

IMPLANTAÇÃO DO PROJETO BÁSICO AMBIENTAL UHE SÃO MANOEL

PROGRAMA 21

RELATÓRIO PARCIAL DA 2ª CAMPANHA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA

JANEIRO-2016

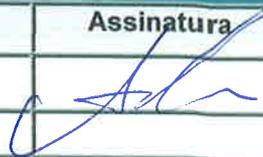
IMPLANTAÇÃO DO PROJETO BÁSICO AMBIENTAL UHE SÃO MANOEL

PROGRAMA 21

RELATÓRIO PARCIAL DA 2ª CAMPANHA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA

3º. Relatório Semestral, referente ao Acompanhamento do Programa 21 da Fase de Instalação. Período: de julho/2015 a dezembro/2015. Licença de Instalação - LI nº. 1017/2014 – IBAMA Processo n. 02001.004420/2007-65.

**EQUIPE TÉCNICA RESPONSÁVEL PELO DESENVOLVIMENTO,
ACOMPANHAMENTO E GESTÃO DO PROGRAMA**

Nome	Cargo	CTF	Assinatura
Anderson Luís Alves	Biólogo	3741374	

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	7
2	CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS	8
3	OBJETIVOS	11
4	METODOLOGIA / ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS	11
	4.1 EXTRAÇÃO DE DNA	12
	4.2 TESTE DE QUALIDADE DO DNA.....	13
5	RESULTADOS PARCIAIS	14
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	15
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS E SUGERIDAS	16

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 4-1: EXEMPLAR DE TUCUNARÉ <i>CICHLA PINIMA</i> SIMILAR AO AMOSTRADO (FONTE FISHBASE)	12
FIGURA 4-2: COLETA DE MATERIAL GENÉTICO DE PEIXES PARA ANÁLISE DE DNA (HASHIMOTO ET AL 2012)	12
FIGURA 5.1 GEL DE ELETROFORESE DE EXTRAÇÃO DE DNA DE TUCUNARÉ <i>CICHLA PINIMA</i>	15

APRESENTAÇÃO

A Segunda Campanha do Programa de Investigação Genética da Ictiofauna realizou-se no período de 30 de outubro a 08 de novembro/2015. As coletas em campo foram realizadas pela equipe do Programa de Monitoramento de Ictiofauna da UHE São Manoel.

As atividades deste Programa foram desenvolvidas de maneira a complementar os trabalhos realizados pela UHE Teles Pires, buscando atender os interesses comuns aos dois empreendimentos. Desta forma, em se tratando da definição de espécies-alvo levaram-se em consideração os estudos já realizados no âmbito do Programa de Investigação Genética da UHE Teles Pires, conforme propõe o PBA. Além disso, as próximas campanhas de Monitoramento da Ictiofauna e do Programa de Telemetria e Marcação da Ictiofauna serão decisivas em relação a escolha definitiva das espécies.

Em anexo, é apresentada sugestão de alteração na metodologia quanto aos marcadores moleculares a serem utilizados ao longo deste trabalho, adequando a viabilidade do estudo com a viabilidade econômica (informações detalhadas em anexo).

Entre as espécies estudadas apenas *Cichla pinima* (tucunaré) foi amostrada na segunda campanha, ainda assim em número baixo de exemplares. Espera-se que a próxima campanha de amostragens de ictiofauna seja mais representativa em relação a esta.

Outras espécies de grande importância para a pesca amadora e de subsistência indígenas serão amostradas e mantidas vivas na última campanha e serão levadas ao Banco de Germoplasma de Peixes Amazônicos da Embrapa Pesca e Aquicultura, visando à manutenção da diversidade genética de populações locais.

1 INTRODUÇÃO

Segundo Purdom (1993), o estudo da genética de peixes é relevante, sobretudo no aspecto da “reprodução”, que pode ser considerado sob dois contextos: a produção, onde se promove o cultivo de peixes com a aplicação de processos envolvendo a seleção de matrizes, ou a exploração pela pesca e a conservação, onde se avalia o impacto determinado por mudanças no ambiente natural sobre as populações de peixe.

De modo geral, tais enfoques estão relacionados, uma vez que a produção depende indiretamente da conservação dos estoques naturais que, além de fornecerem suporte para a pesca profissional, garantem a variabilidade genética necessária para a seleção de matrizes de reprodutores. Dessa maneira, a conservação genética de estoques de peixes no seu ambiente natural (*in situ*) ou através de outras estratégias de conservação (*ex situ*), é de fundamental importância para a manutenção de variabilidade genética e para o estabelecimento de planos de manejo e exploração racional destes organismos.

O Brasil é o país com a maior diversidade e riqueza de espécies. Estima-se que ocorra no Brasil 21% da ictiofauna descritos no mundo (Agostinho et al., 2005), onde são conhecidas 2.300 espécies de peixes dulciaquícolas e 1.298 espécies marinhas, entretanto, estimativas desses valores são flexíveis, pois o conhecimento sobre a ictiofauna brasileira ainda é incompleto (Machado et al., 2008). O rápido e contínuo crescimento da população humana tem fomentado a demanda pela produção de alimentos em todo o mundo, e o consumo de pescado é um dos setores que mais se destaca atualmente (Araki e Schmid, 2010). Neste sentido, as populações de peixes selvagens se tornam cada vez mais explorada, assim como desenvolvimento de empresas de aquicultura.

A redução da variabilidade genética é a resposta à expansão das atividades humanas e da industrialização, que incluem sobrepesca, construção de barragens, exploração de mineração e práticas agrícolas, fatores que vem contribuindo para um declínio de várias populações devido a perda de habitat e as reduções na qualidade da água (O'Reilly e Kozfkay, 2014). A introdução de espécies não-nativas e a perda do habitat são consideradas as duas maiores ameaças à biodiversidade (Carvalho et al., 2009). As espécies não-nativas são introduzidos de forma acidental através de escapes de piscicultura ou de forma intencional, visando o repovoamento de represas, lagos e rios, mas esses peixes tornam-se invasores causando sérios impactos sobre o ambiente aquático e para as populações selvagens, incluindo perda de variabilidade genética

ou até extinção da espécie nativa (Oliveira et al., 2006). Os recursos genéticos são as unidades funcionais da hereditariedade (genes e cromossomos), sendo assim a matéria prima para a manutenção da biodiversidade (variabilidade entre todos os organismos vivos). Os recursos genéticos são preservados através de dois tipos de conservação:

- *in situ*, conservação das populações viáveis em seu habitat natural, protegendo as áreas onde o organismo ocorre;
- *ex situ*, que é a manutenção de organismos inteiros, sementes, ovos, sêmen ou embriões fora de seu habitat natural, feita em programas de reprodução em cativeiro ou bancos de genes (Carolsfeld e Harvey, 1999).

Programas de conservação de recursos genéticos e a atividade de pisciculturas são os principais utilizadores do banco de sêmen de peixe, uma vez que evita os problemas relacionados com a endogamia e a assincronia reprodutiva entre os machos e fêmeas (Ribeiro e Godinho, 2003). A piscicultura vem despertando interesse, por ser uma maneira econômica de se produzir alimento de alto valor nutritivo em curto espaço, e o Brasil apresenta potencial crescimento no setor, pois possui vasta área d'água e apresenta muitas espécies potenciais para cultivo.

Recentemente, vários grupos de pesquisa têm voltado sua atenção para o uso de sequências de DNA mitocondrial para elucidar problemas relativos à genética de populações e à sistemática. Entre os marcadores mais comumente utilizados em estudos populacionais estão os genes ATP sintetase unidades 6 e 8. Nessa perspectiva, o estudo de genética de peixes para o empreendimento hidrelétrico UHE São Manoel, tem por principal objetivo avaliar se há diferenças genéticas entre populações de espécies migradoras e não migradoras, nos trechos a montante e jusante do eixo da futura barragem da UHE.

2 CONSERVAÇÃO DE RECURSOS GENÉTICOS

De acordo com Alves et al. (2013), as principais funções dos BAGs são o manejo e monitoramento de coleções formadas *ex situ*, para a conservação e uso do potencial genético (variabilidade) das populações selvagens. Em geral, essas coleções são mantidas através da criopreservação de sêmen (*in vitro*), em nitrogênio líquido, que representa uma alternativa para a conservação do material genético em cativeiro (*in vivo*) que possui alto custo de manutenção, e permite a otimização dos reprodutores e seus gametas, assim como fornecimento do sêmen

de boa qualidade para a fertilização, até mesmo em períodos menos favoráveis (Leite et al., 2011).

A criopreservação é uma técnica que utiliza temperaturas extremamente baixas (-196° C), para que a estrutura e funcionalidade da célula não sejam comprometidas, conservando-a geneticamente viável e temporariamente inativa por longos períodos (Carneiro et al., 2012). O sucesso da criopreservação depende da coleta do sêmen, composição dos diluentes a serem utilizados, concentração dos crioprotetores (intracelulares e extracelulares) e os métodos de congelamento, armazenamento e descongelamento (Varela Junior et al., 2012; Leite et al., 2011).

De acordo com Alves et al. (2013), os BAGs podem ser utilizados em programas de repovoamento, que são frequentes em rios impactados e prejudicados pela ação antrópica, tais como a construção de usinas hidrelétricas e pesca predatória, que podem levar à diminuição dos estoques naturais e até mesmo à extinção de algumas populações ou espécies. Ainda de acordo com Alves et al (2013), para a formação de BAGs devemos levar em consideração alguns aspectos: as espécies e estoques de peixes que serão cultivados na forma de bancos genéticos; a escolha dos tipos de bancos (*ex situ* e/ou *in vitro*); a coleta apropriada das matrizes na natureza para evitar a redução do potencial genético; os cruzamentos direcionados para gerar prole viável não endogâmica; e estratégias de manutenção e monitoramento de diversidade genética.

Nesse contexto, a variabilidade genética é fundamental para a formação de um BAG efetivo, uma vez que a baixa variabilidade genética dos indivíduos aliados a cruzamentos aleatórios pode levar ao aumento da consanguinidade ou endogamia do estoque. A depressão por consanguinidade resulta do fato de indivíduos biologicamente aparentados terem maior chance de possuírem genes recessivos deletérios (Alves et al., 2013). A probabilidade de anomalias morfológicas e fisiológicas é maior em pais aparentados. Os processos de domesticação de peixes em sistemas de produção levam à perda natural de variabilidade genética dos estoques, em especial no Brasil onde há uma tendência dos plantéis de matrizes serem formados por peixes que possuem alto grau de parentesco (Alves et al., 2013; Barroso et al., 2014).

Vários são os problemas relacionados à endogamia, que, em geral, resultam em baixa capacidade reprodutiva, que são características indesejáveis para programas de conservação de recursos genéticos *ex-situ* (criopreservação). Nesse sentido, a alta variabilidade genética é essencial na formação de BAG utilizados para programas de conservação, principalmente

porque permite que os indivíduos tenham diferentes capacidades de suportar as variações e pressões impostas pelo ambiente (Alves et al., 2013).

3 OBJETIVOS

O Programa de Investigação Genética da Ictiofauna da UHE São Manoel tem como objetivo geral:

- Avaliar a variabilidade genética de peixes migratórios e não migradores no rio Teles Pires, nas Áreas de Influência Direta e Indireta da UHE São Manoel, visando identificar a ocorrência de estruturação genética populacional a montante e jusante da UHE.

Objetivos específicos:

- Definir espécies alvo para o Programa, priorizando a escolha de espécies migratórias, não migratórias, de interesse comercial, endêmicas, ameaçadas de extinção ou de importância alimentar, em consonância com o Programa de Telemetria e Marcação da Ictiofauna;
- Receber e processar amostras de tecido das espécies alvo, as quais deverão ser aportadas principalmente do Programa de Monitoramento da Ictiofauna e do Programa Telemetria e Marcação da Ictiofauna;
- Analisar a estrutura genética e o padrão espacial da variabilidade genética utilizando técnicas de análises estatísticas apropriadas, bem como a relação entre a similaridade genética e as distâncias geográficas e ambientais;
- Utilizar a avaliação da estrutura genética para estimar o fluxo gênico entre subpopulações.

4 METODOLOGIA / ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

A Segunda Campanha do Programa de Investigação Genética da Ictiofauna foi realizada no período de 30 de outubro a 08 de novembro/2015. .

A definição de espécie-alvo está diretamente relacionada às ações desta equipe e da equipe de radiotelemetria, aliado aos estudos já realizados na UHE Teles Pires, assim, tem o objetivo de avaliar a captura das espécies-alvo, definir com base em abundância e relacionar com as espécies definidas para monitoramento de migração por telemetria, uma vez que associar estas informações são de extrema importância para a melhor compreensão dos processos genético-ecológicos que podem estabelecer prévia estruturação populacional na área de influência da UHE São Manoel.

Nesta segunda campanha, foram coletadas amostras de apenas dois indivíduos de tucunaré *Cichla pinima* (Figura 4-1). As duas amostras de tecidos (nadadeira) foram acondicionados em tubos com álcool (Figura 4-2) de acordo protocolo de Hashimoto et al. (2012). Este material foi

recebido no laboratório de Genética e Biotecnologia da Embrapa Palmas/TO (Anexo), em seguida, foi catalogado recebendo o número de tombo (704, 705) e armazenado na coleção para posterior início dos preparos para as análises de genética populacional.



Figura 4-1: Exemplar de tucunaré *Cichla pinima* similar ao amostrado (Fonte FishBase).

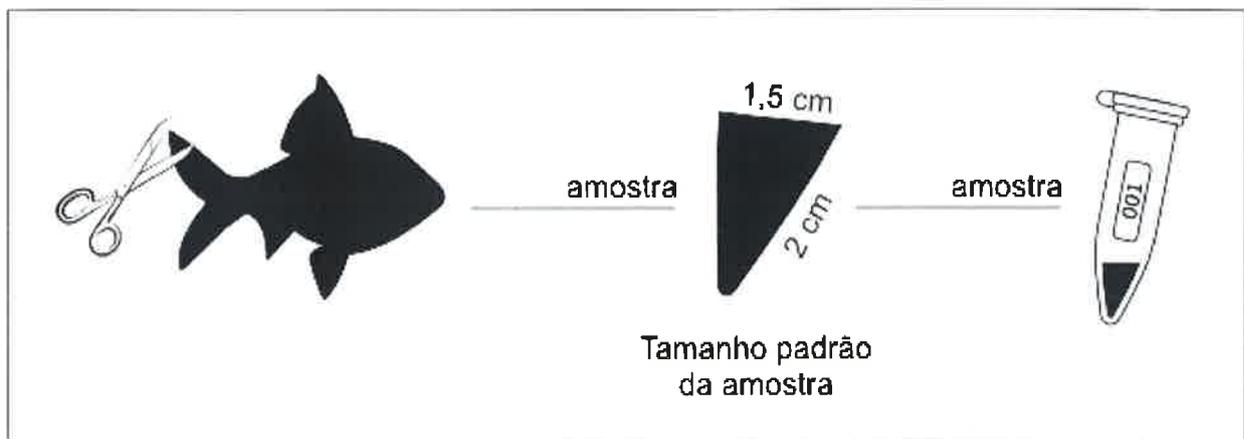


Figura 4-2: Coleta de material genético de peixes para análise de DNA (Hashimoto et al 2012).

4.1 EXTRAÇÃO DE DNA

Para a extração do DNA foi seguido o procedimento descrito a baixo:

- Coletar tecido da nadadeira caudal (2cm) e colocar em tubos eppendorfs com álcool (92,8%) e identificar a amostra com número definitivo da coleção para armazenamento;

- Cortar o tecido em pequenos pedaços e colocar em microtubo (1,5ml) para secar em estufa a 40°C por 5 minutos para eliminar o álcool;
- Adicionar 180µl de Genomic Digestion Buffer, em seguida adicionar 20µl de proteinase K, e deixar em Banho-maria por 1h para que inicie o processo de rompimento celular;
- Centrifugar 3 minutos a 13.000 RPM e retirar o sobrenadante (200µl), em seguida adicionar 20µl Rnase e passar no vortéx 5 segundos, deixar por 2 minutos a temperatura ambiente;
- Adicionar 200µl Genomic Lysis/Binding Buffer e em seguida adicionar 200µl de etanol 100% gelado para precipitação do DNA, passar no vortéx 5 segundos para homogeneizar e transferir 600µl da solução para o tubo contendo a coluna magnética;
- Centrifugar 1 minuto a 13.000 RPM e descartar o líquido sobrenadante, em seguida adicionar 500µl de tampão Wash Buffer 1 para lavagem e purificação do DNA, e centrifugar 1 minuto 13.000 RPM, em seguida descartar tampão 1;
- Adicionar 500µl de tampão Wash Buffer 2 e centrifugar 3 minutos a 13.000 RPM, descartar tampão 2 e centrifugar 30 segundos a 13.000 RPM, em seguida trocar o tubo e adicionar 50µl Elution Buffer para eluir o DNA e esperar 1 minuto a temperatura ambiente;
- Centrifugar 3 minutos a 13.000 RPM e armazenar no freezer.

4.2 TESTE DE QUALIDADE DO DNA

- O DNA extraído foi avaliado em gel de agarose 1% para identificar a qualidade do DNA, se está íntegro ou fragmentado, e a presença de RNAs. A avaliação ocorreu em eletroforese sendo posteriormente visualizado em transluminador de luz UV com captação automática de imagem. Procedimento:
- A preparação do gel consiste em pesar 0,4g de agarose e adicionar 40ml de tampão (TAE) 1X, em seguida aquecer no microondas até a homogeneização e esperar esfriar por 1 minuto;
- Selar as laterais do suporte da cuba com fita crepe, em seguida colocar a mistura de gel no suporte sem formar bolhas e adicionar 2µl de corante de DNA Syber Safe;
- Inserir o pente de aplicação de amostras no gel e esperar o gel solidificar para em seguida colocar o gel na cuba de eletroforese e adicionar tampão (TAE) 1X até a superfície.
- Descongelar as amostras de DNA e em seguida dar “spin” (centrifugar 30 segundos);
- Pipetar alíquota de 3µl da amostra de DNA e homogeneizar com 1µl de tampão de corrida BlueJuice Loading Buffer, em seguida aplicar as amostras nos poços do gel e reservar um

poço para o padrão de corrida (Ladder 1Kb);

- Ajustar a voltagem conforme o tempo de corrida desejado, em média 120V por 20 min, após a eletroforese, retirar o gel da cuba e colocar no transluminaor de luz UV para visualizar as bandas de DNA e avaliar a qualidade;
- Registrar e salvar os resultados.

5 RESULTADOS PARCIAIS

No presente relatório, a extração do DNA das amostras recebidas foi feita utilizando-se kit comercial, o protocolo da extração deste kit pode ser sintetizado da seguinte forma: lise do tecido com Genomic Digestion; digestão das proteínas com Proteinase K; lise das células com Genomic Lysis; degradação do RNA com *RNase*; lavagem e purificação do DNA com o PureLink Genomic Wash Buffers 1 e 2; e hidratação do DNA com *PureLink Genomic Elution Buffer*.

O produto da extração de DNA é submetido à eletroforese em gel de agarose a 1%, corado com 1,5 µl de *Syber Safe* diluído conforme recomendações do fabricante, e visualizado no transiluminador de luz ultravioleta, para serem avaliadas e estimadas a qualidade e a quantidade do DNA resultante da extração (Figura 4-3).

Os resultados obtidos permitem observar que a qualidade de DNA total extraído pelos kits comerciais está alta, ou seja, o DNA extraído se apresenta integro e com peso molecular elevado possibilitando a obtenção de amplicons (produtos de PCR) de excelente qualidade nas reações de PCR dos microssatélites ou genes mitocondriais.

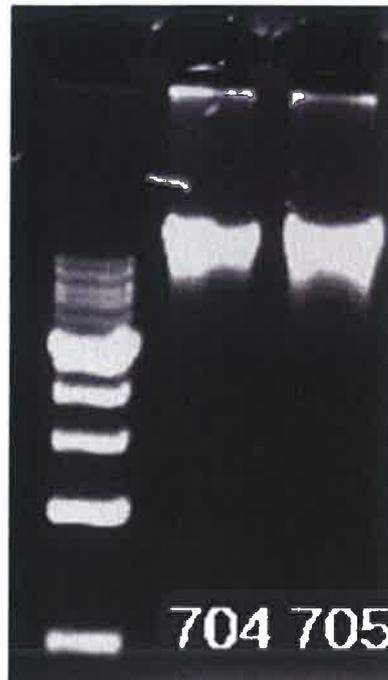


Figura 4-3: Gel de eletroforese de extração de DNA de tucunaré *Cichla pinima*.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Nesta Segunda Campanha, amostras de tecido relativas ao Programa de Investigação Genética da Ictiofauna da UHE São Manoel foram recebidas, acondicionadas e tombadas no Banco de DNA. Estas amostras estão depositadas com os números de acesso 704 e 705 no Laboratório de Recursos Genéticos da EMBRAPA/Tocantins.
- Dentre as espécies estudadas apenas *Cichla pinima* (tucunaré) foi amostrada, ainda assim em número baixo de exemplares. As análises genéticas de *Cichla pinima* foram iniciadas com a extração de DNA e checagem de qualidade do material genético extraído. Os resultados foram positivos, a extração de DNA foi realizada utilizando kits comerciais e o DNA resultante possui alta qualidade, sem arrastos ou fragmentos de pequenos tamanhos, indicando que o processo de coleta e acondicionamento em campo foi realizado de forma adequada. A qualidade do DNA é fundamental para que os procedimentos de genotipagem sejam realizados satisfatoriamente. Estas análises devem ser iniciadas em conjunto com as demais amostras que serão entregues após a terceira campanha.
- A próxima campanha de amostragens de ictiofauna a ser realizada pela equipe de

monitoramento da ictiofauna e de radiotelemetria será fundamental para definição definitiva das espécies a serem avaliadas geneticamente, com representantes de espécies migradoras e não migradoras.

- Outras espécies de grande importância para a pesca amadora e de subsistência indígenas serão amostradas e mantidas vivas na última campanha e serão levadas ao Banco de Germoplasma de Peixes Amazônicos da Embrapa Pesca e Aquicultura visando à manutenção da diversidade genética de populações locais.
- Vale ressaltar que conforme previsto no PBA, deverão ser envidados esforços para a execução integrada desse Programa com os demais no âmbito da UHE São Manoel. Além disso, a metodologia desse Programa poderá ser flexibilizada para a adequação à execução conjunta com os demais empreendimentos hidrelétricos previstos para o rio Teles Pires.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS CITADAS E SUGERIDAS

AGOSTINHO, A. A., THOMAZ, S. M., GOMES, L. C. 2005. **Conservacion of the biodiversity of Brazil's inland waters.** Conservation Biology, v. 19, n. 3, 646-652.

ALVES, A.L.; VARELA, E.S.; HASHIMOTO, D.T. 2013. Genética aplicada a piscicultura. In: RODRIGUES, A.P.O. et al (Orgs.). **Piscicultura de água doce: multiplicando conhecimento.** 1ª Ed. EMBRAPA, Cap. 8, 273- 300.

ALVES, A. L., VARELA, E. S., MORO, G. V., KIRSCHNIK, L. N. G. 2014. **Riscos Genéticos da Produção de Híbridos de Peixes Nativos.** Palmas: Embrapa Pesca e Aquicultura, 58p.

ARAKI, H., SCHMID, C. 2010. **Is hatchery stocking a help or harm? Evidence, limitations and future directions in ecological and genetic surveys.** Aquaculture, 308, S2–S11.

BARTLEY, D.M.; RANA, K.; IMMINK, A.J. 1997. **The use of inter-species hybrids in aquaculture and their reporting to FAO.** The FAO Aquaculture Newsletter, n. 17, 7-13.

BENTSEN, H., OLESEN, I. 2002. **Designing aquaculture mass selection programs to avoid high inbreeding rates.** *Aquaculture*, v. 204, n. 3-4, 349–359.

CARNEIRO, P. C. F.; AZEVEDO, H. C.; SANCHES, E. G.; NIZIO MARIA, A. 2012. **Manual de Curadores de Germoplasma – Animal: Conservação ex situ/in vitro de sêmen de peixes.** Brasília, DF: EMBRAPA – Recursos Genéticos e Biotecnologia.

CAROLSFELD, J., HARVEY, B. J. 1999. **Conservação de recursos genéticos em peixes: Teoria e Prática.** In: Curso de Treinamento Brasileiro. Victória, BC, Canadá: World Fisheries Trust, 47p.

CARVALHO, D. C., OLIVEIRA, D. A. A., DOS SANTOS, J. E., TESKE, P., BEHEREGARAY, L. B., SCHNEIDER, H., SAMPAIO, I. 2009. **Genetic characterization of native and introduced populations of the neotropical cichlid genus *Cichla* in Brazil.** *Genetics and Molecular Biology*, v. 32, n. 3, 601-607.

COSTA, L. R. F., BARTHEM, R. B., BITTENCOURT, M. M. 2001. **A pesca do Tambaqui, *Colossoma macropomum*, com enfoque na área do médio Solimões, Amazonas, Brasil.** *Acta Amazonica*, 31(3), 449-468.

DOWLING, T., SECOR, C. 1997. **The role of hybridization and introgression in the diversification of animals.** *Annual review of Ecology and Systematics*, v. 28, 593–619.

BOSCARDIN, N. R. 2008. **A produção aquícola brasileira.** In: OSTRENSKY, A., BORGHETTI, J. R., SOTO, D. (Ed.) *Aquicultura no Brasil - o desafio é crescer.* Brasília: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação, 276p

GOULDING, M. A, CARVALHO, M. L. 1982. **Life history and management of the tambaqui (*Colossoma macropomum*, characidae): an importante Amazonian foodfish.** *Revista Brasileira de Zoologia*, v.1, n.1, 107-138.

HASHIMOTO, D., ALVES, A. L., MORO, G., VARELA, E. **Genética na Piscicultura Importância da variabilidade genética, marcação e coleta para análise de DNA.** EMBRAPA, 2012

HAMOY, I. G., CIDADE, F. W., BARBOSA, M. S., GONÇALVES, E. C., SANTOS, S. (2011). **Isolation and characterization of tri and tetranucleotide microsatellite markers for the tambaqui (*Colossoma macropomum*, Serrasalminidae, Characiformes).** *Conservation Genetics Resources*, 3(1), 33-36.

HELFMAN, G. COLLETTE, B. B., FACEY, B. W. B. 2009. **The diversity of fishes: biology, evolution, and ecology, Cap.V Behavior and Ecology.** Wiley-Blackwell, 736p.

LEITE, L. V. 2011. **Dose inseminante, embriogênese e criopreservação de sêmen de tambaqui (*Colossoma Macropomum*).** Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Ceará, Faculdade de Medicina Veterinária, Curso de Mestrado Acadêmico em Ciências Veterinárias.

LEITE, L. V., OLIVEIRA, F. C. E., ; NUNES, Larissa Teixeira; NUNES, José Ferreira; SALMITO-VANDERLEY, Carminda Sandra Brito. 2011. **Criopreservação de Sêmen de Tambaqui com ACP® Adicionado de Gema de Ovo**. Revista Brasileira de Engenharia da Pesca, v.6, 23-29.

LENZ, D. R. 2014. **Caracterização e Criopreservação de Sêmen de Tambaqui (*Colossoma Macropomum*) em Diferentes Crioprotetores**. Dissertação - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia, Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal.

LUO, K., KONG, J., LUAN, S., MENG, X.-H., ZHANG, T.-S., WANG, Q.-Y. 2014. **Effect of inbreeding on survival, WSSV tolerance and growth at the postlarval stage of experimental full-sibling inbred populations of the Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis***. Aquaculture, 420–421, 32–37.

MACHADO, A. B. M., DRUMMOND, G. M., PAGLIA, A. P. 2008. **Livro vermelho da fauna brasileira ameaçada de extinção**. 1º Ed. Brasília, DF: MMA. Belo Horizonte, MG: Fundação Biodiversitas, 2v. 1420p.

MADALENA, F. E. 2002. ***Bos indicus* Breeds and *Bos indicus* x *Bos taurus* Crosses**. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J. W.; FOX, P. F. (Org.). Encyclopedia of Dairy Sciences. Academic Press, 576-585.

MEDINA FILHO, H. P.; BORDIGNON, R.; BALLVE, R. M. L.; SIQUEIRA, W. J. 1993. **Genetic proof of the occurrence of mono and dizygotic hybrid twins in Citrus rootstocks**. Revista Brasileira de Genética, v.16, n.3, 703-711.

MALLET, J. 2005. **Hybridization as an invasion of the genome**. Trends in Ecology & Evolution, v. 20, n. 5, 229–237.

MIRIMIN, L., KERWATH, S. E., MACEY, B. M., BESTER-VAN DER MERWE, A. E., LAMBERTH, S. J., BLOOMER, P., ROODT-WILDING, R. 2014. **Identification of naturally occurring hybrids between two overexploited sciaenid species along the South African coast**. Molecular Phylogenetics and Evolution, 76, 30–33.

MPA. **BOLETIM ESTATÍSTICO DA PESCA E AQUICULTURA 2011**. DF, 2011.

OLIVEIRA, A. V.; PRIOLI, A. J.; PRIOLI, S. M. A. P.; BIGNOTTO, T. S.; JÚLIO-JR, H. F.; CARRER, H.; AGOSTINHO, C. S.; PRIOLI, L; M. 2006. **Genetic diversity of invasive and native *Cichla* (Pisces: Perciformes) populations in Brazil with evidence of interspecific hybridization**. Journal of Fish Biology, 69, 206–277.

O'REILLY, P. T., KOZFKAY, C. C. 2014. **Use of microsatellite data and pedigree information in the genetic management of two long-term salmon conservation programs**. Rev Fish Biol Fisheries, 24, 819–848.

RIBEIRO, R. I. M. A.; GODINHO, H. P. 2003. **Criopreservação do sêmen testicular do teleósteo piau-açu *Leporinus macrocephalus***. Arquivo Brasileiro de Medicina Veerinária e Zootecnia, 55(1), 1-7.

SCHANK, S. C., DIZ, D. A., BATES, D. B., THOMPSON, K. E. 1993. **Genetic improvement of napiergrass and hybrids with pearl millet**. *Biomass and Bioenergy*, v.5, 35-40.

SORENSEN, A. M. Jr. 1979. **A laboratory for animal reproduction**. 4. ed. Massachusetts: American Press, 153p.

STREIT JUNIOR, D.P., MORAES, G.V., RIBEIRO, R.P. POVH, J. A., SOUZA, E. D., OLIVEIRA, C. A. L. 2004. **Avaliação de diferentes técnicas para coloração de sêmen de peixes**. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*. UNIPAR, v.7, n.2, 157-162.

VARELA JUNIOR, A. S., CORCINI, C. D., STREIT JR., D. P., RIZZOTO, G., JARDIM, R. D., LUCIA JR., T., FIGUEIREDO, M. R. C. 2012. **Efeito crioprotetor de diferentes concentrações do dimetilsulfóxido no congelamento de sêmen de tambaqui *Colossoma macropomum***. *Atlântica*, Rio Grande, 34 (2), 129-137.

VIEIRA, F. E., ISAAC, V. J., FABRÉ, N. N. 1999. **Biologia reprodutiva do tambaqui, *Colossoma macropomum* CUVIER, 1818 (Teleostei, Serrasalminidae), no baixo Amazonas, Brasil**. *Acta Amazônica*, v. 29, 625-638.

WILLIS, S. C., MACRANDER, J., FARIAS, I. P., ORTÍ, G. 2012. **Simultaneous delimitation of species and quantification of interspecific hybridization in Amazonian peacock cichlids (genus *Cichla*) using multi-locus data**. *BMC Evolutionary Biology*, v. 12, n. 1, p. 96.

8 ANEXOS



Palmas, 18 de fevereiro de 2016

Declaração de Recebimento e tombamento de material biológico

Venho por meio desta, informar que recebemos no Laboratório de Genética e Biotecnologia duas amostras de tucunaré *Cichla pinima* (Pisces: Cichlidae) proveniente do **PROJETO BÁSICO AMBIENTAL UHE SÃO MANOEL** como parte do PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA. As amostras foram recebidas e tombadas em sistema de controle e gestão de material biológico do laboratório recebendo número específico de controle e foram armazenadas na coleção do referido laboratório.

Cordialmente,



Dr. Anderson Luis Alves
CPF: 021022849-05
Pesquisador

1 PROPOSTA DE ADEQUAÇÃO DO PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA

1.1 JUSTIFICATIVA

A metodologia sugerida pelo PBA São Manoel para as análises genéticas populacionais dos peixes envolve a utilização de marcadores microssatélites. No entanto, diversas espécies não possuem marcadores microssatélites descritos e a sugestão do PBA/IBAMA seria de desenvolver e validar estes marcadores no presente estudo, assim como o uso de sequenciamento de nova geração (NGS - Next generation sequence). Porém, essa sugestão é inviável devido ao alto custo de desenvolvimento de marcadores e também em relação ao tempo necessário para desenvolvimento e validação dos marcadores, além do que, para validação são necessárias ao menos 5 populações distintas geograficamente com alta variabilidade genética para efetivamente identificar polimorfismos no marcador.

1.2 SUGESTÕES DE ALTERAÇÕES PARA O DESENVOLVIMENTO METODOLÓGICO DO PROJETO BÁSICO AMBIENTAL DA UHE SÃO MANOEL

Sugerimos então que, para aquelas espécies que tenham marcadores microssatélites disponíveis estes serão realizados, porém, as espécies que não possuam marcadores disponíveis o trabalho será conduzida com outro marcador. Nesse sentido, definimos o uso de genes do genoma mitocondrial, que são amplamente utilizados em diversas espécies animais e em peixes, o ATPase 6 e 8 (ATP sintetase porção 6 e 8), que apresentam taxas de evolução mais lentas, em torno de 1.3% de divergência por milhão de ano. O gene ATPase 6/8 será utilizado nas análises populacionais de forma completa, com 842pb, e por ser um gene funcional não há a presença de indels, reduzindo a chance de mutações falsas. Ou seja, a análise populacional com o gene ATPase é mais robusta do que a região controle do DNA mitocondrial (sugerido pelo IBAMA em outros propostas similares) por possuir taxa de evolução menor e adequada a estudos populacionais, por ter gene completo analisado e não apenas uma região parcial aumentando assim a possibilidade de observação de mutações (caracteres), e finalmente o ATPase 6/8 possibilita identificar eventos populacionais históricos ou a identificação de espécies crípticas, onde o D-loop não teria acurácia suficiente.

2 PLANO DE TRABALHO

Serão coletadas amostras de nadadeiras e/ou músculo, que serão armazenados em microtubos de 2,0 ml contendo álcool absoluto, e posteriormente mantidos congelados em freezer a -20°C, até o momento da extração do DNA.

Após a identificação taxonômica e retirada de tecido para análise genética, vouchers representativos dos tipos populacionais serão depositados em coleção de museu. Assim como as nadadeiras e DNA serão catalogadas e mantidas registradas em coleção de material genético.

Os animais das espécies indicadas para composição do BAG terão o DNA analisado com objetivo de identificar o grau de parentesco visando recomposições de ictiofauna no futuro na área de abrangência da UHE São Manoel.

3 METODOLOGIA / ATIVIDADES A SEREM DESENVOLVIDAS

3.1 EXTRAÇÃO DE DNA

- Coletar tecido da nadadeira caudal (2cm) e colocar em tubos eppendorfs com álcool (92,8%) e identificar a amostra com número definitivo da coleção para armazenamento;
- Cortar o tecido em pequenos pedaços e colocar em microtubo (1,5ml) para secar em estufa a 40°C por 5 minutos para eliminar o álcool;
- Adicionar 180µl de Genomic Digestion Buffer, em seguida adicionar 20µl de proteinase K, e deixar em Banho-maria por 1h para que inicie o processo de rompimento celular;
- Centrifugar 3 minutos a 13.000 RPM e retirar o sobrenadante (200µl), em seguida adicionar 20µl Rnase e passar no vortéx 5 segundos, deixar por 2 minutos a temperatura ambiente;
- Adicionar 200µl Genomic Lysis/Binding Buffer e em seguida adicionar 200µl de etanol 100% gelado para precipitação do DNA, passar no vortéx 5 segundos para homogeneizar e transferir 600µl da solução para o tubo contendo a coluna magnética;
- Centrifugar 1 minuto a 13.000 RPM e descartar o líquido sobrenadante, em seguida adicionar 500µl de tampão Wash Buffer 1 para lavagem e purificação do DNA, e centrifugar 1 minuto 13.000 RPM, em seguida descartar tampão 1;
- Adicionar 500µl de tampão Wash Buffer 2 e centrifugar 3 minutos a 13.000 RPM, descartar tampão 2 e centrifugar 30 segundos a 13.000 RPM, em seguida trocar o tubo e adicionar 50µl Elution Buffer para eluir o DNA e esperar 1 minuto a temperatura ambiente;

- Centrifugar 3 minutos a 13.000 RPM e armazenar no freezer.

3.2 TESTE DE QUALIDADE DO DNA

O DNA extraído será avaliado em gel de agarose 1% para identificar a qualidade do DNA, se está íntegro ou fragmentado, e a presença de RNAs. A avaliação ocorre em eletroforese sendo posteriormente visualizado em transluminador de luz UV com captação automática de imagem.

- A preparação do gel consiste em pesar 0,4g de agarose e adicionar 40ml de tampão (TAE) 1X, em seguida aquecer no microondas até a homogeneização e esperar esfriar por 1 minuto;
- Selar as laterais do suporte da cuba com fita crepe, em seguida colocar a mistura de gel no suporte sem formar bolhas e adicionar 2µl de corante de DNA Syber Safe;
- Inserir o pente de aplicação de amostras no gel e esperar o gel solidificar para em seguida colocar o gel na cuba de eletroforese e adicionar tampão (TAE) 1X até a superfície.
- Descongelar as amostras de DNA e em seguida dar “spin” (centrifugar 30 segundos);
- Pipetar alíquota de 3µl da amostra de DNA e homogeneizar com 1µl de tampão de corrida BlueJuice Loading Buffer, em seguida aplicar as amostras nos poços do gel e reservar um poço para o padrão de corrida (Ladder 1Kb);
- Ajustar a voltagem conforme o tempo de corrida desejado, em média 120V por 20 min, após a eletroforese, retirar o gel da cuba e colocar no transluminador de luz UV para visualizar as bandas de DNA e avaliar a qualidade;
- Registrar e salvar os resultados.

3.3 AMPLIFICAÇÃO DE MARCADORES MICROSSATÉLITES POR PCR

Os DNAs das amostras que obtiverem qualidade na extração serão submetidos a amplificação de marcadores moleculares do tipo microssatélites via reação de polimerase em cadeia (PCR). Serão utilizados locus de microssatélites descritos como polimórficos para populações naturais já validados no laboratório em outros projetos.

A reação de PCR será realizada em volumes de 13,5 µl contendo: 1,0µl de DNA; 0,5µl primer Forward; 0,5µl primer Reverse; 11,5µl de MIX (10 mM Tris-HCl, pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0,125 mM de dNTPs e 1 U de Taq DNA polimerase). Para a amplificação dos seis microssatélites será utilizado o mesmo programa de PCR: Um ciclo de 95°C por 5 min; 6 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1min; seguidos de 25 ciclos a 94°C por 1 min, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 min; e uma extensão final a 72°C por 30 min. Em

seguida o produto de PCR será visualização e avaliado em gel de agarose a 1% para confirmar a amplificação e tamanho dos fragmentos.

3.4 GENOTIPAGEM DE MICROSSATÉLITE

A genotipagem de polimorfismos dos microssatélites é realizada em gel de poliacrilamida para identificar a separação dos fragmentos amplificados com maior resolução. Os procedimentos são os seguintes:

- Lavar as placas e pentes com água, detergente e álcool 70%, e secar as placas em temperatura ambiente, em seguida unir uma placa com fenda junto à placa plana com espaçador soldado e colocar no suporte de placas com a fenda voltada para o interior.
- Alinhar as placas com as barras de pressão e Apertar os pinos levemente dos superiores para os inferiores, em seguida enroscar completamente os pinos do centro, superior e por último inferior, certificando que as placas estão completamente alinhadas, para que o gel não vaze; em seguida encaixar o suporte na base de montagem sobre a almofada de silicone e encaixar os pinos da base no suporte e cuidadosamente girá-los 180 graus em direções opostas;
- Em seguida prerar o gel de acrilamida adicionando 7ml de TBE 10X, 28ml de Acrilamida a 30%, e 700µl de APS 10%, 38ml de água destilada e 20µl de TEMED;
- Injetar a solução nas placas com seringa de 20ml, evitando a formação de bolhas e colocar os pentes, em seguida aguardar a polimerização por 20 minutos e remover os pentes cuidadosamente.
- preparo das amostras para genotipagem deve seguir os seguintes procedimentos: pipetar 10µl do produto de PCR, misturar com 4µl de Loading solution (Sacarose + Cianol), e adicionar 6µl da mistura nos poços. Adiciona 4µl de 10pb e 25pb de Ladder a 45 ng/µL e ajustar a condições de migração, 500V a 90mA (microamperes);
- A coloração do gel deve ser realizada com o corante Sybr Safe diretamente no prepararo do gel sendo 200ml de TBE 1X contendo 10µl de corante Sybr Safe; em seguida corar por 20 minutos e analisar o gel de acrilamida sob radiação ultravioleta (Transiluminador).
- Capturar a imagem e registrar/salvar os resultados.

3.5 ANÁLISE DE SEQUÊNCIAS

Os genes ATPase 6/8 serão completamente sequenciados perfazendo 842pb. As reações de PCR do gene ATPase 6/8 foram efetuadas em um termociclador (BioRad) utilizando-se 12,5 µl de uma solução contendo 8,50 µl de água ultrapura (milli-Q), 0,4 µl de dNTP (2 mM), 1,25 µl de tampão 10X, 0,3 µl de cada *primer* (10 µM), 0,7 µl de MgCl₂ (50 mM), 0,05 µl de DNA polimerase (5 unidades) e 1,0 µl de DNA molde.

As condições de amplificação consistem em um passo inicial de desnaturação a 95°C por 2 minutos, seguidos de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 54°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto, seguido de um passo final de extensão a 72°C por 10 minutos.

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR serão visualizados em gel de agarose 1%. Para as análises de sequencias, o DNA amplificado será purificado pelo tratamento com a enzima EXOSAP. O DNA purificado será sequenciado com o kit DYEnamic ET terminator reagent premix para MEGABACE (Amersham Biociences). O DNA será sequenciado num sequenciador automático de DNA modelo MEGABACE 1000 (GE HealthCare™), na empresa MacroGen na Coréia.

4 ANÁLISE DE DADOS

Análises de microssatélites

Os alelos amplificados serão comparados com aqueles previamente caracterizados na literatura. A amplitude alélica será caracterizada de acordo com o tamanho e o número de alelos das amostras. Será calculado o número médio de alelos por locus o número de homozigotos e de heterozigotos. A frequência alélica será calculada por $p = \frac{2N_{pp} + N_{pq}}{2N}$ onde N_{pp} é o número de homozigotos e N_{pq} corresponde ao número de heterozigotos, onde q pode ser qualquer outro alelo. A heterozigosidade observada será calculada por $H_o = \frac{N^{\circ} \text{Heteroz.}}{N}$ onde N é o numero total de amostras. A Heterozigosidade segundo o equilíbrio de Hardy-Weinberg será calculada por $\hat{H} = \frac{n}{n-1} (1 - \sum_{i=1}^k p_i^2)$, onde n é o número de cópias gênicas.

Após as análises de frequências alélicas será estimado a endogamia individual e de grupos

(populações ou estoques), com os dados será possível obter uma matriz de relacionamento entre todos os animais genotipados identificando os cruzamentos possíveis (não endogâmicos).

Análise de sequências

As sequências de mtDNA para os genes ATPase 6/8 serão alinhadas usando o programa BioEdit v. 7.1.9. No programa PAUP* v. 4.0b10 (Swofford, 2002) serão realizadas as análises de composição nucleotídica, examinada por variações de bases para todas as posições, e o teste de homogeneidade de frequência de bases. As análises filogenéticas para reconstruir as árvores de relação entre as populações serão conduzidas pelo software Paup 4.0 (Swofford, 2002) usando o método de distância genética de Neighbour-Joining (NJ). As filogenias obtidas serão testadas utilizando o método de *bootstrap* com 1000 réplicas (Felsenstein, 1985).

A análise de estrutura populacional será realizada com o auxílio do programa ARLEQUIN ver. 2.0 (Excoffier *et al.*, 2000) e expressada como diversidade de haplótipos (h) e diversidade nucleotídica (π). Para gerar estimativas da variância genética (AMOVA) entre as diferentes populações foram calculados a distância e os valores θ_{ST} , que fornecem informações a estruturação populacional, bem como estimar os padrões geográficos de subdivisão populacional (Excoffier *et al.*, 2000). Como grupo externo para as análises genéticas serão usadas sequências obtidas no Genbank.



Dr. Anderson Luis Alves

Doutor em Genética e pesquisador da Embrapa