

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS - UFAM**  
**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - ICB**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA - PPGBIOTEC**

**PADRÕES GENÉTICO-POPULACIONAIS DE “TRACAJÁ” *PODOCNEMIS UNIFILIS*  
NOS RIOS MADEIRA, MAMORÉ E GUAPORÉ**

**NAYENE DA SILVEIRA CUNHA**

**MANAUS- AM**

**2024**

**NAYENE DA SILVEIRA CUNHA**

**PADRÕES GENÉTICO-POPULACIONAIS DE “TRACAJÁ” *PODOCNEMIS UNIFILIS*  
NOS RIOS MADEIRA, MAMORÉ E GUAPORÉ**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Conservação e uso de recursos genéticos animais da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

**Orientadora: Izeni Pires Farias**

**MANAUS- AM**

**2024**

Ficha Catalográfica

Elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

---

C972p Cunha, Nayene da Silveira  
Padrões genético-populacionais de “tracajá” *Podocnemis unifilis* nos rios  
Madeira, Mamoré e Guaporé / Nayene da Silveira Cunha. - 2024.  
56 f. : il., color. ; 31 cm.

Orientador(a): Izeni Pires Farias.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Amazonas, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, Manaus, 2024.

1. Variabilidade genética. 2. Padrões de dispersão. 3. Região controle. 4.  
Fluxo gênico. 5. Barreiras geográficas. I. Farias, Izeni Pires. II.  
Universidade Federal do Amazonas. Programa de Pós-Graduação em  
Biotecnologia. III. Título

---

**NAYENE DA SILVEIRA CUNHA**

**PADRÕES GENÉTICO-POPULACIONAIS DE “TRACAJÁ” *Podocnemis unifilis* NOS RIOS MADEIRA, MAMORÉ E GUapore**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia. Linha de Pesquisa: Conservação e uso de recursos genéticos animais da Amazônia da Universidade Federal do Amazonas como parte dos requisitos para a obtenção do título de mestre.

APROVADA: 28/06/2024

**BANCA EXAMINADORA**

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** IZENI PIRES FARIA  
Data: 05/11/2025 08:06:28-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Prof(a). Dr(a). Izeni Pires Farias  
(Presidente/ Orientadora)

Documento assinado digitalmente  
**gov.br** MARIA DAS NEVES DA SILVA VIANA  
Data: 05/11/2025 18:32:01-0300  
Verifique em <https://validar.itd.gov.br>

---

Prof(a). Dr(a). Maria das Neves Viana  
(Membro)



---

Prof. Dr. José Gregorio Martínez  
(Membro)

## **DEDICATÓRIA**

*Alguns dos nossos desejos só se cumprem no outro, os pesadelos pertencem a nós mesmos.*

Milton Hatoum

## AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), sou grata a todas as aulas, a atenção e paciência dos coordenadores e professores do programa e a equipe da secretaria do curso;

À CAPES pela concessão de bolsa de estudos;

À Dra. Izeni Pires Farias pela oportunidade de orientação desde o TCC e de fazer parte de um grupo de pesquisa excepcional, obrigada por toda a paciência e compreensão que a senhora teve comigo, obrigada de coração!

Ao Dr. Tomas Hrbck pelo suporte técnico na parte da bioinformática do trabalho, desde o sequenciamento genômico até a filtragem das sequências;

À Dra. Maria das Neves da Silva Viana pelas contribuições valiosíssimas nesse trabalho, que cedeu as amostras para a realização deste estudo e de certa forma, me orientou em suas horas vagas;

À minha querida parceira de trabalho Maria Agostini, por me acompanhar desde o TCC, nos trabalhos de campos, nas etapas do laboratório, nas aulas, e até eu chegar aqui na fase de conclusão da dissertação, obrigada Guta!

Aos membros do melhor laboratório da UFAM, meus colegas do LEGAL! Obrigada Sandrita por me ajudar nas etapas das bibliotecas genômica, além de parceira de laboratório, é uma grande amiga; Obrigada Fabinho por ter me acompanhado no meu estágio na docência, mesmo por pouco tempo, mas foi importantíssimo para tirar minhas dúvidas; Obrigada Pedro Senna, Carlos Faresin, Érico Polo, William Santos, Mikaela Lima, Nasrah Hamdan, Edvaldo Mota, Valéria Machado, Larissa Emily, Mayara Kadmah, Adriano Cantuária, Ingrid Nunes, Juliana Silva, Mario, Sarah, obrigada de coração a todos que me ajudaram diretamente e indiretamente, serei sempre grata por essa equipe!

À minha família, principalmente a minha mãe Núbia Silveira pela paciência e incentivo aos meus estudos; ao meu pai Otávio Pereira (*In memoriam*) que com certeza estaria muito orgulhoso e feliz assistindo minhas conquistas; serei grata sempre aos meus tios, irmãos, sobrinhos e meus queridos avós;

Aos meus melhores amigos, Jonathan Castro, Luiz Souza, Larissa Matos, meus amigos biólogos que sempre me incentivaram a nunca desistir dos meus sonhos, obrigada por serem aquele ombro amigo nos piores e melhores momentos, serei eternamente grata, eu amo muito vocês!

## RESUMO

A espécie *Podocnemis unifilis*, conhecida popularmente como “tracajá”, pertence à família Podocnemididae, cuja sua distribuição geográfica se estende por toda a bacia Amazônica e do Orinoco. A espécie é capaz de se deslocar em grandes áreas de floresta inundada na época da cheia dos rios amazônicos, e é conhecida por desovar em diferentes tipos de habitat. Entretanto, recentes estudos têm evidenciado que fatores ambientais podem afetar sua dispersão e consequentemente a estrutura genética de suas populações. Além disso, a espécie tem sofrido um longo histórico de caça ilegal e consumo desenfreado dos seus ovos o que pode ter afetado sua diversidade genética. Alguns rios da bacia Amazônica possuem corredeiras e cachoeiras que podem funcionar como barreiras geográficas e assim limitar grupos populacionais tornando-os mais suscetíveis a fatores estocásticos e antrópicos. Este é o caso dos tracajás que ocorrem ao longo do rio Madeira, um rio que apresentava cachoeiras e corredeiras no seu alto curso. Nos últimos 15 anos este rio passou por mudanças drásticas causadas pela construção de duas hidroelétricas, Jirau e Santo Antônio, as quais causaram sérias mudanças no ambiente aquático e consequentemente afetaram diretamente a fauna aquática e semiaquática daquela região. Assim, entender os efeitos da construção dessas UHEs ao longo do tempo é de fundamental importância para se implementar medidas de conservação e manejo para as espécies afetadas. Este trabalho teve como objetivo avaliar a diversidade genética, estrutura populacional e a influência de barreiras naturais em populações de *Podocnemis unifilis* dos rios Madeira, Mamoré e Guaporé coletados antes da construção dessas UHE. Para isso utilizamos os marcadores da região controle do DNA mitocondrial, 6 loci de microssatélites e SNPs genômicos. Foram coletados indivíduos de duas localidades abaixo das cachoeiras, Manicoré e Urupiara, e três localidades acima das cachoeiras, Guará-Mirim, Pimenteiras, e Costa Marques. Foram sequenciados 52 indivíduos para a região controle do DNA mitocondrial, 42 indivíduos foram genotipados para 6 loci de microssatélites e 40 indivíduos foram sequenciados via sequenciamento de próxima geração (*Next Generation Sequencing*), para a obtenção dos SNPs com a metodologia de ddRADseq. Para cada marcador foram calculados os índices de diversidades genética. A estrutura genética foi inferida através da análise de AMOVA, comparações par a par do Fst, análise Bayesiana de estrutura populacional e análise de DAPC. Os resultados mostraram padrões diferentes de diversidade genética para os 3 marcadores: para o DNA mitocondrial, foram observados altos níveis de diversidade genética seguido dos

microssatélites, e valores mais baixos, foram observados para os SNPs. Os resultados sugerem que as corredeiras do rio Madeira/Guaporé atuaram como barreira restringindo o fluxo gênico entre as populações que estão acima e abaixo dessas estruturas geomorfológicas. Sugere-se assim duas grandes unidades de manejo para *P. unifilis*, uma acima e outra abaixo do empreendimento das UHEs. Sugere-se um monitoramento genético das populações uma vez que a amostragem deste trabalho foi realizada antes da construção das hidroelétricas de Jirau e de Santo Antônio. Ou seja, é de fundamental importância que se obtenha dados das populações atuais, pois já são quase 15 anos após o fechamento das hidroelétricas.

Palavras-Chave: Variabilidade genética, Padrões de dispersão, Região controle, SNPs, Microssatélites, Fluxo gênico, Barreiras geográficas.

## ABSTRACT

The species *Podocnemis unifilis*, popularly known as “tracajá”, belongs to the Podocnemididae family, whose geographic distribution extends throughout the Amazon and Orinoco basins. The species is capable of moving through large areas of flooded forest when Amazon rivers flood, and is known to spawn in different types of habitat. However, recent studies have shown that environmental factors can affect their dispersal and consequently the genetic structure of their populations. Furthermore, the species has suffered a long history of illegal hunting and unrestrained consumption of its eggs, which may have affected its genetic diversity. Some rivers in the Amazon basin have rapids and waterfalls that can act as geographic barriers and thus limit population groups, making them more susceptible to stochastic and anthropic factors. This is the case of the tracajás that occur along the Madeira River, a river that had waterfalls and rapids in its upper course. In the last 15 years, this river has undergone drastic changes caused by the construction of two hydroelectric plants, Jirau and Santo Antônio, which caused serious changes in the aquatic environment and consequently directly affected the aquatic and semi-aquatic fauna of that region. Therefore, understanding the effects of the construction of these HPPs over time is of fundamental importance to implement conservation and management measures for the affected species. This work aimed to evaluate genetic diversity, population structure and the influence of natural barriers on populations of *Podocnemis unifilis* from the Madeira, Mamoré and Guaporé rivers collected before the construction of these HPPs. To do this, we used markers for the control region of mitochondrial DNA, 6 microsatellite loci and genomic SNPs. Individuals were collected from two locations below the waterfalls, Manicoré and Urupiara, and three locations above the waterfalls, Guajará-Mirim, Pimenteiras, and Costa Marques. 52 individuals were sequenced for the control region of mitochondrial DNA, 42 individuals were genotyped for 6 microsatellite loci and 40 individuals were sequenced via Next Generation Sequencing, to obtain SNPs with the ddRADseq methodology. For each marker, genetic diversity indicators were calculated. Genetic structure was inferred through AMOVA analysis, pairwise comparisons of Fst, Bayesian analysis of population structure and DAPC analysis. The results showed different patterns of genetic diversity for the 3 markers: for mitochondrial DNA, high levels of genetic diversity were observed followed by microsatellites, and lower values were observed for SNPs. The results suggest that the rapids of the Madeira/Guaporé River acted as a barrier restricting gene

flow between populations above and below these geomorphological structures. Therefore, two large management units for *P. unifilis* are suggested, one above and one below the HPP development. Genetic monitoring of populations is suggested since the sampling in this work was carried out before the construction of the Jirau and Santo Antônio hydroelectric plants. In other words, it is of fundamental importance to obtain data on current populations, as it is almost 15 years after the closure of the hydroelectric plants.

**Keywords:** Genetic variability, Dispersal patterns, Control region, SNPs, Microsatellites, Gene flow, Geographic barriers.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Os códigos das localidades serão usados ao longo do trabalho.	.....	25
Tabela 2: Índices de diversidade genética das populações de <i>P. unifilis</i> para o marcador da região controle do DNA mitocondrial.	.....	33
Tabela 3: Índices de diversidade genética das populações de <i>P. unifilis</i> para os seis loci de marcadores de microssatélites.....	.....	34
Tabela 4: Índices de diversidade genética das populações de <i>P. unifilis</i> para os marcadores genômicos de SNPs nucleares	.....	35
Tabela 5: Análise de Variância Molecular entre localidades de Manicoré, Guajará-Mirim, Costa Marques e Pimenteiras.	.....	36
Tabela 6: Matriz dos valores de Fst nas comparações par a par entre as populações de <i>P. unifilis</i> a partir dos dados mitocondriais ( <i>D-loop</i> ). ....	.....	36
Tabela 7: Matriz dos valores de Fst nas comparações par a par entre as populações de <i>P. unifilis</i> a partir dos dados microssátelites.	.....	37

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Mapa global de riqueza de espécies para todas as tartarugas e tartarugas de água doce.....	11
Figura 2: Mapa de extensão de ocorrência da espécie <i>Podocnemis unifilis</i> incluindo os países.....	11
Figura 3: Detalhe da cabeça de um macho adulto de <i>Podocnemis unifilis</i> (esquerda) e Fêmea adulta (direita).....	12
Figura 4: A usina hidrelétrica de Santo Antônio, no Rio Madeira, fica a 7 km de Porto Velho (esquerda) e A usina hidrelétrica de Jirau (direita) – Margem esquerda .....	14
Figura 5: Esquema do DNA mitocondrial. ....	17
Figura 6: Um SNP ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único. ....	18
Figura 7: Representação esquemática de microssatélites.....	19
Figura 8: Locais de amostragem de <i>Podocnemis unifilis</i> utilizados neste estudo .....	24
Figura 9: Coleta de sangue pela veia caudal. ....	29
Figura 10: Reconstrução filogenética das sequências através do método de Neighbor-Joining.....	32
Figura 11: Resultados da análise no programa STRUCTURE para os dados de microssatélites.....	38
Figura 12: Resultados da análise no programa STRUCTURE para os dados dos marcadores SNPs. ....	38
Figura 13: Resultados das análises de PCA para os dados dos marcadores microssatélites....	39
Figura 14: Resultados da análise no programa STRUCTURE para os dados dos marcadores SNPs. ....	40

## SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	14
1.2	Cachoeiras e corredeiras do Rio Madeira	17
1.3	Genética e genômica	19
2.	JUSTIFICATIVA	24
3.	OBJETIVOS	26
3.2	Objetivos específicos:	26
4.	MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1	Área de estudo	27
4.2	Amostragem	27
4.3	Coleta de dados	29
4.3.2	DNA mitocondrial	30
4.3.3	DNA genômico	31
4.4	ANÁLISE DE DADOS	32
4.4.1	DNA mitocondrial	32
4.4.2.	Marcadores nucleares microssatélites e SNPs	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
5.1	Diversidade genética	35
5.2	Estrutura populacional	40
6.	CONCLUSÕES	46
7.	REFERÊNCIAS	46

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Características gerais e biologia da espécie *Podocnemis unifilis*

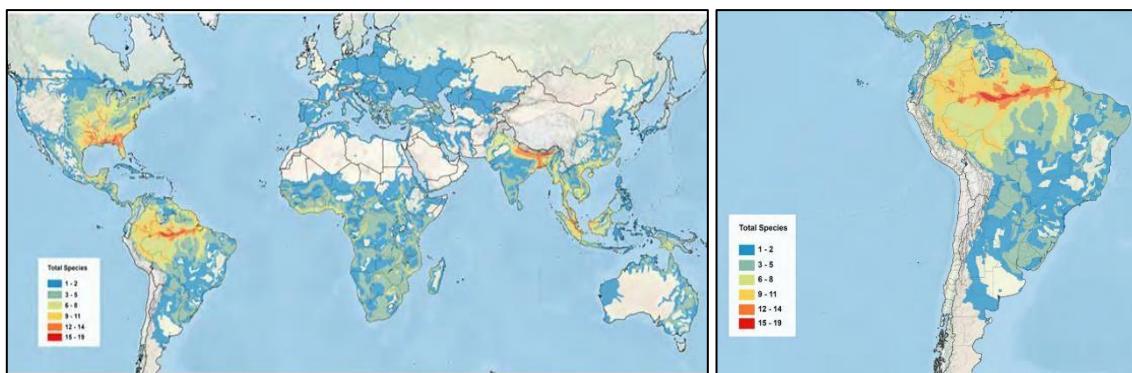
As tartarugas são animais que apresentam vida longa e uma história evolutiva bem-sucedida (Ernst e Barbour, 1989; Gaffney, 1990; Krenz, 2005), são um dos animais mais distintos da terra, que essencialmente ao longo de aproximadamente 220 milhões de anos, permaneceram com o mesmo plano corporal (Stanford *et al.*, 2020; Villamarín *et al.*, 2021). Sua linhagem teve milhões de anos de adaptações evolutivas que favoreceram para o sucesso desse grupo nos diferentes ecossistemas, por exemplo no meio terrestre, de água doce e marinho. As tartarugas apresentaram especializações morfológicas, ecológicas e comportamentais que lhes permitiram se alimentar e se reproduzir em diferentes habitats (Moll e Moll, 2004; Villamarín *et al.*, 2021), o que levou a uma grande diversificação das espécies tanto no ambiente marinho quanto de água doce (Figura 1, TTWG *et al.*, 2017).

As carapaças das tartarugas de água doce são mais macias e planas em relação às espécies de tartarugas terrestres, que é uma característica que melhora sua hidrodinâmica diminuindo o arrasto. Além disso, o pescoço das tartarugas de água doce é fundido ao corpo por um tecido conjuntivo espesso, uma adaptação que contribui para sua capacidade de nadar (Villamarín *et al.*, 2021).

Existem atualmente 360 espécies de quelônios e cerca de 80% habitam em ecossistemas de água doce. Essas espécies se encontram ameaçadas especialmente devido ao alto consumo ilegal de seus ovos e carne e seu uso cultural na medicina tradicional (Rhodin *et al.*, 2018; Villamarín *et al.*, 2021). Infelizmente, na bacia Amazônica essa prática é bem comum e diante dessa situação, torna-se mais necessário o auxílio das unidades de conservação para essas ações que acabam resultando em populações esgotadas em toda a gama de espécies (Villamarín *et al.*, 2021).

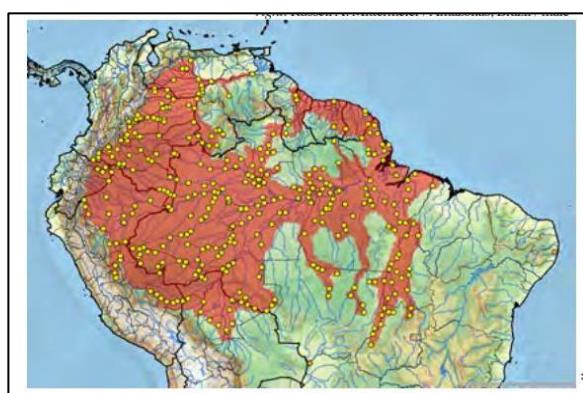
Os representantes da classe Reptilia e da ordem Testudines, estão entre os vertebrados mais ameaçados no mundo. Por certo, de acordo com a Lista Vermelha de Espécies Ameaçadas da União Internacional para a Conservação da Natureza (IUCN), o maior número das espécies pertencentes a essa ordem se encontra em situação de ameaça, com apenas 18% sendo concedida à categoria de “menor preocupação”.

A espécie *Podocnemis unifilis* é pertencente à família Podocnemididae, podendo ser encontrada na Bacia do rio Amazonas e Orinoco (Ataídes, 2009), conhecida popularmente como tracajá, se encontra distribuída em vários países da América do Sul e atualmente se encontra classificada como vulnerável (IUCN, 2016; García-Martín *et al.*, 2021), e listada no Anexo II da Convenção sobre Comércio Internacional de Espécies Ameaçadas de Fauna e Flora (Cites, 2020; García-Martín *et al.*, 2021).



**Figura 1.** Mapa global de riqueza de espécies para todas as tartarugas e tartarugas de água doce **Fonte:** TTWG *et al.*, 2017.

A *Podocnemis unifilis* (tracajá) é uma espécie que apresenta grande distribuição geográfica ocorrendo em países como Colômbia, Venezuela, Peru, Equador, Bolívia, Guiana, Guiana Francesa, Suriname, e sua distribuição no Brasil abrange os sistemas hidrográficos da bacia Amazônica e bacia do rio Orinoco (Figura 2, TTGW *et al.*, 2021).



**Figura 2.** Extensão de ocorrência de *Podocnemis unifilis* incluindo países como a Bolívia (Beni, Cochabamba, La Paz, Pando, Santa Cruz), Brasil (Acre, Amapá, Amazonas, Goiás, Mato Grosso, Maranhão, Pará, Rondônia, Roraima, Tocantins), Colômbia (Amazonas, Arauca, Caquetá, Casanare, Guainía, Meta, Putumayo, Vaupés, Vichada), Equador, Guiana Francesa, Guiana, Peru (Huanuco, Loreto, Madre de Dios, Pasco, Ucayali),

Suriname, Venezuela (Amazonas, Anzoátegui, Apure, Barinas, Bolívar, Cojedes, Delta Amacuro, Guárico, Monagas) **Fonte:** TTWG *et al.*, 2021.

O período de desova dessa espécie varia fortemente de acordo com o local e com o ciclo hidrológico anual. Uma característica fortemente observada é sua plasticidade na escolha dos locais de desova, por exemplo, em barrancos, praias, bancos de argila, ou seja, é uma espécie generalista em relação ao seu habitat, e diferentemente das outras espécies, essa escolha para o local de desova costuma ser muito mais especializado (Erickson *et al.*, 2020; Ferrara *et al.*, 2017). Quanto a morfologia da espécie, a coloração da cabeça em filhotes e machos adultos apresentam manchas amarelas alaranjadas, no entanto nas fêmeas essa coloração é perdida na fase adulta, ganhando uma coloração marrom escura (Figura 3). O comprimento retilíneo da carapaça das fêmeas maduras é maior do que os machos, e os machos possuem uma cauda mais larga e comprida (Ferrara *et al.*, 2017).



**Figura 3.** Detalhe da cabeça de um macho adulto de *Podocnemis unifilis* (esquerda) e Fêmea adulta (direita). Foto: Nayene Silveira (2022).

A Amazônia apresenta uma imensa biodiversidade que abriga muitas espécies de vertebrados terrestres e aquáticos. No entanto, a pressão antrópica sobre as espécies de quelônios amazônicos vem aumentando, e nos últimos anos, foi apontado problemas na manutenção dessas populações naturais, que ocorre em decorrência de queimadas, desmatamentos, poluição das águas, expansão das atividades agropecuárias, construções de empreendimentos hidrelétricos e a exploração desordenada para abastecer o comércio ilegal (Rodrigues, 2005; Alho *et al.*, 2015; Ataídes *et al.*, 2021; Agostini *et al.*, 2022).

Como o patrimônio cultural da bacia amazônica valoriza as tartarugas em toda a região, há uma grande demanda pelas famílias ribeirinhas para a obtenção por carne e ovos como fonte de alimento que são itens de sobrevivência (Villamarín *et al.*, 2021), o tracajá se destaca como uma das espécies mais consumidas em toda a Amazônia (Ferrara *et al.*, 2017). O Brasil no ano de 2017, deu os primeiros passos para o manejo de tartarugas com a criação de condições legais que permitem iniciativas de manejo comunitário de tartarugas para duas das espécies mais importantes e as mais predadas, *Podocnemis expansa* (Tartaruga-da-Amazônia) e *Podocnemis unifilis* (Tracajá), dessa forma promovendo a conservação e ao mesmo tempo auxiliando famílias que necessitam desse recurso (Villamarín *et al.*, 2021).

Compreender as respostas às atividades antrópicas e os impactos gerados por todas essas atividades que atingem a espécie *P. unifilis*, como por exemplo a mudança no habitat, local de alimentação, reprodução, e migração ao longo de toda a Bacia Amazônica, torna-se necessário para determinar o status de conservação (Da Silva, 2019).

## **1.2 Cachoeiras e corredeiras do Rio Madeira**

Barreiras à dispersão de espécies e populações na Amazônia têm sido associadas a quebras geológicas nos escudos cristalinos do Brasil Central e das Guianas, promovendo a criação de trechos de fortes corredeiras e importantes cachoeiras em grandes afluentes do rio Amazonas que drenam para a bacia sedimentar, marcando paisagens distintas, e facilitando a especiação (Ayres, 1995; Queiroz *et al.*, 2013); a bacia do rio Madeira é um exemplo clássico deste tipo de ambiente. A bacia do Rio Madeira corresponde a 20% da Bacia Amazônica, e é a maior desse complexo, abrangendo uma parte do Peru e Bolívia. O rio Madeira se destaca por ser um grande tributário em descarga líquida e sólida da bacia do Amazonas (Latrubesse *et al.*, 2005; Vieira, 2015). Os afluentes principais possuem origem andina (Goulding *et al.*, 2003; Vieira, 2015), na região de convergência dos rios Beni e Mamoré-Guaporé para estruturar o rio Madeira, e em seu tramo inicial até Porto Velho, o rio percorre sobre um vale encaixado pontuado por afloramentos cristalinos que derivaram na formação de 19 sequências de corredeiras, com um desnível total de aproximadamente 70m entre Guajará-Mirim, no rio Mamoré, e Porto Velho (Cella-Ribeiro *et al.*, 2013; Tizuka, 2013; Vieira, 2015).

Rios com cachoeiras e corredeiras, como as do alto rio Madeira, são importantes estruturas geomorfológicas para a construção de usinas hidrelétricas (UHE); estas usinas estão intimamente relacionadas a matriz energética brasileira, entretanto sua construção provoca mudanças significativas nos corpos hídricos e afetam diretamente o comportamento das

espécies aquáticas e semiaquáticas como as do gênero *Podocnemis* (Souza *et al.*, 2016; Da Silva, 2019).

As construções das usinas hidrelétricas do alto rio Madeira (Jirau e Santo Antônio, Figura 4), como várias outras, apresentam a finalidade de gerar mais energia e também um aumento na geração de empregos, porém isso vem causando distúrbios ambientais principalmente aqueles relacionados à utilização dos recursos aquáticos. (Doria *et al.*, 2018).



**Figura 4.** A usina hidrelétrica de Santo Antônio, no Rio Madeira, fica a 7 km de Porto Velho (esquerda) e A usina hidrelétrica de Jirau (direita) – Margem esquerda. Jaci Paraná, Porto Velho. Fonte: 1 Nacional Geographic Brasil; 2 Jirau Energia.

Antes da construção dessas hidrelétricas existiam 19 cachoeiras/corredeiras entre o alto e médio rio Madeira, sendo esta região muito importante do ponto de vista biogeográfico para a Amazônia como um todo. Cachoeiras e corredeiras podem funcionar como barreiras biogeográficas para o movimento dos organismos aquáticos e desta forma serem importantes agentes de especiação alopátrica. O rio Madeira é um dos rios da bacia amazônica que tem sido objeto de vários estudos evidenciando que tais estruturas geomorfológicas podem funcionar como barreiras físicas as quais podem interromper ou interferir no movimento dos vertebrados aquáticos (Rahel, 2007; Farias *et al.*, 2010; Torrente-Vilara *et al.*, 2011). Estudos têm sugerido que esta região pode funcionar como uma área de contato ou hibridização entre espécies diferentes. Um dos estudos realizado com a espécie de boto *Inia boliviensis*, por exemplo, evidenciou que a espécie apresenta dois grupos populacionais geneticamente diferentes acima e abaixo das corredeiras do alto rio Madeira, entre os quais se mantém uma conexão por fluxo gênico restrito unidirecional (Gravena *et al.*, 2014) evidenciando uma área de hibridização com a espécie *Inia geoffrensis*. Padrão semelhante foi observado com duas espécies de jacarés, *Caiman crocodilus* e *Caiman yacare*, onde foi evidenciado compartilhamento de haplótipos de genes nucleares e mitocondriais mostrando que o trecho de corredeiras/corredeiras também pode funcionar como uma zona de contato secundário seguido de hibridização entre as duas

espécies (Hrbek *et al.* 2008). Porém, para outros organismos as corredeiras do alto rio Madeira não formam uma barreira efetiva mas sim parcial, evidenciando fluxo gênico restrito para as populações do tambaqui (*Colossoma macropomum*) e para o bagre *Pseudoplatystoma punctifer* (Farias *et al.* 2010; Machado, 2013, respectivamente).

Para os padrões amazônicos, a diversidade de espécies de quelônios dentro e ao longo do rio Madeira tem sido considerada alta (Keller *et al.*, 2016). Por outro lado, Vogt e colaboradores (2007) concluíram que há uma abundância geralmente baixa de quelônios na região do médio Madeira. Em um trabalho de levantamento de fauna de quelônios, Keller e colaboradores (2016) confirmaram a ocorrência atual de *P. expansa* e *P. unifilis* no alto rio Madeira, ambas imediatamente a jusante das primeiras corredeiras e entre as corredeiras. Levantamentos quantitativos na mesma área de estudo confirmaram a presença de ambas as espécies (Keller *et al.* 2013), bem como a homogeneidade genética de *P. expansa* (Vieira, 2015) entre todas as corredeiras no trecho ao longo de 110 km do rio. Esse resultado nos mostra que as corredeiras provavelmente não atuam como barreira impermeável para as espécies (Keller *et al.*, 2016). *P. expansa* e *P. unifilis* ocorrem nas seções entre as cachoeiras do alto Madeira. A espécie *P. unifilis* foi registrada em praias de nidificação no baixo Madeira e seus afluentes (Andrade *et al.*, 2011), e como um item de consumo preferencial nas comunidades locais (Vogt *et al.* 2007; Nusec/Ufam 2014a, 2014b; (Keller *et al.*, 2016).

Infelizmente há uma escassez de estudos sobre os quelônios do rio Madeira, principalmente sobre os aspectos genéticos. Por isso, por serem um importante recurso natural, e por estarem em uma área onde as ações antrópicas são muitas, as pesquisas de genética populacional de quelônios do gênero *Podocnemis* são relevantes para se compreender a estrutura genética e a influência das barreiras naturais, ou não, em suas populações.

### **1.3 Genética e genômica**

Na última década, os avanços dos métodos moleculares permitiram a utilização de dados genéticos em estudos de processos populacionais e de questões ecológicas com mais eficiência (Selkoe e Toonen, 2006). A genética da conservação emerge como ferramenta essencial, decifrando processos genéticos e evolutivos, delineando padrões cruciais para o manejo de populações ameaçadas e preservando espécies como entidades dinâmicas (Frankham *et al.*, 2004). O estudo da estrutura populacional usando técnicas moleculares é crucial para a genética

da conservação. Essa abordagem é valiosa ao analisar populações comercialmente exploradas e espécies ameaçadas de extinção (Frankham *et al.*, 2004).

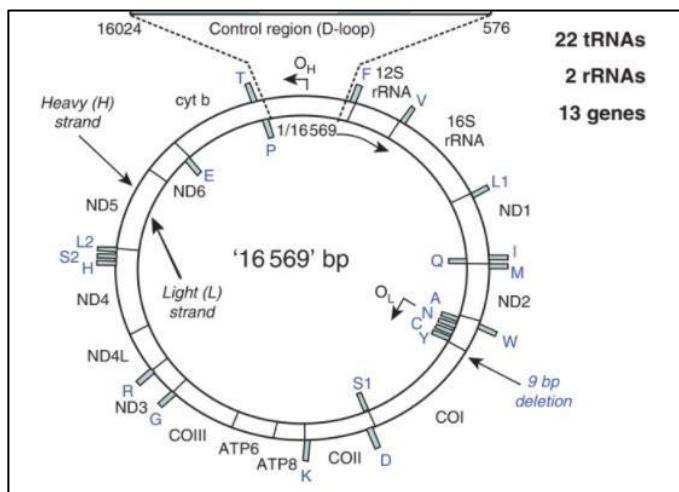
A identificação de populações, resolução da estrutura populacional, definição de unidades de conservação, quantificação da depressão por endogamia, tamanho efetivo populacional, tamanho mínimo viável, níveis de variação genética e fluxo gênico em populações naturais, entre outros, oferecem medidas específicas e comparáveis dos processos que afetam as populações, permitindo compreender os efeitos das forças que geram mudanças evolutivas ao longo do tempo (DeSalle e Amato, 2004).

No manejo e restauração de populações, preservar a diversidade adaptativa ao longo da distribuição geográfica é crucial, dependendo do grau e natureza das perturbações recentes. Recomendações precisam ser baseadas em amostragem adequada e análises apropriadas (Crandall *et al.*, 2000).

A variabilidade gênica é a matéria bruta de pesquisas em biodiversidade molecular, e é a mesma que está envolvida na evolução das espécies; é esta que permite a comparação entre indivíduos, populações ou espécies diferentes. Então, dependendo das questões abordadas no estudo, o nível da variabilidade a ser acessada é o que determina a escolha do método a ser usado em cada abordagem, ou seja, o marcador molecular escolhido será aquele que acessará o nível de divergência que se deseja estudar. Por exemplo, marcadores moleculares mitocondriais (região controle) e nucleares (locos microssatélites) são bastante polimórficos sendo muito úteis para estudos de indivíduos, relacionamentos e populações (Solé-Cava e Cunha, 2012). Diversos marcadores moleculares são empregados para esse fim, sendo fragmentos de DNA capazes de distinguir indivíduos, os quais são herdados geneticamente e prontamente identificáveis no genoma. Esses marcadores fornecem dados sobre o polimorfismo de um local específico e podem derivar tanto do DNA mitocondrial (mtDNA) quanto do DNA nuclear (nDNA) (Rangel, 2015).

O DNA mitocondrial (Figura 5) tem muitas características que o tornam especialmente valioso para certas aplicações em estudos de padrões de variação genética (Allendorf e Luikart, 2007). O DNA mitocondrial é uma importante ferramenta para estudos da diversidade genética. Na maioria das espécies, a mitocôndria possui uma pequena molécula de DNA circular que é de herança maternal (da mãe para a prole). Uma vez que existem muitas mitocôndrias por célula, o DNAm<sub>mt</sub> é relativamente abundante e é de fácil isolamento. A detecção da diversidade genética nesse DNA ocorre através de diversos métodos (Frankham *et al.*, 2008). É composto por uma molécula de DNA circular, pequena, fita dupla e ocorre em inúmeras cópias na mitocôndria. Seu tamanho em animais é relativamente estável, em torno de 16 – 21 Kilobase

(Kb) (Ray e Densmore, 2002). Sua organização inclui 13 genes codificadores de proteína, que no genoma representa 90%, sendo 22 RNAs de transferência (tRNA), 2 de RNAs ribossômicos (12S e 16S tRNA) e uma região controle ou alça-D (D-loop) que é uma região não codificadora (Brown *et al.*, 1979; Avise, 1986; Rangel, 2015). Esta região é responsável por toda a regulação e transcrição mitocondrial, possuindo altas taxas de mutação, sendo bastante utilizada em estudos intraespecíficos de vários grupos biológicos (Stewart e Barker, 1994; Starkey *et al.*, 2003).



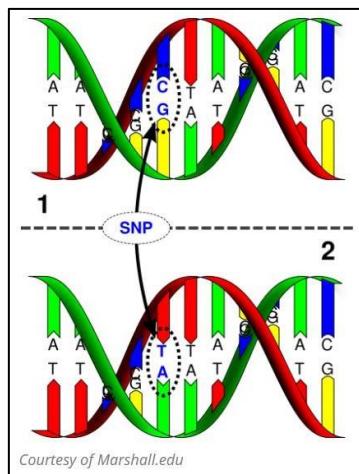
**Figura 5.** Esquema do DNA mitocondrial. Fonte: Butler, 2005.

O estudo da herança materna refletirá hipóteses que podem gerar dados de filogenia das fêmeas de uma população para verificar por exemplo, a movimentação de fêmeas em populações naturais de uma determinada espécie (Lasman *et al.*, 1981; Avise *et al.*, 1954). A utilização da região do DNA mitocondrial que possui altas taxas de mutação permite inferir relações filogenéticas entre populações ou verificar espécies com tempos de divergência relativamente recentes entre milhares e alguns milhões de anos (Brown *et al.*, 1979).

Além das abordagens tradicionais, avanços na tecnologia genômica, como o sequenciamento de alto rendimento, viabilizaram a adoção eficaz de novos marcadores moleculares, particularmente os *SNPs* (*Polimorfismos de Nucleotídeo Único*), para detecção ágil da variabilidade genética (Desalle e Amato, 2004). A genômica da conservação surge como uma ferramenta inovadora que, por meio de numerosos marcadores moleculares, possibilita explorar detalhadamente questões cruciais de conservação em nível populacional. Limitações anteriores em marcadores e informações genéticas são superadas (Allendorf *et al.*, 2010; Catchen *et al.*, 2013a).

Um SNP refere-se à alteração de uma base no DNA. Embora as quatro bases possam ocorrer nessa posição, na prática os SNPs são bialélicos, indicando duas opções de nucleotídeos.

Para ser classificado como SNP, a posição deve ter o alelo menos comum presente em pelo menos 1% da população. Sua evolução ocorre por meio de modelos de mutação simples, como o modelo de sítios infinitos. Devido à origem na substituição de nucleotídeos, estima-se que a taxa de mutação varie entre  $1 \times 10^{-9}$  e  $5 \times 10^{-9}$  por nucleotídeo por ano, especialmente em posições neutras em mamíferos (Vignal *et al.*, 2002).



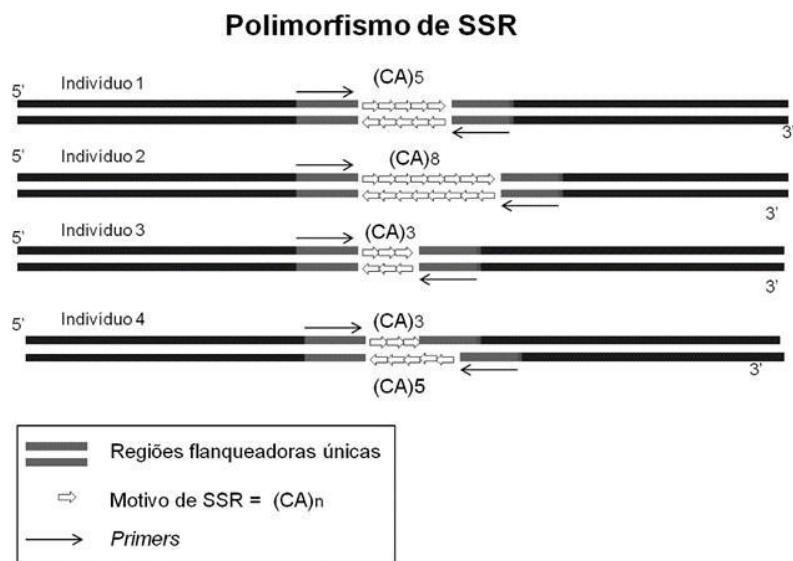
**Figura 6.** Um SNP, ou Polimorfismo de Nucleotídeo Único, é uma alteração em um ponto específico da sequência de DNA, sendo considerado como tal se estiver presente em pelo menos 1% da população. Caso contrário, é classificado como uma simples mutação.

Os SNPs, formas comuns de variação genética, encontram-se amplamente no genoma, permitindo o estudo eficaz da herança genômica devido à sua alta densidade. O método econômico de identificação envolve o rastreamento de pequenos segmentos genômicos adjacentes a sítios de enzimas de restrição, conhecidos como RADs (Restriction-Site Associated DNA). Desenvolvidos para amostragem eficiente, esses RADs possibilitam a descoberta de milhares de SNPs, tornando a genotipagem de populações altamente produtiva (Baird *et al.*, 2008). O ddRADseq (double digest RAD sequencing) é altamente eficaz, envolvendo a geração de bibliotecas genômicas com fragmentos obtidos por digestão usando duas enzimas de restrição. Esses fragmentos, dentro de uma faixa de tamanho específica, são sequenciados posteriormente por Next Generation Sequencing (NGS) (Peterson *et al.*, 2012).

A genômica de populações, ao empregar RADs e genotipagem por sequenciamento, oferece uma abordagem sem precedentes para questões em genética, ecologia e evolução, incluindo identificação de paternidade, migração, estrutura populacional, filogeografia, reconstrução filogenética, detecção de seleção e adaptação molecular, com potência e precisão excepcionais (Morin *et al.*, 2004; Catchen *et al.*, 2013b).

Outro marcador molecular eficaz são os microssatélites, também chamados de SSR (Simple Sequence Repeats), são unidades curtas repetidas em tandem no DNA (2 a 5 pb). Para

obtê-los como marcadores, é necessário amplificar os microssatélites via PCR, usando primers específicos (geralmente de 20 a 25 pb) para regiões que flanqueiam os microssatélites. O processo inclui desenvolvimento de primers específicos para a espécie, construção de bibliotecas genômicas, seleção e sequenciamento dos clones positivos. Em alguns casos, esses primers podem ser usados para obter marcadores microssatélites em espécies geneticamente relacionadas (Faleiro *et al.*, 2003d).



**Figura 7.** Na representação esquemática é possível identificar os polimorfismos individuais relacionados ao número de repetições do SSR para aquele indivíduo. A projeção de primers para amplificação por PCR em região flankeadora única permite a identificação das diferenças nos números de repetição do SSR encontrado em cada indivíduo. Indivíduos 1 - 3 são homozigotos e indivíduo 4 é um heterozigoto.

Os marcadores microssatélites, altamente polimórficos devido à variação no número de repetições, são detectados facilmente por PCR, utilizando regiões flankeadoras. Amplamente utilizados devido a sua herança codominante, cobertura ampla e abundância no genoma, esses marcadores oferecem alta reprodutibilidade, conteúdo informativo multialélico e facilidade de genotipagem. Sua capacidade de distinguir indivíduos próximos geneticamente torna-os amplamente aplicáveis em diversas áreas da biologia molecular (Turcheto-Zolet *et al.*, 2017). Esses marcadores são fundamentais em análises genéticas, distinguindo uma variedade de organismos por métodos moleculares. Sua ampla aplicabilidade permite responder várias questões biológicas. Avanços notáveis têm sido feitos na identificação e genotipagem desses marcadores, especialmente com o auxílio de genomas completos e avanços em bioinformática (Turcheto-Zolet *et al.*, 2017).

Estimativas de estrutura populacional procuram entender a organização genética dentro de uma espécie, revelando o fluxo gênico e diferenciação genética entre populações. Os

marcadores SSR são frequentemente empregados para este fim, sendo essenciais para estratégias de conservação, bem como para compreender a biologia reprodutiva e ecologia das espécies. Logo, diversos motivos podem estar influenciando na estrutura genética das populações como, sistema de acasalamento, processos históricos, barreiras ambientais e principalmente, a ação antrópica (Turcheto-Zolet *et al.*, 2017).

Dessa forma, a utilização de diversos marcadores moleculares e métodos analíticos complementares é crucial para identificar sinais temporais variados nos dados genéticos, reforçando os resultados e quantificando a intensidade de cada sinal (Pearse *et al.*, 2006).

## 2. JUSTIFICATIVA

Marcadores moleculares como os do genoma mitocondrial e microssatélites têm sido utilizados para elaborar estratégias de conservação para espécies do gênero *Podocnemis*, para compreender a dinâmica populacional e características do sistema reprodutivo, variabilidade genética, fluxo gênico e estrutura populacional nas espécies deste grupo (Sites *et al.*, 1999; Valenzuela, 2000; Santos *et al.*, 2016; Viana *et al.*, 2017; Oliveira *et al.*, 2019).

A principal ideia para o estudo da biologia da conservação é a manutenção da diversidade genética pois através desse foco é possível fornecer o potencial adaptativo/evolutivo de uma determinada espécie, ressaltando a importância de ter conhecimento da composição genética do indivíduo e de como ela está estruturada em suas populações a fim de elaborar ações de manejo e conservação. Contudo é importante compreender se a estruturação genética encontrada é uma característica natural da espécie estudada ou é resultado da presença de barreiras físicas causadas pelo homem (como no caso de fragmentação do habitat) (Frankham *et al.*, 2008).

Sendo assim, para ter uma visão mais completa da dinâmica e distribuição da diversidade genética da espécie *Podocnemis unifilis* é importante analisarmos os padrões genéticos de suas populações usando marcadores moleculares. Neste momento, o foco será as populações ao longo do rio Madeira, Mamoré e Guaporé onde será testado se as cachoeiras e corredeiras funcionam, ou funcionaram, como barreiras nas populações naturais desta espécie. Sendo um animal semiaquático, o tracajá apresenta muitas particularidades, e uma delas é que essa espécie apresenta uma grande capacidade de mobilidade por terra (Ferrara *et al.*, 2017). Mesmo que as duas cachoeiras de Jirau e Santo Antônio tenham sido construídas há mais de 10 anos, e considerando que o tempo de geração dos quelônios do gênero *Podocnemis* pode estar ao redor de 10 anos (Páez *et al.* 2015), espera-se que o padrão genético-populacional observado

ainda seja um reflexo do cenário antes da construção das duas hidrelétricas. Conhecer esse padrão é importante para a elaboração de planos de conservação e monitoramento para a espécie. Com isso, será analisada a região *D-Loop* do DNA mitocondrial, marcadores microssatélites e SNPs nucleares com uma abordagem comparativa para se determinar os padrões-genéticos populacionais de *Podocnemis unifilis*.

### **3. OBJETIVOS**

**3.1 Objetivo geral:** Avaliar a diversidade genética, estrutura populacional e a influência de barreiras naturais em populações de *Podocnemis unifilis* dos rios Madeira, Mamoré e Guaporé utilizando a região controle do DNA mitocondrial, microssatélites e SNPs.

#### **3.2 Objetivos específicos:**

- Estimar os níveis de variabilidade genética de *P. unifilis*;
- Verificar a ocorrência de populações geneticamente estruturadas;
- Testar o efeito das cachoeiras e corredeiras como barreiras ao fluxo gênico ao longo dos rios Madeira, Mamoré e Guaporé.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Área de estudo

Na Amazônia, o rio Madeira destaca-se como uma das principais barreiras geográficas, delineando áreas de endemismo (Capparella, 1987; Cohn-Haft, 2000; Cracraft; Prum, 1988; Haffer, 1997). Cobrindo 20% da Bacia Amazônica, o rio Madeira estende-se por aproximadamente 1400 km dentro do Brasil (Goulding; Barthem; Ferreira, 2003).

A formação da bacia do rio Madeira ocorre pela junção de quatro rios de grande porte: Guaporé, Mamoré, Beni e Madre de Dios (Bourrel; Phillips; Moreau, 2009; Goulding; Barthem; Ferreira, 2003). O percurso do rio Madeira é dividido em duas partes distintas: o trecho superior, que inclui os rios Mamoré e Beni, bem como uma área com corredeiras a partir da cidade de Guajará-Mirim (RO) até a cachoeira Santo Antônio; e o trecho inferior, que vai da cachoeira Santo Antônio até onde o rio deságua no rio Amazonas. Ao longo dos rios Mamoré e Guaporé-Iténez, aproximadamente 1000 km das águas do rio Madeira são compartilhados pelo Brasil e Bolívia (Goulding; Barthem; Ferreira, 2003).

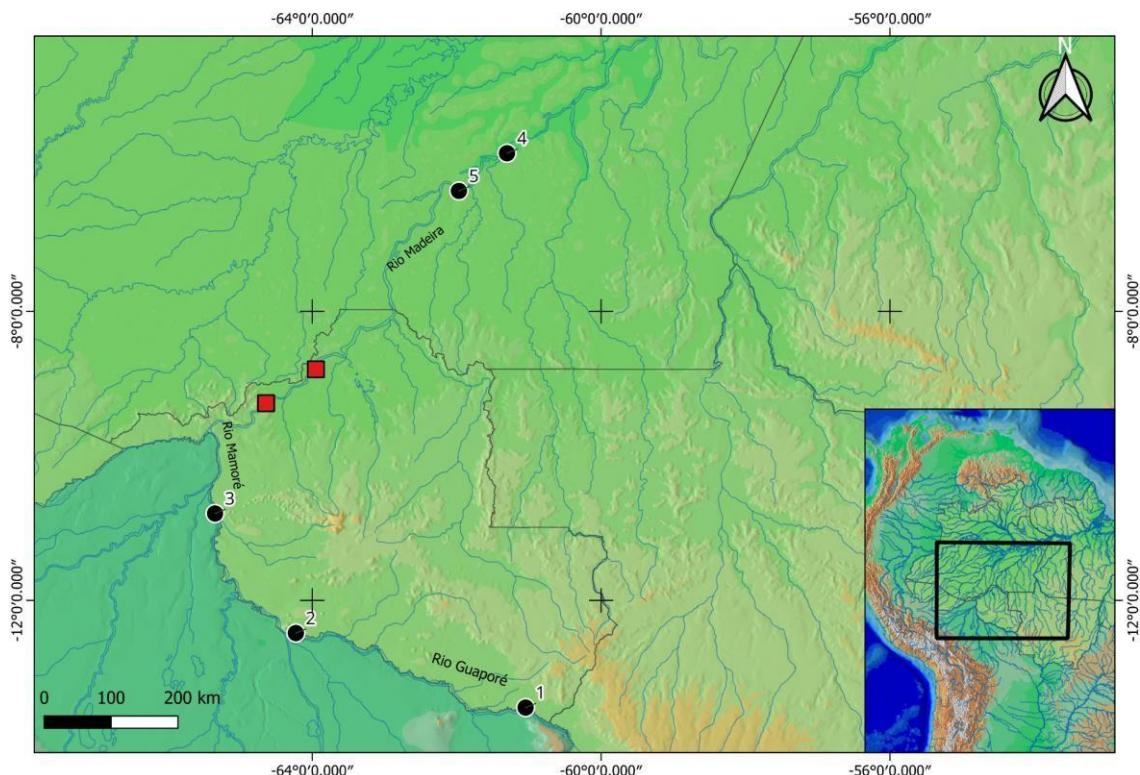
Nascendo da junção do rio Chapare e do rio Mamorecillo, na Bolívia, o rio Mamoré é considerado o quarto maior afluente da bacia Amazônica (Goulding; Barthem; Ferreira, 2003). Com cerca de 2000 km de extensão, o rio Mamoré se une ao rio Beni, formando o rio Madeira no município de Nova Mamoré (RO). Entre os afluentes do rio Mamoré, o rio Guaporé se destaca pela sua abundante diversidade biológica e é popular para a pesca esportiva. O rio Guaporé tem aproximadamente 1400 km de comprimento e atravessa os estados de Mato Grosso e Rondônia no Brasil (Souza, 2017).

### 4.2 Amostragem

Estamos utilizando amostras de tecidos e DNA de *P. unifilis* de 05 localidades em diferentes rios na bacia amazônica brasileira (Fig. 8), tombados na Coleção de Tecido e Genética Animal – Quelônios (CTGA-Q) dos Laboratórios de Evolução e Genética Animal (LEGAL) e Bioquímica Molecular, ambos da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em Manaus, Estado do Amazonas, Brasil. As amostras de DNA são provenientes de tecidos coletados entre 2001 e 2022 por diferentes grupos de pesquisadores de campo, amostrados nos

seguintes pontos do mapa: **Pimenteiras** - Guaporé/São Francisco (Ecovale)-, **Costa Marques**, **Guajará-Mirim**, **Manicoré** e **Urupiara** - Comunidade Cristo Rei/Humaitá-.

Para gerar as sequências de mtDNA foram usadas 52 amostras e para os microssatélites, 42 indivíduos foram genotipados, para esses dois marcadores foram incluídas amostras de **Pimenteiras** - Guaporé/São Francisco (Ecovale) -, **Costa Marques**, **Guajará-Mirim** e **Manicoré**. Para o desenvolvimento dos SNPs, 40 indivíduos foram sequenciados via sequenciamento de próxima geração e para esse marcador foram incluídas amostras de **Pimenteiras** - Guaporé/São Francisco (Ecovale) -, **Costa Marques**, **Guajará-Mirim**, **Manicoré** e **Urupiara** - Comunidade Cristo Rei/Humaitá - (Tabela 2 e Figura 5).



**Figura 8.** Locais de amostragem de *Podocnemis unifilis* utilizados neste estudo(representados pelos pontos na cor preta); e as usinas hidrelétrica de Santo Antônio e Jirau (representados pelos dois quadrados na cor vermelha). Nota: a numeração das localidades na figura segue a lista da Tabela 1.

Código	Grupo	localização	Estado
1	GuapPime	Guaporé/Pimenteiras/São Francisco (Ecovale)	Rondônia
2	GuapCost	Costa Marques	Rondônia
3	MamoGuaj	Guajará-Mirim	Amazonas
4	MadeMani	Manicoré	Amazonas
5	MadeUrua	Comunidade Cristo Rei/Uruapiara/Humaitá	Amazonas

**Tabela 1.** Os códigos das localidades serão usados ao longo do trabalho.

### 4.3 Coleta de dados

#### 4.3.1 Métodos de captura

As amostras foram coletadas utilizando metodologias de captura de tracajás: mergulho, batição, pesca com linha sem anzol e redes de pesca do tipo malhadeira especial para quelônios (*trammel nets*), variando em cada localidade de acordo com particularidades de cada região. Sendo assim, o material biológico será obtido através da punção de sangue da veia caudal de indivíduos adultos para as posteriores análises no laboratório (Figura 9). As amostras serão estocadas em álcool a 96% em caixa térmica e em geladeira a 4°C até o processamento no Laboratório de Evolução e Genética Animal (LEGAL), localizado na Universidade Federal do Amazonas (UFAM) em Manaus-AM. As amostras de DNA são provenientes de tecidos coletados entre 2001 e 2022 por diferentes grupos de pesquisadores de campo



**Figura 9.** Coleta de sangue pela veia caudal. Foto: Nayene Silveira (2022).

#### 4.3.2 DNA mitocondrial

##### *Extração de DNA*

O DNA genômico total foi extraído de amostras de sangue e tecido usando o protocolo de extração por fenol/clorofórmio, conforme descrito por Sambrook *et al.* (1989). Após a extração, as amostras de DNA são analisadas por eletroforese horizontal, em gel de agarose 1% corado com brometo de etídio, com tampão TBE de corrida, com a finalidade de verificar a integridade do DNA obtido, e a quantidade de DNA por amostra é medida no *NanoDrop 2000* (Thermo Scientific) por espectrofotometria.

##### *Amplificação do DNA*

O fragmento mitocondrial que será utilizado é a alça *D-Loop* da região controle, por ser uma região que tem se mostrado ser bastante variável em espécies do gênero *Podocnemis*, inclusive em trabalhos de genética de populações (Viana, 2008; Pearse *et al.*, 2006; Vargas-Ramirez 2012; Santos 2016). As amostras de DNA total serão amplificadas por PCR usando um par de primers externos PRO (5'-CCCATCACCCACTCCCAAAGC-3') (PEARSE *et al.*, 2006) e 12SR5 (5'-GGCGGATACTTGCATGT-3') (Hrbek e Farias, 2008). Cada tubo apresenta um volume de 4mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 mM dNTPs, 1,5x tampão da enzima Taq polimerase (100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 500 mM KCl), 1pMol de cada primer, 1,5 U da enzima Taq DNA polimerase e de 50ng de DNA, completando com água para um volume final de 15 µL. Os ciclos de amplificação foram estabelecidos da seguinte forma de 94 °C por 1 minuto para a desnaturação inicial da fita de DNA, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94 °C por 1min,

anelamento dos primers a 57°C por 1min e extensão a 72 °C por 1 minuto e 30 segundos, além da extensão final das fitas de DNA a 72°C por 5min.

#### *Sequenciamento e genotipagem*

As amostras que amplificaram na PCR, foram submetidas a uma purificação utilizando as enzimas Thermo Scientific Exonuclease I e Thermo Scientific FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (Thermo Scientific) por 30 min a 37°C seguido de 15 min a 80°C no termociclador. As reações de sequenciamento foram realizadas em placas contendo o DNA amplificado e purificado, o primer forward PRO e o primer interno DLSex (5'-AGTGCTCTCCCCATATTATG-3'), 1x do tampão de reação do Big Dye, com volume finalde 10µL para cada amostra. As amostras serão submetidas ao termociclador conforme protocolo do fabricante. O produto da reação de sequenciamento foi precipitado com etanol e EDTA, e posteriormente ressuspêndido em 10 µL de formamida deionizada para ser injetados e analisados no sequenciador automático ABI3500 (Applied Biosystems).

Para os marcadores microssatélites foram genotipados os loci 1B2, 1E1, 1F10, 1H9, 2E7 e 2F6 de Fantin *et al.*, (2007), usando o protocolo estabelecido pelos autores.

#### **4.3.3 DNA genômico**

##### *Construção da biblioteca genômica dos SNPs*

Para construir a biblioteca genômica, é crucial utilizar gDNA de alta qualidade. O DNA de cada amostra foi digerido usando duas enzimas de restrição, a enzima Csp6I, de corte frequente e a enzima *PstI*, de corte raro, uma técnica conhecida como ddRADseq (sequências de fragmentos de DNA associados a sítios de restrição). Na mesma reação foi realizada a ligação dos adaptadores específicos para o sequenciador *Illumina*, contendo sequências *barcode* que servem para demultiplexação dos indivíduos via pipelines de bioinformática. Os produtos da digestão foram purificados usando beads magnéticas. Em seguida, as amostras de cada indivíduo foram quantificadas no Qubit para a preparação do pool equimolar de todas as amostras de uma mesma biblioteca genômica.

O pool de fragmentos foi selecionado, de acordo com o tamanho dos fragmentos, no aparelho *pippen prep* para redução do genoma. Por fim, foi realizado o enriquecimento da biblioteca genômica, por meio de PCRs específicas, chamadas de PCR de enriquecimento, de

modo que as bibliotecas genômicas foram secadas e enviadas para o sequenciamento genômico no *Illumina*. Em seguida, as sequências foram processadas usando “pipelines” de bioinformática e preparadas para as análises subsequentes. Os dados brutos foram recebidos em formato FASTQ e posteriormente processados por meio de ferramentas bioinformáticas. O pipeline DiscoSnpRad (<https://github.com/GATB/DiscoSnp>) foi utilizado para demultiplexar os indivíduos, criar uma biblioteca de referência, eliminar as sequências com baixa qualidade (phred Q score offset < 33) e determinar homologia entre os loci.

As sequências foram filtradas por qualidade usando o pacote vcfR (KNAUS; GRÜNWALD, 20171), implementado na plataforma R, e foi adicionado um importante passo de controle de qualidade das sequências filtradas, seguindo tutorial disponível em: [https://grunwaldlab.github.io/Population\\_Genetics\\_in\\_R/qc.html](https://grunwaldlab.github.io/Population_Genetics_in_R/qc.html), a fim de reduzir a quantidade de dados faltantes (missing data) no banco de dados final.

## 4.4 ANÁLISE DE DADOS

### 4.4.1 DNA mitocondrial

#### *Diversidade genética, testes de neutralidade e distribuição dos haplótipos*

Foram analisados para cada localidade o número de haplótipos ( $nH$ ) - quantidade de cópias gênicas diferentes em cada localidade; o número de sítios segregantes ( $S$ ) - as mutações que separam cada haplótipo; a diversidade genética estimada a partir da diversidade haplotípica ( $\hat{H}$ ) - a probabilidade de duas sequências escolhidas aleatoriamente serem diferentes (equivalente a heterozigozidade esperada em marcadores diploides); e a diversidade nucleotídica ( $\Pi$ ) - número de nucleotídeos diferentes por sítio entre sequências escolhidas ao acaso em uma população (Tajima, 1983; Li, 1987; Nei, 1987).

Os testes de neutralidade  $D$  (Tajima, 1989) e  $Fs$  (Fu, 1997), análogos aos testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg utilizados em marcadores de origem biparental, os dois se baseiam no modelo de sítios infinitos sem recombinação que é apropriado para sequências curtas de DNA como a região *D-Loop*, considerando que as mutações nesse fragmento são independentes e irregulares e que a probabilidade de um mesmo sítio sofrer mutações duas vezes é extremamente pequena (Kimura, 1969). Valores significantes para estes testes podem indicar que as sequências nucleotídicas mitocondriais não estão evoluindo segundo a hipótese de neutralidade seletiva (ausência de equilíbrio em relação à mutação e à deriva genética)

que as populações foram anteriormente subdivididas e/ou experimentaram flutuações no passado (não estão em equilíbrio quanto à migração e à deriva genética) (Hartl e Clark, 1989). O teste *D* de Tajima compara o número de sítios segregantes e o número médio de diferenças nucleotídicas estimado pela comparação em pares de bases, onde valores negativos estão relacionados com eventos fundadores e expansão demográfica (depois de um gargalo populacional recente, por exemplo) e valores positivos podem estar relacionados com subdivisão populacional (Tajima, 1989). Já o *Fs* de Fu tende a ser negativo quando existe muitas mutações recentes (refletido no número de alelos raros), concedendo evidências contra a neutralidade das mutações, apontando crescimento populacional (Fu, 1997). As análises de diversidade genética e os testes de neutralidade foram estimados no programa *Arlequin* versão 3.5 (Excoffier e Lischer 2010).

Para construir a rede haplotípica será gerada uma árvore de máxima verossimilhança entre as sequências usando o modelo de substituição mais apropriado determinado pela ferramenta *propose model* (HKY[{3,1,1,1,1,3},Empirical]) do programa *TreeFinder* v.2011 (Jobb *et al.*, 2004), que estima a árvore que melhor explica a evolução das sequências através de reconstrução filogenética tradicional. Esta árvore é modificada em genealogias de haplótipos possibilitando a visualização bidimensional das relações, através do programa *HaploViewer* (Salzburger *et al.*, 2011).

#### *Estrutura populacional e fluxo gênico*

A diferenciação entre e dentro das localidades estudadas, será estimada mediante a análise de variância molecular (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992), que se baseia na variância das frequências gênicas levando em consideração o número de mutações entre haplótipos. Os grupos são definidos a priori e é feita uma análise hierárquica dos componentes da variância devido a distinção dos indivíduos, e entre ou dentro das populações, calculando o índice  $\Phi ST$  (Excoffier *et al.*, 1992). Então para medir os níveis de estruturação entre as populações pode-se usar a comparação dos pares de localidades através do índice de fixação  $\Phi ST$  (análogo ao *FST* utilizado em marcadores biparentais) (Hudson *et al.*, 1992). Esses valores geralmente são inversamente relacionados à habilidade de dispersão, variam de 0 (sem diferenciação entre as populações) a 1 (Frankham *et al.*, 2008), e são estimados no programa *Arlequin* versão 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010).

Para inferir a estrutura genética das populações a partir das sequências de DNA mitocondrial, foi utilizado um método que visa à formação de grupos biológicos baseado em um modelo Bayesiano e implementado no programa BAPS v.6.0 (Bayesian Analysis of

Population Structure) (Corander *et al.*, 2003; Corander *et al.*, 2008). Esse programa utiliza um algoritmo de busca estocástica que calcula a distribuição posterior dos parâmetros do modelo condicionados pelos dados observados, nesse caso as frequências nucleotíidas das sequências de DNA. Para determinar o número de populações mais provável (K), será realizada uma análise de mistura de populações. O K é incluído como parâmetro a ser estimado e a melhor partição (número de clusters) dos dados é identificada como a de maior probabilidade. Indivíduos agrupados no mesmo cluster possuem o mesmo padrão de cores no gráfico de barras gerado pelo programa, independentemente da localidade de origem.

Os valores do  $\Phi$ ST serão utilizados para estimar indiretamente o número efetivo de fêmeas migrantes (equivalente ao fluxo gênico) através da equação  $Nefm = ((1/\Phi ST) - 1)$  (Weir e Cockerham, 1984) para marcadores mitocondriais, onde Ne é o tamanho efetivo de fêmeas na população e fm é a taxa individual de fêmeas migrantes. O fluxo gênico impõe um limite à diferenciação genética pois quanto maior o número de migrantes, mais intenso é o fluxo gênico entre populações e menor é o nível de estruturação populacional. Desta forma, um número de migrantes maior do que 1 indica que a divergência genética está sendo refreada e a população não está totalmente estruturada (Hartl e Clark, 1989).

#### **4.4.2. Marcadores nucleares microssatélites e SNPs**

Um total de seis loci foram utilizados para as genotipagens dos indivíduos de *P. unifilis* do rio Madeira, são eles: Puni1E1, Puni1B2, Puni1F10, Puni1H9, Puni2E7 e Puni2F6, desenvolvidos por Fantin *et al.* (2010). Estimativas de diversidade genética foram calculadas através do número de alelos (A) e as heterozigosidades observada ( $H_o$ ) e esperada ( $H_e$ ) usando ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier e Lischer, 2010). O coeficiente de endogamia eficiente (FIS) indicando desvio do acasalamento aleatório foi também calculado em ARLEQUIN seguindo WEIR e COCKERHAM (1984). Realizamos um teste de permutação (10.000 permutações) para avaliar desvios significativos de zero. Pairwise FST [36], estimativas indiretas do número de migrantes e a análise de variância molecular (AMOVA) foram calculados em ARLEQUIN v.3.5 (Excoffier e Lischer, 2010) para investigar a estrutura genética da população em *P. unifilis*.

A estrutura genética também foi inferida pela análise Bayesiana implementada no programa *Structure* (Pritchard *et al.* 2000), que atribui indivíduos a um número K de populações assumindo equilíbrio de Hardy Weinberg (EHW) e ausência de desequilíbrio de ligação (DL) entre os locos analisados dentro de cada população. Nessa análise foi usado o modelo de mistura (*admixture model*) que assume que cada indivíduo pode ter ancestrais de mais de uma população e opção de frequências alélicas correlacionadas entre populações (*correlated allele frequencies between populations*), esta opção permite a identificação de populações sub-estruturadas (Falush *et al.* 2003). Foram realizadas dez réplicas (*runs*) para cada valor de K entre 1 e 6 com valores de corte (*burnin*) de 100.000 permutações e 1.000.000 simulações em Cadeias de Monte Carlo (MCMC). O número de populações esperado é o valor de K máximo estimado pelo modelo *log-likelihood* ( $\log(P(X/K))$ ) (Falush *et al.* 2003).

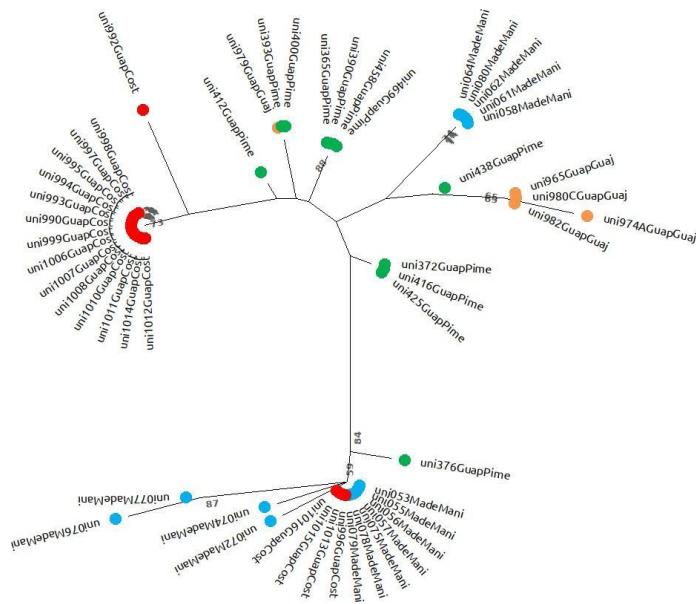
Adicionalmente também foi realizada uma análise de PCA, usando o pacote padrão adequado para dados SNP, o pacote smartpca mantido por Nick Patterson e Alkes Price (em <http://data.broadinstitute.org/alkesgroup/EIGENSOFT/>).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Diversidade genética

Os resultados dos parâmetros genéticos obtidos para cada um dos marcadores moleculares podem ser visualizados nas tabelas 2, 3 e 4.

Foram analisadas 52 sequências da região controle do gene mtDNA, sendo compostas por 27 sítios polimórficos. Os haplótipos apresentaram certa segregação geográfica, mas com evidente compartilhamento entre as localidades (Figura 10).



**Figura 10.** Reconstrução filogenética das sequências através do método de Neighbor-Joining. As sequências dos indivíduos de cada localidade são identificadas pelas cores vermelha= Guaporé, verde= Pimenteiras, laranja= Guajará-Mirim, azul= Manicoré.

Os parâmetros de diversidade genética para cada localidade (Tabela 2). Foram observados níveis relativamente altos de diversidade haplotípica em 3 populações: **GuaPime**, **MamoGuaj** e **MadeMani** (0.8485 - 0.7417), enquanto que a população **GuapCost** apresentou níveis relativamente baixos de diversidade haplotípica (0.4327). Porém, as diversidades nucleotídicas foram baixas em todas as populações (0.003168-0.002611). De uma maneira geral os níveis de diversidade genética para este marcador foram semelhantes aos observados para outras populações de *P. unifilis* (Agostini *et al.*, 2024) e outras espécies do gênero (Santos *et al.*, 2017; Vieira *et al.*, 2017).

O teste *D* de Tajima e o *Fs* de Fu não foram significativos para nenhuma das localidades. Os testes de neutralidade para os dados da região controle evidenciaram que as populações, estão de uma maneira geral, evoluindo em equilíbrio populacional em relação ao genoma mitocondrial, sem nenhuma evidência recente de expansão ou redução populacional, com exceção dos poucos casos citados acima.

**Tabela 2.** Índices de diversidade genética das populações de *P. unifilis* para o marcador da região controle do DNA mitocondrial. *N*, número de indivíduos por localidade; Hap, número de haplótipos; *S*, número de sítios segregantes (polimórficos);  $\pi$ , diversidade nucleotídica;  $\hat{H}$ , diversidade haplotípica; *D* (*p*), teste D de Tajima com valor de *p*; teste *Fs* de Fu com valor de *p*.

Cidade	N	hap	S	Código	$\hat{H}$	$\pi$	D ( <i>p</i> )	Fs ( <i>p</i> )
Pimenteiras	12	12	6	GuapPime	0.8485 +/- 0.0744	0.003180 +/- 0.002278	-0.73090 (0.26840)	-1.92425 (0.05810)
Costa Marques	19	19	6	GuapCost	0.4327 +/- 0.1167	0.004400 +/- 0.002837	0.95327 (0.84560)	3.50430 ( 0.94430)
Guajará-Mirim	5	5	4	MamoGuaj	0.7000 +/- 0.2184	0.003168 +/- 0.002611	-1.0938 (0.08070)	0.27642 (0.49440)
Manicoré	16	16	11	MadeMani	0.7417836 0.7417 +/- 0.0836	0.007112 +/- 0.004266	0.31529 (0.66920)	0.92265 (0.69330)

Os resultados obtidos para os seis loci de microssatélites (Tabela 3) evidenciaram níveis de diversidade genética abaixo de 0.50 para a maioria das localidades. Os baixos valores dos parâmetros de diversidade foram observados para as localidades acima das cachoeiras do alto rio Madeira. Os níveis de heterozigosidade observada e esperada também foram baixos em sua maioria, entretanto estando todos em equilíbrio de Hardy-Weinberg. Somente a localidade de Manicoré (**MadMani**) localizada no baixo rio Madeira apresentou níveis de heterogeneidade moderados igualando-se aos valores observados por Escalona et al. (2008) para as populações de *P. unifilis* de outras localidades da bacia Amazônica e para outras espécies de quelônios marinhos (Roden et al., 2023). Esses resultados evidenciam que as populações de *P. unifilis* acima das cachoeiras do rio Madeira apresentam uma diversidade bem menor, o que pode ser explicado ou por um efeito de redução do tamanho populacional causado por um gargalo de garrafa (efeito *bottleneck*), ou por uma colonização histórica. Como nenhum dos resultados evidenciou algum sinal de reduções populacionais para os indivíduos acima das cachoeiras,

provavelmente estes baixos valores observados nestes marcadores podem ser melhor explicados por uma colonização histórica rio acima. A tartaruga da Amazônia, uma espécie de quelônio que também tem ocorrência natural acima das cachoeiras do rio Madeira, não apresentou valores de diversidade genética baixos para os microssatélites, mesmo sendo uma espécie que passou por confirmadas reduções populacionais evidenciadas por tais marcadores (Pearse *et al.*, 2006). Baixa diversidade genética na fauna acima das cachoeiras do rio Madeira foram observados para o tambaqui, *Colossoma macropomum*, e pirarucu, *Arapaima gigas*, sendo ambos os casos considerados como efeitos de colonização ou introdução de indivíduos em áreas que não ocorriam naturalmente (Hrbek *et al.*, 2005; Santos *et al.*, 2018; Farias *et al.*, 2019).

**Tabela 3.** Índices de diversidade genética das populações de *P. unifilis* para os seis loci de marcadores de microssatélites. *N*, número de indivíduos por localidade; Ho, Heterozigosidade observada; He, Heterozigosidade esperada.

Cidade	N	código	Média N de alelos	Média da diversidade genética	Ho	He
Pimenteiras	11	GuapPime	3.333	0.449495 +/- 0.277159	0.3939	0.4495
Costa Marques	10	GuapCost	2.75	0.206140 +/- 0.152215	0.225	0.3092
Guajará-Mirim	6	MamoGuaj	2.5	0.203030 +/- 0.164409	0.3083	0.3816
Manicoré	15	MadeMani	8.583	0.759540 +/- 0.437735	0.5692	0.7637

Para os dados dos SNPs foi possível adicionar mais uma localidade abaixo das cachoeiras do rio Madeira, a localidade de Uruapiara (localidade 5 na Tabela 1). Para os dados genômicos, as informações foram obtidas utilizando 1000 SNPs polimórficos. Os 1000 são uma amostra aleatória de todos os SNPs polimórficos após a filtragem.

**Tabela 4.** Índices de diversidade genética das populações de *P. unifilis* para os marcadores genômicos de SNPs nucleares. *N*, número de indivíduos por localidade; Ho, Heterozigosidade observada; He, Heterozigosidade esperada.

Cidade	N	código	Média da Diversidade genética	Ho	He
Pimenteiras	11	GuapPime	0.221766 +/- 0.109982	0.34032	0.3112
Costa Marques	10	GuapCost	0.222558 +/- 0.115089	0.39909	0.38221
Guajará-Mirim	6	MamoGuaj	0.271211 +/- 0.135722	0.34788	0.32702
Manicoré	8	MadeMani	0.275566 +/- 0.139611	0.35796	0.34045
Uruapiara	5	MadeUrua	0.284921 +/- 0.150220	0.46213	0.45099

Este é o primeiro trabalho onde foi possível se fazer uma comparação entre três tipos de marcadores moleculares, mitocondrial (região controle), microssatélites e SNPs. De uma maneira geral os valores dos parâmetros de diversidade genética foram bastante heterogêneos entre as localidades e entre os diferentes marcadores. Os dados da região controle do DNA mitocondrial apresentaram valores mais elevados, seguidos dos marcadores microssatélites; valores mais baixos de diversidade genética foram encontrados nos marcadores SNPs. Este trabalho também é o primeiro a utilizar dados de marcadores genômicos de SNPs para uma espécie de quelônio da bacia Amazônica, o que impossibilita a comparação com outras espécies que ocorrem na região. Entretanto, tais marcadores têm sido utilizados em outros trabalhos como em espécies de tartarugas marinhas, como foi abordado neste trabalho de Komoroske e colaboradores (2017), o autor cita que aplicação de marcadores de mtDNA, herdados maternalmente, ajuda a definir a estrutura e conectividade populacional, pois dessa forma gera resultados a nível de escala do *homing* natal feminino. Porém, esses dados só esclarecem a história evolutiva materna e podem ter baixa resolução devido à lenta evolução mitocondrial em tartarugas. Em contraste, marcadores nucleares, que incluem conectividade masculina, são essenciais para delinear populações com maior precisão e possuem maior poder estatístico, como os marcadores de microssatélites e SNPs.

Pesquisas recentes com mais marcadores nucleares revelaram diferenças significativas entre filhotes de tartaruga-verde no Pacífico, indicando que o fluxo gênico mediado por machos entre estoques regionais de nidificação é mais limitado do que se pensava, permitindo uma

delimitação mais clara dos estoques (Roden *et al.*, 2013). Vários viveiros na Turquia exibiram diferentes frequências alélicas de microssatélites (Bagda *et al.*, 2012), indicando uma estrutura populacional não detectada pelo mtDNA. Esses resultados são semelhantes a estudos com tartarugas-de-couro, onde o mtDNA identificou sete populações no Atlântico, mas os microssatélites revelaram nove, sendo assim mostrando maior precisão na delimitação populacional (Dutton *et al.*, 2013). Dessa forma, está claro que a combinação dos marcadores de mtDNA e marcadores nucleares pode fornecer mais informações sobre o fluxo gênico e os limites populacionais, o uso de vários marcadores pode complementar muito mais no avanço da nossa compreensão da estrutura populacional em escala precisa (Komoroske *et al.*, 2017).

## 5.2 Estrutura populacional

Os resultados da AMOVA para os dados da região controle indicaram uma estrutura populacional significativa ( $F_{ST} = 0.48$ ,  $P < 0.001$ ) com 47.8% da variância entre populações e 52.2% da variância dentro das populações (tabela 5). Os valores de  $F_{ST}$  pareados mostraram alta estrutura populacional para todas as comparações (tabela 6).

**Tabela 5.** Análise de Variância Molecular entre localidades de Manicoré, Guajará-Mirim, Costa Marques e Pimenteiras. Índices de  $F_{ST}$  específicos para cada população: Manicoré (0,45708); Guajará-Mirim (0,49617); Costa Marques (0,48072); Pimenteiras (0,49257).

Fontes de variação	Grau de Liberdade	Somas dos Quadrados	Componente variantes	Porcentagem de Variação
<b>Entre grupos</b>	3	45.125	1.12349	47,77%
<b>Dentro das localidades</b>	48	58.971	1.22856	52,23%
<b>Total</b>		104.096	2.35205	
<b>Índice de fixação de <math>F_{ST}</math></b>		0.47767		

**Tabela 6.** Matriz dos valores de Fst nas comparações par a par entre as populações de *P. unifilis* a partir dos dados mitocondriais (*D-loop*).

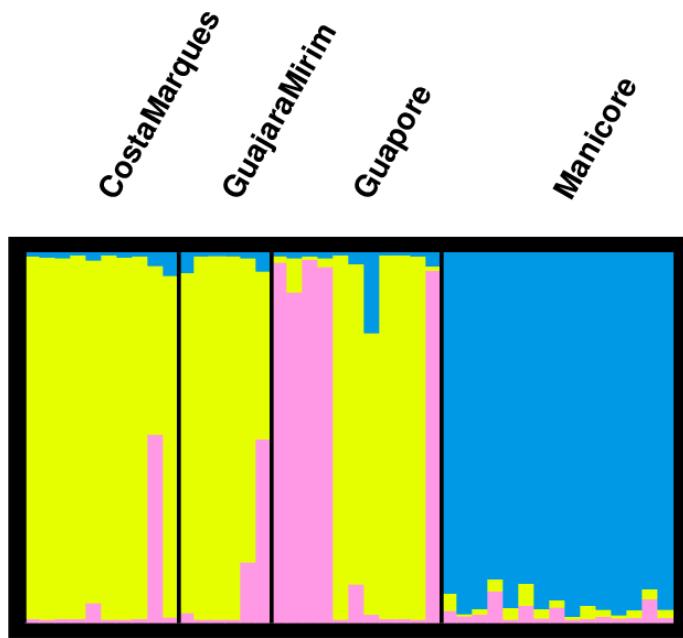
	<b>Localidade</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>MadeMani</b>	0			
<b>2</b>	<b>MamoGuaj</b>	0.45955	0		
<b>3</b>	<b>Guap Cost</b>	0.42123	0.6332	0	
<b>4</b>	<b>GuapPime</b>	0.46808	0.4203	0.48639	0

Para os dados dos marcadores microssatélites os resultados da AMOVA também indicaram uma estrutura populacional ( $F_{ST} = 0.25$ ,  $P < 0.001$ ), inferindo que 25% da variância ocorre entre populações e 75% dentro das populações. Já os resultados do Fst pareados evidenciam que somente a comparação entre Guajará-Mirim e Costa Marques não foi significativa (tabela 7).

**Tabela 7.** Matriz dos valores de Fst nas comparações par a par entre as populações de *P. unifilis* a partir dos dados microssatélites. .

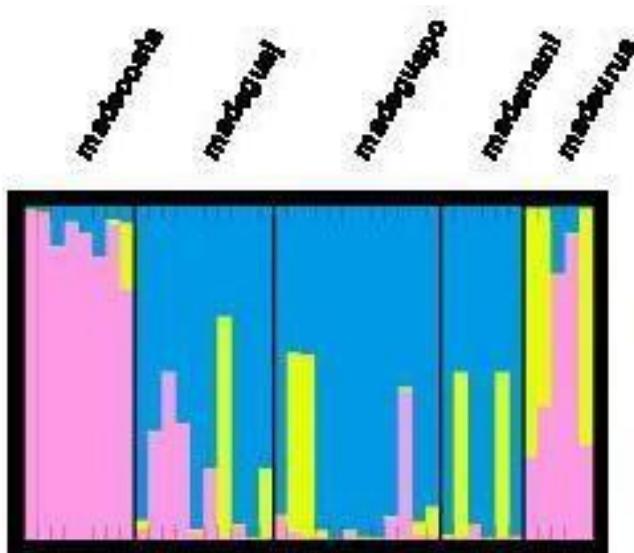
	<b>Localidade</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
<b>1</b>	<b>GuapCost</b>	0			
<b>2</b>	<b>MamoGuaj</b>	0.01367	0		
<b>3</b>	<b>GuapPime</b>	0.15003	0.19078	0	
<b>4</b>	<b>MadeMani</b>	0.29784	0.29373	0.22975	0

Com a análise do programa STRUCTURE os dados obtidos pelos microssatélites indicaram  $K= 3$  (Figura 11), ou seja, a melhor probabilidade é que existam três grupos populacionais ( $\text{LnP}(K) = -500.3500$ ). De acordo com a Figura 11, os três grupos populacionais seriam compostos pelo grupo de Manicoré, o segundo pelo grupo de Costa Marques, Guajará-Mirim e alguns indivíduos da localidade do Guaporé. O terceiro grupo populacional seria composto por parte dos indivíduos de Guaporé também.



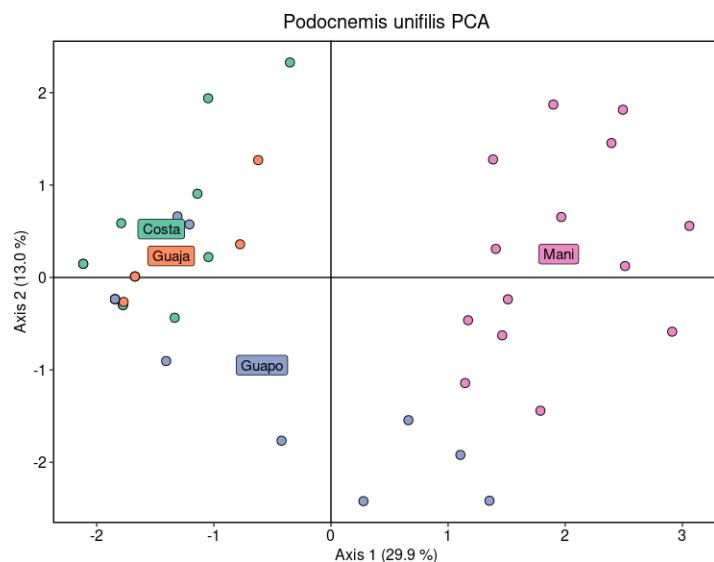
**Figura 11.** Resultados da análise no programa STRUCTURE para os dados de microssatélites.

Para os dados dos SNPs foi possível adicionar mais uma localidade abaixo das cachoeiras do rio Madeira, a localidade de Uruapiara. Os resultados do programa STRUCTURE para dados de SNPs também indicaram um melhor Delta K (11.402691) para três grupos populacionais (Figura 12).



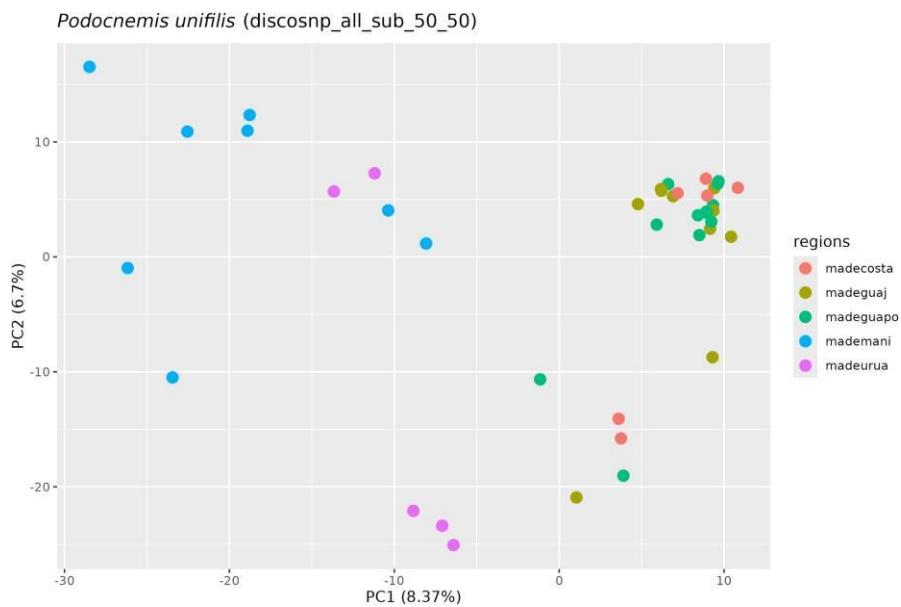
**Figura 12.** Resultados da análise no programa STRUCTURE para os dados dos marcadores SNPs.

O resultado do PCA para os dados dos marcadores microssatélites recuperaram dois grupos populacionais, onde o PC1 explicou 29.9% da variação total, mostrando uma segregação do grupo do médio Madeira em relação ao PC2 (explicando 13% da variação) com as amostras do alto Madeira (Figura 13).



**Figura 13.** Resultados das análises de PCA para os dados dos marcadores microssatélites.

Os resultados dos PCAs para os dados dos SNPs genômicos foram bastante semelhantes aos resultados obtidos pelos microssatélites. O PC1 identificou as populações do alto Madeira (**Guajará-Mirim, Costa Marques, Ecovale, e Pimenteiras**) como um cluster distinto, enquanto que as populações do médio Madeira (**Uruapiara e Manicoré**) foram agrupadas ao longo do PC2 (Figura 14). O PC1 (explicou 8.37% da variação total) mostrou uma segregação do grupo do médio Madeira em relação ao PC2 (explicou 6.7% da variação) com as amostras do alto Madeira.



**Figura 14.** Resultados da análise no programa STRUCTURE para os dados dos marcadores SNPs.

Todos os resultados são concordantes em sugerir que as cachoeiras do rio Madeira funcionam como uma barreira que restringe o fluxo gênico dos indivíduos de *P. unifilis* para as localidades abaixo e acima dessas estruturas geomorfológicas. Esses resultados são similares ao observado para outras espécies de vertebrados estudadas para esta mesma região, como por exemplo o observado em peixes (Cunha-Machado *et al.*, 2022), anuros (Simões *et al.*, 2008), jacarés (Hrbek *et al.*, 2008; Muniz *et al.*, 2018), botos (Gravena *et al.*, 2014, 2015), para uma outra espécie do gênero, *Podocnemis expansa* (Pearse *et al.*, 2006), e mesmo para *P. unifilis* com poucas localidades amostradas no rio Madeira e somente um único marcador utilizado (Agostini *et al.*, 2024).

Interessantemente, alguns marcadores detectaram estrutura genética populacional entre localidades dentro de cada área amostrada (acima e abaixo das cachoeiras). Abaixo das cachoeiras, o marcador de SNPs nucleares identificado pela análise do Structure diferenciação entre a localidade de **Manicoré** e **Uruapiara**. Esta estrutura populacional precisa, no entanto, ser melhor explorada uma vez que foram poucas localidades amostradas nas áreas abaixo deste grande sistema de drenagem. Acima das cachoeiras a análise do STRUCTURE inferiu estrutura populacional para as localidades de Guaporé e Costa Marques com marcadores de microssatélites e SNPs.

Assim, nossos resultados nos levam a propor diferentes unidades de manejo para o tracajá acima e abaixo das cachoeiras do rio Madeira. De acordo com Moritz (1994) populações que não são reciprocamente monofiléticas (dados da região controle) mas divergiram na frequência alélica (dados de microssatélites e SNPs), são significativos para fins de conservação

e devem ser reconhecidos como Unidades de Manejo diferentes a serem manejadas e geridas de forma diferencial.

Esse trabalho está contribuindo para o conhecimento sobre da espécie *P. unifilis* da Bacia Amazônica, uma vez que Agostini *et al* (2024) incluiu somente duas localidades do alto rio Madeira e usou somente um marcador molecular (região controle). Os resultados comparativos de três marcadores moleculares apresentados no presente estudo nos indicam de forma mais robusta a presença de pelo menos duas unidades de manejo para o tracajá, uma unidade acima e outra abaixo das cachoeiras do rio Madeira. Tais resultados irão contribuir para futuros planos de manejo desta espécie nesta região. Estas unidades de manejo devem ser consideradas de forma independentes para quaisquer planos de manejo para a espécie que envolva translocação, introdução, ou obtenção de indivíduos para criação em cativeiro.

Para justificar a manutenção da biodiversidade, precisamos refletir que nós utilizamos dos benefícios, seja de forma direta ou indiretamente da nossa floresta Amazônica, que nos proporciona inúmeros recursos de valor econômico. Grandes empreendimentos hidrelétricos precisam ter esse conhecimento em mente das proporções causadas e ajudar a colaborar com planos de manejo a fim de proteger os organismos vivos, para que os recursos naturais e o patrimônio genético das espécies sejam mantidos para as gerações futuras. Dessa forma torna-se importante mais estudos voltados para a conservação da Biodiversidade Amazônica, a genética da conservação é crucial para a manutenção das espécies ameaçadas, a diversidade genética está diretamente ligada a biodiversidade, logo a diversidade das espécies deve ser priorizada.

## 6. CONCLUSÕES

Este estudo foi o primeiro feito usando 3 tipos de marcadores moleculares para as populações de tracajás com a finalidade de realizar uma comparação, de modo geral, os valores dos parâmetros de diversidade genética variaram consideravelmente entre as localidades e entre os diferentes marcadores;

As populações de tracajá (*P. unifilis*) apresentam padrões de distribuição da variabilidade genética devido a diferenciação e estruturação por presença de barreiras geográficas, que constituem as dinâmicas populacionais mais importantes para a espécie;

Para dados mitocondriais, a espécie, no geral, apresentou altos níveis de diversidade genética, para dos dados microssatélites, os resultados indicaram que as populações de *P. unifilis* acima das cachoeiras do rio Madeira possuem uma diversidade menor, entretanto ainda dentro do esperado para a espécie, não evidenciando reduções do tamanho efetivo populacional; As corredeiras do rio Madeira/Guaporé atuam como barreira para a espécie restringindo o fluxo gênico entre as populações que estão acima e abaixo delas;

Considerando tais resultados sugere-se duas grandes unidades de manejo para a espécie no alto rio Madeira. Para os dados de SNPs, as localidades de Manicoré e Uruapiara apresentaram diferenciação, através da análise no Structure, ressaltando a importância de se obter mais amostras para mais localidades abaixo das cachoeiras;

Sugere-se um monitoramento genético das populações uma vez que a amostragem deste trabalho foi realizada antes da construção das hidroelétricas de Jirau e de Santo Antônio. Ou seja, é de fundamental importância que se obtenha dados das populações atuais, pois já são quase 15 anos após o fechamento das hidroelétricas.

## 7. REFERÊNCIAS

Agostini, M. A. P. (2016). *Padrões Genético-Populacionais do “tracajá” Podocnemis unifilis (Troschel, 1848) (Testudines: Podocnemididae) na Amazônia Brasileira*. Dissertação de Mestrado. Laboratório de Evolução e Genética Animal/Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.

Agostini, M. A. P.; Rocha, B. S. S.; Balestra, R. A. M.; Paiva, S. R. (2022). Marcador de DNA Mitocondrial para Estudos Genético-Populacionais de Tartaruga-da-amazônia (*Podocnemis expansa* Schweigger, 1812). *Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade. Biodiversidade Brasileira*. 12(1): 328-341. DOI: <https://doi.org/10.37002/biobrasil.v12i1.1938>

Agostini, M.A.P; Machado, A. F; Ritter, C. D; Félix-Silva, D; Pezzuti, J.C.B; Andrade, P.C.M; Pantoja-Lima, J; Viana, M.N.S; Monjeló, L. A. S; Vogt, R.C; Junior, W. P. O; Farias, I.P. (2024). Riverscape features determining the genetic structure of the Yellow-Spotted Amazon River Turtle (*Podocnemis unifilis*) in Brazilian Amazonia. **Biotropica**. 2024;00:e13323. <https://doi.org/10.1111/btp.13323>

Alho & Pádua. (1982). Reproductive parameters and nesting behavior of the Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae) in Brazil. **Canadian Journal of Zoology**. 60: 97–103. DOI: <https://doi.org/10.1139/z82-012>

Alho, C. J. R.; Reis, R. E.; Aquino, P. P. U. (2015). Amazonian freshwater habitats experiencing environmental and socioeconomic threats affecting subsistence fisheries. **Ambio**. 44(5):412-425. DOI: 10.1007/s13280-014-0610-z

Allendorf, F.W.; Hohenlohe, P.A.; Luikart, G. 2010. Genomics and the future of conservation genetics. **Nat Rev Genet**, 11: 697-709.

Alves, H.A.S. (2014). *Homogeneização de habitats de corredeiras e seu efeito na estrutura das assembleias de peixes de um trecho do rio madeira, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Fundação Universidade Federal de Rondônia/UNIR. Porto Velho, Rondônia, Brasil.

Andrade, P. C. M.; Duarte, J. A. M.; Oliveira, P. H. G.; COSTA, P.M.; Vicente, A.; Brelaz, A.; Almeida-Junior, C. D.; Rodrigues, W.; Nascimento, J.; Medeiros, H. C.; Mendonça-Neto, L.; Azevedo, S. H.; Pinto, J. R. S. (2008). *Capítulo 3: Áreas de reprodução de quelônios protegidas pelo RAN-IBAMA/Amazonas e UFAM*. in: Andrade P.C.M. (org). Criação e manejo de quelônios no Amazonas. 2nd ed. Manaus: ProVárzea/IBAMA. **AquaBio**. pp. 55–126.

Ataídes, A. G.; Souza, H.C.; Carmo, J. B.; Malvasio, A. (2021). Avaliação da influência de fatores hidroclimáticos sobre a estrutura populacional de *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) no Rio Formoso, sudeste da Amazônia brasileira. *Iheringia Série Zoologia*. e-ISSN 1678-4766. Universidade Federal do Tocantins. DOI: <https://doi.org/10.1590/1678-4766e2021021>

Ataídes, A.G. (2009). *Parâmetros populacionais, aspectos reprodutivos e importância socioeconômica de Podocnemis unifilis (TROSCHEL, 1848) (Testudines, Podocnemididae), no entorno do Parque Nacional do Araguaia, Tocantins*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brasil. 154p.

Avise, J. C.; Arnold, J.; Ball, R. M.; Bermingham, E.; Lamb, T.; Neigel, J.E.; Reeb, C.A.; Saunders, N.C. (1987). Intraspecific Phylogeography: The Mitochondrial DNA Bridge Between Population Genetics and Systematics. **Annu Rev Ecol Syst**.18: 489- 522. DOI:<https://doi.org/10.1146/annurev.es.18.110187.002421>

Ayres JM. (1995). As matas de várzea do Mamirauá: médio Solimões. 2nd ed. Bra-sília: CNPq/Sociedade Civil Mamirauá.

Bagda, E., Bardakci, F., and Türkozan, O. (2012). Lower genetic structuring in mitochondrial DNA than nuclear DNA among the nesting colonies of green turtles (*Chelonia mydas*) in the Mediterranean. **Biochem. Syst. Ecol.** 43, 192–199. doi: 10.1016/j.bse.2012.03.015

- Baird, N.A.; Etter, P.D.; Atwood, T.S.; Currey, M.C.; Shiver, A.L.; Lewis, Z.A.; Selker, E.U.; Cresko, W.A.; Johnson, E.A. 2008. Rapid SNP discovery and genetic mapping using sequenced RAD markers. *PLOS ONE*, 3(10): e3376.
- Bernacki & Kilpatrick. (2020). Structural Variation of the Turtle Mitochondrial Control Region. *Journal of Molecular Evolution*. 88:618–640. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00239-020-09962-0>
- Bernardes, V.C.D. (2011). *Estrutura populacional de Podocnemis erythrocephala (Testudines, Podocnemididae) no rio Unini, Amazonas, Brasil*. Dissertação de Mestrado, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil. 63p.
- Bernhard & Vogt. (2012). Population Structure of the Turtle *Podocnemis erythrocephala* in the rio Negro Basin, Brazil. *Herpetologica*. 68(4), 491–504. DOI: <https://doi.org/10.1655/HERPETOLOGICA-D-12-00008>
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res*. 27:1767–1780. DOI: 10.1093/nar/27.8.1767.
- Bourrel, L., Phillips, L., Moreau, S. (2009). The dynamics of floods in the Bolivian Amazon Basin. *Hydrol. Process.* 23, 3161–3167. <https://doi.org/10.1002/hyp.7384>
- Brown, W. M.; George Jr, M.; Wilson, A. C. (1979). Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 76(4): 1967-1971. DOI: 10.1073/pnas.76.4.1967
- Bruyn, M. (2008). F. W. Allendorf and G. Luikart, Conserving Global Biodiversity? Conservation and the Genetics of Populations. **Conservation Genetics**. ISBN-13: 978-1-4051-2145-3. DOI: 10.1007/s10592-007-9330-2
- Catchen, J.; Bassham, S.; Wilson, T.; Currey, M.; O'Brien, C.; Yeates, Q.; Cresko, W.A. 2013a. The population structure and recent colonization history of Oregon threespine stickleback determined using restriction-site associated DNA-sequencing. *Mol Ecol*, 22: 2864-2883.
- Cavallari, M. M. (2004). *Estrutura genética de populações de Encholirium (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação*. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Cella-Ribeiro, A.; Torrente-Vilara, G.; Hungria, DBDB.; Oliveira, M. (2013). As corredeiras do rio Madeira. In: Queiroz, L. J.; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W.M.; Pires, T.; Zuanon.; Doria, C. R. C. eds. Peixes do rio Madeira. São Paulo, Brazil: *Editora Dialeto*, 56–63.
- Cites. *Convention on International Trade In Endangered Species of Wild Fauna and Flora*. Appendices I, II and III. Available online: <https://cites.org/sites/default/files/eng/app/2020/E-Appendices-2020-08-28.pdf>
- Corander J, Marttinen P, Sirén J, Tang J (2008) Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinform*, 9:539. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-9-539>
- Corander, J.; Waldmann, P.; Sillanpää, M. J. (2003). Bayesian Analysis of Genetic Differentiation Between Populations. *Genetics*, 163: 367-374.
- Crandall, K.A.; Bininda-Emonds, O.R.P.; Mace, G.M.; Wayne, R.K. (2000). Considering evolutionary processes in conservation biology. *Trends Ecol Evol*, 15(7): 290 295.

Cunha-Machado, A.S.; Farias, I.P.; Hrbek, T.; Escobar, M.D.; Alves-Gomes, J.A.; Formiga, K.M.; Batista, J.S. (2022). Genetic differentiation and gene flow of the Amazonian catfish *Pseudoplatystoma punctifer* across the Madeira River rapids prior to the construction of hydroelectric dams. *Hydrobiologia* 849:29–46.

Da Silva, M.C.H. (2019) . *Ecologia Populacional de Podocnemis sextuberculata e Podocnemis unifilis no Médio Rio Xingu, Pará*. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Tocantins Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade, Ecologia e Conservação. Porto Nacional, Tocantins, Brasil.

DeSalle, R.; Amato, G. (2004). The expansion of conservation genetics. *Nat Rev Genet*, 5: 702-712.

Doria, C. R. C.; Dutka-Gianelli, J.; Athayde, S.; Luiz, A.M.M.T.; Brasil, W.; Estupiñán, G.M.B.; Hauser, M.; Van Damme, P.A.; Torrente-Vilara, G. (2018). Grandes hidrelétricas na Amazônia: impactos no recurso pesqueiro e na pesca artesanal, desafios e lições aprendidas na bacia do Rio Madeira. *Revista Ciências da Sociedade (RCS)*. Vol. 2, n. 4, p.79-106.

Dutton, P. H., Roden, S. E., Stewart, K. R., LaCasella, E. L., Tiwari, M., Formia, A., et al. (2013). Population stock structure of leatherback turtles (*Dermochelys coriacea*) in the Atlantic revealed using mtDNA and microsatellite markers. *Conserv. Genet.* 14, 625–636. doi: 10.1007/s10592-013-0456-0

Erickson, J.; Fagundes, C. K.; Magalhães, M. S.; Dias, L. C.; Vogt, R. C.; Farias, I. P.; Zuanon, J. (2020). Natural nests incubated in two different soil types lead to an overall balanced sex ratio in *Podocnemis unifilis* hatchlings on the lower Purus River, Brazil. *Salamandra German Journal of Herpetology*. 56: 309–316.

Ernst e Barbour. (1989). Turtles of the World. *Smithsonian Institution Press*. Washington, DC.

ESBR (Energia Sustentável do Brasil). (2012). Relatório final de atendimento às condicionantes da Licença de Instalação (LI) nº 621/2009 da AHE Jirau. Energia Sustentável do Brasil S.A. Final technical report of the pre-flooding monitoring program for the Jirau hydropower plant. 590 pp.

Escalona, T.; Engstrom, T. N.; Hernandez, O. E.; Bock, B. C.; Vogt, R. C.; Valenzuela, N. (2009). Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. *Conservation Genetics*. DOI: 10.1007/s10592-008-9746-3

Excoffier & Lischer. (2010). Arlequin suite version 3.5: a new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular ecology resources*. 10(3), 564–7. DOI:10.1111/j.1755-0998.2010.02847. 2010.

Excoffier, L.; Smouse, P. E.; Quattro, J.M. (1992). Analyses or Molecular Variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics* 131:479-491. DOI: 10.1093/genetics/131.2.479

Fachín-Terán, A., Vogt., R.C. (2004). Estrutura populacional, tamanho e razão sexual de *Podocnemis unifilis* (Testudines, Podocnemididae) no rio Guaporé (RO), norte do Brasil. *Phylomedusa*. 3:29-42.

Fachín-Terán, A.; Vogt, R.C.; Thorbjarnarson., J.B. (2006). Seasonal Movements of *Podocnemis sextuberculata* (Testudines: Podocnemididae) in the Mamiraua Sustainable Development Reserve, Amazonas, Brazil. *Chelonian Conservation and Biology*. 5: 18- 24. DOI: [https://doi.org/10.2744/1071-8443\(2006\)5\[18:SMOPST\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.2744/1071-8443(2006)5[18:SMOPST]2.0.CO;2)

Faleiro, F.G.; Faleiro, A.S.G.; Cordeiro, M.C.R., Karia, C.T. Metodologia para operacionalizar a extração de DNA de espécies nativas do cerrado. Planaltina: Embrapa Cerrados, 2003. 6p. (Comunicado Técnico, 92).

Falush, D.; Stephens, M.; Pritchard, J.K. (2003). Inference of population structure using multilocus genotype data: linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 164(4): 1567-1587.

Fantin, C.; Carvalho, C. F.; Hrbek, T.; Sites, J. W.; Monjeló, L. A. S.; Astolfi-Filho, S.; Farias, I. P. (2007). Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. *Molecular Ecology Notes*. 7(6). DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01842.x>

Farias, I. P.; Torrico, J. P.; García-Dávila, C.; Santos, MDCF.; Hrbek, T.; Renno, J. F. (2010). Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56(3): 1129–1135. DOI: 10.1016/j.ympev.2010.03.028

Ferrara, C.R.; Fagundes, C.K.; Morcatty, T.Q.; Vogt, R.C. (2017). Quelônios Amazônicos: Guia de identificação e distribuição. *Wildlife Conservation Society*. Manaus, Amazonas, Brasil.

Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A. (2008). Fundamentos de Genética da Conservação. *SBG - Sociedade Brasileira de Genética*. Ribeirão Preto. p, 280.

FU, Y-X. (1997). Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*. 1447:915-925. DOI: 10.1093/genetics/147.2.915.

Gaffney, E.S. (1990). The comparative osteology of the Triassic turtle Proganochelys. *Bull. Am. Mus. Nat. Hist.* 194, 1–263. DOI: <http://hdl.handle.net/2246/884>

García-Martín, J. M.; Sarmiento-Ramírez, J. M.; Diéguez-Uribeondo, J. (2021). Beyond Sea Turtles: *Fusarium keratoplasticum* in Eggshells of *Podocnemis unifilis*, a Threatened Amazonian Freshwater Turtle. *Journal of Fungi*. DOI: 10.3390/jof7090742

Goulding, M. (2012). Ecologia da pesca do rio Madeira. Manaus: INPA, 172 p. 1979  
Haapasaari, P., Mäntyniemi, S., Kuikka, S. Baltic herring fisheries management: Stakeholder views to frame the problem. *Ecology and Society*. v.17., n.3.

Goulding, M.; Barthem, R.; Ferreira, E. (2003). The Smithsonian atlas of the Amazon. *Princeton Editorial Associates*. London. 253pp.

Gravena, W.; Da Silva, V. M. F.; Da Silva, M. N. F.; Farias, I. P.; Hrbek, T. (2015). Living between rapids: genetic structure and hybridization in botos (Cetacea: Iniidae: *Inia* spp.) of the Madeira River, Brazil. *Biological Journal of the Linnean Society*. DOI: 10.1111/bij.12463.

- Gravena, W.; Farias, I. P.; Da Silva M. N. F.; Da Silva, V. M. F.; Hrbek, T. (2014). Looking to the past and the future: were the Madeira River rapids a geographical barrier to the boto (Cetacea: Iniidae). *Conservation Genetics*. 15(3): 619-629.
- Hartl, D. L., & Clark, A. G. (1989). Principles of population genetics (2nd ed., p. 481). Sinauer Associates Inc.
- Hedrick, P. (2009). Population Genetics and Ecology. *The Princeton Guide to Ecology*. p109. DOI: <https://doi.org/10.1515/9781400833023.109>
- Hrbek T, Farias IP (2008) The complete mitochondrial genome of the pirarucu (*Arapaima gigas*, Arapaimidae, Osteoglossiformes). *Genet Mol Biol* 1:293–302. <http://doi.org/10.1590/S1415-47572008000200024>
- Hrbek, T.; Vasconcelos, W. R.; Rebelo, G.; Farias, I. P. (2008). Phylogenetic relationships of South American alligatorids and the caiman of Madeira River. *Journal of Experimental Zoology. Part A: Ecological Genetics and Physiology*. 309(10): 588- 599. DOI: 10.1002/jez.430
- IUCN Tortoise & Freshwater Turtle Specialist Group. *Podocnemis unifilis* (Errata Version Published in 2016). The IUCN Red List of Threatened Species 1996: E.T17825A97397562. DOI: <https://dx.doi.org/10.2305/IUCN.UK.1996.RLTS.T17825A7506933.en>
- Jemt, E.; Persson, O.; Shi, Y.; Mehmedovic, M.; Uhler, J. P.; Lopez, M. D.; Freyer, C.; Gustafsson, C.M.; Samuelsson, T.; Falkenberg, M. (2015). Regulation of DNA replication at the end of the mitochondrial D-loop involves the helicase TWINKLE and a conserved sequence element. *Nucleic Acids Res.* 43:9262–9275. DOI: 10.1093/nar/gkv804
- Keller, C.; Bernhard, R.; Félix-Silva,D.; Villamarín, F.;Bermúdez-Romero, A. L. (2013). Relatório final da fase de preenchimento do Programa de Monitoramento de Herpetofauna da UHE Santo Antônio – RO, Sub-Programa Herpetofauna de Rios, Parte 2 – Quelônios. INPA/Santo Antônio Energia S.A. – SAE.
- Keller,C.; Villamarín, F.; Bernhard, R.; Da Silva; D.F. (2016). Checklist of chelonians from the upper Madeira River and the lower Madeira-Purus interfluvium (Brazilian Amazon), including a range expansion for *Podocnemis sextuberculata* Cornalia, 1849. *Check List The journal of biodiversity data*. DOI: <http://dx.doi.org/10.15560/12.4.1937>
- Kimura, M. (1969). The number of heterozygous nucleotide sites maintained in a finite population due to steady flux of mutations. *Genetics*. 61, 893-903. DOI: 10.1093/genetics/61.4.893
- Komoroske, L. M., Jensen, M. P., Stewart, K. R., Shamblin, B. M., & Dutton, P. H. (2017). Advances in the application of genetics in marine turtle biology and conservation. *Frontiers in Marine Science*, 4, 156.
- Krenz, J. G.; Naylor, G. J. P.; Shaffer, H. B.; Janzen, F.J. (2005). Molecular phylogenetics and evolution of turtles. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 37. 178–191. DOI: 10.1016/j.ympev.2005.04.027
- Kuramoto, J. C. (2019). *Variabilidade Genética e Fluxo Gênico entre as populações de Podocnemis expansa (Tartaruga-Da-Amazonia) nos rios Crixás-Açu e Araguaia*. Dissertação de Mestrado. Goiás, Brasil.

Lasman, R. A.; Shade, R.O.; Shapiro, J.F.; Avise, J.C. (1981). The use of restriction endonucleases to measure mitochondrial DNA sequence relatedness in natural populations. *J. Mol. Evo.* 17: 214-226. DOI: 10.1007/BF01732759

Latrubesse & Franzinelli. (2005). The late Quaternary evolution of the Negro River, Amazon, Brazil: implications for island and floodplain formation in large anabranched tropical systems. *Geomorphology*. 70, 372–397. DOI: 10.1016/j.geomorph.2005.02.014

Li, W.-H. (1987). Molecular Evolution. *Sinauer Associates*. Sunderland. 487pp.

Machado, A.S.C. (2013). Genética populacional do bagre amazônico *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos rios Madeira e Mamoré/Guaporé. 89 f.: il. color. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Amazonas, Manaus, Brasil.

Moll & Moll. (2004) .The Ecology, Exploitation and Conservation of River Turtles. Oxford, UK: *Oxford University Press*.

Morin, P.A.; Luikart, G.; Wayne, R.K. (2004). SNPs in ecology, evolution and conservation. *Trends Ecol Evol*, 19(4): 208-216.

Nusec/Ufam (Núcleo de Socioeconomia/Universidade Federal do Amazonas). (2014a.) Plano de gestão da Reserva de Desenvolvimento Sustentável do Rio Madeira. Vol. 1 – Diagnóstico. Série Técnica de Planos de Gestão # 22. Manaus: Centro Estadual de Unidades de Conservação (CEUC)/Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (SDS). 292 pp.

NUSEC/UFAM (Núcleo de Socioeconomia/Universidade Federal do Amazonas). 2014b. Plano de gestão da Reserva de Desenvolvimento Sustentável Igapó-Açu. Vol. 1 – Diagnóstico. Série Técnica de Planos de Gestão # 17. Manaus: Centro Estadual de Unidades de Conservação (CEUC)/Secretaria de Estado do Meio Ambiente e Desenvolvimento Sustentável (SDS). 312 pp.

Oliveira, J. D. A., Farias, I. P., Costa, G. C., & Werneck, F. P. (2019). Model-based riverscape genetics: Disentangling the roles of local and connectivity factors in shaping spatial genetic patterns of two Amazonian turtles with different dispersal abilities. *Evolutionary Ecology*, 33, 273–298. <https://doi.org/10.1007/s10682-019-09973-4>

Páez, V. P., Bock, B. C., Espinal-García, P. A., Rendón-Valencia, B. H., Alzate-Estrada, D., Cartagena-Otalvaro, V. M., & Heppell, S. S. (2015). Life history and demographic characteristics of the Magdalena River turtle (*Podocnemis lewyana*): Implications for management. *Copeia*, 103(4), 1058–1074.

Pearse, D. E.; Arndt, A. D.; Valenzuela, N.; Miller, B. A.; Cantarelli, V.; Sites JR, J. W. (2006). Estimating population structure under nonequilibrium conditions in a conservation context: continent-wide population genetics of the giant Amazon river turtle, *Podocnemis expansa* (Chelonia; Podocnemididae). *Molecular Ecology*. DOI: 10.1111/j.1365-294X.2006.02869.x

Perrone, E.L. (2012). *Estrutura populacional de Podocnemis sextuberculata Cornalia, 1849 (Testudines: Podocnemididae) na Reserva Biológica do Rio Trombetas, Pará, Brasil*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, Brasil. 32p.

- Peterson, B.K.; Weber, J.N.; Kay, E.H.; Fisher, H.S.; Hoekstra, H.E. 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLOS ONE*, 7(5): e37135.
- Portelinha, T.C.G.; Malvasio, A.; Piña, C.I.; Bertoluci, J. (2014). Population Structure of *Podocnemis expansa* (Testudines: Podocnemididae) in Southern Brazilian Amazon. *The American Society of Ichthyologists and Herpetologists*. Copeia, 707-715. DOI: <http://dx.doi.org/10.1643/CE-13-058>
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.; Donnelly, P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959.
- Queiroz, L.J.; Torrente-Vilara, G.; Ohara, W. M.; Pires, T.H.S.; Zuanon, J.; Doria, C.R.C. (org.). (2013). Peixes do Rio Madeira. São Paulo: Editora Dialeto/Porto Velho: Santo Antonio Energia S.A. 1169 pp.
- Rahel, F. J. (2007). Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology*. 52: 696–710. DOI: 10.1111/j.1365-2427.2006.01708.x
- Rangel, S. M. H. (2015). *Dinâmica e estrutura populacional do jacaré-açu (*Melanosuchus niger*) na Amazônia*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia. Manaus, Brasil.
- Ray DA, Densmore LD. (2002) . The Crocodilian mitochondrial control region: general structure, conserved sequences and evolutionary implications. *J Exp Zool (Mol Dev Evol)* 294: 334–345.
- Rhodin, A.G.; Stanford, C. B.; Van Dijk, P. P.; Eisemberg, C.; Luiselli, L.; Mittermeier, R. A.; Hudson, R.; Horne, B. D.; Goode, E.V.; Kuchling, G.; et al. (2018). Global conservation status of turtles and tortoises (order Testudines). *Chelonian Conservation and Biology* 17: 135–161. DOI: <https://doi.org/10.2744/CCB-1348.1>
- Roden SE, Horne JB, Jensen MP, FitzSimmons NN, Balazs GH, Farman R, Cruce Horeg J, Hapdei J, Heidemeyer M, Jones TT, Komoroske LM, Limpus CJ, Murakawa S, Piedra R, Sarti-Martinez L, Summers T, Tatarata M, Vélez E, Zárate P and Dutton PH (2023) Population structure of Pacific green turtles: a new perspective from microsatellite DNA variation. *Front. Mar. Sci.* 10:1116941.
- Roden, S. E., Morin, P. A., Frey, A., Balazs, G. H., Zárate, P., Cheng, I.-J., et al. (2013). Green turtle population structure in the Pacific: new insights from single nucleotide polymorphisms and microsatellites. *Endanger. Species Res.* 20, 227–234. doi: 10.3354/esr00500
- Rodrigues, M. T. (2005). The Conservation of Brazilian Reptiles: Challenges for a Megadiverse Country. *Conservation Biology*. 19(3):659-664. DOI: <https://www.jstor.org/stable/3591051>
- Saccone, C.; Attimonelli, M.; Sbisà, E. (1987). Structural elements highly preserved during the evolution of the D-loop-containing region in vertebrate mitochondrial DNA. *J Mol Evol*. 26:205–211. DOI: 10.1007/BF02099853.
- Salzburger, W.; Ewing, G.B.; Von Haeseler, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Mol Ecol*, 20(9): 1952-1963.

- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. Plainview, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos, R. C. (2008). *Estrutura genética das populações de irapuca (*Podocnemis erythrocephala*, *Podocnemididae*) da Amazônia brasileira: implicações para a conservação.* Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. Manaus, Brasil. 79p
- Santos, R. C.; Viana, M. N. S.; Montelejó, L. A. S.; Andrade, P. C. M.; Pantoja-Lima, J.; Oliveira, P. H. G.; Vogt, R. C.; Pezzuti, J. C. B.; Sites JR., W. J.; Hrbek, T.; Farias, I. P. (2016). Testing the Effects of Barriers on the Genetic Connectivity in *Podocnemis erythrocephala* (Red-Headed Amazon River Turtle): Implications for Management and Conservation. ***Chelonian Conservation and Biology***. 15(1):12-22. DOI: <https://doi.org/10.2744/CCB-1184.1>
- Sbisà, E.; Tanzariello, F.; Reyes, A.; Pesole, G.; Saccone, C. (1997). Mammalian mitochondrial D-loop region structural analysis: identification of new conserved sequences and their functional and evolutionary implications. ***Gene***. 205:125–140. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(97\)00404-6](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(97)00404-6)
- Selkoe, K.A.; Toonen, R.J. (2006). Microsatellites for ecologists: a practical guide to using and evaluating microsatellite markers. ***Ecol Lett***, 9: 615-629.
- Simões, P.I., Lima, A.P., Magnusson, W.E., Hödl, W. & Amézquita, A. (2008) Acoustic and morphological differentiation in the frog *Allobates femoralis*: Relationships with the upper Madeira River and other potential geological barriers. ***Biotropica***, 40(5), 607–614.
- Sites JR. J.W.; Fitz-Simmons, N.N.; Silva JR, N.J.; Cantarelli, V.H. (1999). Conservation genetics of the giant Amazon river turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) - Inferences from two classes of molecular markers. ***Chelonian Conservation and Biology***.
- Solé-Cava & Cunha. (2012). A genética e a conservação da natureza. In S. R. Matioli, e F. M. C. Fernandes (Eds.). Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos. p.217-228.
- Souza, I.S. (2017). *Os Botos da Bacia do Rio Madeira: Diversidade Genética, Hibridização e Conservação.* Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia. Manaus, Brasil.
- Souza, M.F.; Marques, E.E.; Miranda, E.B.; Araujo, A.F. (2016). Do rio Tocantins a Hidrelétrica de Peixe Angical: os peixes e as pescarias na memória dos pescadores. ***Revista Interface***. Edição no 12, p. 119-134
- Stanford, C.B.; Iverson, J.B.; Rhodin, A.G.; van Dijk, P.P.; Mittermeier, R.A.; Kuchling, G.; Berry, K.H.; Bertolero, A.; Bjorndal, K.A.; Blanck, T.E. et al. (2020). Turtles and tortoises are in trouble. ***Current Biology***. 30: R721–R735. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2020.04.088>
- Starkey, D.E.; Shaffer, B. H.; Burke, R. L.; Forstner, M. R. J.; Iverson, J. B.; Janzen, F. J.; Rhodin, A. G. J.; Ultsch, G. R. (2003). Molecular systematics, phylogeography, and the effects of Pleistocene glaciation in the painted turtle (*Chrysemys picta*) complex. ***Evolution***. 57: 119-128. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.0014-3820.2003.tb00220.x>

- Stewart e Baker. (1994). Evolution of mtDNA *Dloop* sequences and their use in phylogenetic studies of shrews in the subgenus *Otrisorex* (Sorex: Soricidae: Insectivora). **Molecular Phylogenetics and Evolution**. 3:38-46. DOI: 10.1006/mpev.1994.1005
- Tajima, F. (1983). Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**. 105(2): 437-460. DOI: 10.1093/genetics/105.2.437
- Tajima, F. Statistical methods for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. **Genetics**, 123:585-595. 1989. DOI: 10.1093/genetics/123.3.585
- Tizuka, M.M. (2013). *Geoarqueologia e paleohidrologia da planície aluvial holocênica do alto rio Madeira entre Porto Velho e Abunã-RO*. Dissertação de Mestrado. Rio Claro, Universidade Estadual Paulista (UNESP). 170 pp.
- Torrente-Vilara, G.; Zuanon, J.; Leprieur, F.; Oberdorff, T.; Tedesco, P.A. (2011). Effects of natural rapids and waterfalls on fish assemblage structure in the Madeira River (Amazon Basin). **Ecology of Freshwater Fish**. 20(4):588-597. DOI: 10.1111/j.1600-0633.2011.00508.x
- Valenzuela, N. (2000). Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: Evidence from microsatellite DNA data. **Molecular Ecology**. v. 9, n. 1, p. 99–105. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1365-294x.2000.00806.x>
- Vargas- Ramírez, M., Stuckas, H., Castano- Mora, O. V., & Fritz, U. (2012). Extremely low genetic diversity and weak population differentiation in the endangered Colombian river turtle *Podocnemis lewyana* (Testudines: Podocnemididae). **Conservation Genetics**, 13, 65–77. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10592-011-0263-4>
- Viana, M. D., Oliveira, J. D., Agostini, M. A., Erickson, J., De Morais, G. M., Monjeló, L. A., Andrade, P. C., Félix- Silva, D., de Oliveira Júnior, W. P., Sites, J. W., Jr., Vogt, R. C., Hrbek, T., & Farias, I. P. (2017). Population genetic structure of the threatened Amazon River turtle, *Podocnemis sextuberculata* (Testudines, Podocnemididae).
- Vieira, C.P. (2015). *Estrutura genética de Podocnemis expansa (Testudines – Podocnemididae) no alto rio Madeira e sua implicação na avaliação do impacto das hidrelétricas de Jirau e Santo Antônio (Rondônia, Brasil)*. Dissertação de Mestrado. Instituto Nacional de Pesquisas da Amazonia. Manaus, Brasil.
- Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M.; Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet Sel Evol**, 34(3): 275-305.
- Vignal, A.; Milan, D.; SanCristobal, M.; Eggen, A. 2002. A review on SNP and other types of molecular markers and their use in animal genetics. **Genet Sel Evol**, 34(3): 275-305.
- Villamarín, F.; Moraes, L.J.C.L.; Ferrara, C.R.; Kaefer, I.; Werneck, F.P.; Fraga, R. (2021). Ecology and Conservation of Wetland Amphibians and Reptiles. *Encyclopedia of Inland Waters*. 2nd edition. DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819166-8.00052-9>
- Vogt, R.C. (2008). Tartarugas da Amazônia. Gráfica Biblos, Lima, Peru. 104 p
- Weir, B. S.; Cockerham, C. C. (1984). Estimating F-statistics for the analysis of population structure. **Evolution**, 38: 1358-1370.

Xiong, L.; Nie, L.; Li, X.; Liu X. (2010). Comparison research and phylogenetic implications of mitochondrial control regions in four soft-shelled turtles of Trionychidae (Reptilia, Testudinata). *Genes Genomics* 32:291–298. DOI: 10.1007/s13258-010-0015-8