

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

DIVERSIDADE GENÉTICA DE BOTOS ISOLADOS APÓS MAIS DE TRÊS  
DÉCADAS DA CONSTRUÇÃO DA USINA HIDRELÉTRICA DE BALBINA

MARIA CRISTHIANE DE ARAÚJO ZURRA

Manaus – AM  
Outubro – 2023

MARIA CRISTHIANE DE ARAÚJO ZURRA

DIVERSIDADE GENÉTICA DE BOTOS ISOLADOS APÓS MAIS DE TRÊS DÉCADAS DA CONSTRUÇÃO DA USINA HIDRELÉTRICA DE BALBINA

ORIENTADORA: Dra. WALESKA GRAVENA  
COORIENTADORA: PhD. VERA MARIA FERREIRA DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG GCBEv) do Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia (INPA) como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

Manaus – AM  
Outubro – 2023

## Catalogação na Publicação (CIP-Brasil)

---

Z96d Zurra, Cristhiane

Diversidade genética de botos isolados após mais de três décadas da construção da usina hidrelétrica de Balbina / Maria Cristhiane de Araujo Zurra; orientadora Waleska Gravena; coorientadora Vera Maria Ferreira da Silva. - Manaus: [s.l.], 2023.

639 KB

46p. : il. color.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva) - Coordenação do Programa de Pós-Graduação, INPA, 2023.

1. Genética populacional. 2. Impacto ambiental. 3. DNA mitocondrial. I. Gravena, Waleska. II. Silva, Vera Maria Ferreira da. III. Título

CDD 599.5 811 3

---

### Sinopse

Foram utilizados dados moleculares do DNA mitocondrial e marcadores microssatélites para verificar a diversidade genética de *Inia geoffrensis* do reservatório da Usina Hidrelétrica de Balbina (UHE Balbina). Análises de estruturação, caracterização e variabilidade genética foram avaliados neste estudo.

Palavras-chave: golfinhos de rio, barragens, marcadores mitocondriais, marcadores microssatélites.

## **Dedicatória**

Este trabalho é dedicado em memória ao meu pai (Walter Zurra) e ao meu irmão (Izidoro Zurra), que assim como o mar, sempre me fizeram desejar mergulhos profundos.

A realização deste estudo foi possível devido:

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) e ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva (PPG GCBEv).

Ao Laboratório Mamíferos Aquáticos (LMA) do INPA.

Ao Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do INPA.

Ao Laboratório de Ecofisiologia e Evolução Molecular (LEEM) do INPA.

Aos financiamentos fornecidos pelo projeto da agência à CAPES pela bolsa de Mestrado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) - Programa Institucional de Apoio à Pós-Graduação Stricto Sensu (FAPEAM-POSGRAD).

## **Agradecimentos**

À Deus pelo dom da vida e por ter me dado forças para continuar mediante as perdas e dificuldades que surgiram no decorrer do mestrado.

À minha orientadora Dra. Waleska, pela amizade/irmandade, pelo conhecimento compartilhado, investimento financeiro nas etapas laboratoriais, apoio, paciência e principalmente pela sua humanidade em ajudar, compreender as minhas limitações e por sua infinita compreensão.

À minha coorientadora PhD. Vera Maria Ferreira Da Silva, pelo apoio científico, disponibilidade das amostras, disponibilidade do laboratório para as análises e apoio institucional.

À Karoline Freitas pela amizade/irmandade, apoio, parceria e ajudas laboratoriais.

À Msc. Israela Souza por todo ensinamento das técnicas laboratoriais, pelo apoio e amizade que se formou ao decorrer do mestrado.

À Msc. Ellen Garcia pela disponibilidade das amostras do Rio Negro que foram essenciais para os resultados alcançados.

À minha mãe (Ilza Zurra) e minha irmã (Shirlei Zurra) pelo apoio, investimento, compreensão e força quando eu mais precisei.

Aos amigos (Adriana e Renato) e colegas (Gabriel, Jerffeson e Ítalo) de turma e parceiros de trabalho nos laboratórios.

Ao Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA pelo incentivo e investimento no ensino.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva - PPG GCBEv; bem como a coordenação, secretaria e grupo de professores.

Aos laboratórios: LMA, LTBM (em especial a Aline, Msc. Juliana, Dra. Kyara e Dra. Gisele, pela ajuda e troca de conhecimento das técnicas laboratoriais) e LEEM pela disponibilidade de materiais, equipamentos e apoio técnico.

## **EPIGRAFE**

“Entrei num mar inédito, fui ao fundo para que pudesse aguentar a trolha que se anunciava. Ondas maiores vieram, passei pela primeira sem sacode. Um homem surge ao meu lado e, enquanto uma mais gigante ainda se aproxima, diz: É só mergulhar fundo mulher!”

(LETRUX, 2020)

## Resumo

O boto é uma espécie endêmica dos rios da Amazônia, e entre as várias ameaças enfrentadas por esta espécie na região Amazônica, a fragmentação e isolamento de populações causado pelas construções de hidrelétricas são as mais relevantes. Só na Amazônia brasileira, são 74 barragens em operação, 31 em construção e 91 planejadas. Das barragens existentes, 13 isolaram grupos de golfinhos dentro de seus reservatórios, e uma dessas é a hidrelétrica de Balbina que foi uma das primeiras barragens construídas na Amazônia brasileira, concluída em 1989 no rio Uatumã e desde então é considerada o maior desastre ecológico. Por estas características, esta represa é um laboratório natural perfeito para estudar os efeitos de 38 anos de isolamento de uma população de botos, principalmente no que diz respeito à diversidade genética dessa população. Mediante a este fato, este projeto teve como objetivo verificar a diversidade genética da população isolada de boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) após mais de três décadas da construção da Usina Hidrelétrica de Balbina (UHE Balbina), e estimar quais os impactos futuros que podem ocorrer nesta população. Foram analisadas amostras de 33 indivíduos coletados em um único ponto do reservatório da UHE Balbina (BA) e 35 amostras de um estudo prévio realizado no Rio Negro (RN), totalizando 68 amostras. As análises incluíram 387 pb da região de controle do mtDNA (D-loop). Identificamos 16 haplótipos de região controle em toda população analisada, desses, dois haplótipos são compartilhados entre as localidades e representam 72% da diversidade da população total. No entanto, Balbina apresentou valores menores dos parâmetros genéticos de número de haplótipos ( $H = 5$ ) e diversidade haplotípica ( $Hd = 0,5720$ ) em comparação ao Rio Negro ( $H = 13$ ,  $Hd = 0,8168$ ). A diversidade haplotípica total das localidades foi moderada-alta ( $Hd = 0,7436$ ). A diferenciação das duas localidades resultou num valor de  $F_{ST} = 0,14584$ , considerado significativo. Os testes de Neutralidade não foram significantes ( $P > 0,05$ ) para os dois grupos amostrados (BA Tajima's  $D = -0.79101$ , RN Tajima's  $D = -0.40113$ ), indicando que o polimorfismo genético nesses locais está de acordo com o modelo neutro de mutação.

Palavras-chave: *Inia geoffrensis*, impacto ambiental, genética populacional, DNA mitocondrial, microsatélite.





## Abstract

The Amazon River Dolphin is an endemic species of Amazon rivers, and among the various threats faced by this species in the Amazon region, the fragmentation and isolation of populations caused by the construction of hydroelectric plants are the most relevant. In the Brazilian Amazon alone, there are 74 dams in operation, 31 under construction and 91 planned. Of the existing dams, 13 have isolated groups of dolphins within their reservoirs, and one of these is the Balbina hydroelectric powerplant, which was one of the first dams built in the Brazilian Amazon, completed in 1989 on the Uatumã River and since then has been considered the biggest ecological disaster. Due to these characteristics, this dam is a perfect natural laboratory to study the effects of 38 years of isolation of a population of dolphins, especially with regard to the genetic diversity of that population. Given this fact, this project aimed to verify the genetic diversity of the isolated population of the Amazon River Dolphin (*Inia geoffrensis*) after more than three decades of the construction of the Balbina Hydroelectric Powerplant (UHE Balbina), and to estimate what future impacts may occur on this population. Samples from 33 individuals collected at a single point in the reservoir of the UHE Balbina and 35 samples from a previous study carried out on the Negro River were analyzed, totaling 68 samples. Analyzes included 387 bp of the mtDNA control region (D-loop). We identified 16 control region haplotypes in the entire population analyzed. Of these, two haplotypes are shared between locations and represent 72% of the diversity of the total population. However, Balbina presented lower values of the genetic parameters of number of haplotypes ( $H = 5$ ) and haplotypic diversity ( $H_d = 0.5720$ ) compared to Rio Negro ( $H = 13$ ,  $H_d = 0.8168$ ). The total haplotype diversity of the localities was moderate-high ( $H_d = 0.7436$ ). Differentiating the two locations resulted in a  $F_{ST}$  value = 0.14584, considered significant. Neutrality tests were not significant ( $P > 0.05$ ) for the two sampled groups (BA Tajima's  $D = -0.79101$ , RN Tajima's  $D = -0.40113$ ), indicating that the genetic polymorphism at these sites is in accordance with the neutral model of mutation.

Keywords: *Inia geoffrensis*, environmental impact, population genetics, mitochondrial DNA, microsatellite.

## Sumário

INTRODUÇÃO	1
OBJETIVOS	5
Geral	5
Específicos	5
MATERIAL E MÉTODOS	6
Área de coleta.....	6
Coleta de material genético.....	6
Extração de DNA.....	7
DNA mitocondrial.....	7
Marcadores microssatélites.....	9
Análises dos dados genéticos utilizando marcador mitocondrial.....	10
Análises dos dados genéticos utilizando marcador microssatélite.....	11
RESULTADOS E DISCUSSÃO	13
Estudo genético populacional por análise de marcador mitocondrial (D-Loop).....	13
Estrutura populacional.....	13
Análise de polimorfismo molecular.....	16
Variância Molecular entre os botos capturados em Balbina e Rio Negro.....	25
Testes de neutralidade.....	26
Estudo genético populacional por análise de Marcadores microssatélites.....	27
Ameaças, diversidade genética e possíveis futuros impactos derivados do isolamento por barragem..	29
CONCLUSÃO	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
APÊNDICE.....	41

## INTRODUÇÃO

Diante das mudanças ambientais que vem ocorrendo aos longos das últimas décadas, a sobrevivência das populações naturais depende de adaptações diretamente relacionadas à diversidade genética (Frankham et al. 2008). Esta faz parte da variação genética que causa a diferenciação fenotípica das populações individuais, o que pode garantir que a espécie tenha grande potencial adaptativo e conseqüentemente, poder lidar com os efeitos gerados pelas estocasticidades ambientais, como competição, predação, patologia e fatores abióticos (Amos e Harwood 1998).

Um dos fatores ambientais que pode influenciar na diminuição da variação genética são as alterações dos habitats naturais. Essas alterações podem levar à perda e fragmentação do habitat, levando a uma diminuição da diversidade genética, mudando a forma como as espécies se reproduzem e aumentando as diferenças genéticas entre as populações remanescentes (Lowe et al. 2005; Aguilar et al. 2008).

Segundo Olson et al. (2001), a fragmentação dos ecossistemas provoca uma descontinuidade da distribuição das espécies, o que a nível macro, pode levar a perda da biodiversidade e mudanças na distribuição e abundância das espécies, associadas aos padrões de dispersão e migração. Neste sentido, é fundamental avaliar se os padrões da diversidade genética se devem às características naturais da espécie, ou se são consequência de modificações ambientais produzidas por ações antrópicas, fragmentando o hábitat (Frankham et al. 2008), como por exemplo, a construção de hidrelétricas.

Na Amazônia, observa-se que além do desmatamento, os grandes projetos econômicos impostos, como a construção de hidrelétricas ou pequenas barragens, têm corroborado para a destruição gradativa de sua imensa bacia hidrográfica, devido à interrupção do fluxo natural de seus rios, devastando os ecossistemas aquáticos e prejudicando as comunidades que dependem deles para sobreviver (Rodrigues 2016). Além disso, ainda não se sabe qual será o impacto ecológico da construção das 91 barragens previstas até 2050 (ANEEL 2020), mas já é previsto que a implantação de todas as barragens irá inundar 10 milhões de hectares da Amazônia, ou cerca de 3% da porção brasileira da floresta amazônica (Fearnside 2015). E apesar do aumento do uso de outras fontes que geram energia, como o caso da energia solar fotovoltaica e da energia eólica que cresceram 79,8% e 12,9% em relação à produção energética de 2021, a geração hidrelétrica continua crescendo (17,7%) (Ben 2023).

Mediante a este fato, durante muito tempo falou-se que a geração de energia hidrelétrica não causava impactos ao meio ambiente, no entanto muitas pesquisas demonstraram que este tipo de geração de energia causa sérios impactos desde a sua construção até o seu funcionamento (Inatomi e Udaeta 2011). A formação de um reservatório, proveniente do represamento de um rio para geração de energia hidrelétrica, tem impactos sobre a fauna nativa, incluindo perda de habitat e mudanças ecológicas entre comunidades silvestres (Benchimol e Peres 2015a). Além disso, o enchimento do reservatório causa mudanças de sistema lótico para lântico, e afetam diretamente animais de hábitos semi-aquáticos e aquáticos, como alguns representantes de invertebrados, répteis, aves, mamíferos e peixes (Brandão e Araújo 2008). Mesmo nas novas hidrelétricas, chamadas de “fio d’água” por não criarem um grande reservatório, há mudança, e apesar de não ser um grande reservatório, há supressão da floresta de borda e enchimento de uma área no entorno do rio principal, e onde antes era uma região de floresta de repente se transforma em lago (Benchimol e Peres 2015b).

Um dos efeitos da construção de barragens hidrelétricas é a formação de uma barreira física aos movimentos de espécies aquáticas (Dugan et al. 2010). Das barragens construídas no Brasil até 2014, 13 isolaram grupos de golfinhos dentro de seus reservatórios (Araújo e Wang 2014), e não existem estudos sobre os efeitos desse isolamento nestas populações. A mudança severa do ecossistema associada à construção de represas hidrelétricas e outros tipos de barragens foram a principal fonte de ameaça para golfinhos de rios asiáticos (Reeves e Leatherwood 2004; Smith e Reeves 2012).

Essa fragmentação acentuada é enfrentada pelos golfinhos do rio Indus (*Platanista minor*) (Khan e Naizi 1989; Braulik et al. 2021), cuja população original está dividida em oito grupos em um rio bloqueado por oito barragens (Kreb et al. 2010; Braulik et al. 2012; Braulik et al. 2014). A transformação do habitat, o esgotamento dos alimentos e o isolamento genético causaram declínios acentuados na densidade desta espécie e estão comprometendo a sua sobrevivência (Huang et al. 2012; Braulik et al. 2014). Barragens e outras obras que impedem a conectividade seletiva em sistemas fluviais tiveram grande impacto sobre os golfinhos de rio de outra bacia, o susu do rio Ganges (*Platanista gangetica*) (Shrestha 1989; Braulik et al. 2021). Ambas as espécies são classificadas como em perigo (EN) pela União Internacional para a Conservação da Natureza - IUCN (Smith et al. 2012), principalmente como resultado de um declínio de mais de 50% no tamanho das populações nas últimas três gerações, ocasionado principalmente devido à diminuição na área de ocupação resultante da construção

de barragem. Outro exemplo, ainda mais preocupante, foi a extinção do baiji (*Lipotes vexillifer*), que ocorria no Rio Yangtze (Turvey et al. 2007), causados por extensas modificações ao longo do rio, incluindo construção de barragens, tráfego de barcos não regulamentado, poluição sonora e práticas de pesca (Peixun e Yuanyu 1989). Estes são alguns exemplos dos efeitos negativos de médio a longo prazo das atividades humanas sobre a biodiversidade, e um alerta sobre a magnitude dos problemas envolvendo barragens e espécies amplamente distribuídas (Paschoalini et al. 2020).

Dentre as 13 barragens descritas em Araújo e Wang (2014), que isolaram populações de golfinhos na Amazônia, uma delas foi a Usina Hidrelétrica (UHE) de Balbina. A barragem construída em 1985 no Rio Uatumã provocando morte de peixes e fez surgir um enorme lago, com quase 240 mil hectares. As árvores submersas ainda apodrecem sob as águas, emitindo grandes quantidades de gases como dióxido de carbono, óxido nitroso e principalmente o metano, portanto, contribuindo para o aquecimento global (Fearnside 2015). Devido a esse fenômeno, Balbina contraria a tese de que hidrelétricas significam necessariamente energia limpa e demonstra que hidrelétricas podem ser tão poluidoras quanto geradores a óleo (Fonseca 2018).

O barramento alterou substancialmente a estrutura das assembleias de peixes a montante da barragem, com relatos de decréscimo considerável na população de espécies migradoras, como o Pacu (*Myloplus rubripinnis*) e a Sardinha (*Hemiodus unimaculatus*) (Barroco 2019). Ao mesmo tempo, outros estudos destacaram aumentos na abundância de espécies que não necessitam realizar migrações para completar seu ciclo de vida e que foram beneficiadas pela mudança no ambiente, como tucunarés (*Cichla* spp.) e a piranha preta (*Serrasalmus rhombeus*), que são considerados predadores de topo de cadeia (Santos e Santos 2005).

Conforme citado acima, observa-se que no lago da UHE Balbina já foram realizadas várias pesquisas com diferentes organismos, para avaliar os impactos que a barragem trouxe para a biodiversidade, além de outros, por exemplo, como o nível de metilmercúrio em plâncton e peixes (Kasper et al. 2014), a extinção local de vertebrados terrestres (Benchimol e Peres 2015a) e o uso do lago, hábitos alimentares e dormitórios de aranhas (Rosas et al. 2007; Cabral et al. 2010; Rosas et al. 2015).

O primeiro estudo realizado com a população de botos (*Inia geoffrensis*), estimou uma população de cerca de 1700 animais vivendo no reservatório da UHE de Balbina (Andrade

2020), no entanto, pouco ainda se sabe sobre ela. Após 38 anos de isolamento a partir da construção do reservatório da UHE Balbina (a barragem foi fechada em 01 de outubro de 1989), nada se sabe sobre a diversidade genética dessa população, tornando este reservatório um laboratório natural perfeito para estudar os efeitos do isolamento destes botos, assim como descobrir o nível de endogamia dessa população. Mediante a este fato, nosso estudo representa, portanto, a primeira avaliação genética para compreender os efeitos de longo prazo de barragens sob a espécie. Nossas descobertas ajudarão a esclarecer o impacto sobre o isolamento destes grandes mamíferos aquáticos exclusivos da bacia amazônica. Esta informação é muito importante para decisões futuras sobre outras populações de golfinhos de rio, em áreas de potencial hidrelétrico e áreas onde essas barragens já foram instaladas.

## **OBJETIVOS**

### **Objetivo geral**

Verificar a diversidade genética da população isolada de boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) após mais de três décadas da construção da Usina Hidrelétrica de Balbina, e estimar quais os impactos futuros que podem ocorrer nesta população.

### **Objetivos específicos**

- Testar se existe estruturação genética entre os botos capturados no reservatório de Balbina e em outras localidades da Amazônia central;
- Medir os níveis de variabilidade genética existentes nos botos de Balbina, com base em marcadores tanto de regiões mitocondriais quanto nucleares;
- Estimar quais são os possíveis impactos futuros provenientes do isolamento desta população.



## MATERIAL E MÉTODOS

### Área de coleta

As coletas das amostras de boto utilizadas neste trabalho foram realizadas em um único ponto do reservatório da Usina Hidrelétrica de Balbina (UHE Balbina), localizada no rio Uatumã, zona rural do município de Presidente Figueiredo, Estado do Amazonas, à 177 quilômetros da cidade de Manaus, na Amazônia Central (Ponto 8 na Figura 1). Para a comparação de dados foram utilizadas amostras do projeto de pesquisa de Garcia (2021) coletas em vários pontos (flutuantes) da região do baixo rio Negro representadas nos pontos 1-7 da figura 1.

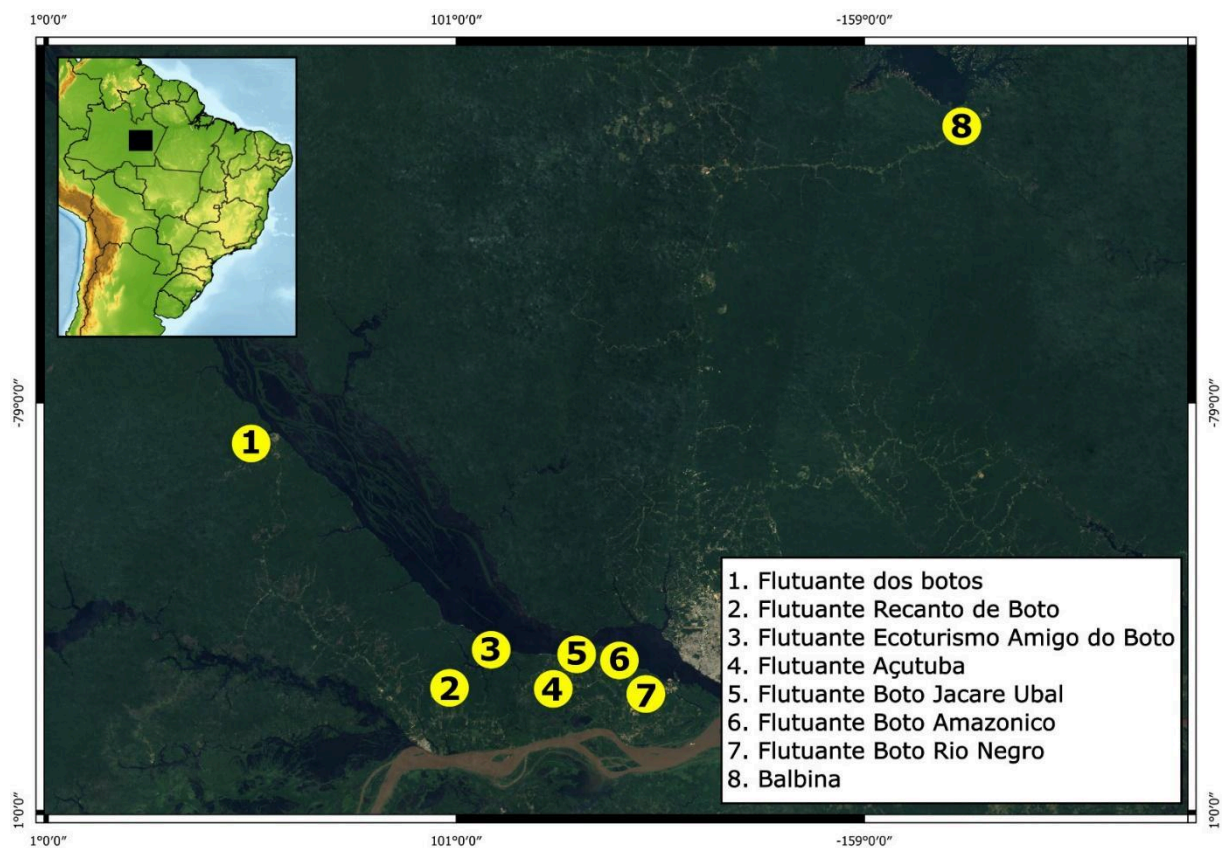


Figura 1 – Área de estudo: Mapa do Brasil com destaque para a localização dos pontos amostrais; Pontos amostrais localizados na região do baixo Rio Negro: (1) Flutuante dos botos, (2) Flutuante Recanto de Boto, (3) Flutuante Ecoturismo Amigo do Boto, (4) Flutuante Açutuba, (5) Flutuante Boto Jacaré Ubal, (6) Flutuante Boto Amazonico, (7) Flutuante Boto Rio Negro; e ponto onde foi realizada captura de botos (8) Reservatório da Usina Hidrelétrica de Balbina (UHE Balbina).

### Coleta de material genético

A coleta de tecido para a análise genética foi realizada conforme descrito por da Silva e Martin (2000), com algumas modificações. Foram realizadas duas capturas na qual

obtivemos o total de 33 amostras de tecido epitelial armazenadas em criotubos contendo álcool 100%. Os materiais biológicos coletados foram depositados na Coleção de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA). No processo de manejo dos animais, que durou cerca de 10 minutos, os golfinhos foram monitorados constantemente (caso houvesse sinais de estresse ou nenhum sinal respiratório). A biópsia foi realizada com auxílio de um bisturi para retirada do tecido epitelial-caudal, que foram utilizadas na análise genética deste estudo. As coletas das amostras de animais vivos, foram realizadas com a aprovação do Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade – SISBio/ICMBio, nº 76904-3 e pela Comissão de Ética no Uso de Animais - CEUA-INPA, nº036/2021, SEI 01280.001622/2021-51.

Para comparação dos dados da população de botos restrita ao reservatório, foram utilizadas 35 amostras de um estudo prévio realizado no Rio Negro (Garcia 2021) (Pontos 1-7 na figura 1), e fazem parte da coleção de Mamíferos Aquáticos do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA.

### **Extração de DNA**

Para a extração de DNA total das 68 amostras foi utilizado o protocolo descrito por Doyle e Doyle (1987). As amostras de tecido epitelial, foram cortadas em pedaços pequenos, sendo feita a digestão e isolamento do DNA com 500µl de tampão CTAB 2% e 10 µl de Proteinase K em banho-maria a 55°C em *overnight*. Sucessivamente foram realizadas as lavagens com clorofórmio-álcool isoamílico (24:1), isopropanol refrigerado e álcool 70%. E por fim, foram adicionadas 50 µl de água *Milli-q*, sendo armazenadas no freezer para posterior utilização.

A concentração e qualidade do DNA das amostras extraídas foram estimadas de duas formas: a) em gel de agarose a 1,0% e, b) quantificação no espectrofotômetro NanoDrop.

### **DNA mitocondrial**

Para amplificação da região controle (D-loop) do DNA mitocondrial foram utilizados os *primers* HDH6 e LTRO (Banguera-Hinestroza et al. 2002). A reação de amplificação foi realizada com os seguintes componentes: 5,46 µL de H<sub>2</sub>O; 1,5 µL de cloreto de magnésio 25mM; 1,25 de tampão 10X; 1,5 µL de dNTPs 2,5 mM; 1,0 µL do *primer* (F) a 2 mM; 1,0 µL

do *primer* (R) a 2 mM; 0,3  $\mu$ L de DNA Taq polimerase à 5 U/ $\mu$ L e 1,0  $\mu$ L do DNA genômico de cada indivíduo. O programa de amplificação teve os seguintes perfis de temperatura: 92°C por um minuto para a desnaturação (dissociação) das fitas complementares do DNA; seguidos por 35 ciclos de 92°C (1 minuto), temperatura de anelamento de 55°C (35 segundos), 72°C (1 minuto e meio); e uma extensão final à 72°C por 5 minutos para a extensão dos fragmentos amplificados de DNA.

Posteriormente, os fragmentos amplificados foram purificados, o que consiste na eliminação dos vários tipos de produtos não incorporados na reação de amplificação como *primers*, dNTPs, sais e outras moléculas de baixo peso molecular. Nessa etapa do processo foram utilizadas as enzimas Exonuclease e Fosfatase alcalina (EXOSAP). A reação foi realizada adicionando na PCR-D-loop, 0,25  $\mu$ L de EXO; 0,5 SAP e 1,5 de Glicerol 50%, que foram incubadas a 37°C por 30 minutos, e 80°C por 15 minutos. Após o processo o DNA está pronto para ser utilizado na reação de sequência.

Na reação de sequência foi utilizado o DNA já purificado e o Kit de reação Big Dye Terminator (*Applied Biosystems*). A reação de sequência foi realizada também utilizando a técnica de PCR na qual o volume final de cada reação foi obtido com os seguintes componentes: 4,25  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O; 1,45 de tampão; 2  $\mu$ L do *primer* L ou H utilizado anteriormente na amplificação do fragmento; 0,3  $\mu$ L da solução do Kit de reação Big Dye Terminator, totalizando 8  $\mu$ L para cada amostra de 2  $\mu$ L de DNA amplificado.

A reação foi preparada em placas de sequenciamento com 96 poços, em seguida levada ao termociclador por 25 ciclos com o seguinte perfil de temperatura: 96° C por 1 minuto afim de desnaturar as fitas complementares; seguidos por 15 ciclos de 96°C por 10 segundos; temperatura de anelamento do *primer* a 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e 15 segundos; uma extensão inicial de 5 ciclos de 96°C por 10 segundos; 50°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto e 30 segundos; seguido de uma extensão final de 5 ciclos de 96°C por 10 segundos; 50°C por 15 segundos e 60°C por 2 minuto para a extensão da região a ser sequenciada.

Após o término da reação de sequenciamento, o produto foi precipitado de acordo com o seguinte protocolo: foram adicionados à placa com o material amplificado 2,5 $\mu$ L de EDTA 125 mM e 30,0  $\mu$ L de etanol absoluto (100% de pureza), misturando com o vórtex e centrifugado por alguns segundos (*spin down*). Em seguida foi feita a incubação a temperatura ambiente por 15 minutos e em seguida foi realizada a centrifugação refrigerada por 30

minutos a 2.000 rcf a 4°C. Posteriormente foi eliminado o álcool por inversão da placa por 1 minuto a 140 rcf. Em seguida foi acrescentado 30 µL de etanol 70%, sendo centrifugado por 15 minutos a 1650 rcf a 4°C e eliminado o álcool por inversão da placa por 1 minuto a 140 rcf; em seguida a placa foi submetida a secagem ao abrigo da luz por 1 hora a temperatura ambiente ou 15 minutos em estufa. Após, as amostras foram ressuspensas em 10 µL de formamida (*HiDi*), vortexando levemente. Antes de injetar no sequenciador foi realizada uma desnaturação em termociclador por 2 minutos a 95°C.

As sequências geradas pelo sequenciador automático ABI 3130, foram importadas para o *software* Geneious 5.6.3 (Drummond et al. 2012), para averiguação da sua integridade. Uma vez compiladas, as sequências foram alinhadas através do algoritmo *Muscle*. Posteriormente fez-se a conferência e edição para a obtenção das sequências individuais e finais.

### **Análises dos dados genéticos por marcador mitocondrial**

Para confirmar se entre as nossas amostras há diferentes grupos biológicos (*clusters*) foi realizada análise Bayesiana no software BAPS 6.0 (Corander et al. 2013). Diferentes valores de K foram testados com 10 réplicas, para detectar a partição mais provável, sendo escolhido o valor de K com maior probabilidade posterior.

Para a caracterização da composição genética das populações analisadas, foram calculados os índices de diversidade genética (número de sítios polimórficos (*s*), número de haplótipos (*H*), diversidade haplotípica (*Hd*) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ )) no software ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier e Lischer 2010).

O grau de estruturação genética das populações de botos fora inferido no software ARLEQUIN 3.5.2.2 (Excoffier e Lischer 2010) pela (1) análise hierárquica da variância molecular (AMOVA) (Excoffier et al. 1992), que calcula a distribuição da variabilidade genética entre grupos definidos com base nos valores de  $\Phi_{ST}$  (Weir e Cockerham, 1984), análogo ao  $F_{ST}$  de Wright (1965); e pelos índices de diferenciação pareados de  $\Phi_{ST}$  (Weir e Cockerham 1984).

Também fora construída uma rede de haplótipos pelo método de inferência *Median-joining network* (MJN) (Bandelt et al. 1999) no software PopART (*Population Analysis with Reticulate Trees*) (Leigh e Bryant 2015) para identificar a distribuição geográfica dos haplótipos.

Também foram utilizados os testes  $D$  de Tajima (Tajima 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu 1997), para testar se as populações analisadas estão sob equilíbrio mutação – deriva genética. O teste  $D$  se baseia no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (Kimura 1969), levando em consideração a razão do número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas, estimado pela comparação em pares de bases (Tajima 1989). O teste  $F_s$  baseia-se na probabilidade de observar em uma amostragem ao acaso um número de alelos similar ou menor do que o número observado de diferenças par-a-par. Este teste é mais sensível para detectar expansão populacional (Fu 1997). As análises foram implementadas no programa ARLEQUIN3.5.2.2 (Excoffier e Lischer 2010).

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Estudo genético populacional por análise de marcador mitocondrial (D-Loop)**

Da região controle do DNA mitocondrial foram sequenciadas 68 amostras viáveis para as análises, com um fragmento de 387 pares de base (pb) cada. Destas, 33 representam a localidade do reservatório de Balbina (BA) e 35 as localidades do Rio Negro (RN) (Tabela 2).

Segundo Avise et al. (1987); Zhang et al. (1993); Petersen (2011) nos animais, o mtDNA é uma molécula circular com milhares de cópias por célula. É considerado DNA não recombinante porque é simplesmente transmitido (da mãe) e normalmente possui um alto polimorfismo intraespecífico na região controle (D-loop), e essas propriedades o tornam amplamente utilizado em estudos genéticos em populações (Brown 1985). A região controle do mtDNA (D-loop) possui informações genéticas que permitem inferir relações entre táxons próximos e a história de populações através de estudos de fluxo gênico, especiação e da estrutura de populações (Avise 1994), resultantes de alta variabilidade de nucleotídeos devido a altas taxas de substituição de bases (Arias et al. 2003; Moritz 1994).

Ao comparar indivíduos de mesma origem materna (Jarreta 1999) podem ser observados a partir da utilização deste indicador uma ou mais diferenças na sequência de nucleotídeos das regiões hipervariáveis do mtDNA (polimorfismos do DNA) (Upholt e Dawid 1977). Devido a todos estes fatores, a taxa de evolução do DNA mitocondrial é 5 a 10 vezes superior à do DNA nuclear, tornando esta região altamente variável entre indivíduos e amplamente utilizada em estudos populacionais. Além disso, o mtDNA representa um quarto

do tamanho real populacional efetivo do DNA nuclear (diplóide), o que o torna mais sensível a eventos demográficos, como o declínio populacional (gargalo de garrafa).

### **Estrutura populacional**

Na análise Bayesiana implementada pelo BAPS, os 68 indivíduos amostrados foram separados em *clusters* de acordo com o número de grupos biológicos encontrado. Foram identificados dois grupos biológicos, o vermelho e o verde (Figura 2). A localidade do Rio Negro é a única que possui os dois grupos biológicos (*clusters*) (Figura 2). Como pode-se observar, os *clusters* não estão restritos às localidades, mostrando que não há estruturação genética entre elas, o que também é comprovado com a análise do índice  $F_{ST}$ . Por isso, podemos considerar tanto Balbina quanto o Rio Negro como parte de uma única população, com diferenças haplotípicas.

Embora observado que a população de Balbina e do Rio Negro não estejam estruturadas, estas apresentam conectividade genética entre elas. Isso se dar segundo Baldisseri (2005) pelo fato da nascente do rio Uatumã ficar na divisa dos estados do Amapá e Amazonas, e seu estuário ficar de encontro com o rio Amazonas. O que nos motivou a escolher Rio Negro como população para comparação devido ser a mais próxima que temos de Balbina, logo esta seria a mais parecida e a que teria teoricamente mais número de migrantes.

Esta conectividade também foi relatada nos estudos de Garcia (2021) em suas análises de conexões genéticas das populações de *Inia*, na qual obteve a mesma padronização encontrada nas análises deste projeto com diferença apenas nos clusters do Rio Negro que em seu estudo foram relatados 5 clusters (Figura 3) para as mesmas localidades utilizadas como população comparativa deste estudo. Essa diferença de clusters da população do Rio Negro de Garcia (2021) comparada com as obtidas neste estudo se dar devido as escolhas aleatórias das amostras, o que pode ter ocorrido a exclusão das amostras que relatam os grupos encontrados por ela. Oliveira et al. (2018) em seu estudo de populações de *Brycon amazonicus* também observou a existência de vários grupos reprodutivos entre o Rio Uatumã, em Balbina e ao longo do eixo Solimões-Amazônia.

Neste contexto, estudos de conectividade populacional apresentam-se como ferramenta úteis para investigação da variabilidade e do fluxo gênico, permitindo uma

percepção da história demográfica das populações, pressões seletivas agindo na variação genética e processos mutacionais que geram diversidade (Freeland 2005). Tais fenômenos vêm tendo um papel crucial no desenvolvimento de estratégias de conservação, principalmente em espécies altamente exploradas e ameaçadas de extinção, já que nessas espécies a pressão seletiva e a destruição dos habitats essenciais para o ciclo de vida, podem criar isolamento genético entre as populações (Tak-Chuen e Ferreira 2006).



Figura 2 - Estrutura populacional de *Inia geoffrensis* inferidas mediante a análise bayesiana (BAPS). As localidades analisadas estão separadas pela barra preta, sendo grupo (A) baseado em 33 sequências de Balbina; e o grupo (B) nas 35 sequências do Rio Negro.

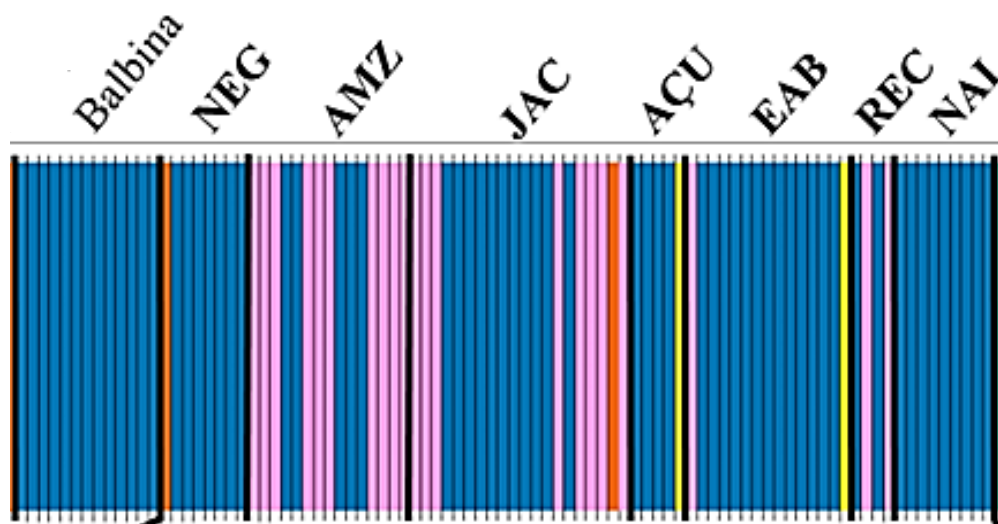


Figura 3 – Análise Bayesiana da estrutura populacional da região controle do DNA mitocondrial por Garcia (2020). População de Balbina e do baixo Rio Negro (77 sequências). Cada coluna representa um indivíduo e cada cor um cluster proposto. NEG = Flutuante Boto Rio Negro, AMZ = Flutuante Boto Amazônico, JAC = Flutuante Boto Jacaré Ubal, AÇU = Flutuante Açutuba, EAB = Flutuante Ecoturístico Amigo do Boto-vermelho, REC = Flutuante Recanto do Boto, NAI = Flutuante dos Botos.

Como citado acima, nota-se que todos os indivíduos fazem parte da mesma população apesar de existir essa diferenciação no rio Negro, que deve ser devido aos haplótipos exclusivos (Tabela 2). Apesar dessa análise ter encontrado dois grupos biológicos, pode-se notar que eles não estão estruturados entre as localidades e que todos fazem parte de uma mesma população. Mas como queremos caracterizar os indivíduos de Balbina, iremos continuar as análises de acordo com as localidades onde foram coletados os indivíduos.

### **Análise de polimorfismo molecular**

A diferenciação entre grupos de indivíduos é um tópico fundamental em genética populacional. Nesse sentido, o uso de múltiplos marcadores moleculares pode fornecer informações valiosas sobre os processos que moldam a estrutura populacional de uma espécie (Gariboldi 2016). Conforme observado, por não haver estruturação entre as localidades e por fazerem parte da mesma população, foram realizadas análises de polimorfismo molecular de forma individual (por localidade) e coletiva (número total amostrado) (Tabela 2).

Os resultados mostram que Balbina, apresenta valores menores dos parâmetros genéticos de número de haplótipos ( $H = 5$ ) e diversidade haplotípica ( $H_d = 0,5720$ ) em comparação ao Rio Negro ( $H = 13$ ,  $H_d = 0,8168$ ) (Tabela 2). A diversidade haplotípica total das localidades foi moderada-alta ( $H_d = 0,7436$ ), enquanto a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) por localidade foi baixa para BA ( $\pi = 0,001742 \pm 0,001521$ ); em comparação a RN ( $\pi = 0,010501 \pm 0,005965$ ), indicando que os haplótipos de Balbina são distintos entre si por poucos passos mutacionais ( $ETA = 4$ ) diferentes de Rio Negro ( $ETA = 18$ ) (Tabela 2).

Segundo Iriarte et al (2011), a baixa diversidade nucleotídica junto com a elevada/moderada diversidade haplotípica pode ser atribuída a um acúmulo de mutações de poucas bases entre haplótipos, podendo ser atribuído a um rápido crescimento populacional após um período de baixa população efetiva. De acordo com cMillan e Palumbi (1997), a variabilidade genética é uma combinação da taxa de mutação e a probabilidade de fixação, sendo essa última diretamente relacionada com a reprodução, o que permite uma avaliação da característica genética a partir de uma geração para a seguinte (Alberts et al. 1996). Os parâmetros genéticos de diversidade haplotípica ( $H_d$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) da região



controle do DNAm<sub>t</sub> podem ser úteis para saber o estado atual da população de uma determinada espécie (Marin 2013).

Tabela 2 - Parâmetros genéticos da região controle (D-Loop) para *Inia geoffrensis* coletadas na UHE de Balbina e Rio Negro.

Parâmetros Genéticos	Balbina	Rio Negro	BA e RN
Tamanho amostral (N)	33	35	68
Número de haplótipos (H)	5	13	16
Diversidade haplotípica (Hd)	0,5720 +/- 0,0628	0,8168 +/- 0,0565	0,7436
Diversidade nucleotídica ( $\pi$ )	0,001742 +/- 0,001521	0,010501 +/- 0,005965	-
Diversidade gênica	0,5720 +/- 0,0628	0,8168 +/- 0,0565	-
Número total de mutações (ETA)	4	18	22
Número de sítios Polimórficos (S)	4	18	22
Média das diferenças nucleotídicas par a par (K)	0,67424	4,06387	-

A diversidade haplotípica observada nas amostras de Balbina ( $H_d = 0,5720$ ) mostra-se menor do que a observada para o Rio Negro ( $H_d = 0,8168$ ), mas semelhante a outras localidades. Hollatz et al. (2011) comparou a diversidade haplotípica da região de Tefé ( $H_d = 0,5111 \pm 0,1643$ ) com amostras da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá/RDSM ( $H_d = 0,4842 \pm 0,1129$ ), as duas localidades têm cerca de 30 km de distância (Tabela 3).

Em estudos realizados por Gravena (dados não publicados) (Tabela 3), a diversidade haplotípica da população de *Inia geoffrensis*, da região do baixo rio Negro (BRN, N=15) foi de  $H_d=0,9429$ , já para a região do Rio Madeira (RM, N=15) foi de  $H_d=0,8143$ , para a região da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá na bacia do rio Solimões (RS, N= 12) foi de  $H_d=0,4394$ . Comparando os nossos dados com as populações analisadas por Gravena, as duas regiões que possuem a menor diversidade haplotípica foram a UHE Balbina (BA) e a população do Mamirauá (RS). Apesar da população do Mamirauá não possuir barreiras a sua movimentação, permitindo que os botos gerem descendentes com qualquer parceiro, da

mesma localidade ou de localidades mais distantes, a diversidade desta população foi a menor observada. Isso pode ter ocorrido devido a aleatoriedade da amostragem, ou realmente esta população possui baixa diversidade devido a filopatria das fêmeas (Hollatz et al. 2011) ou pela redução observada do tamanho da população de 80% durante o período de 10 anos ou de três gerações.

Ruiz-Garcia et. al. (2017) em seu estudo sobre a biodiversidade na Amazônia obteve dados de 21 amostras de *Lontra longicaudis*, apresentando uma diversidade haplotípica de  $Hd = 0,984 \pm 0,015$ ; 7 amostras de *Pteronura brasiliensis* ( $Hd = 0,954 \pm 0,032$ ) e 10 amostras de *Inia* spp., sendo *Inia geoffrensis* ( $Hd = 0,708 \pm 0,043$ ) e *Inia boliviensis* ( $Hd = 0,516 \pm 0,067$ ). Correlacionando esses dados com os nossos nota-se que apesar do número amostral de *Inia boliviensis* ser  $N=5$ , sua diversidade haplotípica é aproximada a que encontramos em Balbina com um número amostral maior ( $N=33$ ). Gravena (dados não publicados) também analisou amostras de *Inia boliviensis* (RG,  $N=10$ ,  $Hd = 0,9333 \pm 0,0620$ ) e *Inia araguaiaensis* (RA,  $N= 12$ ,  $Hd=0,7424 \pm 0,1158$ ), que apesar de ser considerada uma população ameaçada, ainda assim possui diversidade maior do que o observado para Balbina e Mamirauá.

Gariboldi et al. (2015) em seu estudo de genética populacional de golfinhos franciscana (*Pontoporia blainvillei*) observou para a região Monte Hermoso (MH=13) a diversidade haplotípica ( $Hd=0,641$ ), os mesmos propuseram que após a sua colonização por poucas linhagens maternas, a manutenção no MH de uma diversidade reduzida de mtDNA e de um tamanho relativamente constante ao longo do tempo se deve aos baixos níveis de fluxo gênico. Os autores relatam que no caso de MH, mudanças nas condições ambientais e especializações de recursos alimentares podem conduzir a uma influência mais forte de deriva genética do que fluxo gênico, apesar da distância geográfica mais próxima entre esta população e outras. Essas diferenças genéticas podem estar relacionadas a um acasalamento não aleatório entre indivíduos devido às áreas de vida relativamente pequenas da espécie (Bordino et al. 2008).

Já De Oliveira et al. (2020) observou uma baixa diversidade haplotípica ( $Hd = 0,0408$ ,  $N = 68$ ) para franciscana (*Pontoporia blainvillei*) na Áreas de Manejo (FMA) do estado do Espírito Santo. Este pequeno cetáceo é o mais ameaçado do sudoeste do Oceano Atlântico. Segundo os autores, esta espécie tem sido intensamente impactada nos últimos anos pela captura acidental durante atividades pesqueiras e pela degradação do habitat. Eles reforçam a

necessidade de diferentes ações de conservação desta espécie na região. Vale ressaltar que com base em um declínio projetado na abundância de espécies de mais de 30% ao longo de três gerações (36 anos; Taylor et al. 2007), o golfinho franciscana foi classificado em 2008 como “Vulnerável” pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) (Reeves et al. 2012).

Uma pesquisa desenvolvida por Yang et.al. (2003) relata o primeiro levantamento comparativo da variabilidade genética e da estrutura populacional de uma espécie ameaçada o boto-do-índico, *Finless porpoise* (*Neophocaena phocaenoides asiaorientalis*, Pilleri e Gühr, 1972) e o baiji (*Lipotes vexillifer*, Miller, 1918), espécie que na época era considerada ameaçada e atualmente é considerada extinta (Turvey et al. 2007). Os autores consideraram baixos valores de diversidade haplotípica ( $Hd = 0,57 \pm 0,090$ ,  $N=20$ ) para o baiji, que ocorria no rio Yangtze, mesmo sendo superior, embora não significativamente, ao da população de *Finless porpoise* ( $Hd = 0,20 \pm 0,07$ ) do mar da China Meridional. Os autores enfatizam que embora as discrepâncias no tamanho amostral e região gênica examinada, pudessem afetar a validade e a confiabilidade dos dados numa comparação direta, parece claro que a diversidade do mtDNA é baixa tanto para os baiji quanto para os *Finless porpoise*. Além disso, o baixo nível de diversidade genética dos *Finless porpoise* também pode ser um reflexo de um gargalo histórico.

Braulik et. al. (2014) em seu estudo em populações geograficamente isoladas de golfinhos do Sul da Ásia, relataram uma diversidade haplotípica de  $Hd = 0,216 \pm 0,124$  ( $N=18$ ) para a população *Platanista minor*, do Rio Indus e  $Hd = 0,641 \pm 0,097$  ( $n=13$ ) para o *Platanista gangetica*, do Rio Ganges. Os autores enfatizam que todo o gênero *Platanista* possui variação genética de mtDNA extremamente baixa. Isso pode ocorrer porque a espécie ocorre em habitat restrito e naturalmente não é abundante. Vale ressaltar que essa espécie enfrenta uma fragmentação marcante (Khan e Naizi 1989; Braulik et al. 2021), que teve a população original dividida em oito grupos represados por barragens (Kreb et al. 2010; Braulik et al. 2012; Braulik et al. 2014). A modificação do habitat, a escassez de alimentos e o isolamento genético levaram a rápidos declínios na densidade desta espécie e estão afetando a sua sobrevivência (Huang et al. 2012; Braulik et al. 2014). Ambas as espécies são classificadas como em perigo (EN) pela IUCN (Smith et al. 2012), principalmente como resultado de um declínio de mais de 50% no tamanho das populações nas últimas três gerações, ocasionado principalmente devido à diminuição na área de ocupação resultante da construção de barragem.

Um estudo de Marin (2013), mostrou que *Pygocentrus nattereri* apresentou valores baixos de polimorfismo de DNA [diversidade haplotípica ( $Hd = 0,495 \pm 0,070$ ) e diversidade nucleotídica ( $\pi = 0,00078 \pm 0,00016$ )], classificando *P. nattereri* por apresentar valores baixos de diversidade haplotípica e nucleotídica como aquela que tem ou teve um efeito de gargalo recente. Este efeito gargalo (Bignotto et al. 2009; Cui et al. 2009) de acordo com as interpretações sugeridas para espécies de baixa variabilidade genética, são aqueles que estão em perigo de extinção e assim a sua adaptabilidade a mudanças e adversidades ambientais são baixas (Bernatchez et al. 1989).

Segundo Excoffier et al. (1992) a diversidade haplotípica é um indicador importante da variabilidade genética de uma população. Quanto maior a diversidade haplotípica, mais variabilidade genética existe entre os indivíduos dessa população. Isso é crucial para a sobrevivência a longo prazo da espécie, pois uma maior diversidade genética pode proporcionar maior resistência a doenças, mudanças ambientais e outras pressões evolutivas (Franklin et al. 2006).

Quando comparado a população de *Inia geoffrensis* da localidade de Balbina deste estudo com outras espécies de golfinhos, ameaçados ou não, esta apresenta uma diversidade genética de haplótipo baixa ou aproximada aos das espécies também classificada em perigo ou extinta conforme descrito acima. Segundo Gray et al. (2020), estas características, demandam políticas de conservação eficazes para esta população, já que isolamento e baixa diversidade genética deixa a população mais susceptível a sofrer com impactos ambientais e antrópicos, como por exemplo as mudanças climáticas. A baixa diversidade torna a espécie menos capaz de adaptar-se rapidamente ao ambiente global em rápida mudança, gerando perda da incrível biodiversidade atual (Fenster et al. 2018).

Tabela 3 – Parâmetros de diversidade haplotípica ( $Hd$ ) estimados a partir dos dados da região controle do DNA mitocondrial para diferentes espécies e populações, e seus respectivos autores.

Localidade	Espécie	N	$Hd$	Referência
UHE Balbina (BA)	<i>Inia geoffrensis</i>	33	0,5720 +/- 0,0628	Este estudo
Rio Negro (RN)	<i>Inia geoffrensis</i>	35	0,8168 +/- 0,0565	Este estudo

Rio Negro (RN)	<i>Inia geoffrensis</i>	15	0,9429 +/- 0,0542	Gravena et al. dados não publicados
Mamirauá (RS)	<i>Inia geoffrensis</i>	12	0,4394 +/- 0,1581	Gravena et al. dados não publicados
Rio Madeira (RM)	<i>Inia geoffrensis</i>	15	0,8143	Gravena et al. dados não publicados
Região de Tefé	<i>Inia geoffrensis</i>	10	0,5111 +/- 0,1643	Hollatz et al. (2011)
Reserva de Desenvolvimento Sustentável Mamirauá (RDSM)	<i>Inia geoffrensis</i>	20	0,4842 +/- 0,1129	Hollatz et al. (2011)
Bacia amazônica	<i>Inia geoffrensis</i>	5	0,708 +/- 0,043	Ruiz-Garcia et al. (2017)
Bacia do Rio Mamoré	<i>Inia boliviensis</i>	5	0,516 +/- 0,067	Ruiz-Garcia et al. (2017)
Rio Guaporé (RG)	<i>Inia boliviensis</i>	10	0,9333 +/- 0,0620	Gravena et al. dados não publicados
Rio Araguaia (RA)	<i>Inia araguaiaensis</i>	12	0,7424 +/- 0,1158	Gravena et al. dados não publicados
Monte Hermoso (MH)	<i>Pontoporia blainvillei</i>	13	0,641	Gariboldi et al. (2015)
Espírito Santo	<i>Pontoporia blainvillei</i>	68	0,0408	De Oliveira et al. (2020)
Bacia Amazônica	<i>Sotalia fluviatilis</i>	56	0,788	Cunha et al. (2005)
Rio Indus	<i>Platanista minor</i>	18	0,216 +/- 0,124	Braulik et al. (2014)
Rio Ganges	<i>Platanista gangetica</i>	13	0,641 +/- 0,097	Braulik et al. (2014)
Rio Yangtze	<i>Lipotes vexillifer</i>	20	0,57 +/- 0,09	Yang et al. (2003)

Mar da China Meridional	<i>Neophocaena phocaenoides asiaeorientalis</i>	28	0,20 ± 0,07	Yang et al. (2003)
Florianópolis	<i>Tursiops truncatus</i>	124	0,7500	Fruet et al. (2014)
Bacia Amazônica	<i>Lontra longicaudis</i>	21	0,984 ± 0,015	Ruiz-Garcia et al. (2017)
Bacia Amazônica	<i>Pteronura brasiliensis</i>	7	0,954 ± 0,032	Ruiz-Garcia et al. (2017)
Cachoeira de Santo Antônio (Bacia do Rio Madeira/Rondônia)	<i>Pygocentrus nattereri</i>	54	0,495 ± 0,070	Marin (2013)

Nota: N = número de indivíduos, Hd = diversidade haplotípica

As análises das 68 sequências através do *software* DnaSP v. 6, revelaram 22 sítios polimórficos e 16 haplótipos (Tabela 4) em toda população analisada. Desses, dois haplótipos são compartilhados entre as localidades e representam 72% da diversidade da população total: H1 (36,8%) e H2 (35,2%). Já os haplótipos H3, H4 e H5 foram únicos da população de Balbina, bem como os haplótipos H6 ao H16 são exclusivos do Rio Negro.

Esses três haplótipos exclusivos da população de Balbina podem ser mutações novas que se desenvolveram dentro da barragem depois do fechamento, ou podem ser encontrados em outras localidades, no entanto torna-se necessário que haja a comparação com outras populações, pois caso hipoteticamente seja haplótipos novos exclusivos a partir do isolamento, isso indica que estamos vendo uma diferenciação. A frequência dos 16 haplótipos para as duas localidades de *Inia geoffrensis* estão representadas na tabela 4.

Garcia (2021), em sua análise de turísticas de botos-vermelhos juntamente a outras populações também relatou a presença dos 3 haplótipos exclusivos para a população de Balbina e a mesma não identificou haplótipos compartilhados com as outras regiões analisadas. Confirmando os resultados obtidos neste estudo.

Tabela 4 - Distribuição haplotípica da frequência absoluta das duas localidades de coleta de *Inia geoffrensis*.

Localidades coletadas			
Haplótipos	UHE Balbina	Rio Negro	Frequência
			a

<b>H1</b>	11	14	36,8%
<b>H2</b>	19	5	35,2%
<b>H3</b>	1	-	1,5%
<b>H4</b>	1	-	1,5%
<b>H5</b>	1	-	1,5%
<b>H6</b>	-	1	1,5%
<b>H7</b>	-	1	1,5%
<b>H8</b>	-	1	1,5%
<b>H9</b>	-	2	2,9%
<b>H10</b>	-	4	5,8%
<b>H11</b>	-	1	1,5%
<b>H12</b>	-	1	1,5%
<b>H13</b>	-	1	1,5%
<b>H14</b>	-	1	1,5%
<b>H15</b>	-	2	2,9%
<b>H16</b>	-	1	1,5%
<b>Total</b>	33	35	100%

Com base no método *Median-joining network* (MJN), foi gerada uma rede de haplótipos, conforme mostra a Figura 4. O tamanho das elipses é proporcional ao número de indivíduos que possuem o mesmo haplótipo e as cores identificam as diferentes localidades, conforme a descrição da figura. Como descrito acima alguns haplótipos são compartilhados entre as localidades e é possível observá-los por ter tamanhos maiores das elipses, sendo que alguns haplótipos são separados por mutações, representadas pelos riscos pretos.

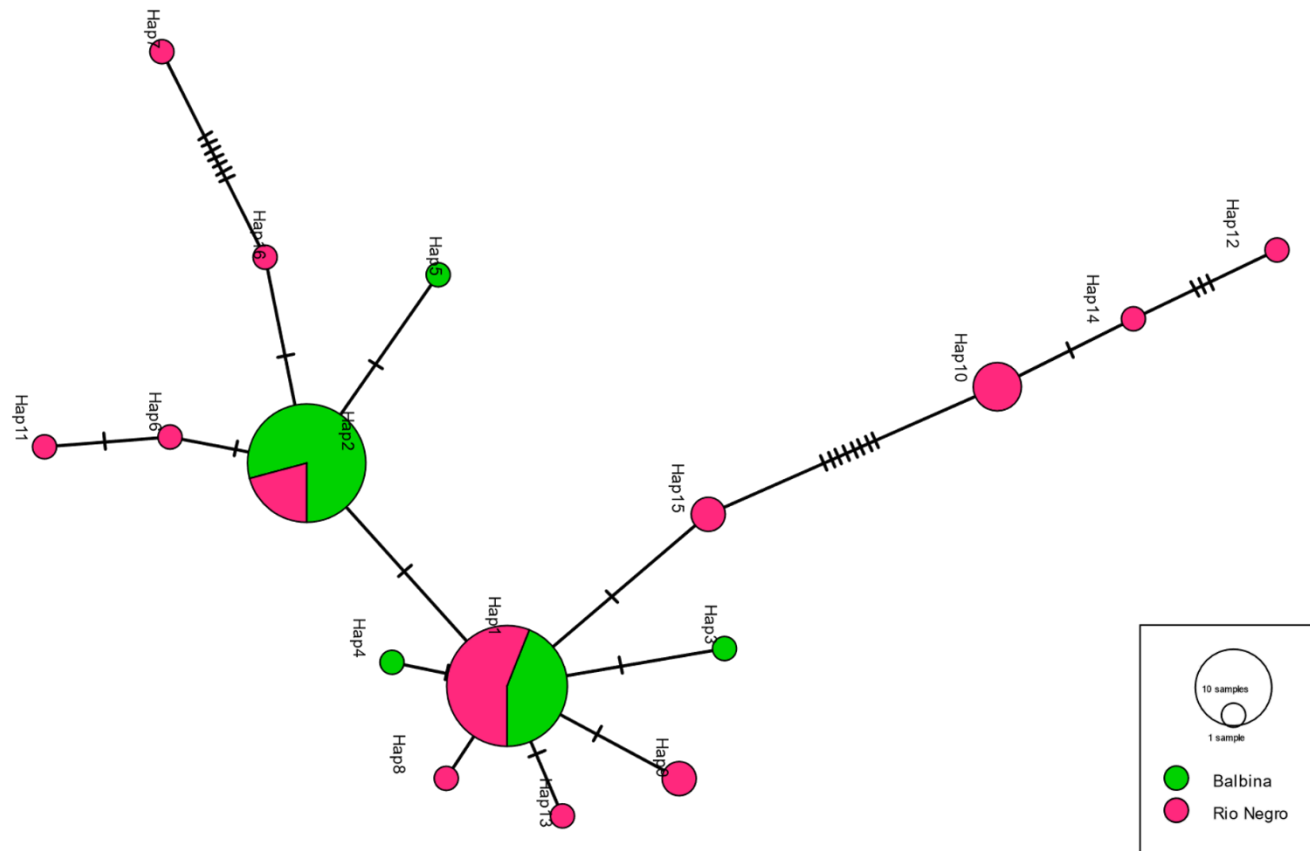


Figura 4 - Relação entre os haplótipos encontrados para as duas localidades estudadas, gerada no software PopArt. Em verde os haplótipos encontrados em Balbina e em rosa os haplótipos encontrados no Rio Negro. O tamanho dos círculos indica o número de indivíduos com o mesmo haplótipo, e os traços indicam o número de mudanças nas sequências entre cada haplótipo.



### **Variância Molecular entre os botos capturados em Balbina e Rio Negro**

A diferenciação entre populações e o nível de diversidade genética são influenciados por fatores como deriva genética, endocruzamento, fluxo gênico e sistema de cruzamento (Wright 1931 e 1943) e dessa maneira, a estimativa da diversidade genética, bem como de sua distribuição intra e interpopulacional, é fundamental para traçar medidas de conservação de espécies (Batista 2001).

A análise de variância molecular (AMOVA), indica que 14,58% das variações encontradas nas frequências dos haplótipos surgiram entre as localidades, e 85,42% dentro das mesmas (considerando todos os indivíduos dos dois grupos). A diferenciação das duas localidades resultou num valor de  $F_{ST} = 0,14584$ , considerado significativo (Tabela 5). Nota-se que a população total se encontra pouco estruturada isso pode ter ocorrido devido os haplótipos exclusivos de cada localidade, que ao longo do tempo podem estar fazendo com que ocorra essa diferenciação.

Aqui vale destacar o tempo de geração do boto que é relativamente longo, de 22 anos (Moore et al. 2018). A maturidade sexual das fêmeas é atingida por volta aos 8 e 10 anos quando atingem o comprimento de 190 cm e o intervalo entre sucessivas crias é de aproximadamente três anos (Best e da Silva, 1989a). As fêmeas começam a se reproduzir a partir dos 7-8 anos de idade, com 170 a 180 cm de comprimento corporal (Best e da Silva, 1993; Martin e da Silva, 2006). E os filhotes permanecem com a mãe por um período médio de dois anos, o que faz com que essa espécie, possa demorar a demonstrar alta estruturação entre populações, ou qualquer diferença entre os haplótipos.

Como a população de Balbina encontra-se isolada no reservatório da hidrelétrica por mais de 30 anos, esperava-se que a diversidade genética desta população não fosse tão alta quanto a população mais próxima, do rio Negro (RN). Apesar de ter sido observado certo nível de estruturação ( $F_{ST} = 0,14584$ ) entre as duas localidades, considerado baixo, pode-se observar que existe diferenciação entre elas. A população de Balbina possui três haplótipos exclusivos quando comparada com o Rio Negro, e isso deve ser melhor investigado, comparado a outras populações.

Braulik et al. (2014) descreveram em seu estudo que o índice de fixação entre os golfinhos dos rios Indus e Ganges foi elevado e claramente significativo; relataram também que a falta de haplótipos compartilhados resultou em um  $F_{ST}$  de 0,843 ( $p < 0,0001$ ), indicando a

ausência de fluxo gênico e clara diferenciação genética entre as duas populações geograficamente isoladas. Esses dados foram posteriormente utilizados para descrição de duas espécies independentes (Braulik et al. 2021).

Ruiz-Garcia et al. (2017) relataram que os testes mostraram uma diferenciação genética muito marcante entre o Orinoco, o Amazonas e a Bolívia  $F_{ST}$  (= 0,7736). Bem como Pickles et al. (2011) em seu estudo de identificação de unidades de conservação da ariranha (*Pteronura brasiliensis*) as distâncias genéticas entre os filogrupos foram altas, com valores de  $F_{ST}$  variando de 0,64 a 0,74, implicando um forte grau de estruturação.

A espécie *Sotalia fluviatilis*, conhecida como tucuxi, ao contrário dos botos, ariranhas e outras espécies de golfinho de rio, não apresenta estruturação entre localidades. Caballero et al. (2018) em seu estudo mostrou que não há estruturação populacional entre a Amazônia ocidental e oriental (isto é, Amazônia colombiana vs. Amazônia brasileira,  $F_{ST}$  = 0,085,  $P < 0,001$ ).

Tabela 5 - Resultado da análise de variância molecular (AMOVA) utilizando a frequência dos haplótipos entre as localidades coletadas de *Inia geoffrensis*, Balbina e Rio Negro.

Fonte de variação	GL	SQ	Componente de variação	Porcentagem da variação	Estatística $F$
Entre as populações	1	8.229	0.20662 Va	14,58%	0,14584
Dentro das populações	66	79.873	1.21021 Vb	85,42%	
Total	67	88.103			

GL= grau de liberdade; SQ= soma dos quadrados.

### Testes de neutralidade

Também foram utilizados os testes  $D$  de Tajima (Tajima 1989) e  $F_s$  de Fu (Fu 1997), para testar se as populações analisadas estão sob equilíbrio mutação – deriva genética. O teste  $D$  se baseia no modelo dos sítios infinitos sem recombinação (Kimura 1969), levando em consideração a razão do número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas, estimado pela comparação em pares de bases (Tajima 1989). O teste  $F_s$  baseia-se na probabilidade de observar em uma amostragem ao acaso um número de alelos similar ou menor do que o número observado de diferenças par-a-par. Este teste é mais sensível para detectar expansão populacional (Fu 1997).

De acordo com Frankham et al. (2006) espécies com pequenas populações ou que sofreram eventos de gargalo têm baixa diversidade genética e sofrem de endogamia acelerada, que leva a menor potencial reprodutivo e evolutivo. No entanto, apesar da baixa/moderada variabilidade genética parecer na população de *Inia geoffrensis*, os valores do teste  $D$  de Tajima não foram significantes ( $P > 0,05$ ) para os dois grupos amostrados (BA Tajima's  $D = -0.79101$ , RN Tajima's  $D = -0.40113$ ), indicando que o polimorfismo genético nesses locais está de acordo com o modelo neutro de mutação, ou seja, existe um equilíbrio genético em relação aos haplótipos de DNAm. Analisando-se separadamente os dois grupos, os valores do teste  $F_s$  de Fu mantêm-se negativo e significativo para os dois grupos (BA  $F_s = -34,02 \cdot 10^{34}$ ,  $p = 0,00$  e RN  $F_s = -25,83$ ,  $p = 0,00$ ), sugerindo expansão populacional. Ou seja, mesmo isolada dentro da represa a população continua crescendo, no entanto não sabemos até o momento qual é a variabilidade desta população, porque se continuar crescendo e possuírem hipoteticamente uma baixa variabilidade genética qualquer evento estocástico como por exemplo doenças, catástrofes climáticas, a chance de sobrevivência desta população é baixa.

Braulik et al. (2014), também realizou teste  $D$  de Tajima sendo que este não foi significativo nem para as amostras do Indus ( $D = -1,165$ ,  $p = 0,135$ ) nem do Ganges ( $D = 1,550$ ,  $p = 0,959$ ); no entanto, foi obtido um resultado significativo para o teste  $F_s$  de Fu na população de golfinhos do Indo (Indus:  $F_s = -1,744$ ,  $p < 0,02$ ; Ganges:  $F_s = 0,774$ ,  $p = 0,631$ ), o que sugere recente expansão demográfica da população.

Machado et al. (2017) em sua pesquisa de estrutura genética populacional da piranha-preta da Amazônia, relataram os resultados dos testes  $D$  de Tajima e  $F_s$  de Fu foram negativos, indicando um histórico geral de expansão populacional (assumindo neutralidade seletiva).

Muniz et al. (2018) em seus estudos de delimitação de unidades evolutivas no jacaré-anão de Cuvier, *Paleosuchus palpebrosus*, relataram que tanto o teste  $D$  de Tajima como o teste  $F_s$  de Fu indicaram uma recente expansão populacional do aglomerado geográfico "Madeira".

### **Ameaças, diversidade genética e possíveis futuros impactos derivados do isolamento por barragem**

Em 2018, o boto foi classificado pela União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN) como ameaçado (EN) (da Silva et al. 2018), sendo a caça intencional para iscas, enredamento em redes de pesca e a alteração de sistemas naturais (por exemplo,

construção de barragens) como as ameaças mais relevantes para esta população (da Silva et al. 2018; CMP 2020; Brum et al. 2021; Campbell et al. 2022; da Silva et al. 2023).

Apesar do quadro legal de proteção, a tendência populacional do boto está em declínio acentuado, com as suas populações caindo pela metade a cada 10 anos (botos) e 9 anos (tucuxis) nas taxas atuais, esses resultados são profundamente preocupantes e mostram taxas de declínio entre as mais graves de todas as medidas numa população de cetáceos desde os primeiros anos da caça moderna às baleias (da Silva et al. 2018). Essa redução observada ou suspeita do tamanho da população de 80% durante qualquer período de 10 anos ou de três gerações, presumindo-se que a duração da geração seja de 13,3 anos em botos e 13,9 anos em tucuxis (Pacifici et al. 2013), resultando em declínios de 3 gerações de 94% em botos e 97% em tucuxis, com taxas de perda relativas desde o ano 2000 (da Silva et al., 2018), o que reforça que a promulgação de leis por si só não é suficiente para garantir a conservação das espécies a longo prazo (da Silva et al. 2023).

Em setembro 2023, quando já se intensificava a seca histórica que assola a Amazônia, cerca de 153 botos foram encontrados mortos na região do Lago Tefé, no Médio Solimões, interior do estado do Amazonas. Entre os animais mortos, foram contados 130 botos cor-de-rosa e 23 da espécie tucuxi. Em uma semana, a perda foi de cerca de 10% da população de botos do local, e apenas no dia 28 de setembro de 2023, quando a temperatura da água bateu 39,1°C, foram registradas 70 carcaças de botos, além de centenas de peixes (Marmontel et al. 2023).

Segundo Root et al. (2003) as espécies respondem às mudanças ambientais de quatro maneiras principais: alteração da distribuição, adaptação fenotípica e genética, flutuação demográfica e, se a mudança for muito severa, extinção. A forma como uma determinada espécie responderá pode ser resultado de características como capacidade de dispersão e plasticidade fenotípica.

De acordo com Hughes et. al. (2008) a diversidade genética entre os indivíduos de uma população é fundamental para que esta se adapte às mudanças ambientais e adversidades resultantes de ações antrópicas, além de favorecer a evolução e manter o fitness reprodutivo. Por essas razões, a União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN) considera a variabilidade genética um importante fator para análise da biodiversidade e conservação das espécies (McNeely et al. 1990). O impacto na diversidade genética é bastante crítico, uma vez que a variação genética é necessária para a adaptação das espécies e sua especiação (Hughes et al. 1997).

Mediante ao explanado, apesar de não termos achado para a população de Balbina uma diversidade tão baixa principalmente comparada com a população de Mamirauá, esta é considerada baixa ou aproximada aos das espécies também classificada em perigo ou extinta (Tabela 3) e essa variação genética baixa é um problema principalmente para espécies ameaçadas. A população de Balbina encontra-se presa dentro da barragem e só podem cruzar entre si. O que levanta uma problematização da vulnerabilidade desta a sofrer de forma direta aos efeitos estocásticos ao longo do tempo, bem como sofrer endogamia. De acordo com Frankham et al. (2006) espécies que tem tamanho populacional pequeno ou que sofreram um evento de gargalo de garrafa e têm baixa diversidade genética, sofrem de endogamia acelerada, que leva a menos potencial reprodutivo e evolutivo.

Como até o momento não concluímos as análises de microssatélites ainda não sabemos ao certo qual o nível de endogamia que a população de Balbina se encontra, o que torna crucial o término das análises para podermos medi-la e estimar quais os possíveis impactos que podem ocorrer nesta população, pois o problema é que quando eles têm uma endogamia relativamente média/alta isso também leva a problemas reprodutivos (Frankham et al. 2006), que ainda não sabemos se existe. Mas caso comprovado a existência da elevada endogamia isso será um problema a esta população pois segundo Frankham et al. (2006) a perda da diversidade genética e a redução do tamanho da população são fatores considerados para o vórtex de extinção.

O que torna este trabalho relevante pelo fato de ser o primeiro estudo genética realizado dentro de uma barragem onde os botos estão presos, e por acaso é a barragem mais antiga construída na Amazônica, sendo de extrema importância para o entendimento dos possíveis impactos que o isolamento ao longo prazo pode ocasionar, bem como inferir medidas para a conservação desta população isolada. É importante ressaltar que a conservação da diversidade é fundamental para a preservação das populações e para a manutenção de seus ecossistemas. A perda de diversidade genética pode tornar as populações mais suscetíveis a doenças, diminuir sua capacidade de adaptação às mudanças ambientais e reduzir sua viabilidade a longo prazo (Frankham et al. 2006). Apesar da crescente atenção, são necessárias mais pesquisas para compreender o impacto das barragens hidroelétricas nos botos, especialmente dada a crescente procura de energia e os impactos adversos documentados para outras espécies (Braulik et al. 2014; Benchimol e Peres 2015).

## CONCLUSÃO

A diferenciação entre grupos de indivíduos é um tópico fundamental em genética populacional. Nesse sentido, o uso de múltiplos marcadores moleculares pode fornecer informações valiosas sobre os processos que moldam a estrutura populacional de uma espécie. Acreditamos que uma melhor compreensão da estrutura populacional e da diversidade genética seria valiosa para tornar medidas de conservação eficazes úteis para a coexistência a longo prazo especialmente úteis para evitar que os botos passem por um declínio rápido no tamanho populacional como já ocorreu com o baiji.

Os resultados apresentados até o momento refletem as informações genéticas de aproximadamente três gerações desde o isolamento do lago de Balbina. Apesar de já termos observado diferenciação entre as localidades analisadas, não podemos dizer com certeza, de que os botos de Balbina estão se diferenciando, pois, para concluir isso, temos que manter estudo de longa duração nessa localidade, além de dados de outros marcadores genéticos. O marcador mitocondrial escolhido é o mais variável, mas comparado a outras partes do genoma nuclear, que possuem taxa mutacional maior, podemos ter resultados diferentes, o que pode estar mostrando só um lado da história. Por isso é importante a conclusão das análises dos marcadores microssatélites, que por serem bem mais variáveis, é possível ver resultado de estruturação em menos gerações comparado ao DNA mitocondrial.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABI. 1992. SeqEd: Sequence Editor, version 1.0.3. ABI, Foster City.
- Aguilar, R. *et al.* 2008. Genetic consequences of habitat fragmentation in plant populations: susceptible signals in plant traits and methodological approaches. *Molecular Ecology*, v. 17, n. 24, p. 5177–88.
- Alberts, B. *et al.* 1996. *Biología Molecular de la Célula*. Tercera Edición. Ediciones Omega. S. A. 1385pp.
- Amos, W. and Harwood, J. Factors affecting levels of genetic diversity in natural populations. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, v. 353, n. 1366, p. 177–186, 1998.
- Andrade, A. K. P. 2020. Estimativa populacional e distribuição do boto-vermelho (*Inia geoffrensis*) no reservatório da Usina Hidrelétrica de Balbina, Amazonas, Brasil.
- ANEEL (Agência Nacional de Energia Elétrica). 2020. Banco de Informações de Geração. <http://www2.aneel.gov.br/aplicacoes/capacidadebrasil/GeracaoTipoFase.asp> Last access on 10/02/2021.
- Araújo, C. e Wang, J. Y. 2014. The dammed river dolphins of Brazil: impacts and conservation. *Cambridge Journals. Fauna & Flora International, Oryx*, 49 (1): 17–24.
- Arias, M. C. *et al.* 2003. O DNA mitocondrial em estudos populacionais e evolutivos de meliponíneos. *Apoidea Neotropica* (GAR Mello & I. Alves-dos-Santos, eds.). Universidade do Extremo Sul Catarinense, Criciúma, 305-309.
- Avise, J. C. 1994. Conservation genetics. In *Molecular Markers, Natural History and Evolution* (pp. 361-398). Springer, Boston, MA.
- Avise, J. C. *et al.* 1987. Intraspecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*. Vol. 18, v. 18, n. 1987, p. 489-522, 1987.
- Baldisseri, D.H. 2005. As transformações espaciais e os impactos ambientais na bacia do Rio Uatumã – AM, BRASIL. *Anais do X Encontro de Geógrafos da América Latina – 20 a 26 de março de 2005 – Universidade de São Paulo*.
- Bandelt, H. J. *et al.* 1999. Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular biology and evolution*, v. 16, n. 1, p. 37–48, 1999.
- Banguera-Hinestroza, E.; H. Cardenas; M. Ruiz-Garcia; M. Marmontel; E. Gaitan; R. Vazquez; F. Garcia-Vallejo. 2002. Molecular identification of evolutionarily significant units in the Amazon River dolphin *Inia* sp. (Cetacea: Iniidae). *Journal of Heredity* 93: 312-322.
- Barroco, L. S. A. 2019. O efeito de barragens hidrelétricas sobre populações de peixes de rios de águas pretas na Amazônia: uma abordagem com uso de marcadores bioquímicos e moleculares. UFAM: Manaus.
- Batista, J. da S. 2001. Estimativa da variabilidade genética intra-específica da dourada - *Brachyplatystoma flauicans Castelnau* 1855 (Pimelodidae - Siluriformes) no Sistema Estuário-Amazonas-Solimões. Manaus: INPA.

- Beebee, T. e Rowe, G. 2004. An Introduction to Molecular Ecology. Oxford University Press.
- BEN 2023. Balanço Energético Nacional. Relatório Síntese 2023. Ano base 2022. Relatório Síntese / Ano Base 2020. Rio de Janeiro, RJ. Maio de 2021.
- Benchimol M. e Peres C. A. 2015a. Predicting local extinctions of Amazonian vertebrates in forest islands created by a mega dam. *Biological Conservation*, 187, 61-72.
- Benchimol M. e Peres C. A. 2015b. Edge-mediated compositional and functional decay of tree assemblages in Amazonian forest islands after 26 years of isolation. *Journal of Ecology*, 103(2), 408-420.
- Benchimol, M. e Peres, C. A. 2015. Widespread Forest Vertebrate Extinctions Induced by a Mega Hydroelectric Dam in Lowland Amazonia. *PLoS One*, 10(7): e0129818. doi:10.1371/journal.pone.0129818.
- Best, R. C. e da Silva, V. M. F. 1989a. Amazon River Dolphin, Boto. *Inia geoffrensis* (de Blainville, 1817). In: Ridgway, S.H.; Harrison, R.J. (Eds). *Handbook of Marine Mammals*. Vol. 4: River dolphins and the larger toothed whales. Academic Press. London, England. p. 1-24.
- Best, R. C. e da Silva, V. M. F. 1993. *Inia geoffrensis* de Blainville, 1817. *Mammalian Species*, 426: 1-8.
- Best, R.C. e da Silva, V.M.F. 1993. *Inia geoffrensis*. *Mammalian Species*, 426: 1–8.
- Bignotto, T. S. et al. 2009. Genetic divergence between *Pseudoplatystoma corruscans* and *Pseudoplatystoma reticulatum* (Siluriformes: Pimelodidae) in the Paraná River Basin. *Braz. J. Biol.* 69: 681 – 689.
- Bordino, P. et al. 2008. Satellite tracking of franciscana dolphins, *Pontoporia blainvillei*, in Argentina: preliminary information on ranging, diving and social patterns. *International Whaling Commission SC 60/SM14*.
- Bourret V. et al. 2008. Microsatellites in Cetaceans: An Overview. *The Open Marine Biology Journal*, v.2: 38-42.
- Brandão, R. A. and Araújo, F. B. 2008. Changes in Anuran Species Richness and Abundance Resulting from Hydroelectric Dam Flooding in Central Brazil. *Biotropica*, 40(2), 263-266.
- Brasil, MME (Ministério das Minas e Energia) 2013. Plano Decenal de Expansão de Energia 2023. Brasília, DF: MME, Empresa de Pesquisa Energética (EPE). 2 vols.
- Braulik et al. 2021. Taxonomic revision of the South Asian River dolphins (*Platanista*): Indus and Ganges River dolphins are separate species. *Marine Mammal Science* published by Wiley Periodicals LLC on behalf of Society for Marine Mammalogy: DOI: 10.1111/mms.12801.
- Braulik, G. T. et al. 2012. Uso do habitat por um golfinho de água doce na estação de águas baixas. *Conservação Aquática: Ecossistemas Marinhos e de Água Doce*. 22: 533- 546.
- Braulik, G. T. et al. 2014. Fragmentação de habitat e extirpação de espécies em ecossistemas de água doce; causas do declínio do alcance do golfinho do rio Indus (*Platanista gangetica minor*). *PloSOne*. 2014; 9 (7): e101657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0101657> PMID: 25029270.



- Brum, S. M. et al. 2021. Conservation of Amazonian aquatic mammals. *Aquatic Conservation: Marine and Freshwater Ecosystems*, 31(5), 1068-1086. <https://doi.org/10.1002/aqc.3590>.
- Caballero, S. et al. 2018. Population Structure of Riverine and Coastal Dolphins *Sotalia fluviatilis* and *Sotalia guianensis*: Patterns of Nuclear and Mitochondrial Diversity and Implications for Conservation *Journal of Heredity*, 757–770. doi:10.1093/jhered/esy049.
- Cabral, M. M. M. et al. 2010. Feeding habits of giant otters *Pteronura brasiliensis* (Carnivora: Mustelidae) in the Balbina hydroelectric reservoir, Central Brazilian Amazon. *Zoologia*, 27(1): 47–53.
- Campbell, E. et al. 2022. Challenges and priorities for river cetacean conservation. *Endangered Species Research*, 49: 13-42. <https://doi.org/10.3354/esr01201>.
- CMP - Conservation Management Plan. 2020. CMP South America River Dolphins (Publication No. SC/68B/CMP/21). International Whaling Commission. <https://archive.iwc.int/?r=17238>.
- Corander, J. et al. 2013. BAPS: Bayesian Analysis of Population Structure. Manual v.6.0. 2013.
- Cui, Z. et al. 2009. The complete mitochondrial genome of the large yellow croaker, *Larimichthys crocea* (Perciformes, Sciaenidae): Unusual features of its control region and the phylogenetic position of the Sciaenidae. *Gene* 432: 33–43.
- Cunha et al. 2005. Riverine and marine ecotypes of *Sotalia* dolphins are different species. *Marine Biology*: 2005. DOI 10.1007/s00227-005-0078-2.
- da Silva, V. M. F. et al. 2018. *Inia geoffrensis*, Amazon River Dolphin. The IUCN Red List of Threatened Species, eT10831A50358152. <https://doi.org/10.2305/IUCN.UK.2018-2.RLTS.T10831A50358152.en>.
- da Silva, V. M. F. et al. 2023. The Amazon River dolphin, *Inia geoffrensis*: What have we learned in the last two decades of research? *Latin American Journal of Aquatic Mammals*, 18(1), 139-157. <https://doi.org/10.5597/lajam00298>.
- de Oliveira et al. 2020. Low Genetic Diversity of the Endangered Franciscana (*Pontoporia blainvillei*) in Its Northernmost, Isolated Population (FMAIa, Espírito Santo, Brazil). *Frontiers in Marine Science*: 18 December 2020. DOI:10.3389/fmars.2020.608276
- Do, C., et al. 2014. NeEstimator v2: re-implementation of software for the estimation of contemporary effective population size ( $N_e$ ) from genetic data. *Mol. Ecol. Res.* 14, 209–214. doi: 10.1111/1755-0998.12157
- Doyle, J.J.; Doyle, J.L. 1987. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 12: 13-15.
- Drummond et al. 2012. Geneious v5.6.3.
- Dugan, P. J. et al. 2010. Fish migration, dams, and loss of ecosystem services in the Mekong basin. *Ambio*. 39 (4): 344-348. doi: 10.1007 / s13280-010-0036-1.
- Estoup A, et al. 1995. Size homoplasy and mutational processes of interrupted microsatellites in two bee species, *Apis mellifera* and *Bombus terrestris* (Apidae). *Mol Biol Evol* 12:1074–1084.

- Excoffier, L. and Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 10: 567-74.
- Excoffier, L.; P. E. Smouse; J.M. Quattro. 1992. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131: 479-491.
- Fearnside, P. M. 2015. Hidrelétricas na Amazônia: impactos ambientais e sociais na tomada de decisões sobre grandes obras. Vol. 1 e 2. Editora do INPA. Manaus, AM.
- Fenster, C. B et al. 2018. Conservation and Genetics. *Yale Journal of Biology and Medicine*, p. 291-501.
- Fonseca, V. 2018. Vila de Balbina sob o temor da privatização da Eletrobrás. Acesso em: 21/01/2021.  
<https://amazoniareal.com.br/vila-de-balbina-sob-o-temor-da-privatizacao-da-eletobras/>.
- Frankham, R. et al. 2006. *Fundamentos de Genética da Conservação*. Ribeirão Preto: SBG, 262.
- Frankham, R. *et al.* 2008. *Fundamentos de genética da conservação*. Ribeirão Preto: Editora Sociedade Brasileira de Genética, 2008. 280 p.
- Freeland, J e Petersen, H. K. 2011. *Molecular Ecology*. Wiley-Blackwell, v. 2, n. 2.
- Freeland, J. R. 2005. *Molecular Ecology*. John Wiley; Sons Ltd, West Sussex. 388p.
- Fruet et. al. 2014. Remarkably low genetic diversity and strong population structure in common bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from coastal waters of the Southwestern Atlantic Ocean. Article in *Conservation Genetics*: August 2014. DOI: 10.1007/s10592-014-0586-z.
- Fu, Y. X. 1997. Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics* 1447:915-925.
- Garcia, E. H. S. de P. 2021. Do turismo à genética: uma avaliação populacional dos botos-vermelhos provisionados no Rio Negro, Amazônia Central. Manaus: INPA.
- Gariboldi et. al. 2016. Patterns of population structure at microsatellite and mitochondrial DNA markers in the franciscana dolphin (*Pontoporia blainvillei*). *Ecology and Evolution* 2016; 6: 8764–8776. DOI: 10.1002/ece3.2596.
- Gariboldi, M. C. et al. 2015. Population genetics of Franciscana Dolphins (*Pontoporia blainvillei*): Introducing a new population from the southern edge of their distribution. *PLoS One*, 10, e0132854.
- Garza, J. C. and Williamson, E. G. 2001. Detection of reduction in population size using data from microsatellite loci. *Molecular Ecology* 10: 305-318.
- Goldstein, D. B. et al. 1995. An evaluation of genetic distances for use with microsatellite loci. *Genetics*, v. 139, n. 1, p. 463–471.
- Goodnight, K. F.; D. C. Queller. 1999. Computer software for performing likelihood tests of pedigree relationship using genetic markers. *Molecular Ecology* 8: 1231-1234.

- Gravena, W. *et al.* 2009. Microsatellite loci for population and parentage analysis in the Amazon River dolphin (*Inia geoffrensis* de Blainville, 1817). *Molecular Ecology Resources* 9: 600-603.
- Gray, H. W. I. *et al.* 2020. Comparative biogeography and the evolution of population structure for bottlenose and common dolphins in the Indian Ocean. *Journal of Biogeography*, v. 48, n. 7, p. 1654-1668.
- Hollatz *et al.* 2011. The Amazon River system as an ecological barrier driving genetic differentiation of the pink dolphin (*Inia geoffrensis*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 2011, 102, 812–827.
- Huang *et al.* 2012. Padrão comum de declínio populacional para espécies de cetáceos de água doce em habitats em deterioração. *Freshwater Biology*. 57 (6), 1266–1276.
- Hughes, A. R. *et al.* 2008. Ecological consequences of genetic diversity. *Ecology Letters*, v. 11, n. 6, p. 609-623, 2008.
- Hughes, J. B. *et al.* 1997. Population diversity: its extent and extinction. *Science*, 278(5338), 689-692.
- Inatomi, T. A. H. e Udaeta, M. E. M. 2011. Análise Dos Impactos Ambientais na Produção de Energia Dentro do Planejamento Integrado de Recursos. Seção de estudos estratégicos de energia e de desenvolvimento sustentável do GEPEA/EPUSP, p. 14.
- Iriarte, P. J. F. *et al.* 2011. Phylogeography of weakfish *Cynoscion guatucupa* (Perciformes: Sciaenidae) from the southwestern Atlantic. *Scientia Marina*. 75(4), 701-706.
- Jarne, P. e Lagoda, P. J. L. 1996. Microsatellites, from molecules to populations and back. *Trends in Ecology and Evolution*, v. 11, n. 10, p. 424-429.
- Jarreta, M.B.M. 1999. La puebra Del ADN em Medicina Forense. Masson.
- Kasper, D. *et al.* 2014. Reservoir Stratification Affects Methylmercury Levels in River Water, Plankton, and Fish Downstream from Balbina Hydroelectric Dam, Amazonas, Brazil. *Environmental Science & Technology*, dx.doi.org/10.1021/es4042644.
- Khan, K. M., Naizi, M. S. 1989. Distribution and population status of the Indus Dolphin, *Platanista minor*. In: Perrin WF, Brownell Jr RL, Kaiya Z, Jionkang L (eds) *Biol. Conserv. River Dolphins*. IUCN, Gland, Switzerland, pp 77–80.
- Kimura, M. 1969. The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics* 61:893-903.
- Kreb *et al.* 2010. Estabelecendo áreas protegidas para cetáceos de água doce asiáticos: Cetáceos de água doce como espécies emblemáticas para a gestão integrada da conservação dos rios, Samarinda, 19–24 de outubro de 2009. Relatório Final do Workshop. Yayasan Konservasi RASI, Samarinda, Indonésia. 116 pp. ISBN: 978-602-97677-0-4.
- Leigh, J. W and Bryant, D. 2015. Popart: full-feature software for haplotype network construction. *Methods in Ecology and Evolution* / Volume 6, Issue 9 / p. 1110-1116. <https://doi.org/10.1111/2041-210X.12410>.

- Lowe, A. J. *et al.* 2005. Genetic resource impacts of habitat loss and degradation; reconciling empirical evidence and predicted theory for neotropical trees. *Heredity*, v. 95, n. 4, p. 255–273, 2005.
- Machado *et al.* 2017. Population genetic structure of the Amazonian black flannelmouth characin (Characiformes, Prochilodontidae: *Prochilodus nigricans* Spix & Agassiz, 1829): contemporary and historical gene flow of a migratory and abundant fishery species. *Environ Biol Fish* (2017) 100:1–16. DOI 10.1007/s10641-016-0547-0.
- Marin, J. M. 2013. Análise da estrutura genética populacional de duas espécies de Characiformes (*Pygocentrus nattereri* e *Potamorhina latior*) na região da bacia do Rio Madeira, Rondônia. Botucatu – SP Fevereiro/2013.
- Marmontel, M. *et al.* 2023. “Estarrecedor”: em meio à seca na Amazônia, lago perde 10% da população de botos em apenas uma semana. Acessado em 29/09/2023: <https://umsoplaneta.globo.com/biodiversidade/noticia/2023/10/17/estarrecedor-em-meio-a-seca-na-amazonia-lago-perde-10percent-da-populacao-de-botos-em-apenas-uma-semana.ghtml>.
- Martin, A.R. & Da Silva, V.M.F. 2006. Sexual dimorphism and body scarring in the boto (Amazon river dolphin) *Inia geoffrensis*. *Marine Mammal Science*, 22: 25–33.
- McMillan, W. O. e Palumbi, S. R. 1997. Rapid rate of control-region evolution in Pacific Butterflyfishes (Chaetodontidae). *J. Mol. Evol.* 45: 473 – 484.
- McNeely, J. A. *et al.* 1990. Conserving the world’s biological diversity. World Conservation Union, World Resources Institute, Conservation International, World Wildlife Fund–US, and the World Bank.
- Miller, 1918. *Lipotes vexillifer*. in GBIF Secretariat. GBIF Backbone Taxonomy. Checklist dataset <https://doi.org/10.15468/39omei> accessed via GBIF.org on 2023-10-20.
- Moore, J. E., *et al.* 2018. Intrinsic growth ( $r_{max}$ ) and generation time (T) estimates for *Inia geoffrensis*, in support of an IUCN Red List re-assessment. U.S. Department of Commerce, NOAA Technical Memorandum NMFS-SWFSC-596. <https://doi.org/10.7289/V5/TM-SWFSC-596>
- Moritz, C. 1994. Applications of mitochondrial DNA analysis in conservation: A critical review. *Molecular Ecology*, v. 3, n. 4, p. 401–411.
- Muniz *et al.* 2018. Delimitation of evolutionary units in Cuvier’s dwarf caiman, *Paleosuchus palpebrosus* (Cuvier, 1807): insights from conservation of a broadly distributed species. *Conservation Genetics* (2018) 19:599–610. <https://doi.org/10.1007/s10592-017-1035-6>.
- Nater *et al.*, 2009. New polymorphic tetranucleotide microsatellites improve scoring accuracy in the bottlenose dolphin *Tursiops aduncus*. First published: 12 February 2009. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0998.2008.02246.x>.
- Oliveira, R.C. *et al.* 2018. From river to farm: an evaluation of genetic diversity in wild and aquaculture stocks of *Brycon amazonicus* (Spix & Agassiz, 1829), Characidae, Bryconinae. *Hydrobiologia*, 805: 75–88.

- Olson, D. M. *et al.* 2001. Terrestrial Ecoregions of the World: A New Map of Life on Earth. *BioScience*, Volume 51, Issue 11. Pages 933–938, [https://doi.org/10.1641/0006-3568\(2001\)051\[0933:TEOTWA et al.2.0.CO;2](https://doi.org/10.1641/0006-3568(2001)051[0933:TEOTWA et al.2.0.CO;2).
- Pacifici M. *et al.* 2013. Banco de dados sobre duração de geração de mamíferos. *Nat Conserv*; 5:89–94. <https://doi.org/10.3897/natureconservation.5.5734>.
- Palstra, F. P., and Fraser, D. J. 2012. Effective/census population size ratio estimation: a compendium and appraisal. *Ecol. Evol.* 2, 2357–2365. doi: 10.1002/ece3.329.
- Paschoalini, M. *et al.* 2020. On the brink of isolation: Population estimates of the Araguaian river dolphin in a human-impacted region in Brazil. *PLoS ONE* 15(4): e0231224.
- Peixun, C., Yuanyu, H. 1989. Distribution, population size and protection of *Lipotes vexillifer*. In: Perrin WF, Brownell Jr RL, Kaiya Z, Jionkang L (eds) *Biol. Conserv. River Dolphins*. IUCN, Gland, Switzerland, pp 81–85.
- Pilleri e Gühr 1972. *Neophocaena phocaenoides* subsp. *Asiaeorientalis*. in National Museum of Natural History, Smithsonian Institution (2023). Integrated Taxonomic Information System (ITIS). Checklist dataset <https://doi.org/10.5066/f7kh0kbb> accessed via GBIF.org on 2023-10-20.
- Piry S. *et al.* 1999. BOTTLENECK: a computer program for detecting recent reductions in the effective size using allele frequency data. *J Hered.* 1999; 90: 502–503. <https://doi.org/10.1093/jhered/90.4.502>.
- Pritchard, J. K. *et al.* 2010. Documentation for structure software: Version 2.3, 2010. Disponível em: [https://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/structure\\_doc.pdf](https://www.ccg.unam.mx/~vinuesa/tlem09/docs/structure_doc.pdf).
- Reeves, R. *et al.* 2012. *Pontoporia blainvillei*. Database: IUCN Red List of Threatened Species. Gland, Switzerland and Cambridge. Retrieved from <http://www.iucnredlist.org/details/17978/0>.
- Reeves, R. R., Leatherwood, S. 2004. Dams and river dolphins: can they co-exist? *Ambio*: 23:172–175.
- Rodrigues, L. A. 2016. Hidrelétricas na Amazônia um Mau Negócio para o Brasil e para o Mundo. Affiliation: Greenpeace International: April. DOI: 10.13140/RG.2.2.22184.11520.
- Rooney. *et al.* 1999. Evaluating a Putative Bottleneck in a Population of Bowhead Whales from Patterns of Microsatellite Diversity and Genetic Disequilibria. *J Mol Evol* (1999) 49:682–690.
- Root, T.L. *et al.* 2003. Fingerprints of global warming on wild animals and plants. *Nature*, 421, 57-60, doi:10.1038/nature01333.
- Rosas, F. C. W. *et al.* 2007. The use of hydroelectric lakes by giant otters (*Pteronura brasiliensis*): The case of Balbina dam in Central Amazonia, Brazil. *Oryx*, 41(4): 520-524.
- Rosas, F. C. W. *et al.* 2015. Sleeping sites used by giant otters (*Pteronura brasiliensis*) in the Balbina Hydroelectric Reservoir, Central Brazilian Amazon. *Aquatic Mammals*, 41(2): 143-148.

- Ruiz-Garcia et al. 2017. Biodiversity in the Amazon: Origin Hypotheses, Intrinsic Capacity of Species Colonization, and Comparative Phylogeography of River Otters (*Lontra longicaudis* and *Pteronura brasiliensis*, Mustelidae, Carnivora) and Pink River Dolphin (*Inia* sp., Iniidae, Cetacea). *J Mammal Evol.* DOI:10.1007/s10914-016-9375-4.
- Ruiz-García et. al. 2017. Biodiversity in the Amazon: Origin Hypotheses, Intrinsic Capacity of Species Colonization, and Comparative Phylogeography of River Otters (*Lontra longicaudis* and *Pteronura brasiliensis*, Mustelidae, Carnivora) and Pink River Dolphin (*Inia* sp., Iniidae, Cetacea). *J Mammal Evol.* DOI 10.1007/s10914-016-9375-4.
- Santos, G. M. e Santos, A. C. M. 2005. Sustentabilidade da pesca na Amazônia. *Acta Amazônica* 19, 165-182, 2005.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology* 18: 233-234.
- Shrestha, T.K. 1989. Biology, status and conservation oof the Ganges River Dolphin, *Platanista gangetica*, in Nepal. In: Perrin WF, Brownell Jr RL, Kaiya Z, Jionkang L (eds) *Biol. Conserv. River Dolphins*. IUCN, Gland, Switzerland, pp 70–76.
- Smith B. D. and Reeves, R. R. 2012. River cetaceans and habitat change: Generalist resilience or specialist vulnerability? *J Mar Biol* 2012:1–11. doi: 10.1155/2012/718935.
- Smith, B. D. *et al.* 2012. *Platanista gangetica* ssp. gangetica. The IUCN Red List of Threatened Species: e.T41756A17627639. <http://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.2012.RLTS.T41756A17627639.en>.
- Tajima, F. 1989. Statistical methods for testing the neutral mutation hypotesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123:585-595.
- Tak-Chuen, C. e Ferreira, B. P. 2006. *Epinephelus itajara* – IUCN Red List of Thereatenet Species.
- Turvey, S. *et al.* 2007. First human-caused extinction of a cetacean species? *Biol. Lett.* 3, 537–540. doi: 10.1098/rsbl.2007.0292.
- Upholt, W.B. e Dawid, I.B. 1977. Mapping of mtDNA of individual sheep and goats: rapid evolution in the D-loop region. *Cell*, v.11, p.571-583.
- Valsecchi, E. e Amos, W. 1996. Microsatellite markers for the study of cetacean populations. Department of Genetics, Downing Street, Cambridge CB2 3EH, UK. *Molecular Ecology* 1996,5,151-156.
- Waples, R. S., and Do, C. 2008. Ldne: a program for estimating effective population size from data on linkage disequilibrium. *Mol. Ecol. Res.* 8, 753–756. doi: 10.1111/j.1755-0998.2007.02061.x.
- Weber, J.L e May P.E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *Am J Hum Genet* 44:388–396.
- Weir, B. S. and Cockerham, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of Population structure. *Evolution*, 38 (6), pp. 1358-1370.

- Wright, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16:97-159
- Wright, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28:114-138
- Wright, S. 1965. The interpretation of population structure by Fstatistics with special regard to system of mating. *Evolution, Lawrence*, v. 19, p.395-342.
- Yang et.al. 2003. Mitochondrial control region variability of baiji and the Yangtze finless porpoises, two sympatric small cetaceans in the Yangtze river. *Acta Theriologica* 48 (4): 469–483, 2003. PL ISSN 0001–7051.
- Zhang, Y. et al. 1993. Animal mitochondrial DNA polymorphism: A valuable tool for evolutionary studies. *Cell Research*, v. 3, p. 113–119.