

1. SÍNTESE DOS RESULTADOS OBTIDOS NAS AMOSTRAGENS DE ANFÍBIOS NOS PEDRAIS DO AHE SANTA ISABEL PELAS EQUIPES DA UFAM E FAUNAPRO

Duas equipes independentes amostraram os anfíbios nos Pedrais situados na área de influência do AHE Santa Isabel: A equipe que realizou o Diagnóstico da Herpetofauna, que amostrou amplamente a Área de Influência, e a equipe que realizou as análises genéticas das espécies de anuros encontradas nos Pedrais. No presente documento, todos os resultados obtidos nos Pedrais pelas duas equipes são reapresentados de forma integrada e complementar com o objetivo de sanar as dúvidas levantadas pelo IBAMA e estabelecer procedimentos para atendimento de eventuais itens não atendidos pelos documentos anteriores. Para atingir tal objetivo o presente documento apresenta:

1. Períodos e pontos de amostragem em Pedrais pelas duas equipes;
2. Espécies registradas nestes ambientes segundo identificação morfológica e acústica, destacando aquelas observadas em atividade reprodutiva;
3. A confirmação da identificação morfológica pela análise genética;
4. Correspondência entre as linhagens genéticas obtidas e as morfoespécies não nomeadas;
5. Apresentação da distribuição das espécies na Área de Influência e na Bacia do Tocantins/Araguaia;
6. Procedimentos a serem executados para cumprimento pleno dos questionamentos.

1.1. PERÍODOS E PONTOS DE AMOSTRAGEM

No total foram amostrados 7 pontos em Pedrais, 4 pontos amostrados pela equipe da Genética e 3 amostrados pela equipe da Herpetofauna (Ilustração 1, Quadro 1). A equipe da Herpetofauna amostrou a região em duas campanhas no ano de 2009. A primeira delas foi realizada no fim da estação chuvosa entre os dias 6 e 24 de abril e a segunda, na estação seca entre 19 de julho e 8 de agosto. A amostragem da Equipe da UFAM ocorreu em agosto de 2009.

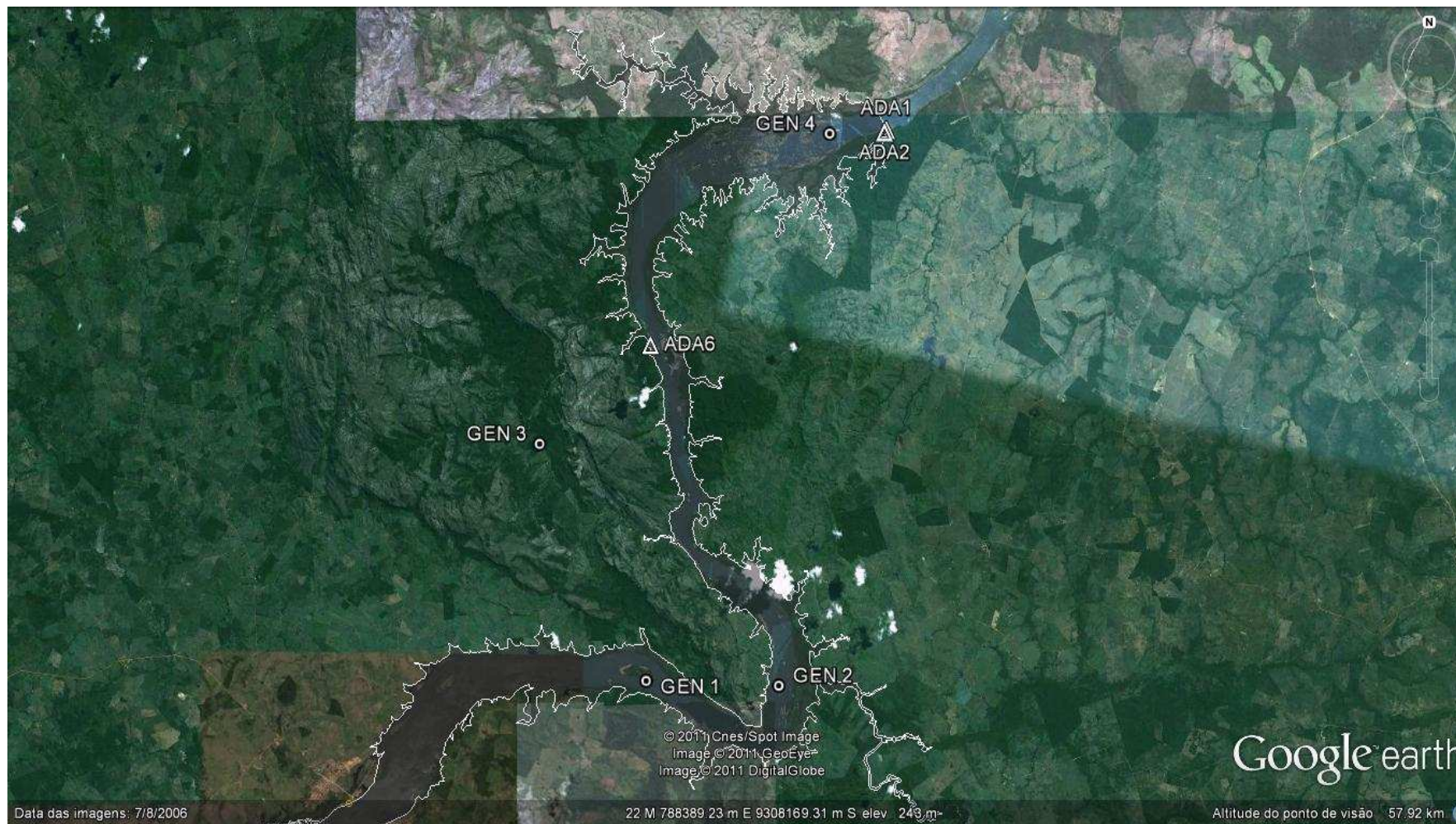


Ilustração 1. Pontos Amostrados em Áreas de Pedral pelas Equipes de Genética e Herpetofauna na AHE Santa Isabel.

Os Pedrais do eixo da Barragem (ADA1, ADA2) e da Vila de Santa Cruz (ADA 6) foram amostrados pela equipe da Herpetofauna (Ilustração 1, Diagnóstico da Herpetofauna-AID, 2009). O ADA 1 e ADA 2 estão situados na margem direita do Pedral, no Estado do Tocantins. O ADA 2 situado no contato da mata ciliar com a margem do rio, foi amostrado nas duas campanhas, já o ADA 1, situado no centro do Pedral, foi amostrado apenas em julho, quando o mesmo encontra-se exposto. O ADA 6, amostrado também em julho, é situado na margem esquerda próxima ao povoado de Santa Cruz, no Estado do Pará, no Pedral próximo à base da Serra das Andorinhas, na altura da Fazenda Furnas Azul.

Estes três pontos foram amostrados por procura ativa, predominantemente no período noturno (1ª campanha: ADA 2- três noites; 2ª campanha: ADA 1- duas noites, ADA 2 e ADA 6 uma noite cada), e foram observados principalmente espécimes adultos e em alguns casos em atividade reprodutiva (para consultar datas e horários de amostragem ver Quadro 1). Eventualmente, os pontos ADA 1 e ADA 2 foram percorridos durante o dia, porém poucos resultados foram obtidos nestas ocasiões.

A equipe da Genética obteve amostras principalmente de larvas aquáticas no Pedral de Santa Isabel, no Remanso dos Botos, Ilha do Campo e Pedral Barreira Branca (Quadro 1, Ilustração 1).

As amostras para análise genética foram obtidas das espécies encontradas nos Pedrais pelas duas equipes. Foram obtidas também amostras para análise genética nas populações fora da ADA das mesmas Morfoespécies para confirmar geneticamente se estas espécies se reproduzem em outros ambientes além dos Pedrais da ADA.

Estas amostras foram obtidas em um grande número de pontos amostrada na AID e All pela Equipe da Herpetofauna (Diagnóstico Herpetofauna, EIA, 2009) e também na APA de São Geraldo pela Equipe de Genética (Quadro 1). Os procedimentos de análise genética podem ser consultados em detalhe no EIA.

Também são fornecidos para as espécies com identificação geneticamente confirmada nos Pedrais, a distribuição das mesmas na Bacia do Tocantins-Araguaia, a partir de Pavan, 2007, do Diagnóstico da Herpetofauna (2009) e de dados ainda não publicados obtidos em 2009 e 2010 pelo mesmo pesquisador e equipe.

Quadro 1. Todas as áreas amostradas pela equipe de genética e somente áreas de pedral amostradas pela equipe da herpetofauna. São apresentados as coordenadas (UTM), ambiente e método, data, hora.

PONTOS	Área	Coordenadas		Ambiente
ADA1	Pedral Eixo	795029	9320404	Poças temp. pedral
ADA2	Pedral Eixo	794936	9320304	Mata ciliar Araguaia
ADA6	Pedral Faz Furnas Azul	784254	9311272	Poças temp. pedral
GEN 1	Ilha do campo	784015	9296990	Pedral
GEN 2	Remanso dos Botos	790048	9296754	Pedral
GEN 3	APA S. Geraldo	779224	9307123	Serra das Andorinhas
GEN 4	Pedral Santa Isabel	792473	932030	Pedral

PONTOS	Área	Coordenadas		Ambiente
GEN 5	Pedral Barreira Branca	S 06°47'40"	W 049°01'29"	Pedral
GEN 6	Faz. Prefeito Xambioá	S 06°26'34,6"	W 048°33'31"	Vegetação Ciliar

1.2. ESPÉCIES AMOSTRADAS

No total foram registradas 17 espécies de anfíbios nos Pedrais (Quadro 2), das quais 12 foram observadas em atividades reprodutivas. Entre as espécies reprodutivamente ativas, *Pristimantis* e *Leptodactylus hylaedactylus* são espécies de reprodução terrestre que se encontram na margem do rio vocalizando na vegetação ciliar sobre as pedras e não usam os ambientes dos Pedrais propriamente ditos na reprodução. Entre as 10 espécies restantes, a maioria foi observada apenas alguns indivíduos vocalizando esporadicamente. Entre as larvas obtidas nos Pedrais, não foi registrada espécie diferente das obtidas nas amostragens noturnas. As espécies que apresentaram atividade reprodutiva intensa nos Pedrais foram *Hypsiboas boans*, *Pseudopaludicola sp2*, *Rhinella marina*, *R. mirandaribeiroi* e *Scinax* grupo *ruber* em plena estação seca. Estas espécies, com exceção de *Scinax* grupo *ruber*, se reproduzem em ambientes aquáticos mais perenes, geralmente associados e abastecidos por cursos de água e a atividade reprodutiva ocorre principalmente na estação seca, quando estes locais não estão sujeitos aos efeitos perturbadores das enchentes típicas do período chuvoso. A estratégia reprodutiva destas espécies difere daquelas utilizada por grande parte da Anurofauna na região, que usam poças de água efêmeras abastecidas pela chuva e que desaparecem no período seco.

Quadro 2. Espécies de Anfíbios registradas nas Áreas de Pedrais, apresentando Identificação Morfológica, Registro de Atividade Reprodutiva (V: vocalização; G: girino; A: amplexo; N: Atividade não reprodutiva), Confirmação via código de barras genético (Barcode), Pedrais de ocorrência e número de pontos na AID e AII onde cada espécie foi registrada.

Morfológica	Barcode	Reprodução	Pedrais	AID	AII
Classe LISSAMPHIBIA					
Ordem ANURA					
Família Bufonidae					
<i>Rhaebo guttatus</i>	Ok	N	ADA 1	1	
<i>Rhinella marina</i>	Ok	G/V	ADA 1/GEN 1	4	1
<i>Rhinella margaritifera</i>	Ok	N	ADA 2	9	1
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	Ok	V	ADA 6		
<i>Rhinella schneideri</i>	-	V	ADA 6		
Família Hylidae					
<i>Dendropsophus cruzi</i>	Ok	V	ADA2	33	16
<i>Hypsiboas boans</i>	Ok	V	ADA 1	15	2
<i>Hypsiboas multifasciatus</i>	-	V	ADA 1 e 2	36	21
<i>Hypsiboas raniceps</i>	Ok	N	ADA 1 e 6	19	16
<i>Scinax gr. ruber</i>	Ok	V	ADA 1,2 e 6	15	8
Família Leiuperidae					
<i>Pseudopaludicola sp. 2</i>	Ok	V/A/G	ADA 1 , 2 e 6/GEN 1, 2, 4		
Família Leptodactylidae					
<i>Leptodactylus hylaedactylus</i>	Ok	V	ADA 2	9/19	1/5
<i>Leptodactylus cf. vastus</i>	-	N	ADA 2	4/2	/3
<i>Leptodactylus cf. macrosternum</i>	-	N	ADA 1, 2 e 6	/14	/7
<i>Leptodactylus cf. leptodactyloides</i>	Ok	V	ADA 1 e 2	2	
<i>Leptodactylus pustulatus</i>	Ok	V	ADA 1 e 2	1/14	/7
<i>Pristimantis fenestratus</i>	Ok	V	ADA 1,2 e 6	11	
Total de Espécies		12	17		

Na Bacia do Tocantins-Araguaia, os pedrais são ambientes típicos dos trechos sobre terrenos cristalinos, onde se formam corredeiras sobre leito rochoso. Estas rochas são ocupadas por vegetação tolerante a inundação das cheias e na seca, amplas extensões de rochas tornam-se expostas, e formam grande quantidade de poças e lagoas temporárias de diversos tamanhos e graus de isolamento com o rio. Estas espécies de anfíbios se reproduzem quando o rio atinge seu menor nível anual nas poças que foram isoladas do rio, onde não há entrada de peixes grandes e outros predadores dos rios. O comportamento reprodutivo destas espécies pode ser considerado explosivo e está relacionado a necessidade de concluir o desenvolvimento pré-metamórfico antes do ambiente desaparecer com a subida do nível do rio, voltando a profundidade, a correnteza e os peixes.

As espécies observadas em Reprodução no Pedral se reproduzem durante a estação seca em diversos outros ambientes aquáticos permanentes presentes na diversos pontos da AID e AII, como também em outras localidades da bacia (Quadro 2 e Quadro 3). A única espécie que apresentou atividade reprodutiva observada somente em Pedrais foi a morfoespécie *Pseudopaludicola* sp2, representada por duas linhagens genéticas com grau de divergência genética inferior a 3%, que se assume ser uma grau de variação intraespecífico.

Quadro 3. Ocorrência das 10 espécies registradas em Reprodução nos Pedrais da Área de Influência da AHE Santa Isabel na Bacia do Tocantins/Araguaia. De norte para sul SI= AHE Santa Isabel (TO/PA); Est=Estreito (MA); Bab=Babaçulândia (TO), Car=Carolina (MA), Pal=Palmeirante (TO), Gua=Guaraí (TO), VR= Vila Rica (MT), LEM= UHE Luís Eduardo Magalhães (TO). Siglas: E = endêmico do Cerrado, Hab: habitat (FL=Florestal, A=Aberto, P=Periantrópico); Distr: distribuição nos biomas (AM=Amazônia, CE=Cerrado, MA=Mata Atlântica, CA=Caatinga, CH=Chaco, DS = Diagonaç Seca (CA/CE/CH), AD=amplamente distribuído). ? - Informação Desconhecida.

TÁXON	Hab	Distr	SI	Est	Bab	Car	Par	Gua	LEM	VR
Classe LISSAMPHIBIA										
Ordem ANURA										
Família Bufonidae										
<i>Rhinella marina</i>	FL,A	AM	X							X
<i>Rhinella mirandaribeiroi</i>	A	CE	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Rhinella schneideri</i>	FL/A	CE/CH	X	X	X	X	X	X	X	
Família Hylidae										
<i>Dendropsophus cruzi</i>	A	CE	X	X	X	X	X	X	X	
<i>Hypsiboas boans</i>	FL	AM	X	X	X		X		X	X
<i>Hypsiboas multifasciatus</i>	A	AM/CE	X	X	X	X	X	X	X	X
<i>Scinax gr. ruber 1</i>	A	CE	X	X	X	X	X	X	X	X
Família Leiuperidae										
<i>Pseudopaludicola</i> sp.2	A	CE	X							
Família Leptodactylidae										
<i>Leptodactylus cf. leptodactyloides</i>	FL	AM	X							
<i>Leptodactylus pustulatus</i>	A	CE	X	X	X		X	X	X	

1.3. RESULTADOS COM AMOSTRAGEM EXPANDIDA

As análises moleculares foram expandidas com a adição dos novos indivíduos obtidos pela amostragem da Herpetofauna para elaboração do Diagnóstico. Este procedimento permitiu identificar molecularmente vários indivíduos ainda não identificados, incluindo poucos girinos. O total de indivíduos amostrados geneticamente compôs um banco de dados de 230 indivíduos, sendo destes, 84 girinos. A utilização conjunta da identificação molecular, a identificação do banco genético mundial e morfológica permitiu o reconhecimento de 22 espécies, incluindo algumas espécies não registradas nos Pedrais, cujo agrupamento por semelhança genética está apresentado na Ilustração 2. Conforme a análise de identificação molecular através do método de distancia genética de agrupamento de vizinhos e das análises genéticas através do “código de barras do DNA - *DNA barcoding*”, os girinos coletados foram identificados como pertencentes às seguintes espécies: *Leptodactylus hylaedactyla*, *Osteocephalus taurinus*, *Rhinella margaritifera*, *Rhinella marina*, *Pseudopaludicola* spp. (duas espécies), *Hypsiboas raniceps*, e *Hypsiboas boans*.

Devido à baixa amostragem para os girinos coletados nos pedrais e elevada endogamia esperada numa mesma poça, considerou-se os girinos de uma mesma poça e provavelmente da mesma ninhada com pseudo-réplicas. Entretanto, inferências baseadas nas distribuições de alelos diferentes dentro das espécies mais amplamente amostrados sugerem os seguintes resultados:

1. *Rhinella margaritifera* e *Rhinella marina* – Ambas as espécies foram coletadas em vários lugares incluindo áreas de pedrais. As sequências geradas foram idênticas ou quase idênticas (99%+) entre todas as áreas amostradas. Portanto, essas espécies não evidenciam diferenciação genética entre locais de coleta nas áreas do estudo, evidenciando também altos níveis do fluxo gênico entre os dados nas áreas de coleta.
2. *Osteocephalus taurinus* – esta espécie não foi coletada em Pedral, a amostra analisada foi obtida na APA São Geraldo. A sequência desse girino é igual (100% similaridade genética) a sequência depositada no GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), gerada através de um indivíduo coletado no Peru, reserva Madre de Dios. Isso indica ausência de endemismo e estruturação genética, evidenciando alto nível de fluxo gênico.
3. *Leptodactylus hylaedactyla* – foi coletada na APA São Geraldo. A espécie é caracterizada pelas duas linhagens principais, uma representada por dois adultos, e a outra por um girino. O girino é aproximadamente 98% similar a sequência de um espécime depositado no GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) proveniente de Alter do Chão, Pará. Pela aparente simpatria das duas linhagens, é provável que a espécie *Leptodactylus hylaedactyla* seja geneticamente muito mais diversa, mas com pouca estrutura geográfica ao longo de uma ampla área de distribuição.
4. *Hypsiboas raniceps* – os adultos e girinos foram coletados na APA São Geraldo e na fazenda do prefeito de Xambioá (ambas fora da ADA). Eles não apresentam estruturação genética, e um dos haplotipos é compartilhado entre os indivíduos

provenientes das duas áreas coletadas e também se encontra no indivíduo coletado em Santa Fé, Argentina (depositado no GENBANK (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)). A espécie aparentemente não é estruturada geneticamente, e suas áreas da ocorrência são conectadas pelo fluxo gênico.

5. *Hypsiboas boans* – os girinos e adultos coletados nas áreas de Santa Fé do Araguaia, Ananás e APA São Geraldo, uma área geograficamente bem abrangente, compartilham haplotipos, mas não compartilham haplotipos com os adultos e girinos coletados no Pedral Barra Branca. A divergência entre os haplotipos é mínima, e não necessariamente representa estruturação genética.
6. *Pseudopaludicola* spp. – Para facilitar o entendimento das divergências dentro destas espécies fez-se uma análise específica com somente indivíduos deste gênero, usando as espécies de *Scinax* como outgroup. O resultado desta análise pode ser visualizado na Ilustração 2. Nestes resultados com dados genéticos identificou-se a ocorrência de prováveis duas espécies (Ilustração 2). A distância genética entre as espécies aqui denominadas geneticamente como *Pseudopaludicola* sp1 e *Pseudopaludicola* sp2 foi de 11 a 13%. A distância genética entre as linhagens dentro de *Pseudopaludicola* sp2 e dentro da espécie *Pseudopaludicola* sp1 foi de 3%. A Sistemática atual do Gênero *Pseudopaludicola* é baseada principalmente numa diagnose específica com base morfológica e é extremamente confusa, devido ao grande número de espécies descritas para localidades específicas, o reduzido grau de divergência morfológica entre as espécies, o reduzido tamanho corporal, a falta de revisões sistemáticas geograficamente amplas, falta de informações sobre vocalizações e de dados genéticos. No AHE Santa Isabel, foram reconhecidas 3 morfoespécies, porém não foi possível atribuir as mesmas, com nível de certeza razoável, à nomes de espécies válidas para o gênero. Sendo assim, as mesmas foram denominadas de acordo com a identificação morfológica como *Pseudopaludicola* sp1, *P. sp2* e *P.sp3*. *Pseudopaludicola* sp1 e sp3 ocorreram fora da ADA e dos Pedrais, por isso não foram listadas nos Quadros anteriores. *Pseudopaludicola* sp1 e sp3 diferem entre si pela ocupação do espaço ecológico onde a *P. sp3* ocorre nas áreas de cabeceiras de igarapés, e a *P. sp1* ocorre em áreas de terra firme em geral. A análise genética das amostras obtidas confirmou que ambas diferem da espécie dos Pedrais *Pseudopaludicola* sp2. A análise genética não corroborou que as morfoespécies *P.sp 1* e *P. sp3* sejam duas espécies distintas (usando o conceito de espécies filogenéticas), pois as duas linhagens obtidas não compõem grupos reciprocamente monofiléticos e através das análises de distribuição dos haplotipos observa-se que as *P. sp1* e *P. sp3* não estão distribuídas alopatricamente. Esta discordância entre os dados genéticos e morfológicos tem no mínimo duas explicações. Realmente existe somente uma espécie caracterizada pelos altos valores de divergência genética intraespecífica e com alta diversidade fenotípica. Por outro lado, podem existir duas espécies *P. sp1* e *P. sp3*, mas elas ainda compartilham haplotipos entre si por terem divergido recentemente. A outra possibilidade seria de eventos de hibridização. Em amostragens posteriores na região, realizadas fora do âmbito

do empreendimento em questão, a morfoespécie *Pseupaludicola* sp2 (Ilustração 2) foi registrada em atividade reprodutiva sempre próximo as margens do rio Tocantins/Araguaia, no Barranco do rio Araguaia na zona urbana da cidade de Araguatins, em canal de irrigação de concreto em projeto de irrigação na planície aluvial do rio Tocantins, próximo a cidade de Sampaio, no Pedral no rio Tocantins próximo a São João do Araguaia e numa poça na margem do rio Tocantins, no embarcadouro da cidade de Itupiranga. Nestas amostragens pôde se atestar a diferença entre as vocalizações entre a morfoespécie *P.sp2* e *P. sp3* observada fora da influência dos rios.

Em todas as outras amostragens na Bacia do Tocantins, anteriores ao trabalho da AHE Santa Isabel, onde *Pseudopaludicola* foi observado (Quadro 3) é possível existir mais de uma espécie, que não tenha sido reconhecida, havendo a possibilidade de haver mais registros da morfoespécie *P. sp2* fora da área de influência do empreendimento.

Como há possibilidade de haver material genético desses exemplares armazenados em banco das instituições que participaram destes trabalhos, a obtenção destas amostras e sua análise genética permitirão confirmar se *P. sp2* ocorre muito além dos Pedrais da ADA. Novas análises a serem realizadas em uma próxima coleta confirmarão também se a *P. sp2*–linhagem 2 trata-se ou não de uma provável espécie distinta, e se a mesma é ou não restrita a ADA.

Será elaborado um plano de trabalho visando à complementação dos dados de acordo com os itens discutidos acima com os seguintes objetivos:

1. Complementar o N amostral para as espécies alvo (espécies de Reprodução exclusiva nos Pedrais da ADA);
2. Inclusão de amostras já coletadas anteriormente e depositadas em banco de tecidos. Tais amostras são provenientes da bacia do Tocantins–Araguaia, onde os dados genéticos poderão confirmar a ocorrências das espécies alvo em outras áreas afetadas;
3. A amostragem será realizada em três áreas: pedral a montante, pedral a jusante e na ADA.
4. Serão realizadas análises conforme o plano de trabalho aprovado pelo IBAMA.

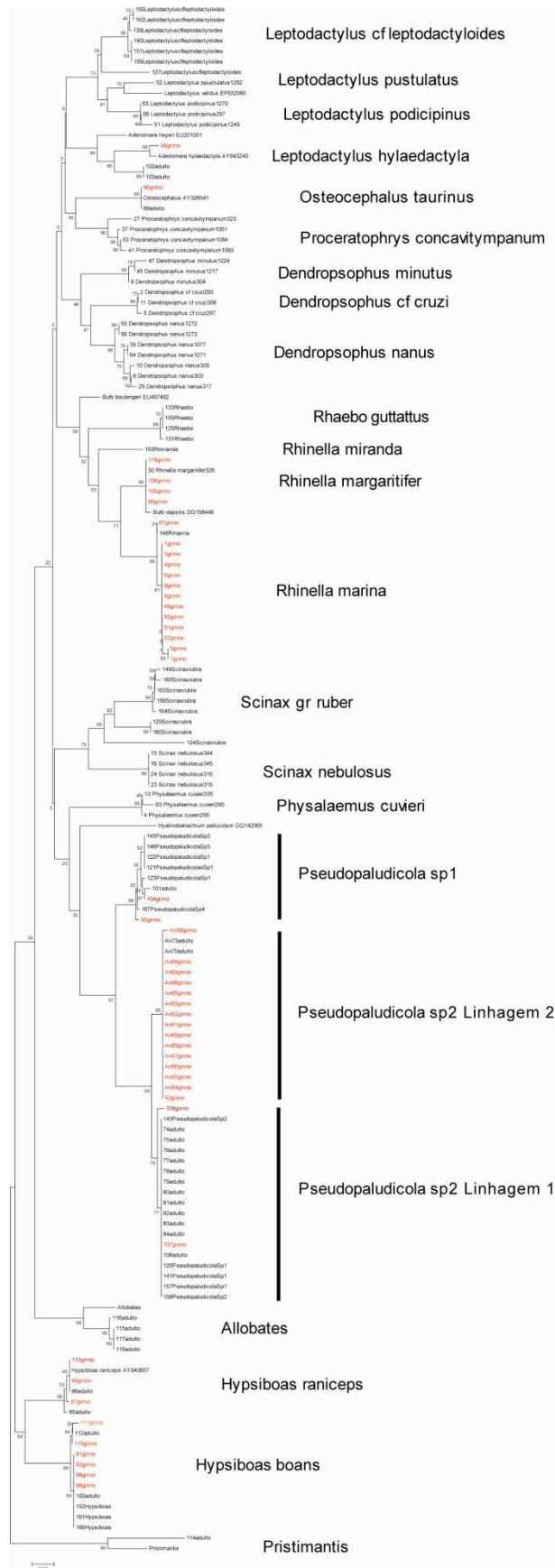


Ilustração 2. Filograma utilizando o método de distância genética de agrupamento de vizinhos e das análises genéticas através do “código de barras do DNA – DNA barcode”. As amostras que correspondem a girinos estão marcadas em cor vermelha.

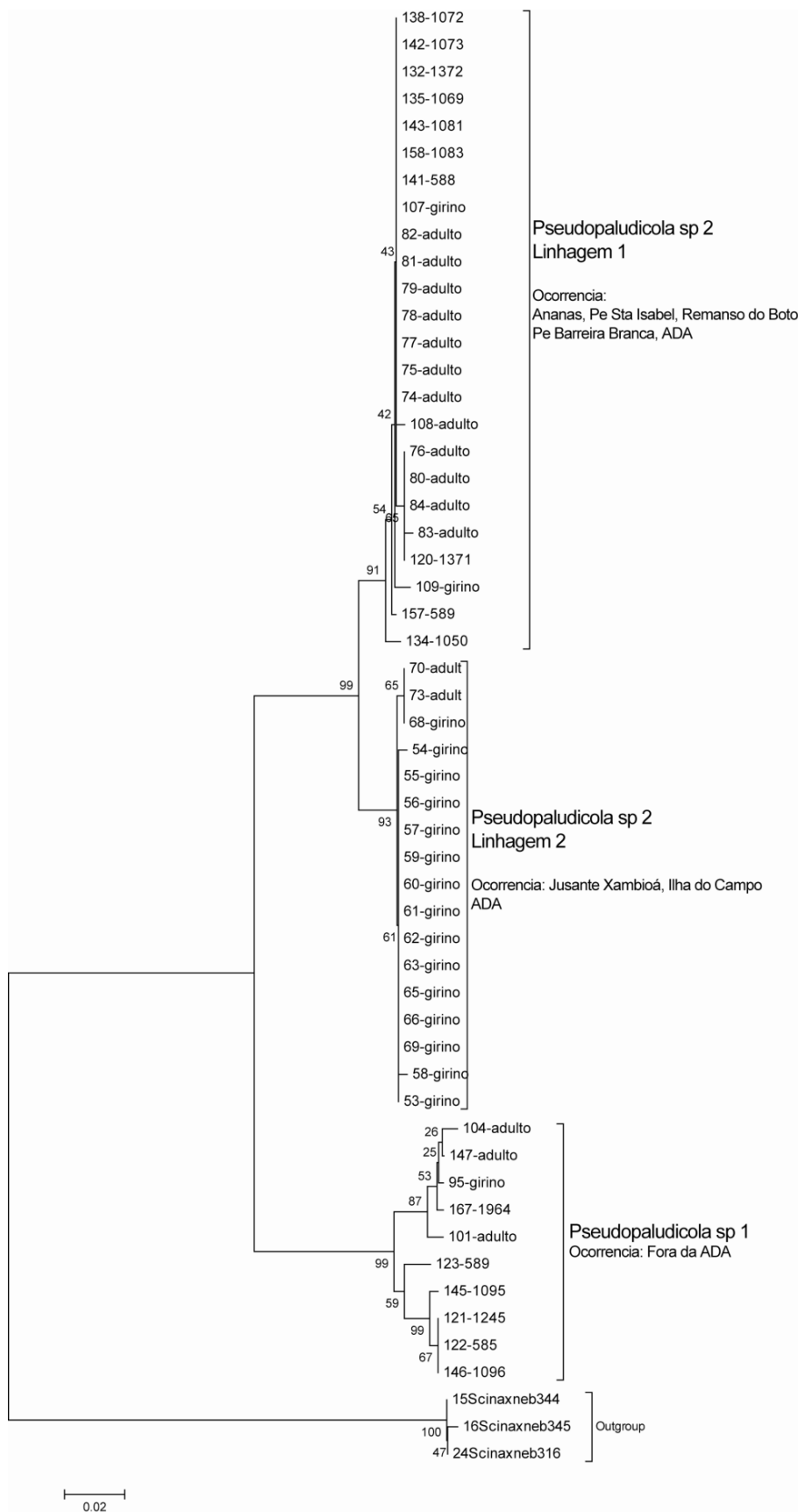


Ilustração 3. Árvore filogenética com método de distancia de agrupamentos de vizinhos (Neighbor-Joining) para as espécies de *Pseudopanudicola* usando *Scinax* como outgroup.