

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

**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)**

CAMILA PAIVA VIEIRA

Manaus, Amazonas  
Julho, 2015

CAMILA PAIVA VIEIRA

**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)**

**Orientadora:** Dra. Camila Cherem Ribas

**Co-orientadores:** Dra. Claudia Keller; Dr. Cleiton Fantin Rezende

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

Manaus, Amazonas  
Julho, 2015

## **RELAÇÃO DA BANCA JULGADORA**

Dr. Richard Carl Vogt (INPA) ..... APROVADO

Dra. Maria da Conceição Freitas Santos (UEA) ..... APROVADO

Dra. Jacqueline Batista (INPA) ..... APROVADO

## FICHA CATALOGRÁFICA

V657 Vieira, Camila Paiva  
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) / Camila Paiva Vieira. --- Manaus: [s.n.], 2015.

-- f.: il. color.

Dissertação (Mestrado) --- INPA, Manaus, 2015.

Orientadora: Camila Cherem Ribas.

Área de concentração: Genética, Conservação e Biologia Evolutiva.

**Sinopse:** Analisou-se a estrutura genética de *Podocnemis expansa* no alto Rio Madeira e sua implicação na avaliação do impacto das hidrelétricas de Jirau e Santo Antônio (Rondônia, Brasil).

**Palavras-chave:** tartaruga-da-Amazônia, genética de populações, barreiras artificiais.

Aos meus pais que sempre  
incentivaram.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Programa de Pós-Graduação Genética Conservação, e Biologia Evolutiva (GCBEV) pela oportunidade de ter realizado o Mestrado.

A Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) por ter concedido a bolsa.

À orientadora Camila Ribas, aos co-orientadores Claudia Keller Cleiton Fantin por terem me aceitado como aluna, pela disponibilidade para discutirmos sobre o trabalho, e a colaboradora e Chrysoula Gubili pelas grandes contribuições para este trabalho, e paciência.

Às grandes amigas que me acompanharam em momentos bons e ruins: Jéssica, Erica, Nayara, Shyzuka.

Agradeço às pessoas do Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) pela convivência, aos que me ajudaram a concluir a parte da bancada de forma direta e indireta, e também os que ajudaram a usar diversos programas estatísticos: Elisama, Mateus, Jacqueline, Kyara, Paula, Giselle, Glauco, Erik, Denise, Kátia, Chrysa, Saulo, Adriel, Romina.

Agradeço a Higa, Dorothy e Fernanda do Laboratório de Proteômica e Genômica da UEA pela ajuda na interpretação da genotipagens.

Ao Programa de Monitoramento de Fauna da Santo Antônio Energia S.A., a concessionária responsável pela construção e operação da UHE Santo Antônio, no rio Madeira, no Estado de Rondônia (sudoeste da Amazônia brasileira) pelas amostras obtidas para este estudo. Agradeço a Rafael Bernhard e Daniely Felix pela colaboração na obtenção das amostras

Ao projeto de Monitoramento de Herpetofauna de Rios e Grandes Igarapés do Programa de Monitoramento de Fauna (fase de pré-enchimento) da Santo Antônio Energia S.A. pelos recursos que financiaram os reagentes utilizados na bancada para obtenção dos dados.

## SUMÁRIO

RESUMO .....	8
ABSTRACT .....	10
LISTA DE TABELAS .....	12
LISTA DE FIGURAS .....	13
INTRODUÇÃO GERAL .....	15
LITERATURA CITADA.....	22
OBJETIVOS .....	27
OBJETIVO GERAL .....	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
CAPÍTULO 1.....	28
ABSTRACT .....	30
1. INTRODUÇÃO.....	33
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	37
AMOSTRAGEM.....	37
MARCADORES MOLECULARES.....	38
Região Controle do DNA Mitocondrial.....	38
Microsatélites DNA Nuclear .....	39
ANÁLISES DE DADOS .....	39
Região Controle do DNA Mitocondrial.....	39
Microsatélites do DNA nuclear .....	41
3. RESULTADOS .....	42
Região Controle do DNA Mitocondrial.....	42
Microsatélites do DNA nuclear .....	43
4. DISCUSSÃO.....	44
Distribuição dos haplótipos na bacia amazônica.....	44
Biogeografia histórica no alto rio Madeira.....	46
Diversidade Genética .....	47
História Demográfica.....	48
Implicações para a conservação de <i>Podocnemis expansa</i> na sub-bacia rio Madeira e na bacia amazônica .....	48
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	51
TABELAS .....	63
FIGURAS.....	66
CONCLUSÕES .....	75

## RESUMO

*Podocnemis expansa* é a maior tartaruga amazônica e está distribuída ao longo das bacias dos rios Amazonas, Orinoco, e Tocantins/Araguaia. O padrão de distribuição é metapopulacional, com diferenças na estrutura genética entre sub-bacias, mas mantendo ampla conectividade. Fortes corredeiras de águas brancas estão entre as barreiras naturais à dispersão de vertebrados aquáticos. No rio Madeira, um dos principais afluentes da margem direita do Amazonas, ocorre uma sequência de 18 corredeiras que constitui uma barreira impermeável ou semi-permeável para várias espécies, de peixes a jacarés e botos. *P. expansa* foi encontrada entre todas as corredeiras do Madeira analisadas neste estudo, mas dados de captura-recaptura não foram adequados para estimar a magnitude da mobilidade da espécie entre as corredeiras. A região controle do DNA mitocondrial e cinco locos microssatélites nucleares foram analisados para estimar a diversidade genética e a conectividade de *P. expansa* entre as corredeiras, e em relação a outras partes da área de distribuição da espécie, bem como a ocorrência de possíveis gargalos populacionais recentes. Nenhuma evidência genética foi encontrada de uma recente diminuição no tamanho efetivo populacional, apesar da espécie ter sofrido intensa exploração na região desde o século XIX. O haplótipo mais comum em toda a área de distribuição da espécie também ocorreu no alto rio Madeira, reforçando a noção de uma estrutura panmítica da espécie na bacia amazônica. Três haplótipos foram registrados apenas na área de estudo, sendo um deles muito abundante entre os indivíduos amostrados. Os locos microssatélites indicaram apenas um agrupamento para a região do alto rio Madeira, enquanto o DNA mitocondrial indicou cinco grupos, que estão misturados indistintamente ao longo dos trechos entre corredeiras amostrados. A diversidade genética foi maior no alto rio Madeira do que no rio Guaporé, um afluente localizado a montante das corredeiras, sugerindo algum nível de restrição de fluxo gênico entre as duas áreas. No entanto, os resultados não suportam um efeito das corredeiras com barreira para *P. expansa*. A recente construção de duas barragens hidrelétricas no rio Madeira, por outro lado, muito provavelmente formou barreiras intransponíveis para *P. expansa*, interrompendo o fluxo gênico desta espécie entre a parte alta da sub-bacia do rio Madeira e o resto da bacia amazônica. Até 2020, trinta grandes usinas hidrelétricas serão construídas em muitos dos principais afluentes da bacia amazônica, o que irá comprometer a conectividade de *P. expansa* em uma escala geográfica equivalente a uma grande parte da sua área de distribuição brasileira. As

medidas de mitigação para *P. expansa* afetadas por barragens hidrelétricas existentes se limitam ao manejo de sítios de desova e programas de *headstarting*. No entanto, o cenário estabelecido pelo desenvolvimento hidroenergético na Amazônia brasileira exige que as medidas de mitigação incluam a preservação da conectividade de tartarugas entre acima e abaixo das barragens, a fim de garantir a integridade genética desta espécie antiga e emblemática.

**Palavras-chave:** *Podocnemis expansa*; bacia amazônica; hidrelétricas; genética de populações; região controle do DNA mitocondrial, microssatélites do DNA nuclear.

## ABSTRACT

*Podocnemis expansa* is the largest Amazonian turtle and is distributed throughout the Amazon, Orinoco, and Tocantins/Araguaia river basins. Its distribution pattern is metapopulational, with differences in genetic structure among sub-basins, but maintaining widespread connectivity. Strong white-water rapids are among the natural barriers to aquatic vertebrate dispersal. In the upper Madeira River, one of the main tributaries to the right margin of the Amazon, a sequence of 18 rapids constitutes an impermeable or semi-permeable barrier for several species, from fish to caimans and dolphins. *P. expansa* were found in between all Madeira rapids surveyed for this study, but capture-recapture was not suitable to estimate gene flow among the rapids in this species. Mitochondrial DNA control region and five nuclear microsatellite loci were analyzed to estimate genetic diversity and connectivity of *P. expansa* among the rapids, and in relation to other parts of the specie's distribution area, as well as possible recent population bottlenecks. No genetic evidence was found of a recent decrease in effective population size, despite the species being known to suffer heavy overexploitation in the region since the XIXth century. The most common haplotype throughout the species' distribution area also occurred frequently in the upper Madeira, supporting the panmictic structure of the species in the Amazon basin. Three haplotypes were recorded only in the study area, one of them being very abundant among the sampled individuals. The microsatellite loci indicated only one grouping for the upper Madeira region, while mitochondrial DNA indicated five groups, which mixed up indistinctively along the inter-rapids stretches surveyed. Genetic diversity was higher in the upper Madeira than in the Guaporé River, a tributary located upstream from the rapids, suggesting some level of gene flow restriction between the two areas. However, the results do not support a barrier effect of the rapids for *P. expansa*. The recent construction of two hydropower dams in the upper Madeira River, on the other hand, is very likely to have formed impermeable barriers for *P. expansa*, interrupting gene flow between turtles in the upland part of the Madeira sub-basin and the rest of the Amazon basin. Until 2020, thirty large hydropower plants will be constructed in many of the main tributaries of the Amazon basin, which will compromise the connectivity of *P. expansa* on a geographical scale equivalent to a large proportion of its Brazilian distribution area. Mitigation measures for affected *P. expansa* in existing hydropower dams are limited to the management of downstream egg-laying sites and headstarting programs. However,

the scenario laid out by the hydroenergetic development in the Brazilian Amazon requires that mitigation measures include the preservation of connectivity between turtles up and downstream from the dam, in order to ensure the genetic integrity of this ancient and emblematic species.

**Keywords:** *Podocnemis expansa*; Amazon basin; hydropower; population genetics; Mitochondrial DNA control region, Nuclear DNA microsatellites.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1.** Haplótipos de *Podocnemis expansa* encontrados na sub-bacia do rio Madeira e parâmetros de diversidade genética de *P. expansa* amostradas em cada localidade. Haplótipos destacados em itálico foram registrados apenas no alto rio Madeira. Dados para o rio Guaporé de Pearse *et al.* (2006). Siglas: Número de indivíduos sequenciados (N); Diversidade Haplotípica (*h*); Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ ); Testes de neutralidade D de Tajima (D) e  $F_s$  de Fu (F); Desvio Padrão (DP). Localidades: GUA = rio Guaporé (próximo de Costa Marques); GUP = rio Guaporé (Pimenteiras); PAR = a jusante da corredeira do Paredão; CAL = a jusante da corredeira do Caldeirão do Diabo; MOR = a jusante da corredeira de Morrinhos; TEO = a jusante da cachoeira de Teotônio; JUS = a jusante da corredeira de Santo Antônio.

**Tabela 2.** Estimativa dos valores das comparações par a par de  $\Phi_{ST}$  e  $F_{ST}$  entre os cinco trechos entre corredeiras amostrados. Os valores acima da diagonal correspondem ao  $\Phi_{ST}$  obtido das sequências nucleotídicas do DNAm e abaixo da diagonal ao  $F_{ST}$  obtido dos locos microssatélites. O valor destacado em itálico foi significativo antes da correção de Bonferroni. Após a correção de Bonferroni ( $p < 0,01$ ) nenhuma das comparações foi significativa. PAR= a jusante da corredeira do Paredão; CAL = Caldeirão-Morrinhos; MOR = Morrinhos-Teotônio; TEO = Teotônio-Santo Antônio; JUS = a jusante da corredeira de Santo Antônio.

**Tabela 3.** Resumo das análises estatísticas dos cinco locos microssatélites para *Podocnemis expansa* amostrados no alto rio Madeira. N - número de indivíduos;  $H_o$  - heterozigosidade observada;  $H_e$  - heterozigosidade esperada;  $\hat{A}$  - riqueza alélica;  $F_{IS}$  - coeficiente de endogamia; EHW - probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy - Weinberg;  $p < 0,01$  após a correção de Bonferroni.

## LISTA DE FIGURAS

### Figuras da Introdução Geral

**Figura A.** Fêmea adulta de *Podocnemis expansa* capturada a jusante da Cachoeira do Caldeirão (alto rio Madeira, Rondônia). Fonte: Claudia Keller.

**Figura B.** Mapa de distribuição de *Podocnemis expansa*. Fonte: Rueda-Almonacid *et al.* (2007).

**Figura C.** Mapa do norte da América do Sul mostrando as localidades amostradas por Pearse *et al.* (2006). O círculo vermelho indica a região de corredeiras do alto rio Madeira. E os círculos pretos indicam as localidades analisadas. Fonte: modificado de Pearse *et al.* (2006).

**Figura D.** Hidrelétricas planejadas, em construção, e em operação para a bacia amazônica. Fonte: Castello *et al.* (2013).

### Figuras do Capítulo 1

**Figura 1.** Mapa da América do Sul destacando a localização da área de estudo, no noroeste do Estado de Rondônia. A área destacada delimita a região do alto rio Madeira, mostrando a localização das corredeiras relevantes para as amostragens deste estudo (barras tracejadas) e a localização das barragens das usinas hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau (barras sólidas).

**Figura 2.** Rede de haplótipos gerada no programa Network (Bandelt *et al.* 1999) com 365 sequências nucleotídicas (72 sequencias do alto rio Madeira e 293 de Pearse *et al.* 2006 para outras áreas da região amazônica) da região controle do DNA mitocondrial de *Podocnemis expansa* do alto rio Madeira. As linhas que conectam os haplótipos indicam um passo mutacional e os traços são mutações adicionais. Os haplótipos com números sublinhados foram registrados apenas no alto rio Madeira. Os círculos preenchidos de branco são haplótipos não observados.

**Figura 3.** Análise bayesiana realizada no programa Baps (Corander *et al.* 2007) para estimativa do número de agrupamentos de *Podocnemis expansa* na região do alto rio Madeira utilizando a região controle do DNA mitocondrial. O gráfico mostra os cinco trechos entre corredeiras amostrados delimitados por linhas pretas. Os cinco agrupamentos bayesianos são indicados pelas cores verde, azul, vermelho, amarelo e rosa.

**Figura 4.** Relação entre distância genética e distância geográfica para *Podocnemis expansa* amostradas em cinco trechos entre corredeiras no alto rio Madeira para dados gerados a partir dos locos microssatélites (Fst) e da região controle do DNAm (distância genética de Tamura-Nei).

**Figura 5.** Probabilidade média de diferentes números de agrupamentos (K) estimada utilizando o método de Pritchard *et al.* (2000).

**Figura 6.** Variação da probabilidade média entre números sucessivos de agrupamentos (K) estimada utilizando o método de Evanno *et al.* (2005).

**Figura 7.** Probabilidades de indivíduos coletados nos diferentes trechos estudados pertencerem aos agrupamentos estimados pelo método de Pritchard *et al.* (2000), considerando diferentes valores de K. Cada indivíduo é representado por uma barra e as linhas pretas de separação representam a separação entre grupos amostrais no sentido montante a jusante no alto rio Madeira.

## INTRODUÇÃO GERAL

Evidências de fósseis e análises de marcadores moleculares sugerem que a diversificação do gênero *Podocnemis* ocorreu do Eoceno (~ 37 Mya) ao Mioceno Médio (~ 15 Mya). A linhagem de *Podocnemis expansa* (Figura A), que é o grupo irmão de todas as outras espécies do gênero, originou-se no Eoceno (~ 37 Mya) (Vargas-Ramírez *et al.* 2008).



**Figura A.** Fêmea adulta de *Podocnemis expansa* capturada a jusante da Cachoeira do Caldeirão (alto Rio Madeira, Rondônia). Fonte: Claudia Keller.

*Podocnemis expansa* é a maior espécie atual do gênero podendo atingir um tamanho máximo de aproximadamente 90 cm, e um peso médio de 30 a 45 kg (Ernest e Barbour 1989; Rueda-Almonacid *et al.* 2007). O dimorfismo sexual no tamanho do corpo é considerado característico para as tartarugas, sendo que as fêmeas atingem um tamanho maior do que os machos (Rueda-Almonacid *et al.* 2007). Há estimativas de que a fêmea pode atingir a maturidade sexual aos 11 anos (Mogollones *et al.* 2010). Quanto às características morfológicas, a carapaça é oval e achatada, com coloração variável de oliva ao cinza escuro, ou marrom, podendo haver algumas manchas escuras em indivíduos mais jovens (Ernest e Barbour 1989). A cabeça possui coloração marrom, cinza, e manchas amarelas que desaparecem com a idade (Ernest e Barbour 1989).

Diversos nomes comuns e indígenas são atribuídos a esta espécie, como por exemplo: tartaruga, chapanera, samurita, charapa, capitari, careta, chapanera, pocera, jipú, harra, arrau, galápago, gurruña, kuwe, kubee, tsapeindu, tsapanilu. Na Amazônia brasileira é popularmente conhecida como tartaruga-da-amazônia (Rueda-Almonacid *et al.* 2007). Esta espécie é amplamente distribuída nos maiores tributários dos rios Orinoco e Essequibo, e drenagens do Rio Amazonas na Colômbia, Venezuela, Guiana, Peru, Equador, Bolívia e Brasil (Vogt 2008) (Figura B). Possui hábito essencialmente

aquático, e pode ser encontrada em águas pretas, claras e barrentas (Smith 1979; Vogt 2008).



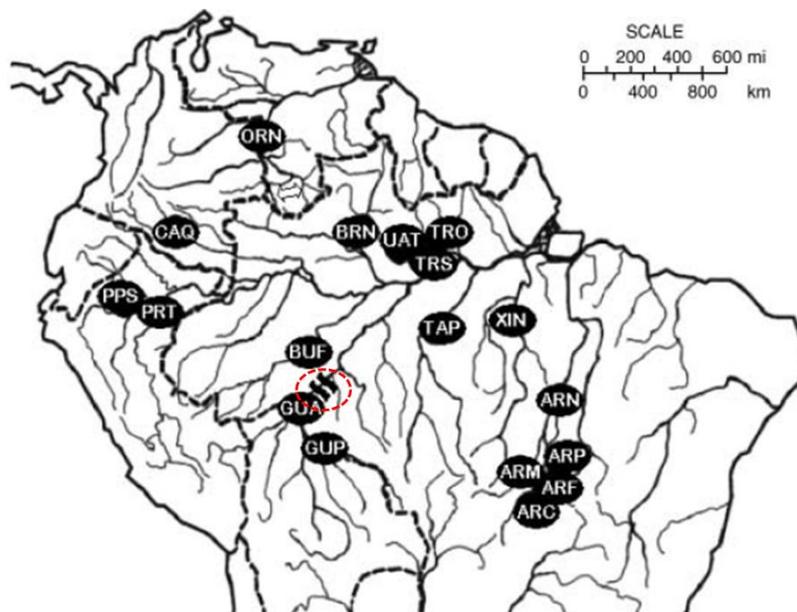
**Figura B.** Mapa de distribuição de *Podocnemis expansa*. Fonte: Rueda-Almonacid *et al.* (2007).

*Podocnemis expansa* sofreu exaustivas ações de caça desde o início da colonização europeia na região amazônica (Rebêlo e Pezzutti 2000) e conseqüentemente, os estoques naturais de tartarugas foram sendo reduzidos a níveis preocupantes (Cantarelli 2006). Esforços conservacionistas ocorrem apenas em algumas áreas de desova. Devido a sua ampla distribuição *P. expansa* ainda está classificada como Baixo Risco de Extinção/Dependente de Conservação de acordo com a Lista Vermelha da União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN 2014) e no Apêndice II da Convenção sobre o Comércio Internacional de Espécies da Fauna e Flora Selvagem (CITES 2015). No entanto, a ação antrópica pode resultar em drásticos declínios regionais de *P. expansa* e elevar esta espécie à classificação de ameaçada (Vogt 2008; Mogollones *et al.* 2010).

A espécie possui comportamento migratório anual, deslocando-se para lagos de meandro e florestas alagadas durante o período de cheia dos rios, para alimentar-se de frutos e sementes que caem na água, e realizando migração reprodutiva para regiões de praias altas de areia na época de vazante dos rios (Rueda-Almonacid *et al.* 2007; Vogt 2008; Ferrara *et al.* 2014). Há registros pontuais de deslocamentos de até 240 km entre

anos por meio de recapturas no rio Guaporé, em Rondônia (Soares 2000). No rio Trombetas, no Pará, grupos de machos e fêmeas foram localizados entre 60 e 100 km de distância da praia de nidificação (Ferrara *et al.* 2014).

O estudo filogeográfico mais completo para *Podocnemis expansa* ao nível de sua área total de distribuição foi realizado por Pearse *et al.* (2006) (Figura C). De maneira geral, esta espécie é caracterizada pela ausência de forte estrutura genética na bacia amazônica, mas com evidências de restrição do fluxo gênico entre sub-bacias. A maior diferenciação genética para a espécie foi encontrada em cinco localidades do rio Araguaia, que juntamente com o rio Tocantins deixou de ser um afluente direto do Amazonas desde o Pleistoceno (Figueiredo *et al.* 2009; Rossetti e Valeriano 2007), mas ainda mantém contato com o rio Amazonas através do sistema do Golfo Amazônico, formado ao redor da Ilha de Marajó. Na bacia amazônica, *P. expansa* amostradas no rio Guaporé, um afluente da sub-bacia do rio Madeira, apresentaram maior grau de isolamento em relação ao estimado entre outras sub-bacias do rio Amazonas. Os autores atribuíram este fato a um possível efeito de barreira exercido pelas corredeiras do alto rio Madeira, situadas a jusante do rio Guaporé, o que poderia reduzir o fluxo gênico entre as regiões de cabeceira da sub-bacia do rio Madeira e outras áreas da bacia amazônica.



**Figura C.** Mapa do norte da América do Sul mostrando as localidades amostradas por Pearse *et al.* (2006). O círculo vermelho indica a região de corredeiras do alto Rio Madeira e os círculos pretos indicam as localidades analisadas. Fonte: modificado de Pearse *et al.* (2006).

O rio Madeira é o maior tributário da bacia do Amazonas em descarga líquida e sólida (Latrubesse *et al.* 2005). Os principais afluentes que o formam tem origem andina, sendo que cerca de 50% de sua drenagem ocorre na Bolívia, 10% no Peru e 40% no Brasil (Goulding *et al.* 2003). Na região de confluência dos rios Beni e Mamoré-Guaporé para formar o rio Madeira, e em seu tramo inicial até Porto Velho, o rio corre sobre um vale encaixado pontuado por afloramentos cristalinos que resultaram na formação de 18 seções de corredeiras, com um desnível total por volta dos 70 m entre Guajará-Mirim, no rio Mamoré, e Porto Velho (Cella-Ribeiro *et al.* 2013; Tizuka 2013).

Estudos de monitoramento de fauna para um grande empreendimento hidrelétrico no rio Madeira comprovaram a ocorrência de *Podocnemis expansa* em todos os trechos entre corredeiras do alto rio Madeira, entre Porto Velho e a região de Mutum (Keller *et al.* 2013). Não existem, até hoje, estudos científicos sobre a espécie no baixo e médio rio Madeira, porém sua presença nessas regiões é conhecida por meio de alguns projetos de manejo comunitário de praias de desova (Andrade *et al.* 2011). A espécie é conhecida na região de cabeceira da sub-bacia e em praticamente todos os tributários do rio Amazonas (Iverson 1992; Rueda-Almonacid *et al.* 2007).

Cachoeiras e corredeiras podem funcionar como barreiras biogeográficas ao movimento de organismos aquáticos, e o rio Madeira é um dos poucos rios da bacia amazônica com vários relatos de que suas barreiras físicas podem interromper o movimento de animais aquáticos (Rahel 2007; Farias *et al.* 2010; Torrente-Vilara *et al.* 2011). No rio Negro (município de São Gabriel da Cachoeira), e no rio Jaú (Parque Nacional do Jaú) também há corredeiras que constituem barreiras ao fluxo gênico de *Podocnemis erythrocephala* (Santos 2008). Botos da espécie *Inia boliviensis*, formam dois agrupamentos diferenciados geneticamente acima e abaixo das corredeiras do alto rio Madeira, entre os quais se mantém uma conexão por fluxo gênico unidirecional (Gravena *et al.* 2014). O trecho de corredeiras também pode funcionar como uma zona de contato secundário seguido de hibridização para duas espécies de jacaré (*Caiman crocodilus* e *Caiman yacare*), que compartilham haplótipos nucleares e mitocondriais (Hrbek *et al.* 2008). Entretanto, para outros organismos as corredeiras do alto rio Madeira não formam barreira ao fluxo gênico, como já foi evidenciado para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e não interrompem totalmente o fluxo gênico para o bagre *Pseudoplatystoma punctifer* (Farias *et al.* 2010; Machado 2013).

Dados de captura-recaptura de dois anos para *Podocnemis expansa* na região do alto rio Madeira incluem quatro casos de transposição de corredeiras por indivíduos

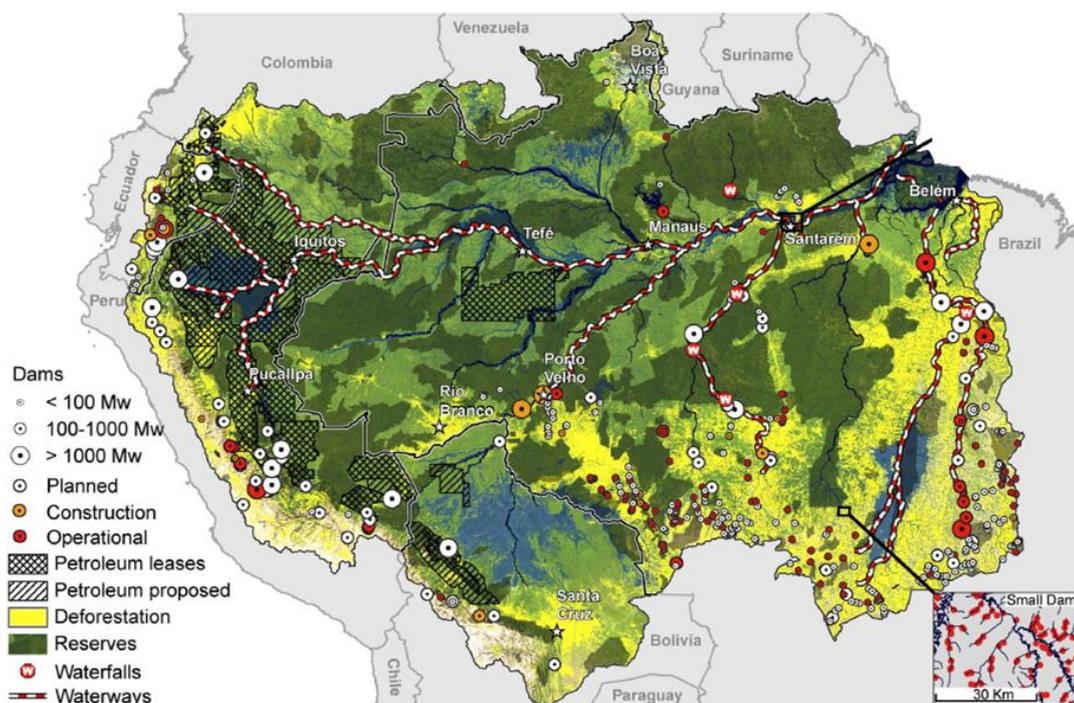
adultos e um juvenil, incluindo um caso de jusante a montante, o que indica que as tartarugas são capazes de superar as fortes correntezas entre os pedrais que formam as corredeiras (Keller *et al.* 2013). No entanto, os dados de recaptura não permitiram estimar a frequência de transposição, nem determinar inequivocamente se a espécie é capaz de transpor rio acima as maiores corredeiras da região, cachoeiras de Teotônio e Jirau, as únicas não navegáveis durante todo o ano (Tizuka 2013).

Dois empreendimentos hidrelétricos de grande porte (UHE Santo Antônio, com 3.568 MW e UHE Jirau, com 3.300 MW de potência geradora) foram instalados no alto rio Madeira e já estão operando desde 2011-2012 (Furnas 2006; AIDA 2009; Santo Antônio Energia 2015). Os lagos das represas das duas barragens, situadas a 110 km uma da outra, submergiram de forma permanente 9 das 18 corredeiras da região (Cella-Ribeiro *et al.* 2013). As medidas de mitigação de impacto ambiental dos empreendimentos incluem a construção de canais de transposição de peixes (Torrente-Vilara *et al.* 2011), mas estes dispositivos não foram projetados, nem testados para a passagem de tartarugas (C. Keller, com. pessoal). Neste contexto, o conhecimento sobre a estrutura genética de *P. expansa* ao longo da zona de corredeiras se torna relevante para o manejo da espécie na área de influência das usinas hidrelétricas e a conservação da conectividade entre populações ao nível da sub-bacia.

As hidrelétricas fazem parte do Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) do governo federal brasileiro, cujo destaque é a expansão da produção de energia elétrica (Fearnside e Millikan, 2012). Nos próximos anos, ainda está prevista para a região amazônica a construção de 30 grandes hidrelétricas (UHEs) e mais de 170 hidrelétricas menores (PCHs, com até 30MW de potência) (Brasil/MME 2011; Fearnside e Millikan 2012; Verdum 2012) (Figura D). Barragens são construções intransponíveis para organismos aquáticos, se não forem implementadas medidas específicas de mitigação de impacto, como escadas e canais que facilitem a transposição da barragem por peixes e outros organismos-alvo. O isolamento de populações a jusante e a montante de barragens pode gerar sérias consequências a longo prazo, desde a redução da diversidade genética, resultando na perda de potencial adaptativo, até a diminuição do tamanho efetivo populacional, fazendo com que seja pequena a probabilidade dos descendentes isolados representarem uma amostra aleatória do pool gênico original (Bennett *et al.* 2010).

O rio Madeira é o mais densamente habitado e explorado da região amazônica (RappPy-Daniel *et al.* 2007). O monitoramento de praias de desova de *P. expansa* no

alto rio Madeira indicou que a população reprodutiva neste trecho do rio se encontra em esgotamento por sobre-exploração de ovos e captura de indivíduos adultos (Keller *et al.* 2013). Programas de manejo comunitário de ovos e filhotes existem apenas para duas áreas de desova da espécie, no médio/ baixo rio Madeira (Andrade *et al.* 2011). A zona de corredeiras é ocupada por populações humanas de forma contínua desde o começo do período Holoceno (Tizuka 2013), portanto é provável que a coleta de ovos e pesca de adultos venha ocorrendo na região há milhares de anos. Já no final do século XIX a coleta de ovos e adultos ocorria em grande escala nos tabuleiros do rio Guaporé e alto rio Madeira, para abastecer os mercados de Manaus e Belém (Vianna 1973), e é provável que esteja refletida na estrutura genética das tartarugas na região.



**Figura D.** Hidrelétricas planejadas, em construção, e em operação para a bacia amazônica e sub-bacias. Fonte: Castello *et al.* (2013).

O conhecimento da estrutura genética de populações é entendido como etapa fundamental para a realização de programas de conservação e manejo (Cavalari 2004). A variação genética em populações é potencialmente afetada por diversos fatores, mas principalmente pela seleção, endogamia, a deriva genética, fluxo gênico, mutação e recombinação (Hedrick 2009). O objetivo central da genética aplicada à conservação é o uso de marcadores moleculares e sua interpretação ecológica e evolutiva para ajudar a minimizar os danos causados pelas atividades humanas sobre as populações (Solé-Cava e Cunha 2012).

A matéria bruta dos estudos em biodiversidade molecular é a mesma envolvida na evolução das espécies: a variabilidade gênica. É essa variabilidade que permite comparar indivíduos, populações ou espécies diferentes. A escolha do método a ser usado em cada abordagem depende de critérios científicos, como a adequação do grau de variabilidade do marcador molecular escolhido ao nível de divergência que se deseja estudar (Solé-Cava e Cunha 2012). Marcadores moleculares mitocondriais (região controle) e nucleares (locos microssatélites), por exemplo, evoluem rapidamente e são úteis para estudos de indivíduos, famílias e populações (Solé-Cava e Cunha 2012).

Várias características do DNA mitocondrial tornam-no especialmente valioso para certas aplicações na compreensão de padrões de variação genética (Allendorf e Luikart 2007). Primeiramente é haploide e herdado maternalmente na maioria das espécies, ou seja, geralmente uma progênie herda unicamente o genótipo do DNA mitocondrial da mãe. Existem milhares de moléculas de DNA mitocondrial em um óvulo, mas relativamente poucas no espermatozoide (Allendorf e Luikart 2007). O DNA mitocondrial é uma molécula de fita dupla circular e que codifica aproximadamente 5% de toda a maquinaria necessária para o funcionamento da mitocôndria (Arias e Infante-Malachias 2012). Foram descritos 37 genes, dos quais 13 codificam RNA mensageiros para proteínas envolvidas diretamente no transporte de elétrons e fosforilação oxidativa, dois para subunidades ribossômicas e 22 para RNA transportadores. Neste trabalho foi utilizada a região não codificadora do DNA mitocondrial, conhecida como D-loop nos vertebrados, que contém o controle da replicação e transcrição desse genoma (Arias e Infante-Malachias 2012). Outro marcador molecular utilizado foi locos microssatélites, que se tornaram amplamente utilizados em genética de populações para mapeamento do genoma, ecologia molecular, e os estudos de conservação (Allendorf e Luikart 2007). Eles também são chamados VNTRs (número variável de repetições em série) ou SSRs (sequências repetitivas simples) e consistem de repetições em tandem de uma sequência curta de um a seis nucleotídeos (por exemplo, cgtcgtcgtcgtcgt, que pode ser representado por (CGT) $n$ , onde  $n = 5$ ). O número de repetições em um loco polimórfico pode chegar a variar de cinco a 100 (Allendorf e Luikart 2007).

**LITERATURA CITADA**

- Allendorf, F.W.; Luikart, G. 2007. Conservation and the Genetics of Populations. ISBN-13: 978-1-4051-2145-3.
- 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.. 2011. 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. 2ª ed. Cap. 3. ProVárzea/IBAMA e AquaBio. pp 55-126.
- Arias, M.C.; Infante-Malachias, M.E. – RFLP: o emprego de enzimas de restrição para detecção de polimorfismos no DNA. In: Matioli, S. R. Biologia Molecular e Evolução. Ribeirão Preto: Holos Editora, 2012. p 143-152.
- Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente (AIDA). 2009. Informe Grandes Represas na América, Pior o Remédio que a Doença?. 13p.
- Bennett, A.M.; Keevil, M.; Litzgus, J.D. 2010. Spatial ecology and population genetics of northern map turtles (*Graptemys geographica*) in fragmented and continuous habitats in Canada. Chelonian Conservation and Biology, 9(2), 185-195.
- Brasil, MME (Ministério de Minas e Energia). 2011. Plano Decenal de Expansão de Energia 2020. MME, Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Brasília, DF. 2 vols. [http://www.epe.gov.br/PDEE/20111229\\_1.pdf](http://www.epe.gov.br/PDEE/20111229_1.pdf).
- Cantarelli, V.H. 2006. Alometria reprodutiva da tartaruga-da-Amazônia (*Podocnemis expansa*): bases biológicas para o manejo (Doctoral dissertation, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”).
- Castello, L.; McGrath, D.G.; Hess, L.L.; Coe, M.T.; Lefebvre, P.A.; Petry, P.; Arantes, C.C. 2013. The vulnerability of Amazon freshwater ecosystems. Conservation Letters, 6(4), 217-229.

- Cavallari, M.M. 2004. Estrutura genética de populações de *Encholirium* (Bromeliaceae) e implicações para sua conservação (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Cella-Ribeiro A, Torrente-Vilara G, Hungria DBDB, Oliveira M (2013) As corredeiras do rio Madeira. In: Queiroz LJ, Torrente-Vilara G, Ohara WM, Pires T, Zuanon J, Doria CRC, eds. Peixes do rio Madeira. São Paulo, Brazil: Editora Dialo, 56–63.
- CITES. 2015. the Convention on International Trade in Endangered Species of Wild Fauna and Flora. <http://www.cites.org/eng/app/appendices.php>.
- Ernst, C.H.; Barbour, R.W. 1989. Turtles of the World.
- Farias, I.P.; Torrico, J.P.; García-Dávila, C.; Santos, M.D.C.F.; Hrbek, T.; Renno, J.F. 2010. Are rapids a barrier for floodplain fishes of the Amazon basin? A demographic study of the keystone floodplain species *Colossoma macropomum* (Teleostei: Characiformes). *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 56(3), 1129–1135.
- Fearnside, P.M.; Millikan, B. 2012. Hidrelétricas na Amazônia: Fonte de energia limpa? pp. 47-54; 93-99. In: P.F. Moreira (ed.) Setor Elétrico Brasileiro e a Sustentabilidade no Século 21: Oportunidades e Desafios. 2ª ed. Rios Internacionais, Brasília, DF. 100 pp.
- Ferrara, C.R.; Vogt, R.C.; Sousa-Lima, R.S.; Tardio, B.M.; Bernardes, V.C.D. 2014. Sound Communication and Social Behavior in an Amazonian River Turtle (*Podocnemis expansa*). *Herpetologica*, 70(2), 149-156.
- Figueiredo, J.; Hoorn, C.; Van der Ven, P.; Soares, E. 2009. Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology*, 37(7), 619-622.
- Furnas. 2006. Grandiosidade Marca Obras Civis do Projeto Madeira. *Revista Furnas*, ano XXXII, N° 329.

[http://www.furnas.com.br/arqtrab/ddppg/revistaonline/linhadireta/rf329\\_pmadei.pdf](http://www.furnas.com.br/arqtrab/ddppg/revistaonline/linhadireta/rf329_pmadei.pdf).

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

Gravena, W.; Farias, I.P.; da Silva, M.N.; da Silva, V.M.; 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.

Hedrick, P. 2009. Population Genetics and Ecology. The Princeton Guide to Ecology. p109.

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.

Iverson, J.B. 1992. A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World. Printed Privately, Richmond, VA.

IUCN. 2014. The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/details/17822/0>.

Keller, C.; Bernhard, R.; Silva, D.F.; Jurado, F.V.; Romero, A.L.B. 2013. Programa de Monitoramento de Herpetofauna da UHE Santo Antônio – RO. Sub-Programa Herpetofauna Rios. Parte 2 – Quelônios. Relatório Final. 57pp. [http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidretricas/Santo Antonio \(rio Madeira\)](http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidretricas/SantoAntonio(rioMadeira)).

Latrubesse, E.M.; Stevaux, J.C.; Sinha, R. 2005. Tropical rivers. *Geomorphology*, 70 (3), 187-206.

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 (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas.

- Mogollones, S.C.; Rodríguez, D.J.; Hernández, O.; Barreto, G.R.A. 2010. Demographic Study of the Arrau Turtle (*Podocnemis expansa*) in the Middle Orinoco River , Venezuela. *Chelonian Conservation and Biology*, 9(1): 79–89.
- Pearse, D.E.; Arndt, A.D.; Valenzuela, N.; Miller, B.A.; Cantarelli, V.; Sites, 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* 15, 985-1006.
- Rahel, F.J. 2007. Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology* (2007) 52, 696–710.
- RappPy-Daniel, L.R.; Deus, C.P.; Henriques, A.L.; Pimpão, D.M.; Ribeiro, O.M. 2007. Biodiversidade do medio Madeira: bases científicas para propostas de conservação. Manaus: INPA ; Brasília: MMA : MCT,. 244 pp.
- Rebêlo, G.; Pezzuti, J.C.B. 2000. Percepções sobre o consumo de quelônios na Amazônia, sustentabilidade e alternativas ao manejo atual. *Ambiente & Sociedade*, 6 (7), 85-104.
- Rossetti, D.F.; Valeriano, M.M. 2007. Evolution of the lowest Amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. *Catena*, 70(2), 253-265.
- Rueda–Almonacid, J.V.; Carr, J.L.; Mittermeier, R.A.; Rodríguez-Mahecha, J.V.; Mast, R.B.; Vogt, R.C.; Mittermeier, C.G. 2007. Las tortugas y los crocodrilianos de los países andinos del Trópico. *Conservação Internacional*. Editorial Panamericana, Formas e Impresos. Bogotá, Colombia. 588 pp.
- 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-AM. 79p.

- Solé-Cava, A.M.; Cunha, H.Á. 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.
- Tizuka, M.M. 2013. Geoarqueologia e paleoidrologia da planície aluvial holocênica do alto rio Madeira entre Porto Velho e Abunã-RO. Dissertação de Mestrado. Rio Claro – SP. 170p.
- 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.
- Vargas-Ramírez, M.; Castaño-Mora, O.V.; Fritz, U. 2008. Molecular phylogeny and divergence times of ancient South American and Malagasy river turtles (Testudines: Pleurodira: Podocnemididae). *Organisms Diversity & Evolution*, 8(5), 388-398.
- Verdum, R. 2012. As obras de infraestrutura do PAC e os povos indígenas na Amazônia brasileira. Instituto de Estudos Socioeconômicos (INESC). 56a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Nota técnica. 56pp.
- Vianna, C.M. 1973. A tartaruga no contexto histórico. In: IICA. Proceedings do Simpósio Internacional sobre Fauna Silvestre e Pesca Fluvial e Lacustre Amazônica. Manaus. Vol. II. Instituto Interamericano de Ciências Agrícolas – IICA Trópicos; IBDF/SUDEPE. pp. 66-95.
- Vogt, R.C. 2008. Tartarugas da Amazônia. Editora INPA. 104pp.

## OBJETIVOS

### Objetivo Geral

Estimar o padrão de diversidade genética e conectividade de *Podocnemis expansa* ao longo do trecho de corredeiras do alto rio Madeira, e sua relação com *P. expansa* amostradas a montante da região de corredeiras, no rio Guaporé, e em outras sub-bacias hidrográficas abrangendo a área de distribuição da espécie.

### Objetivos Específicos

- 1) Determinar a relação entre haplótipos na área de estudo e com os encontrados na bacia amazônica;
- 2) Estimar os níveis de diversidade genética nos diferentes pontos amostrais ao longo das corredeiras do alto rio Madeira;
- 3) Determinar o grau de estruturação genética de *P. expansa* ao longo da região de corredeiras do alto rio Madeira e na escala de distribuição da espécie na Amazônia;
- 4) Analisar se houve declínio populacional recente de *P. expansa* no alto rio Madeira.

## Capítulo 1

---

Vieira, P. C.; Fantin, C.; Gubili, C. Keller, C.; Ribas, C. C. 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). *Conservation Genetics*. Em preparação.

**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)**

Camila P. Vieira<sup>1</sup>; Cleiton Fantin<sup>2</sup>; Chrysoula Gubili<sup>1</sup>; Claudia Keller<sup>3</sup>; Camila C. Ribas<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA, Av. André Araújo 2936 – Petrópolis – CEP 69067-375, Manaus – AM, Brasil

<sup>2</sup>Universidade do Estado do Amazonas - UEA, Escola Normal Superior. Av. Djalma Batista, 2470 - Chapada - CEP 69050-010 - Manaus, AM – Brasil

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia - INPA e Coordenação de Biodiversidade - CBIO, Av. André Araújo 2936 – Petrópolis – CEP 69067-375, Manaus – AM, Brasil

Autor Correspondente: Camila Paiva Vieira

Telefone: +55 (92) 82776928; e-mail: camilapav@yahoo.com

## ABSTRACT

*Podocnemis expansa* is the largest Amazonian turtle and is distributed throughout the Amazon, Orinoco, and Tocantins/Araguaia river basins. Its distribution pattern is metapopulational, with differences in genetic structure among sub-basins, but maintaining widespread connectivity. Strong white-water rapids are among the natural barriers to aquatic vertebrate dispersal. In the upper Madeira River, one of the main tributaries to the right margin of the Amazon, a sequence of 18 rapids constitutes an impermeable or semi-permeable barrier for several species, from fish to caimans and dolphins. *P. expansa* were found in between all Madeira rapids surveyed for this study, but capture-recapture was not suitable to estimate gene flow among the rapids in this species. Mitochondrial DNA control region and five nuclear microsatellite loci were analyzed to estimate genetic diversity and connectivity of *P. expansa* among the rapids, and in relation to other parts of the species' distribution area, as well as possible recent population bottlenecks. No genetic evidence was found of a recent decrease in effective population size, despite the species being known to suffer heavy overexploitation in the region since the XIXth century. The most common haplotype throughout the species' distribution area also occurred frequently in the upper Madeira, supporting the panmictic structure of the species in the Amazon basin. Three haplotypes were recorded only in the study area, one of them being very abundant among the sampled individuals. The microsatellite loci indicated only one grouping for the upper Madeira region, while mitochondrial DNA indicated five groups, which mixed up indistinctively along the inter-rapids stretches surveyed. Genetic diversity was higher in the upper Madeira than in the Guaporé River, a tributary located upstream from the rapids, suggesting some level of gene flow restriction between the two areas. However, the results do not support a barrier effect of the rapids for *P. expansa*. The recent construction of two hydropower dams in the upper Madeira River, on the other hand, is very likely to have formed impermeable barriers for *P. expansa*, interrupting gene flow between turtles in the upland part of the Madeira sub-basin and the rest of the Amazon basin. Until 2020, thirty large hydropower plants will be constructed in many of the main tributaries of the Amazon basin, which will compromise the connectivity of *P. expansa* on a geographical scale equivalent to a large proportion of its Brazilian distribution area. Mitigation measures for affected *P. expansa* in existing hydropower dams are limited to

the management of downstream egg-laying sites and headstarting programs. However, the scenario laid out by the hydroenergetic development in the Brazilian Amazon requires that mitigation measures include the preservation of connectivity between turtles up and downstream from the dam, in order to ensure the genetic integrity of this ancient and emblematic species.

**Keywords**

*Podocnemis expansa*; Amazon basin; hydropower; population genetics; Mitochondrial DNA control region, Nuclear DNA microsatellites.

## 1. INTRODUÇÃO

Quelônios aquáticos possuem vida excepcionalmente longa, o que provavelmente fornece oportunidades substanciais para a dispersão ao longo do tempo de vida e fluxo gênico dentro de sistemas hidrológicamente conectados (Pough et al. 2008; Todd et al. 2013). *Podocnemis expansa* é o maior quelônio de água doce da América do Sul e tem ampla distribuição nos maiores tributários dos rios Orinoco e Essequibo, e drenagens do rio Amazonas na Colômbia, Venezuela, Guiana, Peru, Equador, Bolívia e Brasil (Andrade 2008; Vogt 2008). A espécie possui comportamento migratório anual, deslocando-se para lagos de meandro e florestas alagadas durante o período de cheia dos rios, para alimentar-se de frutos e sementes que caem na água, e realizando migração reprodutiva para regiões de praias altas de areia na época de vazante dos rios (Rueda-Almonacid et al. 2007; Vogt 2008; Ferrara et al. 2014). Há registros pontuais de deslocamentos de até 240 km entre anos por meio de recapturas no rio Guaporé, em Rondônia (Soares 2000). No rio Trombetas, no Pará, grupos de machos e fêmeas foram localizados entre 60 e 100 km de distância da praia de nidificação (Ferrara et al. 2014).

O estudo filogeográfico mais completo para *Podocnemis expansa* ao nível de sua área total de distribuição foi realizado por Pearse et al. (2006). De maneira geral, esta espécie é caracterizada pela ausência de forte estrutura genética na bacia amazônica, mas com evidências de restrição do fluxo gênico entre sub-bacias. A maior diferenciação genética para a espécie foi encontrada em cinco localidades da bacia do rio Araguaia que, juntamente com o rio Tocantins, deixou de ser um afluente direto do Amazonas desde o Pleistoceno (Figueiredo et al. 2009; Rossetti e Valeriano 2007), mas ainda mantém contato com o rio Amazonas através do sistema do Golfo Amazônico, formado ao redor da Ilha de Marajó. Na bacia amazônica, *P. expansa* amostradas no rio Guaporé, um afluente da sub-bacia do rio Madeira, apresentaram maior grau de isolamento em relação ao estimado entre outras sub-bacias do rio Amazonas. Os autores atribuíram este fato a um possível efeito de barreira exercido pelas corredeiras do alto rio Madeira, situadas a jusante do rio Guaporé, o que poderia reduzir o fluxo gênico entre as regiões de cabeceira da sub-bacia do rio Madeira e outras áreas da bacia amazônica.

O rio Madeira é o maior tributário da bacia do Amazonas em descarga líquida e sólida (Latrubesse et al. 2005). Os principais afluentes que o formam tem origem andina, sendo que cerca de 50% de sua drenagem ocorre na Bolívia, 10% no Peru e 40% no Brasil (Goulding et al. 2003). Na região de confluência dos rios Beni e Mamoré-Guaporé para formar o rio Madeira, e em seu tramo inicial até Porto Velho, o rio corre sobre um vale encaixado pontuado por afloramentos cristalinos que resultaram na formação de 18 seções de corredeiras, entre Guajará-Mirim, no rio Mamoré, e Porto Velho, no rio Madeira, onde as maiores corredeiras da região são as chamadas cachoeiras de Teotônio e Jirau (Cella-Ribeiro et al. 2013; Tizuka 2013).

Estudos de monitoramento de fauna para um grande empreendimento hidrelétrico no rio Madeira comprovaram a ocorrência de *Podocnemis expansa* em todos os trechos entre corredeiras do alto rio Madeira, entre Porto Velho e a região de Mutum (Keller et al. 2013). Não existem, até hoje, estudos científicos sobre a espécie no baixo e médio rio Madeira, porém sua presença nessas regiões é conhecida por meio de alguns projetos de manejo comunitário de praias de desova (Andrade et al. 2011). A espécie é conhecida na região de cabeceira da sub-bacia e em praticamente todos os tributários do rio Amazonas (Iverson 1992; Rueda-Almonacid et al. 2007).

Cachoeiras e corredeiras podem funcionar como barreiras biogeográficas ao movimento de organismos aquáticos, e o rio Madeira é um dos poucos rios da bacia amazônica com vários relatos de que suas barreiras físicas podem interromper o movimento de animais aquáticos (Rahel 2007; Farias et al. 2010; Torrente-Vilara et al. 2011). No rio Negro (município de São Gabriel da Cachoeira), e no rio Jaú (Parque Nacional do Jaú) também há corredeiras que constituem barreiras ao fluxo gênico de *Podocnemis erythrocephala* (Santos 2008). Botos da espécie *Inia boliviensis* formam dois agrupamentos diferenciados geneticamente acima e abaixo das corredeiras do alto rio Madeira, entre os quais se mantém uma conexão por fluxo gênico unidirecional (Gravena et al. 2014). O trecho de corredeiras também pode funcionar como uma zona de contato secundário seguido de hibridização para duas espécies de jacaré (*Caiman crocodilus* e *Caiman yacare*), que compartilham haplótipos nucleares e mitocondriais (Hrbek et al. 2008). Entretanto, para outros organismos as corredeiras do alto rio Madeira não formam barreira ao fluxo gênico, como já foi evidenciado para o tambaqui (*Colossoma macropomum*) e não interrompem totalmente o fluxo gênico para o bagre *Pseudoplatystoma punctifer* (Farias et al. 2010; Machado 2013).

Dados de captura-recaptura de dois anos para *Podocnemis expansa* na região do alto rio Madeira incluem quatro casos de transposição de corredeiras por indivíduos adultos e um juvenil, incluindo um caso de jusante a montante, o que indica que as tartarugas são capazes de superar as fortes correntezas entre os pedrais que formam as corredeiras (Keller et al. 2013). No entanto, os dados de recaptura não permitiram estimar a frequência de transposição, nem determinar inequivocamente se a espécie é capaz de transpor rio acima as maiores corredeiras da região, as cachoeiras de Teotônio e Jirau, as únicas não navegáveis durante todo o ano (Tizuka 2013). No rio Xingu, *P. expansa* aparentemente não ocorria naturalmente acima da zona de cachoeiras na zona da volta grande do Xingu, mas foram introduzidas a montante por seringueiros e pelo próprio IBAMA (Pezzuti, 2008). A zona de cachoeiras do Xingu tem um desnível total de 80m em 160km (Pezzuti, 2008), enquanto a zona de corredeiras do alto Madeira tem um desnível de 68m em aproximadamente 400km (Tizuka, 2013).

Dois empreendimentos hidrelétricos de grande porte (UHE Santo Antônio, com 3.568 MW e UHE Jirau, com 3.300 MW de potência geradora) foram instalados no alto rio Madeira e já estão operando desde 2011-2012 (Furnas 2006; AIDA 2009; Santo Antônio Energia 2015). Os lagos das represas das duas barragens, situadas a 110 km uma da outra, submergiram de forma permanente 9 das 18 corredeiras da região (Cella-Ribeiro et al, 2013). As medidas de mitigação de impacto ambiental dos empreendimentos incluem a construção de canais de transposição de peixes (Torrente-Vilara et al. 2011), mas estes dispositivos não foram projetados, nem testados para a passagem de tartarugas (C. Keller, com. pessoal). Neste contexto, o conhecimento sobre a estrutura genética de *P. expansa* ao longo da zona de corredeiras se torna relevante para o manejo da espécie na área de influência das usinas hidrelétricas e a conservação da conectividade entre populações ao nível da sub-bacia.

As hidrelétricas fazem parte do Programa de Aceleração do Crescimento (PAC) do governo federal brasileiro, cujo destaque é a expansão da produção de energia elétrica (Fearnside e Millikan, 2012). Nos próximos anos, ainda está prevista para a região amazônica a construção de 30 grandes hidrelétricas (UHEs) e mais de 170 hidrelétricas menores (PCHs, com até 30MW de potência) (Brasil/MME 2011; Fearnside e Millikan 2012; Verdum 2012). Barragens são construções intransponíveis para organismos aquáticos, se não forem implementadas medidas específicas de mitigação de impacto, como escadas e canais que facilitem a transposição da barragem por peixes e outros organismos-alvo. O isolamento de populações a jusante e a

montante de barragens pode gerar sérias consequências a longo prazo, desde a redução da diversidade genética, resultando na perda de potencial adaptativo, até a diminuição do tamanho efetivo populacional, fazendo com que seja pequena a probabilidade dos descendentes isolados representarem uma amostra aleatória do pool gênico original (Bennett et al. 2010).

O rio Madeira é o mais densamente habitado e explorado da região amazônica (RappPy-Daniel et al. 2007). O monitoramento de praias de desova de *P. expansa* no alto rio Madeira indicou que a população reprodutiva neste trecho do rio se encontra em esgotamento por sobre-exploração de ovos e captura de indivíduos adultos (Keller et al. 2013). Programas de manejo comunitário de ovos e filhotes existem apenas para duas áreas de desova da espécie, no médio/ baixo rio Madeira (Andrade et al. 2011). A zona de corredeiras é ocupada por populações humanas de forma contínua desde o começo do período Holoceno (Tizuka 2013), portanto é provável que a coleta de ovos e pesca de adultos venha ocorrendo na região há milhares de anos. Já no final do século XIX a coleta de ovos e adultos ocorria em grande escala nos tabuleiros do rio Guaporé e alto rio Madeira, para abastecer os mercados de Manaus e Belém (Vianna 1973), e é provável que esteja refletida na estrutura genética das tartarugas na região.

Neste trabalho foi investigado o padrão de diversidade genética e conectividade de *Podocnemis expansa* ao longo do trecho de corredeiras do alto rio Madeira, e sua relação com *P. expansa* amostradas a montante da região de corredeiras, no rio Guaporé, e em outras sub-bacias hidrográficas abrangendo a área de distribuição da espécie, utilizando dados mitocondriais (região controle) e nucleares (locos microsatélites). Os objetivos específicos foram: 1) determinar a relação entre haplótipos na área de estudo e com os encontrados na bacia amazônica; 2) estimar os níveis de diversidade genética nos diferentes pontos amostrais ao longo das corredeiras do alto rio Madeira; 3) determinar o grau de estruturação genética de *P. expansa* ao longo da região de corredeiras do alto rio Madeira e na escala de distribuição da espécie na Amazônia; e 4) analisar se houve declínio populacional recente de *P. expansa* no alto rio Madeira. Os resultados obtidos poderão fornecer subsídios para a análise do efeito das barragens hidrelétricas de Jirau e Santo Antônio sobre a conectividade de *Podocnemis expansa* na sub-bacia do rio madeira, e serão discutidos no contexto da política de expansão energética na Amazônia.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### Amostragem

As amostras para este estudo foram obtidas com apoio do Programa de Monitoramento de Fauna da Santo Antônio Energia S.A., a concessionária responsável pela construção e operação da UHE Santo Antônio, no rio Madeira, no Estado de Rondônia (sudoeste da Amazônia brasileira). A barragem foi fechada em novembro 2011, inundando aproximadamente 210 km<sup>2</sup> de terra-firme e várzea, mas as amostras foram coletadas antes do fechamento das comportas. As amostragens de *Podocnemis expansa* (Figura 1) foram realizadas ao longo de um trecho de aproximadamente 220 km do rio Madeira, entre a cidade de Porto Velho (8°38'34"S;63°50'58"W) e a vila de Mutum-paraná (9°36'38"S;64°55'31"W), próximo a fronteira com a Bolívia. Neste trecho o rio Madeira é estreito e profundo com 8 seções de corredeiras, sendo as de maior desnível, Jirau e Teotônio, denominadas cachoeiras (Torrente-Vilara et al. 2011; Cella-Ribeiro et al. 2013). O canal do rio Madeira acima da cachoeira de Teotônio é morfologicamente heterogêneo, com um substrato predominantemente rochoso, exibindo valores maiores de profundidade (115-60 m), e a jusante da cachoeira de Teotônio, o substrato rochoso é substituído por um substrato barrento-arenoso com um canal mais raso e menor variação em profundidade (50-46 m) (Torrente-Vilara et al. 2011; Tizuka 2013).

O trabalho de campo foi realizado durante a época da vazante do rio Madeira, quando as tartarugas se concentram em remansos profundos na proximidade das praias de desova (Alho e Pádua 1982). A captura de *P. expansa* ocorreu de julho e setembro em 2010 e 2011, com redes de cerco de 100 m de comprimento e 10 m de altura, operadas por seis pescadores locais experientes a partir de duas canoas com motor de popa e remo. Todos os animais foram liberados no local de captura após medição e obtenção das amostras de tecido. Foram coletados pequenos pedaços (aprox. 2x2 mm) da membrana interdigital da pata posterior direita de cada indivíduo por meio de corte com tesoura de íris. Esse local de corte tem a vantagem de não causar sangramento. As amostras foram conservadas individualmente em microtubos de 1,5 ml (*Eppendorf*) com álcool 70%. As amostras foram armazenadas no Laboratório Temático de Biologia Molecular (LTBM) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA).

Foram obtidas amostras de tecido de 75 indivíduos em cinco trechos entre corredeiras da região: a jusante da corredeira de Santo Antônio (40 amostras), entre as

corredeiras de Santo Antônio e Teotônio (5), entre as corredeiras de Teotônio e Morrinhos (7), entre as corredeiras de Morrinhos e Caldeirão do Diabo (13), e a jusante da corredeira do Paredão, acima da corredeira do Jirau (10) (Figura 1).

## Marcadores Moleculares

### *Região Controle do DNA Mitocondrial*

A região controle do DNA Mitocondrial (DNAMt) foi amplificada utilizando os iniciadores: Pro (5' - CCCATCACCCACTCCCAAAGC-3'); DLR (5'-GGGATGCTGGTTTCTTGAG-3'); CSB (5'-TTATAGTGCTCTTCCCCATATTATG-3') e PodF (5'TAATCTATCTATCGCATCTTCAG-3') (Pearse et al. 2006).

As amplificações foram realizadas em um volume final de 15 µl. As concentrações e o volume de cada reagente foram respectivamente 7,2 µl de água deionizada; 3 µl de tampão 5X (Promega); 0,3 µl de dNTPs à 10 mM (Invitrogen); 1,2 µl de cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) à 25 mM (Promega); 0,3 µl de DNA Taq polimerase à 5U/µl (Promega), 1,0 µl do DNA genômico de cada indivíduo com concentração de aproximadamente 50 ng/µl. Os parâmetros de ciclagem foram 68 °C por 1 minuto; seguidos por 30 ciclos de 93 °C (um minuto), 53 °C (35 segundos), 68 °C (1 minuto e meio); e extensão final a 68 °C por 7 minutos. A purificação foi realizada utilizando polietilenoglicol (PEG). Para o sequenciamento foram utilizados o primers internos DLR (5'-GGGATGCTGGTTTCTTGAG-3'); CSB (5'-TTATAGTGCTCTTCCCCATATTATG-3') e o Pe656F: (5'-GGGTGAGTTCTATACTTT-3') que foi desenvolvido neste estudo. O sequenciamento foi realizado no sequenciador automático ABI 3130xl (Applied Biosystems) seguindo a metodologia padrão do fabricante.

Os fragmentos das sequências nucleotídicas obtidos para cada indivíduo foram agrupados no programa Geneious 8 0 2 (Kearse et al. 2012) e depois foram alinhados automaticamente utilizando a ferramenta *Clustal W* (Thompson et al. 1994) do referido programa, gerando uma matriz de dados que contém sequências nucleotídicas de todos os indivíduos analisados.

As novas sequências obtidas neste trabalho serão depositadas no Banco de Dados de Sequências Genéticas (*GenBank*) do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI). Elas serão acrescentadas às 293 sequências de outras regiões da área de distribuição da espécie já depositadas no Banco de Dados de Sequências Genéticas (*GenBank*) do Centro Nacional de Informações Biotecnológicas (NCBI). Os

números de acesso são: AF361951-361997, AY572978-572985, e DQ352567-352804 (Pearse et al. 2006)

#### *Microsatélites DNA Nuclear*

A genotipagem foi realizada para cinco locos microsatélites: PE344, PE519 e PE1075 desenvolvidos para *Podocnemis expansa* por Valenzuela (2000), e os locos Puni\_1D12 e Puni\_1E1 desenvolvidos para *Podocnemis unifilis* por Fantin et al. (2007). As ampliações foram realizadas seguindo o protocolo econômico de Schuelke (2000) com a adição de uma cauda de M13 na extremidade 5' no *forward primer*, e a fluorescência escolhida foi acoplada a esse *primer*. A quantidade de *forward primer* foi a metade do *reverse primer*. O volume total dos reagentes da PCR foi de 12,5 µl, contendo 2,3 µl de H<sub>2</sub>O, 3,0 µl de tampão 5x (Promega), 1,5 µl de MgCl<sub>2</sub> (25 mM) (Promega); 1,5 µl de *reverse primer* (2 µM), 0,75 µl de *forward primer* (2 µM), 0,75 µl de *primer* M13 marcado com fluorescências FAM, HEX ou NED (2,0 µM), 1,5 µl de dNTP mix (2,5 mM), 0,2 µl de Taq DNA Polimerase (1U/ul) (Promega), e 1 µl de DNA (aproximadamente 10 ng). A temperatura inicial de desnaturação foi de 94 °C por 2 minutos, seguida por 25 ciclos à 94 °C por 50 segundos, 54 °C por 50 segundos e 72 °C por 1 minuto. Em seguida 20 ciclos à 94 °C por 40 segundos, 53 °C por 35 segundos e 72 °C por 40 segundos com uma extensão final à 72 °C por 10 minutos.

Os produtos de PCR foram diluídos de acordo com a concentração e depois foi adicionado o marcador de tamanho ROX pUC-19 modificado de DeWoody et al. (2004). As genotipagens foram realizadas no sequenciador automático de DNA ABI 3130xl, e a análise dos alelos observados para cada loco foi feita usando o programa Gene Marker 1.9 (Soft Genetics LLC, USA).

#### **Análises de dados**

##### *Região Controle do DNA Mitocondrial*

A diversidade haplotípica ( $h$ ), a probabilidade de que duas sequências aleatórias sejam diferentes na amostra, e a diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (Nei, 1987), a média do número de diferenças nucleotídicas por sítio, foram calculadas no programa DnaSP 5.10 (Librado e Rojas, 2009). Para ambas as análises, o desvio padrão (DP) foi estimado.

A estimativa dos valores das comparações par a par de  $\Phi_{ST}$  foi obtida utilizando o programa Arlequin 3.11 (Excoffier et al. 2005), para verificar se há estrutura genética entre os cinco trechos amostrados entre corredeiras do alto rio Madeira. A Análise da Variância Molecular (AMOVA) implementada no programa Arlequin 3.11 foi realizada para as sequências nucleotídicas agrupadas em relação as duas principais cachoeiras do alto rio Madeira (Jirau e Teotônio): (1) amostras coletadas a montante de Jirau; (2) entre Jirau e Teotônio; (3) e a jusante de Teotônio. De acordo com Excoffier et al. (2006), AMOVA é essencialmente similar a outras abordagens com base em análise de variância de frequências gênicas, mas leva em conta o número de mutações entre haplótipos moleculares. Ao definir grupos de populações, define-se uma estrutura genética específica que será testada. A análise de variância hierárquica particiona a variância total em componentes de covariância, devido às diferenças intra-individuais, inter-individuais e/ou inter-populacionais.

A representação gráfica da relação dos haplótipos foi obtida utilizando o programa Network, por meio do algoritmo filogenético de rede *median-joining* (MJ) (Bandelt et al. 1999). Foram incluídas 360 sequências nucleotídicas da região controle do DNAm, sendo 72 obtidas neste trabalho e 293 obtidas no GenBank (Pearse et al. 2006).

Para testar se há estruturação das populações de *P. expansa* na região do alto rio Madeira foi utilizada a Análise Bayesiana de Estruturação Populacional (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*), implementada no programa BAPS 4.14 (Corander et al. 2006). Nesta análise, o número de grupos biológicos é definido usando-se um algoritmo Bayesiano que estima a distribuição das frequências alélicas de todas as populações em teste. Foi calculada uma probabilidade posterior, a partir de todos os indivíduos agrupados, usada para escolher o melhor valor do número de grupos na partição ideal (números de clusters) através da análise de mistura de populações com a verificação de agrupamentos de indivíduos (Corander et al. 2003).

O teste de Mantel, implementado no programa GenAlEx (Peakall e Smouse 2012), foi utilizado para determinar a correlação entre distâncias genéticas e distâncias geográficas (Mantel 1967). No gráfico gerado, as distâncias em quilômetros (km) calculadas no programa Arcmap (Copyright © 1995–2015 Esri), estão representadas no eixo X e os valores de distância genética de Tamura-Nei (1993), estimados no programa Mega 6.06 (Tamura et al. 2013), no eixo Y.

Os testes da hipótese de que todas as mutações são seletivamente neutras (Kimura 1983) foram realizados utilizando o programa DnaSP 5.10. O teste D de Tajima (Tajima 1989) é baseado no modelo de sítios infinitos sem recombinação e compara dois estimadores do parâmetro  $\theta$  da população, um com base no número de segregação de sítios na amostra, e o outro com base no número médio de diferenças de pares entre haplótipos (Excoffier et al. 2005). O teste  $F_s$  de Fu também é baseado no modelo de sítios infinitos sem recombinação (Fu 1997). Ambos os testes são sensíveis ao desvio de equilíbrio populacional como no caso de expansão da população (Fu 1997).

#### *Microsatélites do DNA nuclear*

O programa Micro-Checker 2.2.3 (Van Oosterhout et al. 2004) foi utilizado para detectar sinais de alelos nulos e artefatos de amplificação via PCR (Van Oosterhout et al. 2004). O número de alelos de cada loco foi estimado utilizando o programa Cervus 3.0.6 (Kalinowski et al. 2007). A proporção de indivíduos heterozigotos amostrados ( $H_O$ ) e heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) (Frankham et al. 2008) foram estimadas utilizando o programa Genetix 4.05 (Belkhir et al. 2004). Testes de equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) e desequilíbrio de ligação foram realizadas por meio de permutações de cadeia de Markov usando programa GenPop 4.3 (Raymond e Rousset 1995). Os níveis de significância estatísticas foram ajustados com uma correção de Bonferroni para ambos os testes de EHW e DL (Rice, 1989). O coeficiente de endogamia ( $F_{IS}$ ) foi calculado por locos entre cinco trechos de corredeiras do alto rio Madeira utilizando o programa Fstat 2.9.3.2 (Goudet 2001). Riqueza alélica ( $\hat{\Lambda}$ ) foi estimada utilizando o mesmo programa.

Para determinar a existência de estrutura genética entre os cinco trechos entre corredeiras amostrados do alto rio Madeira, foram realizadas comparações par a par dos valores de  $F_{ST}$  utilizando locos microsatélites com o programa Arlequin. A análise da variância molecular (AMOVA) implementada no programa Arlequin seguiu o mesmo critério de agrupamento dos dados mitocondriais. A estimativa do número de agrupamentos ( $K$ ) foi realizada no programa Structure 2.3.4 (Pritchard et al. 2000), que agrupa os dados de forma a minimizar os desequilíbrios de Hardy-Weinberg e de ligação intra-grupo. Os agrupamentos são definidos pelos dados sem inferência *a priori* (Solé-Cava e Cunha 2012; Pritchard et al. 2000). O modelo de ancestralidade utilizado foi o de mistura. A extensão das corridas incluiu 100,000 valores de corte (*burnin*) e

1,000,000 de simulações em cadeias de Monte Carlo (MCMC) com cinco iterações. Estatística *ad hoc* foi relacionada à taxa de mudanças na probabilidade log dos dados de acordo com o número de K propostos por Evanno et al. 2005, com K sendo usado como preditor do número ideal de agrupamentos. Os gráficos dos dados foram gerados no programa Structure Harvester (Earl e VonHoldt 2012).

Para analisar se houve redução recente do tamanho efetivo populacional de *Podocnemis expansa* na região do alto rio Madeira, foi utilizado o programa Bottleneck 1.2.02 (Piry et al. 1999). O modelo utilizado foi o de mutação de duas fases (TPM) (Di Rienzo et al., 1994). Desvios significativos foram determinados pelo teste bicaudal de Wilcoxon (Luikart e Cornuet, 1998).

Da mesma forma que para os dados de DNA mitocondrial, foram realizados uma Análise Bayesiana de Estruturação Populacional no programa BAPS, e o teste de Mantel no programa GenAlEx tendo os valores estimados de  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  no eixo Y.

O teste de Mantel implementado no programa GenAlEx também foi realizado para os locos microssatélites, sendo que o gráfico gerado apresenta as distâncias em quilômetros (km) no eixo X calculadas no Arcmap e os valores estimados de  $F_{ST}/(1-F_{ST})$  no eixo Y.

### 3. RESULTADOS

#### *Região Controle do DNA Mitocondrial*

Neste trabalho foram obtidas 72 sequências nucleotídicas de indivíduos de *Podocnemis expansa* capturados no alto rio Madeira (Rondônia), cada uma com 1183 pares de bases (pb) (Tabela 1). Os maiores valores de diversidade haplotípica ( $h$ ) (0,731;  $\pm 0,088$  DP) e diversidade nucleotídica ( $\pi$ ) (0,003;  $\pm 0,0010$  DP) foram encontrados para os quelônios entre Caldeirão e Morrinhos.

Foram observados cinco haplótipos (H) na região amostrada, aumentando para 19 o número total de haplótipos conhecidos para *P. expansa* (Figura 2). Nove dos 19 haplótipos foram representados por apenas um indivíduo (singletons). Foram encontrados apenas três haplótipos perdidos ou não observados. O haplótipo 6 havia sido registrado anteriormente apenas no rio Guaporé. O haplótipo 1 foi encontrado em tartarugas de praticamente toda a bacia amazônica e também foi frequente no alto Madeira (38% dos indivíduos). Três novos haplótipos foram encontrados na região do alto rio Madeira: o haplótipo 19, que foi o mais frequente na amostra total (44% dos

indivíduos) na maioria dos trechos analisados, e os haplótipos 18 e 19, com um registro cada, respectivamente entre Caldeirão e Morrinhos, e a jusante de Santo Antônio.

A análise bayesiana no programa BAPS indicou cinco agrupamentos (probabilidade  $\log -61,624$ ) (Figura 3). Os indivíduos pertencentes a cada agrupamento se encontram dispersos pelos cinco trechos entre corredeiras amostrados.

O teste de isolamento por distância (Figura 4) não foi significativo para a região controle do DNAm ( $R^2 = 0,347$ ;  $p = 0,056$ ). As comparações par a par dos valores de  $\Phi_{ST}$  (Tabela 2) não foram significativos após a correção de Bonferroni (Rice, 1989). Na Análise da Variância Molecular (AMOVA) nenhum dos índices de fixação foi significativo. Os testes de neutralidade  $D$  de Tajima e  $F_S$  de Fu (Tabela 1) não foram significativos para nenhum dos trechos analisados, indicando que as mutações são seletivamente neutras e não há indícios de mudanças recentes no tamanho populacional (Kimura, 1969).

#### *Microsatélites do DNA nuclear*

Foram genotipados cinco locos para 75 tartarugas da região do alto rio Madeira. O maior valor de riqueza alélica (Tabela 3) foi encontrado no trecho entre Jirau e Teotônio para o loco PE1075 (7,766). Apenas o loco PE519 se encontrou em EHW na região abaixo da corredeira de Teotônio. O teste de desequilíbrio de ligação não foi significativo para nenhum dos locos analisados. Houve evidência de alelos nulos entre as corredeiras de Jirau e Teotônio para os locos PE344 e PE519 e também a jusante da corredeira de Teotônio para os locos Puni\_1E1, PE344 e PE519.

A estimativa do número de agrupamentos biológicos de *P. expansa* presentes na região amostrada no alto rio Madeira por meio do programa Structure indicou  $K=1$  usando o método de Pritchard et al. (2000) (Figura 5). Da mesma forma, o programa BAPS indicou um único agrupamento, com probabilidade marginal de  $-119,6321$ . Usando a metodologia de Evanno et al. (2005) o Structure indicou  $K=4$  (Figura 6). No entanto, o bar plot não identificou uma diferenciação espacial entre grupos no alto rio Madeira (Figura 7), indicando que a probabilidade de uma amostra pertencer a um ou mais grupos é semelhante, de forma que nenhuma subdivisão pode ser definida. O teste de Mantel (Figura 4) não foi significativo para os dados de microsatélites ( $R^2 = 0,061$ ;  $p = 0,345$ ), indicando que não há correlação entre distância genética e distância geográfica entre as localidades amostradas. As comparações par a par dos valores de  $F_{ST}$  (Tabela 2) também não foram significativas, mostrando que não há estruturação

genética de *Podocnemis expansa* entre as corredeiras. Para a AMOVA, na qual foi utilizado o mesmo critério de agrupamento dos dados mitocondriais, nenhum dos valores de ( $p$ ) dos índices de fixação foi significativo. A análise realizada no programa Bottleneck sob modelo de mutação de duas fases (TPM), no qual os desvios significativos observados foram determinados pelo teste bicaudal de Wilcoxon, não foi significativa para os cinco locos analisados, indicando que não houve redução recente do tamanho efetivo populacional de *P. expansa* no alto rio Madeira.

#### 4. DISCUSSÃO

##### **Distribuição dos haplótipos na bacia amazônica**

A distribuição de haplótipos em *Podocnemis expansa* sugere um padrão de distribuição em estrutura metapopulacional, com sub-populações conectadas por migração ocasional de indivíduos entre elas (Sites et al. 1999; Pearse et al. 2006). O haplótipo mais abundante de *P. expansa* ocorreu em praticamente todas as localidades amostradas ao longo da bacia amazônica e na bacia do rio Orinoco, assim como em amostras do alto rio Madeira. Ocorreram três haplótipos no alto Madeira que não foram registrados em outras partes da área de distribuição, inclusive o rio Guaporé, que pertence à sub-bacia do rio Madeira. Isto é particularmente notável para o haplótipo 19, que foi registrado em 50% dos indivíduos em praticamente todas as localidades amostradas do alto rio Madeira. Essa configuração pode refletir alguma restrição de migração de fêmeas rio acima. A maior variabilidade genética observada no trecho de corredeiras amostrado (210 km) em relação à extensão abrangida pelas amostragens no rio Guaporé (aproximadamente 500 km), onde não se registraram haplótipos exclusivos, também dá suporte a uma restrição de fluxo gênico entre o rio Madeira e o rio Guaporé.

O trecho do rio Madeira amostrado neste estudo comporta nove corredeiras com até 1 km de extensão (Cella-Ribeiro et al. 2013) ao longo de 230 km, separadas por extensas porções de água livre e profunda, com a presença de numerosas praias adequadas para desova de *P. expansa*. No trecho não amostrado no rio Mamoré, oito corredeiras se sucedem ao longo de apenas 140 km, duas delas com mais de 5 km de extensão (Cella-Ribeiro et al. 2013), que pode ser mais difícil de transpor para as tartarugas e, também, menos atrativo, porque não há praias de grande porte nesta parte do rio. Além disso, o primeiro local de amostragem de Pearse et al. (2006) no rio Guaporé se situa a aproximadamente 500 km rio acima do último ponto de amostragem

deste estudo. O comportamento de filopatria reprodutiva de *P. expansa* pode implicar que a distância tem uma função mais marcada de restrição de fluxo de indivíduos do que as corredeiras, pois os dois agrupamentos amostrados provavelmente têm afinidade com distintas zonas de desova. O agrupamento reprodutor no rio Guaporé atualmente é muito numeroso (Soares 2000), enquanto que as tartarugas no alto Madeira são altamente impactadas e seus efetivos muito reduzidos (Keller et al. 2013), o que provavelmente gera um excedente de fluxo de dispersão de montante a jusante. É notável, também, que, à parte de barreiras físicas evidentes como as corredeiras, uma transição marcada de espécies foi detectada no baixo rio Madeira para assembleias de peixes (Queiroz et al. 2013) e botos, *Inia* spp (Gravena et al. 2014), evidenciando a importância de outros aspectos históricos, climáticos e/ou ecológicos na determinação do padrão de distribuição de espécies no rio Madeira.

### **Estruturação populacional nas corredeiras do alto rio Madeira**

Todas as análises para detecção de estruturação populacional, tanto com os dados de DNA mitocondrial, como de locos microssatélites, indicaram a ocorrência de um único agrupamento biológico na região de corredeiras ou a ocorrência de mais de um agrupamento, mas sem relação espacial entre os agrupamentos e as corredeiras. Os resultados evidenciam a ausência de restrição histórica ou atual (antes da construção das barragens) ao fluxo gênico de *P. expansa* relacionado às corredeiras. Com isso se confirmam os resultados indicativos das amostragens de captura-recaptura, de que as tartarugas eram capazes de transpor habitualmente todas as corredeiras da zona de estudos (Keller et al. 2013). Muitos dos indivíduos capturados apresentavam marcas de raspado e bordas quebradas da carapaça (C. Keller, obs. pessoal), condizentes com a passagem frequente por locais rochosos com forte correnteza. Não há evidência de fluxo unidirecional no trecho de corredeiras, seja para montante ou para jusante.

A jusante da corredeira de Santo Antônio, os cinco locos microssatélites estavam fora de Equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) (Tabela 3), provavelmente devido à presença de alelos nulos para os locos PE344, PE1075 e Puni\_1E1, que possuem deficiência de heterozigoto. Em outros rios da bacia amazônica, o padrão mais consistente de desvio do EHW em *P. expansa* foi encontrado no rio Purus, onde 7 de 9 locos estavam fora do EHW (Pearse et al. 2006), provavelmente como resultado da redução populacional de tartarugas por sobre-exploração (Pantoja-Lima 2007).

## Biogeografia histórica no alto rio Madeira

A bacia do rio Madeira assumiu sua configuração atual após as últimas fases de soerguimento dos Andes e a transgressão do Arco de Purus, que alguns autores datam no Mioceno tardio (~ 10 Mya, Hoorn et al. 2010) e outros no Plio-Pleistoceno (~6-3 Mya, Latrubesse et al. 2010; Nogueira et al. 2013). A região de corredeiras do alto rio Madeira situa-se na unidade morfoestrutural Alto Estrutural Guajará Mirim-Porto Velho, que representa uma porção do embasamento soerguido por tectônica durante o Cenozoico, formando um vale encaixado, marcado por níveis de base locais (corredeiras, travessões e saltos) e planícies de inundação pouco extensas (Souza Filho et al. 1999; Dantas e Adamy 2005). A formação das corredeiras provavelmente está relacionada com o soerguimento do Arco de Fitzcarrald há não mais que 4 Mya (Espurt et al. 2007).

A divergência genética entre os grupos de *Inia boliviensis* abaixo e acima das corredeiras do Madeira coincide aproximadamente com a transição do Pleistoceno médio para o superior (por volta de 120 mil anos atrás), que marca a transição entre dois períodos glaciais (Gravena et al. 2014). Registros geológicos dos sedimentos fluviais indicam condições climáticas secas e redução do nível d'água na Amazônia durante períodos glaciais (Van der Hammen e Hooghiemstra 2000; Latrubesse 2003), incluindo o vale do rio Madeira (Feitosa et al. 2015). Nestas condições o efeito de barreira das corredeiras pode ter se acentuado, afetando de forma variável a distintas espécies. Por exemplo, a dourada (*Brachyplatystoma rousseauxii*), um grande bagre migrador, provavelmente forma uma população panmítica na bacia amazônica (Batista, 2010), porém existem dois agrupamentos dentro da bacia do rio Madeira, entre Villa Bella, próximo da confluência dos rios Mamoré e Beni, e Puerto Villarroel, rio Ichilo (Bolívia) (Carvajal-Vallejos et al. 2014). Por outro lado, dados genéticos indicaram que as corredeiras do alto rio Madeira não formam uma barreira absoluta ao fluxo gênico de tambaqui (*Colossoma macropomum*) entre a bacia amazônica e a sub-bacia boliviana (Farias et al. 2010). Já para o jacaré, *Paleosuchus palpebrosus*, foram encontrados haplótipos compartilhados entre o Madeira e a Bolívia, e isto somente ocorreu em localidades próximas ao conjunto de corredeiras do rio Madeira, sugerindo que a região funciona como zona de contato ou transição entre duas populações desta espécie (Muniz 2012).

A origem da configuração atual da bacia amazônica é recente se comparada à idade da linhagem que originou *P. expansa*, que, de acordo com análises utilizando datação molecular e o registro fóssil, surgiu no Eoceno Tardio, há aproximadamente 37 milhões de anos (Vargas-Ramírez et al. 2008). Os fósseis conhecidos de *Podocnemis* datam do Mioceno do Peru, Colômbia e da Formação Solimões no Brasil (Carvalho et al 2002), quando a Amazônia ocidental era coberta por uma extensa formação lacustre, antes da transgressão do Arco do Purus (Hoorn et al 2010). Entretanto, mesmo com a longa história de *P. expansa* na Amazônia, e em contraste com os resultados encontrados para alguns outros organismos aquáticos, como os botos e a dourada, os resultados obtidos com ambos os marcadores utilizados neste trabalho indicam que as corredeiras não causaram restrição de fluxo gênico no alto rio Madeira, nem historicamente, nem em tempo mais recente. Isto indica que *P. expansa* tinha capacidade de atravessar a região de corredeiras do alto rio Madeira antes da construção das barragens, e que a estrutura metapopulacional da espécie seria mais influenciada pela conformação da drenagem, disponibilidade de praias para desova e possível filopatria das fêmeas do que pelas corredeiras.

### **Diversidade Genética**

A diversidade genética representa a matéria-prima para facilitar a adaptação a mudanças ambientais por meio de seleção natural (Alacs et al. 2007). Dadas as atuais taxas de mudança ambiental, o potencial adaptativo das populações estará intimamente ligado à sua probabilidade de persistência a longo prazo (Alacs et al. 2007). No alto rio Madeira, o maior valor de diversidade nucleotídica foi encontrado entre as corredeiras de Caldeirão e Morrinhos, tendo sido maior que os valores encontrados no rio Guaporé, e entre Morrinhos, Teotônio (apesar de que o tamanho amostral em MOR e TEO foi muito pequeno) e a jusante de Santo Antônio (Tabela 1). Santo Antônio é a primeira corredeira do alto Madeira, portanto é interessante que a diversidade encontrada abaixo da região de corredeiras tenha sido tão baixa quanto a encontrada no rio Guaporé. É possível que os trechos intermediários entre corredeiras recebam tanto indivíduos vindos de jusante como de montante, mantendo nestes trechos uma maior diversidade. Esse processo está interrompido desde a construção das barragens e a diversidade da população total do sistema Madeira-Guaporé poderá ser gravemente afetada.

## **História Demográfica**

Apesar de que os dados genéticos não detectaram um declínio recente do tamanho efetivo populacional de *P. expansa*, existem indícios de exploração antiga da espécie na região. Datações de sítios arqueológicos encontrados às margens do rio Madeira indicaram que houve uma intensificação de ocupações humanas a região por volta dos 2000-1000 AP, com registro de 139 sítios pré-coloniais com evidências de material cerâmico, lítico e/ou rupestres (Tizuka 2013). Desde o final do século XIX enchiam-se os porões de navios e composições de vagões de transporte de gado da ferrovia Madeira-Mamoré com tartarugas capturadas nos tabuleiros de desova da região, para abastecer os mercados de Manaus e Belém (Vianna 1973). No mesmo período estima-se que cerca de 4 milhões de ovos foram coletados no rio Madeira para consumo humano (Smith 1979; Vogt 2008). Um levantamento populacional recente de *P. expansa* no alto rio Madeira indicou que a população reprodutiva na região se encontra muito reduzida (Keller et al. 2013). Nos tabuleiros do rio Guaporé, registros da transição entre os séculos XIX-XX relatam que “a viração de tartarugas assumia aspecto de extinção da espécie” (Vianna 1973). Em décadas recentes, um programa de proteção de tabuleiros de desova na área de Costa Marques proporcionou a recuperação da população reprodutora de *P. expansa* (Soares 2000; Cantarelli 2006). No entanto, da mesma forma que no alto Madeira, análises genéticas também não indicaram declínio ou expansão populacional recente no rio Guaporé (Pearse et al. 2006). A discrepância entre dados históricos e indicadores genéticos de gargalos populacionais pode ser devida ao efeito da conectividade entre as diferentes partes da sub-bacia do Madeira e outras sub-bacias, que acaba mantendo a diversidade genética local. Também há que considerar que o longo tempo geracional da espécie implica que os efeitos de impactos demográficos levam mais tempo para ser registrados a nível genético.

## **Implicações para a conservação de *Podocnemis expansa* na sub-bacia rio Madeira e na bacia amazônica**

A noção generalizada é a de que as medidas de mitigação e compensação de impactos causados por reservatórios de barragens hidrelétricas sobre quelônios amazônicos devem incluir proteção de ninhos, controle de predadores, restauração de habitats e proteção contra caça e pesca de adultos (Alho 2000). De fato, as medidas conhecidas de mitigação de impacto sobre *P. expansa* em empreendimentos hidrelétricos na Amazônia enfocam o manejo de praias remanescentes ou artificiais de

desova e programas de *headstarting* de filhotes (Oliveira et al. 2011; Sábato e Félix-Silva 2014). Mesmo em empreendimentos antigos, como a hidrelétrica de Balbina, em operação desde 1987 no rio Uatumã (Amazonas), nenhuma atenção foi dirigida às tartarugas isoladas a montante da barragem; todas as ações de conservação têm sido dirigidas a jusante do empreendimento (E. Arévalo Gomes, CPPQA Balbina, com. pessoal). A proteção e manejo de desovas e filhotes são importantes medidas de conservação de *P. expansa* no contexto de reservatórios de hidrelétricas, especialmente quando a situação pré-existente era de sobre-exploração, como no caso das hidrelétricas do Madeira. Porém, as barragens de Santo Antônio e Jirau muito provavelmente criaram barreiras intransponíveis para *P. expansa* no rio Madeira. A interrupção da conectividade que existia entre tartarugas abaixo e acima das barragens foi desconsiderada como um impacto sobre a espécie. A avaliação e implementação de medidas mitigatórias que assegurem a preservação do contato das tartarugas da parte alta da sub-bacia com o resto da bacia amazônica seriam de grande importância neste caso, considerando os significativos efetivos que a espécie apresenta no Guaporé e na Bolívia.

Desde o final da década de 1970, *Podocnemis expansa* tem sido objeto de esforços oficiais de conservação do governo brasileiro, por meio do Projeto Quelônios da Amazônia, coordenado pelo IBAMA. O projeto estabeleceu unidades de conservação e colabora com comunidades locais para promover a proteção de tabuleiros de desova e o incremento da sobrevivência de quelônios recém-nascidos (programas de *headstarting*) (Cantarelli 2006; Alves-Júnior et al. 2012). Esta estratégia teve sucesso na conservação de estoques de matrizes e na recuperação de índices de recrutamento juvenil em enclaves de proteção isolados na Amazônia (Cantarelli 2006). Em parte, como consequência destes esforços de conservação, e também devido a sua ampla área de distribuição, *Podocnemis expansa* ainda está classificada como Baixo Risco de Extinção/Dependente de Conservação pela União Internacional para Conservação da Natureza (IUCN 2014). Porém, a continuidade deste status de conservação depende da manutenção de vias migratórias sazonais entre áreas de reprodução e áreas de forrageio, e da conectividade entre as sub-bacias do rio Amazonas para preservar a integridade genética da espécie.

O projeto de expansão energética do governo brasileiro prevê a instalação de 30 grandes hidrelétricas (>30MW de potência geradora) na Amazônia até 2020 (Brasil/MME 2011), e aproximadamente um centenar a mais estão planejadas para as

décadas subsequentes (Fearnside e Milikan 2012). Para cada empreendimento é realizada uma avaliação de impacto individual, sem levar em conta o impacto conjunto de outros projetos que fazem parte do plano de desenvolvimento de uma bacia hidrográfica (Fearnside e Laurance 2012). A sub-bacia do rio Madeira não é exceção. Os estudos preparatórios para as hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau incluíram uma avaliação de viabilidade técnica de uma hidrovia e duas outras hidrelétricas, uma binacional no rio Beni e outra no rio Guaporé, sem que estas obras tenham sido contempladas no estudo de impacto ambiental (Furnas 2005). As duas hidrelétricas do alto rio Madeira, localizadas a apenas 110km uma da outra, realizaram de forma integrada a avaliação de impacto e monitoramento de ictiofauna (ESBR 2011). Para nenhum outro grupo de vertebrados aquáticos, inclusive quelônios, uma avaliação conjunta foi considerada necessária.

Várias grandes hidrelétricas construídas ou planejadas para a Amazônia bloqueiam ou bloquearão o canal do rio principal da sub-bacia, como Santo Antônio e Jirau, no rio Madeira, Bem Querer, no rio Branco, Belo Monte, no rio Xingu, São Luiz do Tapajós e Jatobá, no rio Tapajós, Cachoeira Porteira, no rio Trombetas, Tucuruí, Estreito e Serra Quebrada, no rio Tocantins, e Santa Isabel, no rio Araguaia. Nestes casos, o potencial de impacto sobre o padrão de dispersão de *Podocnemis expansa* é ainda maior, porque interrompe o fluxo gênico ao nível de toda a sub-bacia. Um exemplo é a mega-hidrelétrica de Tucuruí, que entrou em operação no baixo rio Tocantins em 1984, forma, há 30 anos, uma barreira à dispersão de tartarugas entre as bacias do Amazonas e Tocantins/Araguaia.

## **AGRADECIMENTOS**

As amostras para este estudo foram obtidas com apoio do Programa de Monitoramento de Fauna da Santo Antônio Energia S.A., a concessionária responsável pela construção e operação da UHE Santo Antônio, no rio Madeira, no Estado de Rondônia (sudoeste da Amazônia brasileira). A coleta de amostras foi realizada com autorização das licenças de captura, coleta e transporte de material biológico do IBAMA n° 067/2010 e 138/2011 (processo n° 02001.000965/2008-83). CPV recebeu uma bolsa de mestrado da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas – FAPEAM. Agradecemos a Rafael Bernhard e Daniely Felix pela colaboração na obtenção das amostras.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alacs EA, Janzen FJ, Scribner KT (2007) Genetic issues in freshwater turtle and tortoise conservation. *Chelonian Res Monogr*, 4: 107-123
- Alho, CJ, Pádua, LF (1982) Reproductive parameters and nesting behavior of the Amazon turtle *Podocnemis expansa* (Testudinata: Pelomedusidae) in Brazil. *Canadian Journal of Zoology*, 60(1): 97-103
- Alho CJ (2000) Environmental effects of hydropower reservoirs on wild mammals and freshwater turtles in Amazonia: a review. *Oecologia Australis*, 15:593-604
- Alves-Júnior JRF, Lustosa APG, Bosso ACS, Balestra RAM, Bastos LF, Miranda LB, Santos A L Q (2012) Reproductive indices in natural nests of giant Amazon river turtles *Podocnemis expansa* (Schweigger, 1812) (Testudines, Podocnemididae) in the Environmental Protection Area Meanders of the Araguaia river. *Brazilian Journal of Biology*, 72(1): 199-203
- Andrade PCM (2008) Criação e manejo de quelônios no Amazonas. Manaus: Ibama, ProVárzea. ISBN 978-85-7300-262-1. 528p
- Andrade PCM, Duarte JAM, Oliveira PHG, Costa PM, Vicente A, Brelaz A, Almeida-Junior CD, Rodrigues W, Nascimento J, Medeiros HC, Mendonça-Neto L, Azevedo SH, Pinto JRS (2011) 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. 2ª ed. Cap. 3. ProVárzea/IBAMA e AquaBio. pp 55-126
- Asociación Interamericana para la Defensa del Ambiente (AIDA) (2009) Informe Grandes Represas na América, Pior o Remédio que a Doença?. 13p
- Batista SB (2010) Caracterização genética da dourada – *Brachyplatystoma rousseaxii*, Castelnau, 1855 (Siluriforme: Pimelodidae) na Amazônia por meio de marcadores moleculares mitocondriais e microssatélites: subsídios para conservação e manejo. Tese Doutorado. INPA. Manaus, 2010. 148p

- Bandelt H, Forster P, Röhl A (1999) Median-Joining Networks for Inferring Intraspecific Phylogenies. *Molecular Biology and Evolution*, 16(1):37–48
- Belkhir K, Borsa P, Chikhi L, Raufaste N, Bonhomme F (2004) GENETIX 4.05, logiciel sous Windows TM pour la génétique des populations. Laboratoire Génome, Populations, Interactions, CNRS UMR 5000, Université de Montpellier II, Montpellier (France)
- Bennett AM, Keevil M, Litzgus JD (2010) Spatial ecology and population genetics of northern map turtles (*Graptemys geographica*) in fragmented and continuous habitats in Canada. *Chelonian Conservation and Biology*, 9(2): 185-195
- Brasil MME (Ministério de Minas e Energia) (2011) Plano Decenal de Expansão de Energia 2020. MME, Empresa de Pesquisa Energética (EPE). Brasília, DF. 2 vols. [http://www.epe.gov.br/PDEE/20111229\\_1.pdf](http://www.epe.gov.br/PDEE/20111229_1.pdf)
- Carvajal-Vallejos FM, Duponchelle F, Desmarais E, Cerqueira F, Querouil S, Nuñez, J, Renno JF (2014) Genetic structure in the Amazonian catfish *Brachyplatystoma rousseauxii*: influence of life history strategies. *Genetica*, 142(4): 323-336
- Carvalho P, Bocquentin J, Lapparent de Broin F (2002) Une nouvelle espèce de *Podocnemis* (Pleurodira, Podocnemididae) provenant du Néogène de la Formation Solimões, Acre, Brésil. *Geobios*, 35:677-686
- Cella-Ribeiro A, Torrente-Vilara G, Hungria DBDB, Oliveira M (2013) As corredeiras do rio Madeira. In: Queiroz LJ, Torrente-Vilara G, Ohara WM, Pires T, Zuanon J, Doria CRC (eds). Peixes do rio Madeira. São Paulo, Brazil: Editora Dialetto, 56–63
- Corander J, Waldmann P, Sillanpää MJ (2003) Bayesian analysis of genetic differentiation between populations. *Genetics*, 163(1): 367-374
- Corander J, Marttinen P (2006) Bayesian identification of admixture events using multi-locus molecular markers. *Molecular Ecology*, 15: 2833-2843

- Dantas M E, Adamy A (2005) Complexo Hidrelétrico do Rio Madeira - Geomorfologia – Setor Santo Antônio. Convênio Furnas/ CPRM. Ministério de Minas e Energia – MME/ Serviço Geológico do Brasil – CPRM – Residência de Porto Velho. Porto Velho. 96p
- DeWoody JA, Schupp J, Kenefic L, Busch J, Murfitt L, Keim P (2004) It ROX!. *Biotechniques*, 37(3): 348-352
- Di Rienzo A, Peterson AC, Garza JC, Valdes AM, Slatkin M, Freimer NB (1994) Mutational processes of simple-sequence repeat loci in human populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91(8): 3166-3170
- Earl DA (2012) STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 359-361
- Escalona T, Engstrom TN, Hernandez OE, Bock BC, Vogt RC, Valenzuela N (2009) Population genetics of the endangered South American freshwater turtle, *Podocnemis unifilis*, inferred from microsatellite DNA data. *Conservation Genetics*, 10:1683–1696
- ESBR (2011) Estratégia de transposição de peixes. Programa de Conservação da Ictiofauna do Aproveitamento Hidrelétrico do Jirau. Energia Sustentável do Brasil – ESBR. Relatório técnico, 23 pp. <http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidreletricas/Jirau>
- Espurt N, Baby P, Brusset S, Roddaz M, Hermosa W, Regard V, Antoine P-O, Salas-Gismondi R, Bolaños R (2007) How does the Nazca Ridge subduction influence the modern Amazonian foreland basin? *Geology*, 35:515-518
- Evanno G, Regnaut S, Goudet J (2005) Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8): 2611-2620

- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin Ver 3.01: An integrated software package for population genetics. *Evol Bio Inform Online*,1, 47-50
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2006) An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis. Arlequin ver 3.1 user manual. <http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3>
- Fantin C, Carvalho CF, Hrbek T, Sites JW, Monjelo LA, Astolfi-Filho S, Farias IP (2007) Microsatellite DNA markers for *Podocnemis unifilis*, the endangered yellow-spotted Amazon River turtle. *Molecular Ecology Notes*, 7(6): 1235-1238
- Farias IP, Torrico JP, García-Dávila C, Santos MDCF, Hrbek T, Renno JF (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
- Fearnside PM, Laurance WF (2012) Infraestrutura na Amazônia: as lições dos planos plurianuais. *Caderno CRH*, 25:87-98
- Fearnside PM, Millikan B (2012) Hidrelétricas na Amazônia: Fonte de energia limpa? pp. 47-54; 93-99. In: P.F. Moreira (ed.) *Setor Elétrico Brasileiro e a Sustentabilidade no Século 21: Oportunidades e Desafios*. 2ª ed. Rios Internacionais, Brasília, DF. 100 pp
- Feitosa YO, Absy ML, Latrubesse EM, Stevaux JC (2015) Late Quaternary vegetation dynamics from central parts of the Madeira River in Brazil. *Acta Botanica Brasilica*, 29(1): 120-128
- Ferrara CR, Vogt RC, Sousa-Lima RS, Tardio BM, Bernardes VCD (2014) Sound Communication and Social Behavior in an Amazonian River Turtle (*Podocnemis expansa*). *Herpetologica*, 70(2): 149-156
- Figueiredo J, Hoorn C, Van der Ven P, Soares E (2009) Late Miocene onset of the Amazon River and the Amazon deep-sea fan: Evidence from the Foz do Amazonas Basin. *Geology*, 37(7): 619-622

- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2008) Fundamentos de genética da conservação. Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética. 280p
- Fu YX (1997) Statistical tests of neutrality of mutations against population growth, hitchhiking and background selection. *Genetics*, 147(2): 915-925
- Furnas/Odebrecht/Leme Eng (2005) Estudo de Impacto Ambiental dos aproveitamentos hidrelétricos Santo Antônio e Jirau, Rio Madeira, Rodônia. Tomo A, Volume 1, 191pp. [http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidretricas/Santo Antonio \(Rio Madeira\)](http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidretricas/SantoAntonio(RioMadeira))
- Furnas (2006) Grandiosidade Marca Obras Civis do Projeto Madeira. *Revista Furnas*, ano XXXII, N° 329. [http://www.furnas.com.br/arqtrab/ddppg/revistaonline/linhadireta/rf329\\_pmadei.pdf](http://www.furnas.com.br/arqtrab/ddppg/revistaonline/linhadireta/rf329_pmadei.pdf)
- Goudet J (2001) FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3). Department of Ecology and Evolution, University of Lausanne. 485-6
- Goulding M, Barthem R, Ferreira, E (2003) *The Smithsonian atlas of the Amazon*. Princeton Editorial Associates, London. 253pp
- Gravena W, Farias IP, da Silva MN, et al. (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
- Horn C, Wesselingh FP, Ter Steege H, Bermudez MA, Mora A, Sevink J, Antonelli A (2010) Amazonia through time: Andean uplift, climate change, landscape evolution, and biodiversity. *Science*, 330(6006): 927-931
- Hrbek T, Vasconcelos WR, Rebelo G, Farias IP (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

- Iverson JB (1992) A Revised Checklist with Distribution Maps of the Turtles of the World. Printed Privately, Richmond, VA
- IUCN (2014) The IUCN Red List of Threatened Species. <http://www.iucnredlist.org/details/17822/0>
- Kalinowski ST, Taper ML, Marshall TC (2007) Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment. *Molecular Ecology*, 16: 1099-1106
- Kearse M, Moir R, Wilson A, Stones-Havas S, Cheung, M, Sturrock S, Buxton S, Cooper A, Markowitz S, Duran C, Thierer T, Ashton B, Mentjies P, Drummond A (2012) Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12), 1647-1649
- Keller C, Bernhard R, Silva DF, Jurado FV, Romero ALB (2013) Programa de Monitoramento de Herpetofauna da UHE Santo Antônio – RO. Sub-Programa Herpetofauna Rios. Parte 2 – Quelônios. Relatório Final. 57pp. [http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidreletricas/Santo Antonio \(Rio Madeira\)](http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidreletricas/Santo Antonio (Rio Madeira))
- Kimura M (1983) *The Neutral Theory of Molecular Evolution*. Cambridge University Press, Cambridge, MA
- Latrubesse E (2003) The Late Quaternary paleohydrology of large South-American fluvial systems. In: Gregory, K; Benito, G. (Eds). *Palaeohydrology: understanding global change*. J. Wiley & Sons: pp.193-212
- Latrubesse EM, Stevaux JC, Sinha R (2005) Tropical rivers. *Geomorphology*, 70(3): 187-206
- Latrubesse EM, Cozzuol M, da Silva-Caminha SA, Rigsby CA, Absy ML, Jaramillo C (2010) The Late Miocene paleogeography of the Amazon Basin and the evolution of the Amazon River system. *Earth-Science Reviews*, 99(3): 99-124

- Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25(11): 1451-1452
- Luikart G, Cornuet JM (1998) Empirical evaluation of a test for identifying recently bottlenecked populations from allele frequency data. *Conservation Biology*, 12(1): 228-237
- Machado ASC (2013) Genética populacional do bagre amazônico *Pseudoplatystoma punctifer* (Siluriformes: Pimelodidae) nas sub-bacias dos Rios Madeira e Mamoré/Guaporé. 89 f.: il. color. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27(2 Part 1): 209-220
- Muniz FDL (2012) Filogeografia e genética de populações de jacaré-paguá (*Paleosuchus palpebrosus*) ao longo do rio Madeira e bacia do rio Paraguai (Pantanal). Dissertação (Mestrado em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva). Instituto Nacional de Pesquisa da Amazônia/Universidade Federal do Amazonas. 61p
- Nei M (1987) Phylogenetic trees. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. pp. 287-326
- Nogueira ACR, Silveira R, Guimarães JTF (2013) Neogene-Quaternary sedimentary and paleovegetation history of the eastern Solimões Basin, central Amazon region. *Journal of South American Earth Sciences*, 46:89-99
- Oliveira PH, Nascimento S, Lazzari S. (2011) Proteção e monitoramento das áreas de reprodução de quelônios no Rio Uatumã, no criadouro científico, praias artificiais e praias naturais com participação comunitária através de ações sócio-ambientais (Amazonas, Brasil). *Proceedings do 1º Workshop de Estratégias para a Conservação de Quelônios da Amazônia: Proteção de Praias*. INPA/AIHA/CEUC Amazonas. pp 18-26

- Pantoja-Lima J (2007) Aspectos da Biologia Reprodutiva de *Podocnemis expansa* Schweigger, 1812, *Podocnemis sextuberculata* Cornalia, 1849 e *Podocnemis unifilis* Troschel, 1848 (Testudines: Podocnemididae) na Reserva Biológica do Abufari, Amazonas, Brasil. Manaus: Programa de Pós-Graduação em Biologia Tropical e Recursos Naturais do convênio INPA/UA, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Amazonas; 74 p
- Peakall R, Smouse PE (2012) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6(1): 288-295
- Pearse, DE, Arndt AD, Valenzuela N, et al. (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*, 15: 985-1006
- Pezzuti J (2008) Estudo de Impacto Ambiental – EIA do Aproveitamento Hidrelétrico Belo Monte. Componente Quelônios e Crocodilianos. Relatório técnico final para Leme Engenharia Ltda. 185 pp.  
<http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidretricas/Belo Monte>
- Piry S, Luikart G, Cornuet JM (1999) BOTTLENECK: a program for detecting recent effective population size reductions from allele frequency data. *Journal of Heredity*, 90:502-503
- Pough FH, Christine MJ, John BH (2008) A vida dos vertebrados. Coordenação editorial da edição brasileira Ana Maria de Souza; tradutores Ana Maria de Souza, Paulo Auricchio. 4. Edição, São Paulo: Atheneu Editora
- Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2): 945-959
- Queiroz, LJ, Torrente-Vilara G, Ohara WM, Pires THS, Zuanon J, Doria CRC (2013) Peixes do Rio Madeira. Dialeto Latin American Documentary, São Paulo / Santo Antonio Energia S.A., Porto Velho. 1169 pp

- Rahel FJ (2007) Biogeographic barriers, connectivity and homogenization of freshwater faunas: it's a small world after all. *Freshwater Biology*, 52: 696–710
- Rapp Py-Daniel LR, Deus CP, Henriques AL, Pimpão DM, Ribeiro OM (2007) Biodiversidade do medio Madeira: bases científicas para propostas de conservação. Manaus: INPA ; [Brasília]: MMA : MCT,. 244 pp
- Raymond M, Rousset F (1995) GENEPOP (version 1.2): population genetics software for exact tests and ecumenicism. *Journal of Heredity*, 86(3): 248-249
- Rice WR (1989) Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225
- Rossetti DF, Valeriano MM (2007) Evolution of the lowest Amazon basin modeled from the integration of geological and SRTM topographic data. *Catena*, 70(2): 253-265
- Rueda–Almonacid JV, Carr JL, Mittermeier RA, et al. (2007) Las tortugas y lós crocodrilianos de lós países andinos del Trópico. *Conservação Internacional*. Editorial Panamericana, Formas e Impresos. Bogotá, Colombia. 588 pp
- Sábato EL, Félix-Silva D (2014) Relatório consolidado da fase de pós-enchimento do Sub-programa de Monitoramento de Herpetofauna de Rios – Quelônios da UHE Santo Antônio. SETE Soluções e Tecnologia Ambiental/Santo Antônio Energia S.A. 148 pp. [http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidreletricas/Santo Antonio \(Rio Madeira\)](http://licenciamento.ibama.gov.br/Hidreletricas/Santo Antonio (Rio Madeira))
- Santo Antônio Energia (2015)<http://www.santoantonioenergia.com.br/energia/energia1/>
- Santos RC (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-AM. 79p
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234

- Sites JW, FritzSimmons NN, Silva JN, Cantarelli VH (1999) Conservation Genetics of the Giant Amazon River Turtle (*Podocnemis expansa*; Pelomedusidae) – Inferences From Two Classes of Molecular Markers. *Chelonian Conservation and Biology*, 3 (3): 454 – 463
- Smith NJH (1979) Aquatic Turtles of Amazonia: an Endangered Resource. *Biological Conservation*, 16(3): 165-176
- Soares FGS (2000) Distribuição, mortalidade e caça de *Podocnemis* (Testudinata, Pelomedusidae) no Rio Guaporé, Rondônia, Brasil. Dissertação de mestrado, Ecologia/INPA, 61 pp
- Solé-Cava AM, Cunha HA (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 Filho PWM, Quadros MLDES, Scandolara JE, Da Silva Filho EP, Reis MR (1999) Compartimentação morfoestrutural e neotectônica do sistema fluvial Guaporé-Mamoré-alto Madeira, Rondônia-Brasil. *Brazilian Journal of Geology*, 29(4):469-476
- Tajima F (1989) Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Statistical Genetics*, 123:585-595
- Tamura K, Nei M (1993) Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Molecular Biology and Evolution*, 10(3):512-526
- Tamura K, Stecher G, Peterson D, Filipski A, Kumar S (2013) MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Molecular Biology and Evolution*, 30(12):2725-2729
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-

specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, 22:4673-4680

Tizuka MM (2013) Geoarqueologia e paleoidrologia da planície aluvial holocênica do alto rio Madeira entre Porto Velho e Abunã-RO. Dissertação de Mestrado. Rio Claro – SP. 170p

Todd EV, Blair D, Farley S, et al. (2013) Contemporary genetic structure reflects historical drainage isolation in an Australian snapping turtle, *Elseya albagula*. *Zoological Journal of the Linnean Society*, 169:200-214

Torrente-Vilara G, Zuanon J, Leprieur F, Oberdorff T, et al. (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

Valenzuela N. (2000) Multiple paternity in side-neck turtles *Podocnemis expansa*: evidence from microsatellite DNA data. *Molecular Ecology*, 9:99–105

Van der Hammen T, Hooghiemstra H (2000) Neogene and Quaternary history of vegetation, climate, and plant diversity in Amazonia. *Quaternary Science Reviews*, 19(8):725-742

Van Oosterhout C, Hutchinson WF, Wills DPM, Shipley P (2004) MICRO-CHECKER: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology*, 9:99-105

Vargas-Ramírez M, Castaño-Mora OV, Fritz U (2008) Molecular phylogeny and divergence times of ancient South American and Malagasy river turtles (Testudines: Pleurodira: Podocnemididae). *Organisms Diversity & Evolution*, 8(5):388-398

Verdum, R (2012) As obras de infraestrutura do PAC e os povos indígenas na Amazônia brasileira. Instituto de Estudos Socioeconômicos (INESC). 56a Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência. Nota técnica. 56pp

Vianna CM (1973) A tartaruga no contexto histórico. In: IICA. Proceedings do Simpósio Internacional sobre Fauna Silvestre e Pesca Fluvial e Lacustre Amazônica. Manaus. Vol. II. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas – IICA Trópicos; IBDF/SUDEPE. pp. 66-95

Vogt RC (2008) Tartarugas da Amazônia. Editora INPA. 104pp

## TABELAS

**Tabela 1.** Haplótipos de *Podocnemis expansa* encontrados na sub-bacia do rio Madeira e parâmetros de diversidade genética de *P.expansa* amostradas em cada localidade. Haplótipos destacados em itálico foram registrados apenas no alto rio Madeira. Dados para o rio Guaporé de Pearse *et al* (2006). Siglas: Número de indivíduos sequenciados (N); Diversidade Haplotípica (*h*); Diversidade Nucleotídica ( $\pi$ ); Testes de neutralidade D de Tajma (D) e Fs de Fu (F); Desvio Padrão (DP). Localidades: GUA = rio Guaporé (próximo de Costa Marques); GUP = rio Guaporé (Pimenteiras); PAR = a jusante da corredeira do Paredão; CAL = a jusante da corredeira do Caldeirão do Diabo; MOR = a jusante da corredeira de Morrinhos; TEO = a jusante da cachoeira de Teotônio; JUS = a jusante da corredeira de Santo Antônio.

Haplótipos	Rio Guaporé		Alto rio Madeira					TOTAL
	GUA	GUP	PAR	CAL	MOR	TEO	JUS	
1	20	16	2	3	5	2	15	27
6	2	6	3	3	1		4	11
<i>17</i>							1	<b>32</b>
<i>18</i>				1				<b>1</b>
<i>19</i>			5	6		3	18	<b>1</b>
N	22	22	10	13	6	5	38	72
H	2	2	3	4	2	2	4	5
<i>h</i> ( $\pm$ DP)	0,736 ( $\pm$ 0,0549)	0,667 ( $\pm$ 0,0741)	0,689 ( $\pm$ 0,104)	0,731 ( $\pm$ 0,088)	0,333 ( $\pm$ 0,215)	0,600 ( $\pm$ 0,175)	0,624 ( $\pm$ 0,044)	0,647 ( $\pm$ 0,028)
$\pi$ ( $\pm$ DP)	0,002 ( $\pm$ 0,0010)	0,001 ( $\pm$ 0,0010)	0,002 ( $\pm$ 0,0010)	0,003 ( $\pm$ 0,0010)	0,001 ( $\pm$ 0,0010)	0,001 ( $\pm$ 0,0002)	0,001 ( $\pm$ 0,0003)	0,002 ( $\pm$ 0,0003)
D	-1,096 ( $p > 0,05$ )	1,531 ( $p > 0,05$ )	1,498 ( $p > 0,05$ )	0,136 ( $p > 0,05$ )	0,001 ( $p > 0,05$ )	1,225 ( $p > 0,05$ )	-0,156 ( $p > 0,05$ )	-0,131 ( $p > 0,05$ )
F	2,12 ( $p > 0,05$ )	2,92 ( $p > 0,05$ )	2,986 ( $p > 0,05$ )	2,171 ( $p > 0,05$ )	2,593 ( $p > 0,05$ )	0,626 ( $p > 0,05$ )	1,952 ( $p > 0,05$ )	2,541 ( $p > 0,05$ )

**Tabela 2.** Estimativa dos valores das comparações par a par de  $\Phi_{ST}$  e  $F_{ST}$  entre os cinco trechos entre corredeiras amostrados. Os valores acima da diagonal correspondem ao  $\Phi_{ST}$  obtido das sequências nucleotídicas do DNAm e abaixo da diagonal ao  $F_{ST}$  obtido dos locos microssatélites. O valor destacado em itálico foi significativo antes da correção de Bonferroni. Após a correção de Bonferroni ( $p < 0,01$ ) nenhuma das comparações foi significativa. PAR = a jusante da corredeira do Paredão; CAL = Caldeirão-Morrinhos; MOR =Morrinhos-Teotônio; TEO= Teotônio-Santo Antônio; JUS= a jusante da corredeira de Santo Antônio.

<b>Localidades</b>	<b>PAR</b>	<b>CAL</b>	<b>MOR</b>	<b>TEO</b>	<b>JUS</b>
<b>PAR</b>	-	-0,082	0,154	0,018	0,004
<b>CAL</b>	0,005	-	0,119	-0,025	-0,001
<b>MOR</b>	-0,004	-0,003	-	0,162	<i>0,144</i>
<b>TEO</b>	0,014	0,030	-0,002	-	-0,073
<b>JUS</b>	0,007	0,008	-0,026	0,014	-

**Tabela 3.** Resumo das análises estatísticas dos cinco locos microssatélites para *Podocnemis expansa* amostrados no alto rio Madeira. N - número de indivíduos;  $H_o$  – heterozigosidade observada;  $H_e$  – heterozigosidade esperada;  $\hat{A}$  - riqueza alélica;  $F_{IS}$  – coeficiente de endogamia; EHW – probabilidade do teste de Equilíbrio de Hardy – Weinberg;  $p < 0,01$  após a correção de Bonferroni.

Trechos entre corredeiras		Locos				
		Puni_1E1	Puni_1D12	PE344	PE1075	PE519
Paredão/Jirau	N	10	10	10	10	10
	$\hat{A}$	5	4	5	7	4
	$H_o$	0,500	<b>1,000</b>	0,700	0,700	0,700
	$H_e$	0,675	0,660	0,645	0,690	0,790
	$F_{IS}$	0,308	-0,475	-0,033	0,038	0,166
	HWE	0,092	<b>0,000</b>	0,093	0,063	1,000
	Caldeirão/Morrinhos	N	13	13	13	13
$\hat{A}$		5	4	8	6	4
$H_o$		0,539	<b>1,000</b>	0,539	0,615	0,539
$H_e$		0,659	0,713	0,799	0,642	0,772
$F_{IS}$		0,222	-0,368	0,361	0,081	0,339
HWE		0,147	<b>0,001</b>	0,024	0,029	0,365
Morrinhos/Teotônio		N	7	7	7	7
	$\hat{A}$	4	4	4	8	4
	$H_o$	0,714	<b>1,000</b>	0,857	0,571	0,714
	$H_e$	0,643	0,622	0,704	0,694	<b>0,837</b>
	$F_{IS}$	-0,034	<b>-0,556</b>	-0,143	0,250	0,221
	HWE	0,851	<b>0,007</b>	0,094	0,224	0,158
	Teotônio/Santo Antônio	N	5	5	5	5
$\hat{A}$		<b>3</b>	4	4	4	<b>3</b>
$H_o$		0,400	<b>1,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,200</b>	0,400
$H_e$		<b>0,340</b>	0,660	0,720	0,460	0,660
$F_{IS}$		-0,067	-0,429	<b>1,000</b>	0,636	0,484
HWE		1,000	0,035	<b>0,003</b>	0,111	0,110
Jusante Santo Antônio		N	40	40	40	39
	A	<b>9</b>	4	8	<b>9</b>	4
	$H_o$	0,546	<b>1,000</b>	0,479	0,630	0,510
	$H_e$	0,647	0,672	0,773	0,833	0,674
	$F_{IS}$	0,194	-0,542	0,432	0,157	0,242
	HWE	<b>0,001</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,159</b>	<b>0,017</b>
	Total	N	75	75	75	74
A		10	4	9	4	10
$H_o$		0,560	1,000	0,427	0,514	0,703
$H_e$		0,693	0,652	0,748	0,667	0,837
$F_{IS}$		0,194	-0,542	0,432	0,157	0,242
HWE		<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>	<b>0,000</b>

## FIGURAS

**Figura 1.** Mapa da América do Sul destacando a localização da área de estudo, no noroeste do Estado de Rondônia. A área destacada delimita a região do alto rio Madeira, mostrando a localização das corredeiras relevantes para as amostragens deste estudo (barras tracejadas) e a localização das barragens das usinas hidrelétricas de Santo Antônio e Jirau (barras sólidas).

**Figura 2.** Rede de haplótipos gerada no programa Network (Bandelt et al. 1999) com 365 sequências nucleotídicas (72 sequencias do alto Rio Madeira e 293 de Pearse et al. (2006) para outras áreas da região amazônica) da região controle do DNA mitocondrial de *Podocnemis expansa* do alto rio Madeira. As linhas que conectam os haplótipos indicam um passo mutacional e os traços são mutações adicionais. Os haplótipos com números sublinhados foram registrados apenas no alto rio Madeira. Os círculos preenchidos de branco são haplótipos não observados.

**Figura3.** Análise bayesiana realizada no programa Baps (Corander et al. 2007) para estimativa do número de agrupamentos de *Podocnemis expansa* na região do alto rio Madeira utilizando a região controle do DNA mitocondrial. O gráfico mostra os cinco trechos entre corredeiras amostrados delimitados por linhas pretas. Os cinco agrupamentos bayesianos são indicados pelas cores verde, azul, vermelho, amarelo e rosa.

**Figura 4.** Relação entre distância genética e distância geográfica para *Podocnemis expansa* amostradas em cinco trechos entre corredeiras no alto rio Madeira para dados gerados a partir dos locos microssatélites ( $F_{st}$ ) e da região controle do DNAm (distância genética de Tamura-Nei).

**Figura 5.** Probabilidade média de diferentes números de agrupamentos (K) estimada utilizando o método de Pritchard et al (2000).

**Figura 6.** Variação da probabilidade média entre números sucessivos de agrupamentos (K) estimada utilizando o método de Evanno et al (2005).

**Figura 7.** Probabilidades de indivíduos coletados nos diferentes trechos estudados pertencerem aos agrupamentos estimados pelo método de Pritchard et al. (2000), considerando diferentes valores de K. Cada indivíduo é representado por uma barra e as linhas negras de separação representam a separação entre grupos amostrais no sentido montante a jusante no alto rio Madeira.

Figura 1.

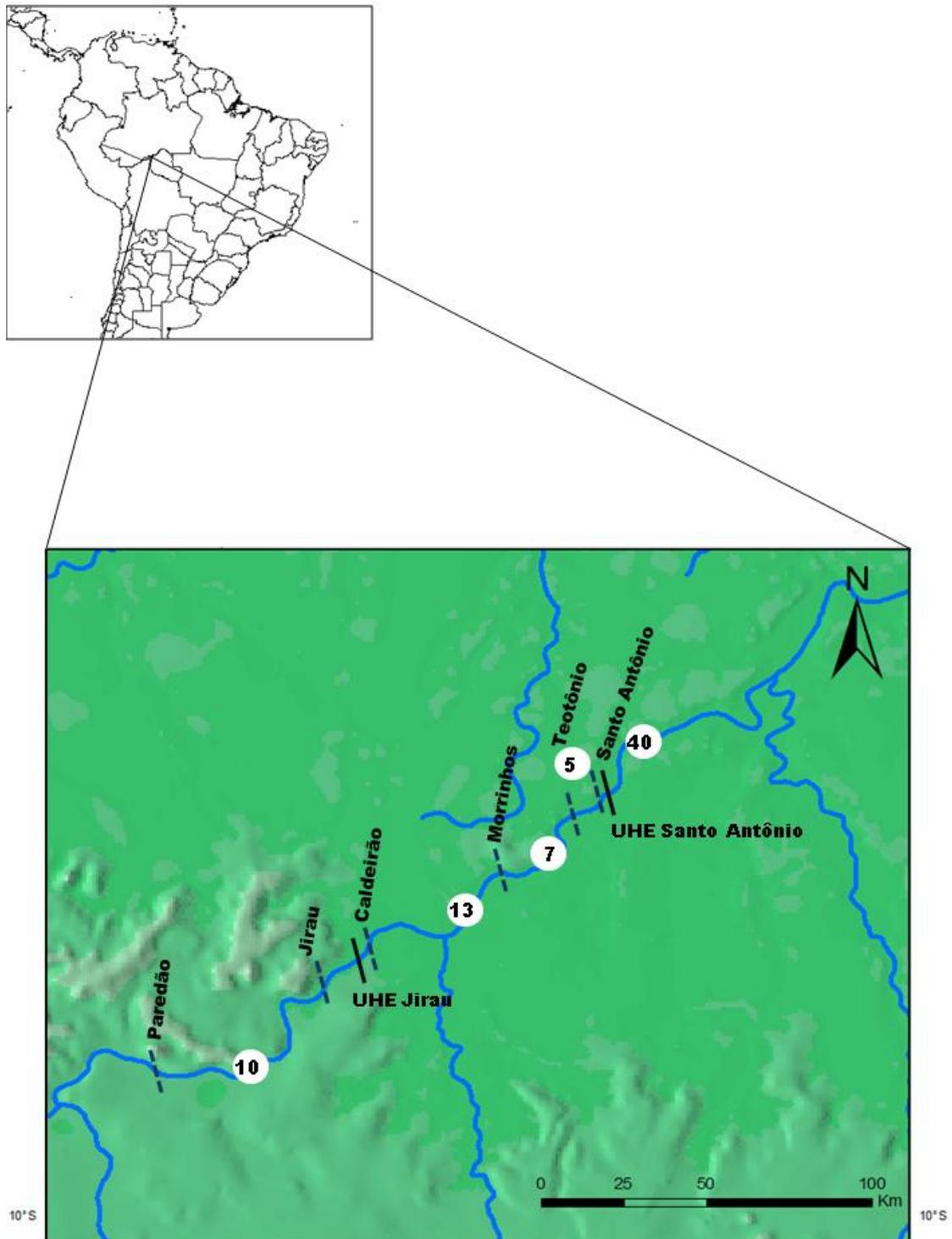
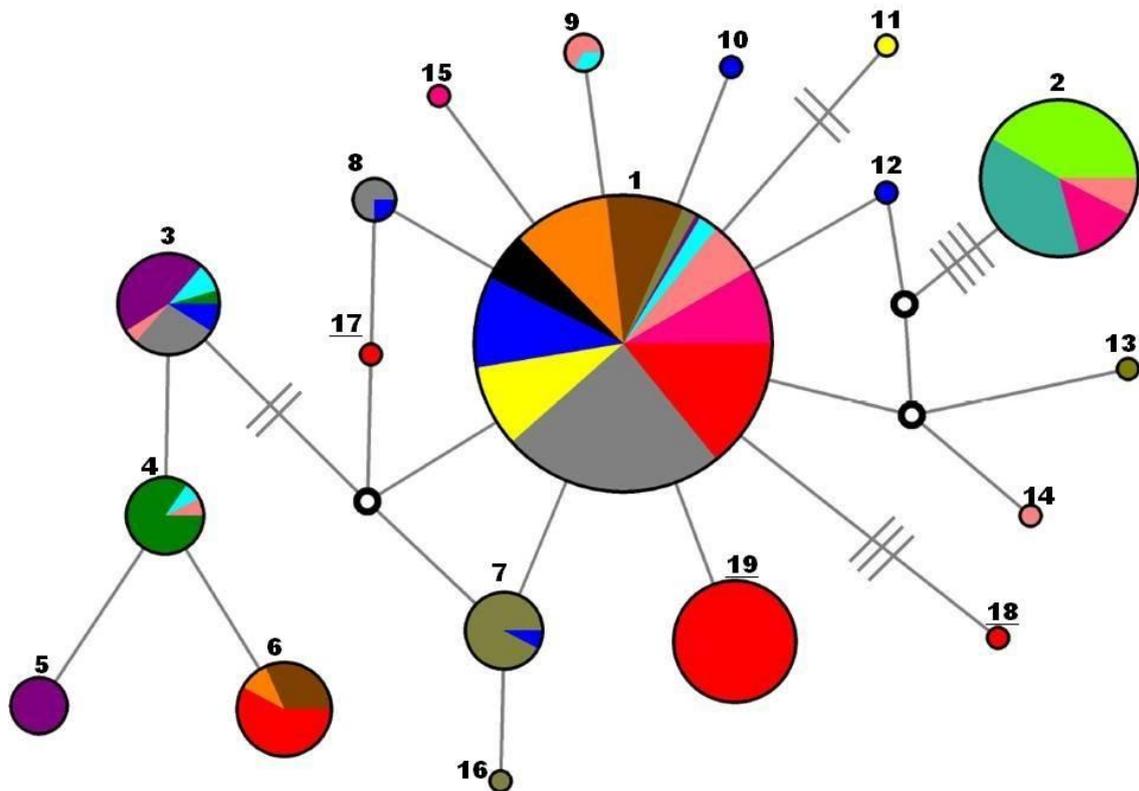


Figura 2.



- Rio Orinoco, Playa Medio (Venezuela)
- Rio Caquetá (Colômbia)
- Peru
- Rio Branco (Brasil)
- Rio Uatumã (Brasil)
- Rio Trombetas (Brasil)
- Rio Amazonas, Terra Santa (Brasil)
- Rio Purus, Abufari (Brasil)
- Rio Madeira, Alto rio Madeira (Brasil)
- Rio Guaporé (Brasil)
- Rio Guaporé, Pimenteiras (Brasil)
- Rio Tapajós, Pimenteiras (Brasil)
- Rio Xingu (Brasil)
- Rio Araguaia, Rio das Mortes (Brasil)
- Rio Araguaia, Parque Nacional do Araguaia (Brasil)

**Figura 3.**

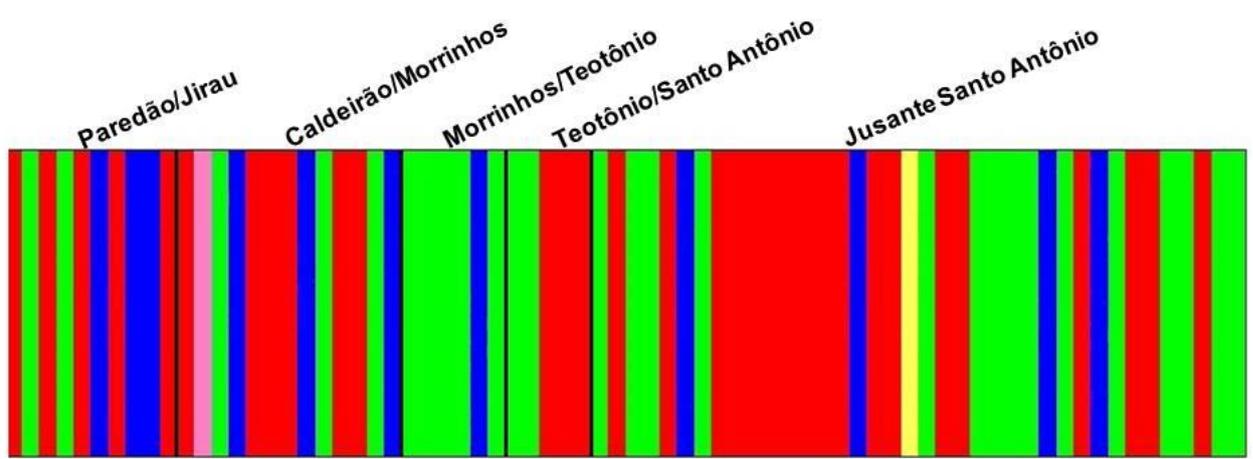
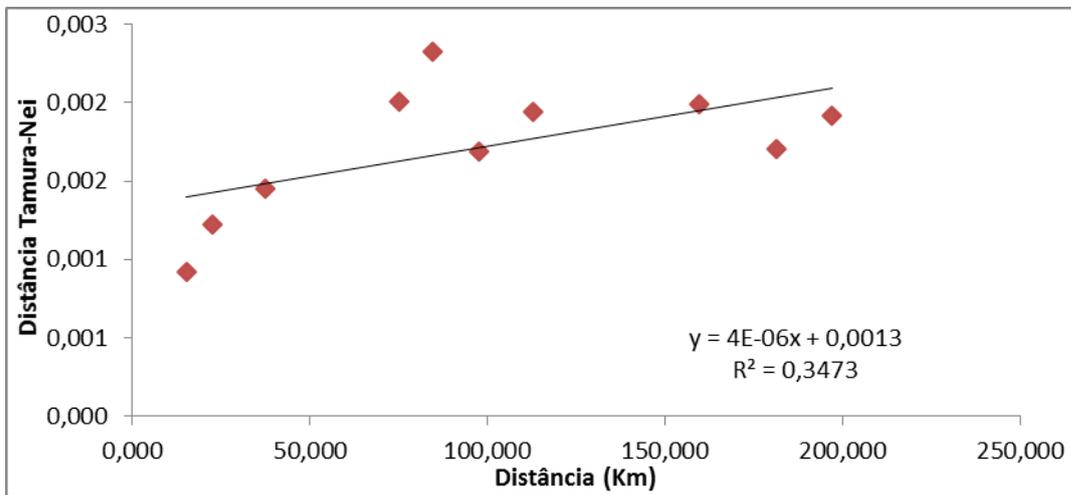
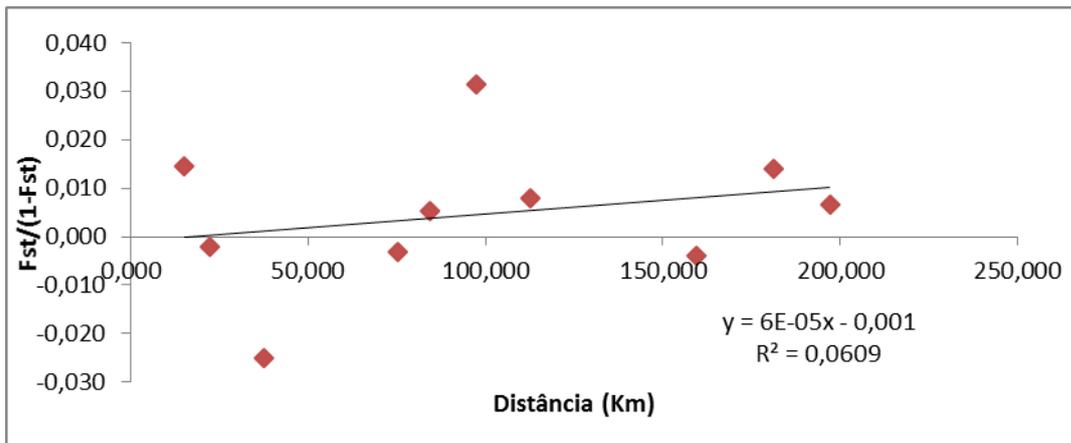
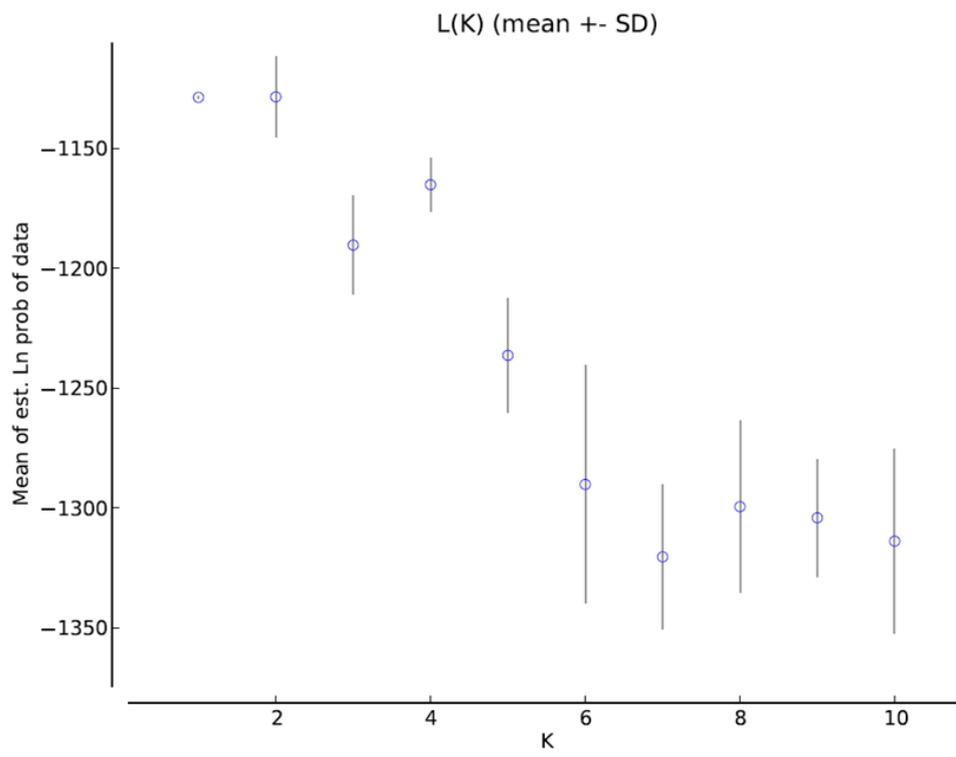


Figura 4.



**Figura 5.**

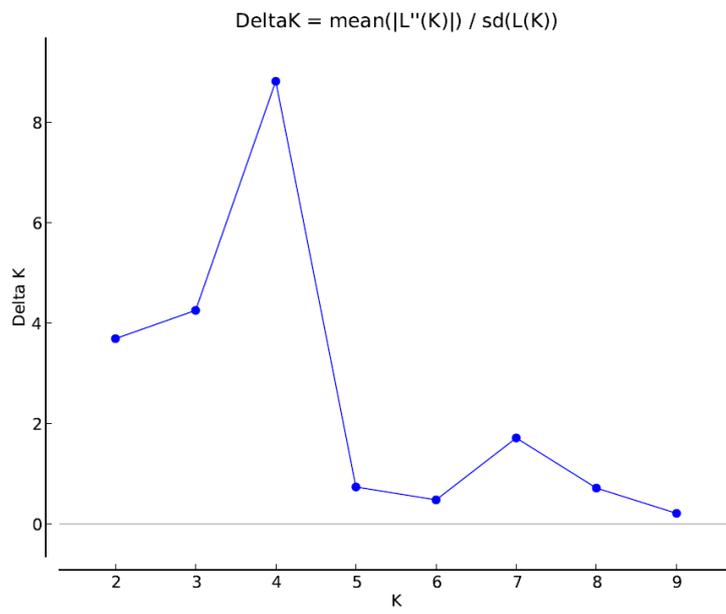
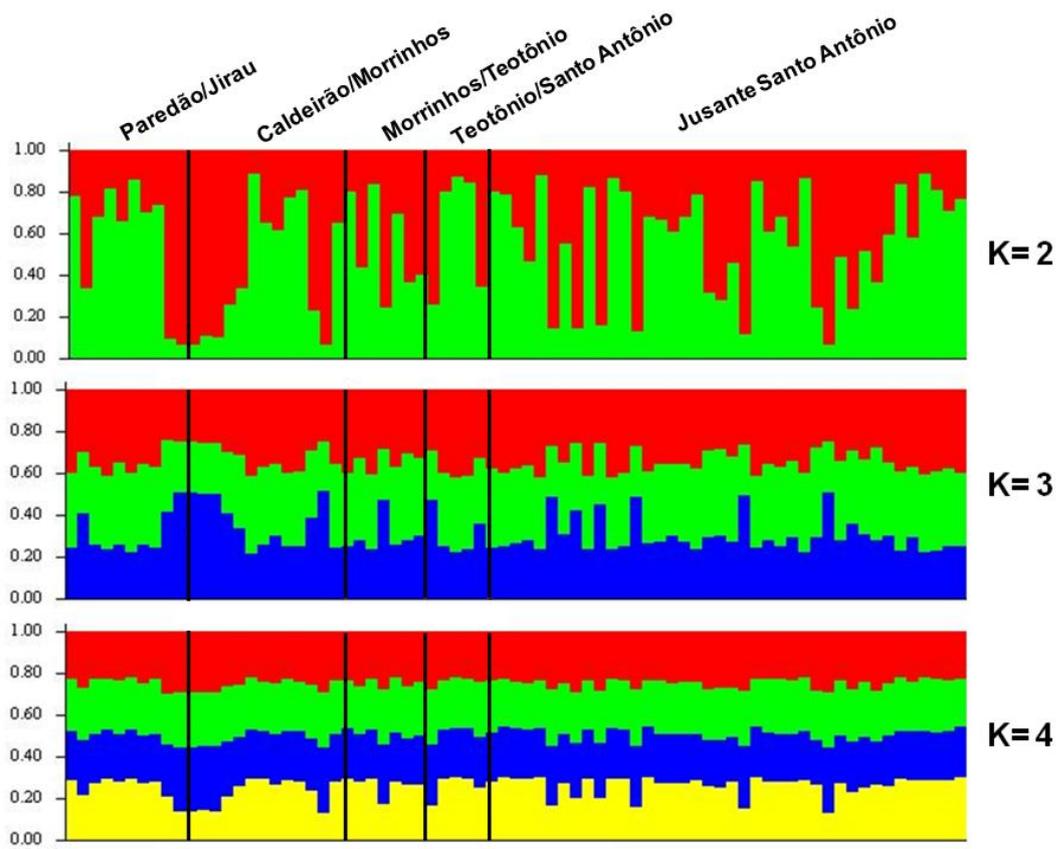
**Figura 6.**

Figura 7.



## CONCLUSÕES

- Mesmo com a longa história de *Podocnemis expansa* na Amazônia, e em contraste com os resultados encontrados para alguns outros organismos aquáticos, os resultados obtidos com ambos os marcadores utilizados neste trabalho indicam que as corredeiras do alto rio Madeira não causaram restrição de fluxo gênico, nem historicamente, nem em tempos mais recentes. Há haplótipos que ocorrem no alto rio Madeira não registrados em outras partes da área de distribuição, inclusive o rio Guaporé, pertencente a sub-bacia do rio Madeira, e isto é particularmente notável para o haplótipo 17, que compôs 50% de praticamente todas as amostras do alto rio Madeira, e pode refletir alguma restrição de migração de fêmeas rio acima, mas não há evidência de que esta restrição seja devida a um efeito de barreira das corredeiras;
- Há maior variabilidade genética observada no pequeno trecho de corredeiras amostrado em relação à extensão abrangida pelas amostragens no rio Guaporé, onde não se registraram haplótipos exclusivos, também dá suporte a uma restrição de fluxo gênico entre o rio Madeira e o rio Guaporé;
- Não foi detectado declínio populacional recente com os marcadores moleculares utilizados, e este resultado não corrobora os registros históricos relatados para o rio Madeira, isto pode ser atribuído à característica da população desta espécie ser tão grande e conectada que esses declínios podem não ter afetado na diversidade genética.