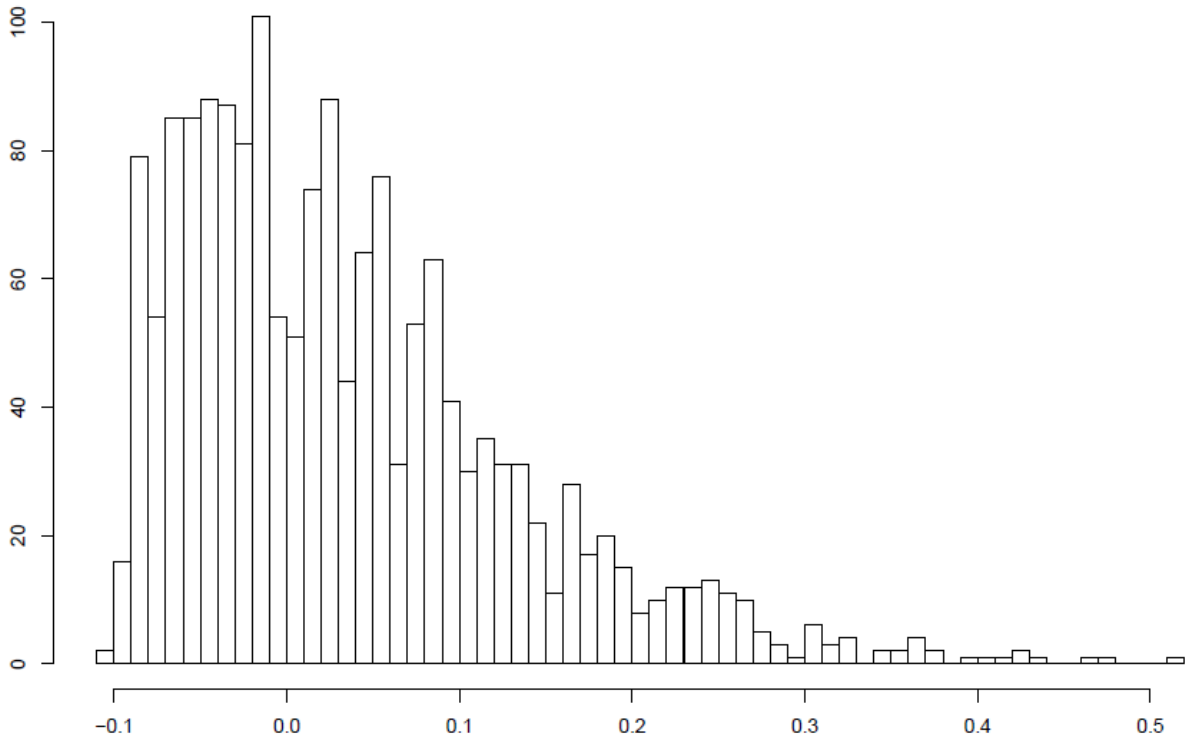
**Figura 11.** Distribuição de frequências das médias dos valores de  $F_{ST}$  por loco, na comparação entre rio Madeira x Xingu. No eixo X estão os valores de  $F_{ST}$  e no eixo Y o número de locos.



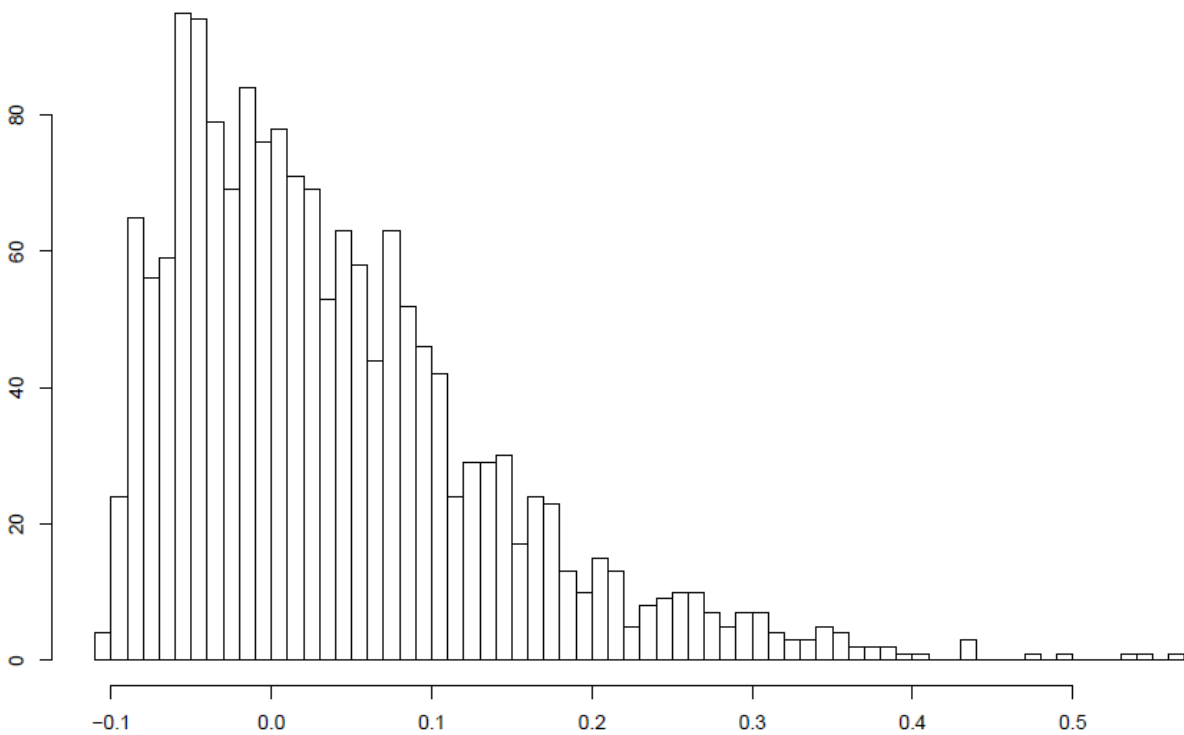
**Figura 12.** Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Tocantins x Xingu. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos.



**Figura 13.** Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Tocantins x Tapajós. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos.



**Figura 14.** Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Madeira x Tocantins. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos.



**Figura 15.** Distribuição de frequências das médias dos valores de FST por loco, na comparação entre rio Xingu x Tapajós. No eixo X estão os valores de FST e no eixo Y o número de locos.

**Tabela 3.** Relação de loci que foram significativos para  $p \leq 0,001$  para o índice de diferenciação FST de Wright. Os agrupamentos foram feitos de acordo com o e tipo de água e combinação entre os rios (Mad = Madeira, Tap= Tapajós e Xin = Xingu).

Entre tipos de água		Mad x Tap		Mad x Xin	
Loco	Valor F <sub>ST</sub>	Loco	Valor F <sub>ST</sub>	Loco	Valor F <sub>ST</sub>
L0046	0,919	L0045	0,513	L0137	0,777
L0152	0,629	L0137	0,518	L0502	0,669
L0155	0,929	L0152	0,521	L0535	0,771
L0295	0,524	L0155	0,548	L0545	0,671
L0335	0,557	L0295	0,543	L0629	0,627
L0387	0,536	L0535	0,638	L0658	0,609
L0419	0,597	L0749	0,727	L0870	0,686
L0521	0,936	L0822	0,543	L1050	0,733
L0592	0,588	L1050	0,611	L1170	0,642
L0749	0,624	L1233	0,515	L1432	0,762
L0822	0,876	L1495	0,538	L1495	0,642
L0861	0,560	L1644	0,601	L1609	0,613
L0918	0,512			L1644	1
L1070	0,630				
L1230	0,556				
L1233	0,691				
L1558	0,515				
<b>Total</b>	<b>17</b>	<b>12</b>		<b>13</b>	

**Tabela 4.** Relação de loci que foram significativos para  $p \leq 0,001$  para o índice de diferenciação FST de Wright. Os agrupamentos entre as combinações dos rios (Toc = Tocantins, Tap = Tapajós, Xin = Xingu e Mad = Madeira).

Toc x Xin		Toc x Tap		Mad x Toc		Xin x Tap	
Loco	Valor F <sub>ST</sub>	Loco	Valor F <sub>ST</sub>	Loco	valor F <sub>ST</sub>	Loco	Valor F <sub>ST</sub>
L0137	0,518	L0152	0,521	L0137	0,518	L0152	0,434
L0152	0,480	L0387	0,466	L0545	0,464	L0419	0,430
L0155	0,548	L0648	0,489	L0555	0,402	L0749	0,539

L0277	0,543	L0749	0,687	L0847	0,436	L0822	0,561
L0295	0,543	L0822	0,531	L0870	0,427	L1070	0,433
L0535	0,638	L0918	0,509	L0925	0,428	L1233	0,548
L0749	0,562	L1070	0,458	L1032	0,412	L1367	0,475
L0822	0,543	L1233	0,515	L1229	0,398	L1501	0,491
L0918	0,509			L1644	0,473		
L1050	0,593						
L1070	0,508						
L1233	0,515						
L1495	0,538						
L1644	0,601						
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>8</b>		<b>9</b>		<b>8</b>	

#### 5.4 Teste exato de Fisher

Para o teste exato de Fisher, o agrupamento por tipo de água foi identificado 3 locos com valores significativos. A combinação entre os rios: Madeira x Tapajós, Madeira x Xingu e Madeira x Tocantins, apresentaram 2 *loci* significativos, sendo os mesmos *loci*, para cada combinação (Tabela 4). Também foram feitas análises combinando as demais localidades entre elas (entre as de água clara), Tapajós x Tocantins, Tapajós x Xingu, Tocantins x Xingu, mas não foram encontrados *loci* com valores de *P* significativos.

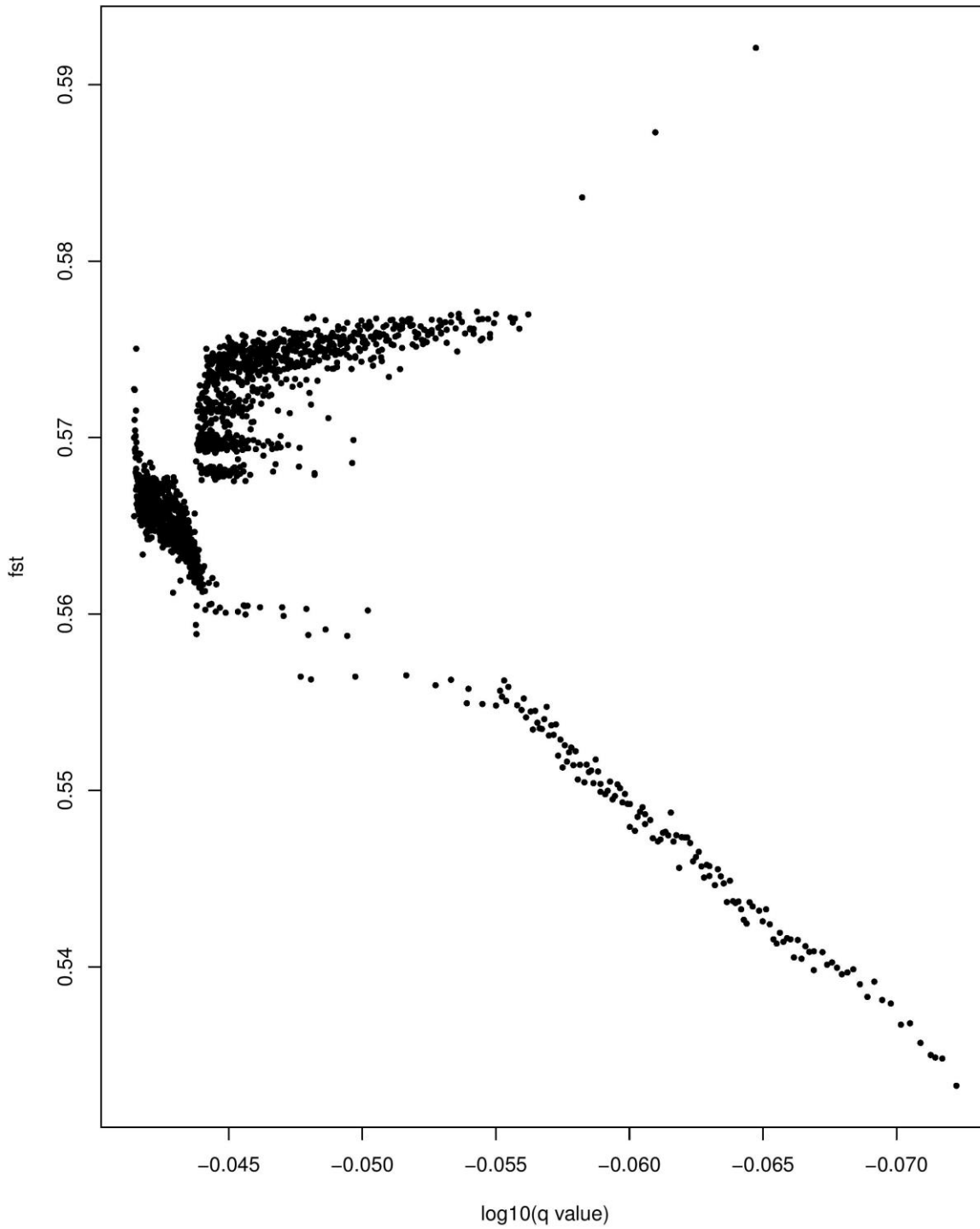
**Tabela 4.** *Loc*i que foram significativos para  $p \leq 0,001$  no teste exato de Fisher de diferenciação (Mad= Madeira, Tap = Tapajós, Xin=Xingu e Toc = Tocantins).

Tipos de água (Barrenta x Clara)		Mad x Tap		Mad x Xin		Mad x Toc	
Loco	p Valor	Loco	p Valor	Loco	p Valor	Loco	p Valor
L796	0,0008	L1411	0,0010	L1411	0,0010	L1411	0,0010

L920	0,0001	L160 5	0,0009	L1605	0,0009	L160 5	0,0009
L1605	0,0009						
<b>Total</b>	<b>3</b>		<b>2</b>		<b>2</b>		<b>2</b>

## 5.6 Identificação de *loci* sob seleção divergente

Para análise de seleção divergente, as populações foram agrupadas em duas populações de acordo com os tipos de água, assim os indivíduos do rio Madeira (água barrenta) representam uma população e os indivíduos do rio Tapajós, Xingu e Tocantins (água clara) representam uma segunda população (Figura 16). Os resultados mostram baixa diferenciação no genoma, com poucos *loci* com diferenciação acentuada. Foram encontrados três *loci* com maior diferenciação: Loco 387 com  $F_{ST} = 0,587$ , loco 1487  $F_{ST} = 0,583$  e loco 1602  $F_{ST} = 0,592$ . Tais *loci* apresentaram  $\alpha$  positivo variando de 0,83 a 0,86 que pode ser considerado uma evidência substancial para seleção, porém não foram significativos para o  $q$  (value) 0.05 (FOLL; GAGGIOTTI *et al.*, 2008; STOREY; TIBSHIRANI, 2003). Desses três *loci* apenas um, *loci* 387, coincide com análise de diferenciação de  $F_{ST}$  por loco.



**Figura 16.** Valores de  $F_{ST}$  por loco, realizado no software Bayescan considerando duas populações distintas, uma população de água clara e outra de água barrenta.



## 6. DISCUSSÃO

### 6.1 Estrutura populacional associada à água clara e água barrenta

A estrutura populacional de uma espécie que compreende o grau de diversidade genética, diferenciação populacional e fluxo gênico, pode ser dirigida por uma série de mecanismos ecológicos e evolutivos como a seleção, mutação e deriva genética (WADE, 2008).

No presente estudo a formação dos grupos biológicos para *P. nigricans* não está associada aos tipos de água (seleção), mas provavelmente à deriva genética. Aparentemente as populações de Curimatã estão estruturadas conforme os rios coletados, sendo que as populações do Tapajós (água clara) e Madeira (água barrenta) são compostas por uma mistura de ambos os rios, enquanto que Xingu (água clara) e Tocantins (água clara) compõem populações distintas entre elas e as demais localidades, resultado este que corrobora as evidências observadas no estudo feito por Machado (2009) para essa espécie utilizando DNA mitocondrial. Nesse estudo foi evidenciado a presença de estoques genéticos distintos nas mesmas áreas estudadas no presente estudo. Igualmente, análises de filogeográficas demonstraram a existência de monofilia recíproca entre os rios Tapajós, Xingu e Tocantins, sendo mencionado, inclusive, a possibilidade de serem espécies diferentes para cada rio.

Algumas espécies, como é o caso da sardinha comum (*Triportheus albus*) suportam a hipótese de estruturação populacional associada à composição hidroquímica da bacia Amazônica. Em estudo feito por Cooke, Chao e Beheregaray (2012a) para a espécie, baseado em análises filogeográficas e detecção de seleção divergente foi identificada uma linhagem associada a água barrenta e outra associada a água clara e água negra, sugerindo a ação da seleção como fator estruturador e diversificador. O mesmo parece não ocorrer para espécie de *P. nigricans*.

Espera-se que espécies com alta capacidade de dispersão apresentem alto fluxo gênico e baixa estruturação populacional (BEHEREGARAY; SUNNUCKS, 2001). *P. nigricans* é uma espécie com ampla distribuição, presente em rios de água clara, barrenta e negra da bacia Amazônica, com extensa migração no período reprodutivo e alimentação (SANTOS; FERREIRA; ZUANON, 2006). No entanto, nossas análises revelam grupos

distintos, bem estruturados, entre as localidades, com exceção do rio Madeira e Tapajós que mostram uma mistura dos indivíduos de ambas as localidades. Tal estruturação não pode ser atribuída ao tipo de água influenciando como uma barreira para dispersão da espécie.

O padrão observado na estruturação das populações de *P. nigricans*, na bacia Araguaia-Tocantins pode ser atribuído a outros fatores, como por exemplo, isolamento histórico entre os ambientes. Durante o Pleistoceno, há cerca de 1,8 milhões, as bacias, amazônica e Araguaia-Tocantins, permaneceram separadas pela existência de depósitos de sedimento que preencheram o paleovale, impossibilitando o contato da fauna aquática entre as duas bacias. Apesar da conexão entre ambas as bacias, com a formação da ilha de Marajó, que criou um estreito canal entre elas ligando o delta do rio Amazonas com o Pará, no qual drena o Rio Araguaia-Tocantins, atualmente essas bacias são consideradas independentes (ROSSETTI; VALERIANO, 2007).

Estudos anteriores feitos em diferentes taxa na bacia Araguaia-Tocantins também evidenciaram a separação de suas populações em relação ao resto da bacia Amazônica. Pearse *et al.*, (2006) avaliaram populações de tartaruga da Amazônia, *P. expansa*, e identificaram que as populações do rio Araguaia eram diferenciadas das demais populações estudadas. Estudos conduzidos por Hernandez (2015) com populações de Jacaré-açú, *Melanosuchus niger*, também demonstraram que os indivíduos do rio Araguaia formavam uma população com alta diferenciação das demais populações da bacia Amazônica. No boto vermelho (*Inia* sp.) as diferenças foram exorbitantes, chegando à descrição de uma nova espécie, *I. araguaiaensis* sp. nov., para essa bacia (HRBEK *et al.*, 2014).

Já as populações dos rios Madeira e Tapajós, o processo de migração poderia explicar o padrão observado entre os rios. Como mencionado anteriormente, *P. nigricans* é uma espécie migratória, sendo que no início da vazante migram entre sucessivos lagos de várzea, fazendo esse movimento de entrada e saída dos lagos de várzea em diferentes épocas do ano sendo que no início da enchente deixam a área de várzea para desovar no canal principal dos rios. (MOTA; RUFFINO, 1997; GODINHO; KYNARD, 2009; ARAUJO-LIMA; RUFFINO, 2003).

Entre esses rios há uma ampla área de várzea, na qual *P. nigricans* poderia dispersar-se, embora, Araujo-lima e Ruffino (2003) afirmem desconhecer a distância que

eles migram dentro do sistema de várzea, devemos considerar a possibilidade de deslocamento entre essas áreas, propiciando o encontro das populações de ambos os rios. Outra possibilidade é o deslocamento utilizando o rio Amazonas como via de conectividade, pois relatos de Ruffino e Mota (1997) mostram que *P. nigricans* desovam no encontro das águas do Amazonas/Tapajós e do Amazonas e Arapiuns, justificando assim o padrão de mistura observado entre as populações do rio Madeira e Tapajós.

Com relação a população do Xingu, a área coletada corresponde a Vitória do Xingu, a partir dessa região o rio Xingu adquire morfologia de ria, canal largo e profundo com aproximadamente 13 km (FILIZOLA *et al.*, 2002). Aparentemente não há barreiras que impeçam a migração dessa espécie nessa região, entretanto o grupo biológico do Xingu é distinto dos demais o que nos leva a crer que esses indivíduos não deixam o sistema Xingu, caracterizando uma população residente nessa bacia. Esse mesmo padrão foi identificado em Grumatã (*Prochilodus lineatus*), na bacia do rio Sinos. Em estudo feito nesse sistema, utilizando marcação com rádio transmissor codificado, para avaliar padrões diários e sazonais de movimento, migração reprodutiva e uso do habitat, foi identificado que dos exemplares marcados, apenas um deixou o rio onde foi marcado originalmente, sugerindo uma população residente, aonde os adultos migram numa taxa muito baixa para outros rios (PESOA; SCHULZ, 2010).

Estrutura populacional também foi identificada em outras espécies que migram longas distâncias, como por exemplo, em Surubim, *Pseudoplatystoma reticulatum* e Pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*). Estudo desenvolvido por Abreu *et al.*, (2009) na bacia do rio Paraguai com marcador microssatélites em duas populações de *P. reticulatum*, foi evidenciado forte estruturação genética populacional entre as duas localidades amostradas (rio Paraguai e rio Jarua). Já Pereira Foresti e Oliveira (2009) estudaram seis populações de *P. corruscans*, sendo três pertencentes a tributário do rio Paraguai e as outras três de tributários do rio Paraná, também utilizando *loci* microssatélites, nesse estudo foi rejeitado a hipótese de panmixia, sendo observado forte diferenciação genética entre os grupos e identificação de seis grupos biológicos distintos, ambos os estudos sugerem provável comportamento de *homing* para explicar o padrão de estruturação encontrada.

Para *P. nigricans* não há estudos que indiquem comportamento de *homing* ou população residente, mas os resultados nos levam a considerar tais hipóteses como uma provável causa da diferenciação entre os estoques populacionais do Xingu em relação a outros rios dentro do Amazonas.

## 6.2 Evidência de *loci* sob seleção divergente

No geral, foram encontrados *loci* sob diferenciação entre as populações estudadas com base no conjunto de dados (1674 SNPs). Tais *loci* sob diferenciação estão presentes tanto na comparação entre os tipos de água, resultado esperado já que cada localidade tem grupos bem definidos, quanto na comparação entre os rios, corroborando com a estrutura populacional encontrada na análise via *structure*. Apesar da diferenciação entre as populações as evidências de adaptação local associada aos tipos de águas não foram contundentes. Podemos apenas assumir que os *loci* que se mantiveram diferenciados para todas as combinações entre rios de águas diferentes (barrenta e clara) no teste exato de Fisher (loco 1605 e loco 1411), e loci 387 detectado na análise de Baysacan e que coincide com análise de diferenciação de FST por loco, são possíveis *loci* candidatos a seleção natural divergente, porém com efeito atenuado por respostas adaptativas plásticas da espécie.

A complexidade da bacia Amazônica composta por diferentes ecossistemas, que incluem rios, pequenos riachos, canais, florestas inundadas, áreas de várzea, tipos de água, dão origem a fenômenos diversos, como por exemplo, composição físico-química diferenciada das águas, pulso de inundação anual (período seco, níveis de água mais baixos e período de cheia, níveis de água mais elevados) quantidade de oxigênio dissolvido, toda essa dinâmica afeta os organismos (ALMEIDA-VAL; VAL; WALKER 1999; JUNK BAYLEY; SPARKS 1989; SIOLI, 1984). De modo a elaborar ajustes para adaptar-se a esse ambiente que incluem ajustes fisiológicos, morfológicos, metabólicos e mudanças moleculares associados a plasticidade fenotípica (ALMEIDA-VAL *et al.*, 1999; ALMEIDA-VAL; HOCHACHKA, 1995).

Alterações no fenótipo em função de um ambiente proporcionam uma tolerância ambiental maior para as espécies, sendo a plasticidade fenotípica uma solução para adaptações a ambientes heterogêneos. Estudos realizados com Acará (*Cichlasoma amazonarum*), relacionados aos ajustes bioquímicos a condição de hipóxia, demonstram que essa espécie tem a capacidade de regular a expressão de LDH (lactato desidrogenase) de acordo com a disponibilidade de oxigênio permitindo a sobrevivência em ambientes com falta de oxigênio severa. Os autores afirmam que essa plasticidade fenotípica pode ocorrer em outras espécies de peixes tolerantes à hipóxia (VIA *et al.*, 1995; ALMEIDA-VAL *et al.*, 1995).

*Prochilodus nigricans* é amplamente distribuído, sendo encontrado em rios com diferentes tipos de água e em áreas de várzea, locais com condições variáveis, que exigem ajustes da espécie, então espera-se que, assim como a espécie citada anteriormente, *Prochilodus nigricans* passe pelo mesmo processo. Reforçando essa ideia, Val, Gomes e Almeida-val (2015) realizaram pesquisas com *P. nigricans* a fim de analisar a regulação dos parâmetros sanguíneos quando submetidos a condição de hipóxia, e constataram que a espécie utiliza ajuste fisiológicos e bioquímicos para melhorar a transferência de oxigênio nesses ambientes.

Em suma, os *loci* que estão sob efeito da plasticidade fenotípica e que estão contribuindo para a adaptação local da espécie, não são identificáveis com a técnica empregada. Apenas aqueles *loci* sob possível seleção natural divergente, de fato, são identificados, assim a análise para identificação de *loci* sob seleção (*Bayescan*) mostrou três locus: Loco 387, loco 1487 e loco 1602 que, ainda que, estatisticamente não sejam significativos não devem ser descartados, pois, são genes candidatos a seleção que podem estar associados a respostas adaptativas da espécie em relação aos tipos de água.

### **6.3 Diferenciação por locos no genoma de *P. nigricans***

Os agrupamentos de indivíduos mostraram diferentes números de *loci* exibindo elevados níveis diferenciação. De modo geral *loci* exibindo altos níveis de diferenciação são *loci* candidatos a seleção e que devem ser usados como base para estudos futuros para entender como eles afetam a aptidão e quais forças de seleção estão agindo sobre eles (VASEMÄGI; PRIMMER 2005). Levando em consideração o conjunto de análises feitas podemos inferir que dos *loci* altamente diferenciados, o loco 387, loco 1605 e loco 1411 sejam fortes candidatos a estarem sob seleção, o loco 387 por estar presente tanto nos resultados de análise de diferenciação por locos, como também no resultado do *Bayescan* e os *loci* 1605 e 1411 por estar presente em todas as combinações do teste exato de fisher. A elevada diferenciação dos demais *loci*, pode estar relacionado a outras forças evolutivas, como deriva e não propriamente a seleção. O que pode ser feito num segundo momento são análises mais específicas em nível de expressão gênica para

confirmar se de fato esses genes estão se expressando de modo distinto em cada ambiente (água clara e barrenta).

Análise de expressão gênica tem se mostrado eficiente na identificação de *loci* sob seleção. Estudo realizado para avaliar a seleção natural atuando na expressão gênica já foi relatado em Fundulo (*Fundulus heteroclitus*). Utilizando microssatélites, técnica *microarray* e temperatura como variável ambiental foi identificado para essa espécie 329 genes dos quais 44 genes tinham a expressão alterada por seleção natural, sendo atribuído 13 genes à seleção direcional, 24 genes à seleção estabilizadora e 7 genes à seleção balanceadora (WHITEHEAD; CRAWFORD, 2006).

Em síntese as análises de Bayescan, teste exato de Fisher e diferenciação por locus geraram pelo menos, três *loci*: loco 387, loco 1605 e loco 1411 nos quais a seleção natural divergente está atuando para adaptação local da espécie aos diferentes tipos de água.

## 7. CONCLUSÃO

A estruturação genética populacional de *P. nigricans* está relacionada a eventos diversos, como por exemplo, isolamento histórico entre os ambientes e história de vida dentro de cada sistema.

O processo de adaptação local da espécie está relacionado à plasticidade fenotípica e possível seleção natural divergente, sendo evidenciado por pelo menos três locus candidatos seleção.

Mais estudos devem ser feitos para uma melhor compreensão dos processos adaptativos, do padrão comportamental e de migração da espécie dentro de cada sistema.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA-VAL, V.M.F et al. Biochemical adjustments to hypoxia by Amazon cichlids. **Brazilian Journal Of Medical And Biological Research**, Manaus, v. 28, n. 34, p.1257-1263, dez. 1995.

ALMEIDA-VAL, Vera Maria F.; HOCHACHKA, Peter W.. Chapter 3 Air-breathing fishes: Metabolic biochemistry of the first diving vertebrates. **Biochemistry And Molecular Biology Of Fishes**, Amsterdam, p.45-55, 1995. Elsevier BV.

ALMEIDA-VAL, V. M. F., VAL, A. L. & WALKER, I.. Long- and short-term adaptation of Amazon fishes to varying O<sub>2</sub>-levels: intra-specific phenotypic plasticity and interspecific variation. *Biology of Tropical Fishes* (Val, A. L. & Almeida-Val, V. M. F., eds), pp. 185–206, 1999. Manaus: INPA

ARAÚJO-LIMA, C.A.R.M.; GOULDING, M. 1998.Os frutos do Tambaqui Ecologia Conservação e cultivo na Amazônia. Tefé: **Sociedade Civil Mamirauá/ Cnpq/ Rainforest Alliance**, 1998. 186 p

ARAUJO-LIMA, C.A.R.M. & RUFFINO, M.L. 2003. Migratory Fishes of the Brazilian Amazon. *In: CAROLSFELD, J., HARVEY, B., ROSS, C., BAER, A. Migratory fishes of South America.* p. 139-181.

ARIDE, Paulo Henrique Rocha; ROUBACH, Rodrigo; VAL, Adalberto Luis. Tolerance response of tambaqui *Colossoma macropomum* (Cuvier) to water pH. **Aquaculture Research**, [s.l.], v. 38, n. 6, p.588-594, abr. 2007. Wiley-Blackwell.

BEHEREGARAY, Luciano B.; SUNNUCKS, Paul. Fine-scale genetic structure, estuarine colonization and incipient speciation in the marine silverside fish *Odontesthes argentinensis*. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 10, n. 12, p.2849-2866, dez. 2001. Wiley-Blackwell.

BARTHEM, R. B.; FABRÉ, N.N.. Biologia e diversidade dos recursos pesqueiros da Amazônia. *In: A pesca e os recursos pesqueiros na Amazônia brasileira.* M. L.Ruffino (Ed.). Ibama (Instituto brasileiro do meio ambiente e dos recursos naturais

renováveis) /ProVarzea, Manaus, Brazil, pp. 17–63. 2004 [Biology and biodiversity of fishery resources in the Amazon].

BLANQUART, François et al. A practical guide to measuring local adaptation. **Ecology Letters**, [s.l.], v. 16, n. 9, p.1195-1205, 15 jul. 2013. Wiley-Blackwell.

BAIRD, Nathan A. et al. Rapid SNP Discovery and Genetic Mapping Using Sequenced RAD Markers. **Plos One**, [s.l.], v. 3, n. 10, e3376, 13 out. 2008. Public Library of Science (PLoS).

BOURRET, V et al. Temporal change in genetic integrity suggests loss of local adaptation in a wild Atlantic salmon (*Salmo salar*) population following introgression by farmed escapees. **Heredity**, Canadá, v. 106, p.500-510, jan. 2011.

BROOKES, Anthony J.. The essence of SNPs. **Gene**, [s.l.], v. 234, n. 2, p.177-186, jul. 1999. Elsevier BV.

CARVALHO, Mayra Costa da Cruz Gallo de; SILVA, Danielle Cristina Gregorio da. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. **Cienc. Rural**, [s.l.], v. 40, n. 3, p.735-744, mar. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

CATARINO, Michel Fabiano et al. Population Dynamics of *Prochilodus nigricans* Caught IN Manacapuru Lake (Amazon basin, BRAZIL)\*. **Bol. Inst. Pesca, São Paulo**, São Paulo, v. 40, n. 4, p.589-595, ago. 2014.

COOKE, Georgina M.; CHAO, Ning L.; BEHEREGARAY, Luciano B.. Divergent natural selection with gene flow along major environmental gradients in Amazonia: insights from genome scans, population genetics and phylogeography of the characin fish *Tripottheus albus*. **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 21, n. 10, p.2410-2427, 18 abr. 2012a.

COOKE, Georgina M.; CHAO, Ning L.; BEHEREGARAY, Luciano B.. Natural selection in the water: freshwater invasion and adaptation by water colour in the Amazonian pufferfish. **Journal Of Evolutionary Biology**, [s.l.], v. 25, n. 7, p.1305-1320, 3 mai. 2012b.

DOYLE, J.J.; DOYLE, J.L.. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. **Phytochem Bull**, 19: 11-15. 1987.



DRAY, S. and DUFOUR, A.B..The ade4 package: implementing the duality diagram for ecologists. *Journal of Statistical Software*. 22(4): 1-20 2007.

DUFORET-FREBOURG, N.; BAZIN, E.; BLUM, M. G. B.. Genome Scans for Detecting Footprints of Local Adaptation Using a Bayesian Factor Model.**Molecular Biology And Evolution**,[s.l.], v. 31, n. 9, p.2483-2495, 3 jun. 2014. Oxford University Press (OUP).

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

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

ELETRONORTE/THEMAG.. Estudos de viabilidade de Serra Quebrada: estudos ambientais, relatório final de ictiofauna. SEQ. 16-1-14-0084-RE, ELETRONORTE, Brasília. 1989.

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.

FILIZOLA N. et al. Caracterização Hidrológica da Bacia Amazônica. In: Rivas A, Freitas CE (org.), Amazônia – Uma Perspectiva Interdisciplinar. Editora Universidade do Amazonas, Manaus; 2002, p. 33–54

FANG, Jing-yu et al. Divergent Selection and Local Adaptation in Disjunct Populations of an Endangered Conifer, *Keteleeria davidiana* var. *formosana* (Pinaceae). **Plos One**, [s.l.], v. 8, n. 7, e70162, 22 jul. 2013. Public Library of Science (PLoS).

FISCHER, Martin C. et al. Enhanced AFLP genome scans detect local adaptation in high-altitude populations of a small rodent (*Microtus arvalis*). **Molecular Ecology**, [s.l.], v. 20, n. 7, p.1450-1462, 24 fev. 2011. Wiley-Blackwell.

FISHER, R. A.. On the Interpretation of  $\chi^2$  from Contingency Tables, and the Calculation of P. **Journal Of The Royal Statistical Society**, [s.l.], v. 85, n. 1, p.87-94, jan. 1922. JSTOR. <http://dx.doi.org/10.2307/2340521>

FOLL, M.; GAGGIOTTI, O.. A Genome-Scan Method to Identify Selected Loci Appropriate for Both Dominant and Codominant Markers: A Bayesian Perspective. **Genetics**, [s.l.], v.

180, n. 2, p.977-993, 9 set. 2008. Genetics Society of America.

FOLL M. BayeScan v2.1 User Manual. *Ecology*. 2012;20:1450–62

GAILLARDET, Jérôme et al. Chemical and physical denudation in the Amazon River Basin. **Chemical Geology**, [s.l.], v. 142, n. 3-4, p.141-173, out. 1997. Elsevier BV.

GODINHO, Alexandre L.; KYNARD, Boyd. Migratory fishes of Brazil: Life history and fish passage needs. **River Res. Applic.**,[s.l.], v. 25, n. 6, p.702-712, jul. 2009. Wiley-Blackwell.

FUNK, W. Chris et al. Harnessing genomics for delineating conservation units. **Trends In Ecology & Evolution**, [s.l.], v. 27, n. 9, p.489-496, set. 2012. Elsevier BV.

HRBEK, Tomas et al. A New Species of River Dolphin from Brazil or: How Little Do We Know Our Biodiversity. **Plos One**,[s.l.], v. 9, n. 1, e83623, 22 jan. 2014. Public Library of Science (PLoS).

HENRY, P.; RUSSELLO, M. A.. Adaptive divergence along environmental gradients in a climate-change-sensitive mammal.**Ecol Evol**, [s.l.], v. 3, n. 11, p.3906-3917, 16 set. 2013. Wiley-Blackwell.

HOLDEREGGER, Rolf; KAMM, Urs; GUGERLI, Felix. Adaptive vs. neutral genetic diversity: implications for landscape genetics. **Landscape Ecology**, [s.l.], v. 21, n. 6, p.797-807, ago. 2006. Springer Science + Business Media.

JAKOBSSON, M.; ROSENBERG, N. A.. CLUMPP: a cluster matching and permutation program for dealing with label switching and multimodality in analysis of population structure. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 23, n. 14, p.1801-1806, 7 mai. 2007. Oxford University Press (OUP).

JOMBART, T.; AHMED, I.. Adegnet 1.3-1: new tools for the analysis of genome-wide SNP data. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 27, n. 21, p.3070-3071, 16 set. 2011. Oxford University Press (OUP).

JUNK, W. J., BAYLEY, P. B. & SPARKS, R. E..The flood pulse concept in river – floodplain systems. *Special Publication of the Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* **106**, 10–127. 1989.

KAWECKI, Tadeusz J.; EBERT, Dieter. Conceptual issues in local adaptation. **Ecology Letters**, [s.l.], v. 7, n. 12, p.1225-1241, dez. 2004. Wiley-Blackwell.

LAMICHHANEY, S. The genetic basis for adaptation in natural populations. 60f. *Digital Comprehensive Summaries of Uppsala Dissertations from the Faculty of Medicine* 1192. Uppsala: **Acta Universitatis Upsaliensis**. ISBN 978-91-554-9502-2. 2016.

LANDIM, P.M.B., BÚSIO, N.J., WU, F.T. & CASTRO, P.R.M.. Minerais pesados provenientes de areais do leito do rio Amazonas. **Acta Amazônica**. 13: 51-72. 1983.

LATRUBESSE, Edgardo M.; STEVAUX, José Cândido. Características físico-bióticas e problemas ambientais associados à planície aluvial do Rio Araguaia, Brasil Central. **Revista Ung – Geociências**, [ s.l ], v. 5, n. 1, p.65-73, 2006.

EXCOFFIER, L.; H.E. L. LISCHER, 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, 2010.

LISCHER, H. E. L.; EXCOFFIER, L. PGDSpider: an automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.298-299, 21 nov. 2012. Oxford University Press (OUP).

MACHADO, Valéria Nogueira. **Análise da variabilidade genética do curimatã, Prochilodus nigricans (Agassiz, 1829) na calha do rio Amazonas e seus principais tributários**. 2009. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Pesqueiras nos Trópicos, Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2009.

MANTEL, N.. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. **Cancer Res**, 27(2): 209-220.1967.

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

**E AMAZONAS**. 2015. 210 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas – Ufam, Manaus, 2015.

MÉRONA, Bernard de et al. **Os peixes e a pesca no baixo Rio Tocantins: vinte anos depois da UHE Tucuruí**. Brasília: Electrobras Eletronorte, 2010. 209 p. (ISBN 978-85-8777-508-5).

MORTATTI, J.; VICTÓRIA, R. L.; TARDY, Y.. BALANÇO DE ALTERAÇÃO E EROÇÃO QUÍMICA NA BACIA AMAZÔNICA. **Geochimica Brasiliensis**, [s.i], v. 11, n. 1, p.099-111, nov. 1997. ISSN: 2358-2812.

MOTA, Sara Quízia; RUFFINO, Mauro Luis. BIOLOGIA E PESCA DO CURIMATÁ (*Prochilodus nigricans* AGASSIZ, 1829) (PROCHILODONTIDAE) NO MÉDIO AMAZONAS. **Revista Unimar**, Maringá, v. 19, n. 2, p.493-508, fev. 1997. Disponível em: <<http://periodicos.uem.br/ojs/index.php/RevUNIMAR/article/view/4540/3075>>. Acesso em: 23 dez. 2015.

MOUNIC-SILVA, Carlos Eduardo; LEITE, Rosseval Galdino. Influência do rio Negro sobre o status nutricional de juvenis de curimatã *Prochilodus nigricans* (Characiformes; Prochilodontidae) no médio rio Solimões-Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 43, n. 3, p.371-375, set. 2013. FapUNIFESP (SciELO).

ARADIS, E.. Pegas: an R package for population genetics with an integrated-modular approach. **Bioinformatics**, [s.l.], v. 26, n. 3, p.419-420, 14 jan. 2010. Oxford University Press (OUP).

PEARSE, D.E.; ARNDT, A.D.; VALENZUELA, N.; Miller, B.A.; CANTARELLI, V.; SITES Jr, J.W.. Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Mol Ecol*, 15: 985-1006. 2006.

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

PESOA, Na.; SCHULZ, Uh. Diel and seasonal movements of grumatã *Prochilodus lineatus* (Valenciennes 1836) (Characiformes: Prochilodontidae) in the Sinos River, Southern Brazil. **Braz. J. Biol.**, [s.l.], v. 70, n. 4, p.1169-1177, dez. 2010. FapUNIFESP (SciELO).

PETERSON, Brant K. et al. Double Digest RADseq: An Inexpensive Method for De Novo SNP Discovery and Genotyping in Model and Non-Model Species. **Plos One**, [s.l.], v. 7, n. 5, e37135, 31 mai. 2012. Public Library of Science (PLoS)..

PRITCHARD, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P.. Inference of population structure using multilocus genotype data. **Genetics**, 155(2): 945-959. 2000.

PRITCHARD, Jonathan K.; WEN, Xiaoquan; FALUSH, Daniel. **Documentation for structure software: Version 2.3**. 2010. Disponível em: <[http://pritchardlab.stanford.edu/structure\\_software/release\\_versions/v2.3.4/structure\\_doc.pdf](http://pritchardlab.stanford.edu/structure_software/release_versions/v2.3.4/structure_doc.pdf)>. Acesso em: 03 abr. 2016.

RANGEL, Sandra Marcela Hernández. **DINÂMICA E ESTRUTURA POPULACIONAL DO JACARÉ-AÇU (*Melanosuchus niger*) NA AMAZÔNIA**. 2015. 74 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, INPA -instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, 2015.

RIBEIRO, Mauro César Lambert de Brito; PETRERE, Miguel; JURAS, Anastácio Affonso. Ecological integrity and fisheries ecology of the Araguaia—Tocantins River Basin, Brazil. **Regul. Rivers: Res. Mgmt.**, [s.l.], v. 11, n. 3-4, p.325-350, nov. 1995. Wiley-Blackwell.

R CORE TEAM . R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>. 2015.

ROSENBERG, Noah A.. Distruct: a program for the graphical display of population structure. **Molecular Ecology Notes**, [s.l.], v. 4, n. 1, p.137-138, 10 dez. 2003. Wiley-Blackwell

ROSSETTI, Dilce F.; VALERIANO, Márcio M.. Evolution of the lowest amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. **Catena**, [s.l.], v. 70, n. 2, p.253-265, jul. 2007. Elsevier BV .2006.08.009

SAINT-PAUL, U. ; BAYLEY, P.B.. Situação da pesca na Amazônia Central. *Acta Amazônica*. 9(4):109-114.1979.

SANTOS, Geraldo Mendes dos; FERREIRA, Efreim Jorge G.; ZUANON, Jansen A. S.. **Peixes comerciais de Manaus**.Manaus: Isbn 85-7300-211-5, 2006. 144 p.

STALLARD, R. F.; EDMOND, J. M.. Geochemistry of the Amazon: 2. The influence of geology and weathering environment on the dissolved load. **J. Geophys. Res.**, [s.l.], v. 88, n. 14, p.9671-9688, 20 nov. 1983. Wiley-Blackwell.

SHENDURE, Jay; JI, Hanlee. Next-generation DNA sequencing. **Nat Biotechnol**, [s.l.], v. 26, n. 10, p.1135-1145, out. 2008. Nature Publishing Group.

SIOLI, H. General features of liminlogy of Amazônia. **Verh. Internant. Verein. Liminol. BD. XV** . Plön, Germany v.1, p.1053-1058, 1964

SIOLI H.. The Amazon and its main affluents : hydrography, morphology of the river courses, and river types, 127-165. In *The Amazon, Limnology and landscape ecology of a mighty tropical river and its basin*, Sioli H. (ed.), Junk Publ., Dordrecht. 1984.

STOREY, J. D.; TIBSHIRANI, R.. Statistical significance for genomewide studies. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 100, n. 16, p.9440-9445, 25 jul. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences.

TEMPLETON, Alan R.. **Genética de Populações e Teoria Microevolutiva: Seleção Natural e Adaptação**. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética, 2011. 705 p. (IBSN 978-85-89265-14-0).

VAL, Adalberto Luis; GOMES, Katia Regina Maruyama; ALMEIDA-VAL, Vera Maria Fonseca de. Rapid regulation of blood parameters under acute hypoxia in the Amazonian

fish *Prochilodus nigricans*. **Comparative Biochemistry And Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology**, [s.l.], v. 184, p.125-131, jun. 2015. Elsevier BV.

VASEMAGI A, PRIMMER CR.. Challenges for identifying functionally importante genetic variation: the promise of combining complementary research strategies. **Molecular Ecology**, **14**, 3623-3642. 2005.

VARUZZA, Leonardo. **Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração** Versão **2.0.1**. 2013. Disponível em: <[http://lvaruzza.com/files/apostila\\_bioinfo\\_2.0.1.pdf](http://lvaruzza.com/files/apostila_bioinfo_2.0.1.pdf)>. Acesso em: 19 maio 2016.

VIGNAL, Alain et al. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genetics Selection Evolution**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.275-305, mai. 2002. Springer Science + Business Media.

WADE, MICHAEL. Evolutionary Genetics", *The Stanford Encyclopedia of Philosophy* (Fall 2008 Edition), Edward N. Zalta (ed.), URL = <<http://plato.stanford.edu/archives/fall2008/entries/evolutionary-genetics/>>. 2008.

WHITEHEAD, A.; CRAWFORD, D. L.. Neutral and adaptive variation in gene expression. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 103, n. 14, p.5425-5430, 27 mar. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0507648103>