

# **IMPLANTAÇÃO DO PROJETO BÁSICO AMBIENTAL UHE SÃO MANOEL**

## **PROGRAMA 21**

### **RELATÓRIO PARCIAL DA 2ª e 3ª CAMPANHAS DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA**

**JULHO-2016**

# **IMPLANTAÇÃO DO PROJETO BÁSICO AMBIENTAL UHE SÃO MANOEL**


## **PROGRAMA 21**

### **RELATÓRIO PARCIAL DA 3ª E 4ª CAMPANHAS DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA**

4º. Relatório Semestral, referente ao Acompanhamento do Programa de Investigação Genética da Ictiofauna. Fase de Instalação. Período: de janeiro/2016 a junho/2016. Licença de Instalação - LI nº. 1017/2014 – IBAMA Processo n. 02001.004420/2007-65.

<b>DESCRIÇÃO DAS REVISÕES</b>		
<b>REV</b>	<b>Descrição e/ou folhas atingidas</b>	<b>Data</b>
<i>“Todo Procedimento é dinâmico, estando sujeito a comentários e revisões”.</i>		
<b>EMPRESA DE ENERGIA SÃO MANOEL - EESM</b>		
Emissão	_____ Sandra Hermenegildo Dias Especialista em Meio Ambiente	
Revisão	_____ Juhei Muramoto Gerente de Meio Ambiente	
Aprovação	_____ Aljan de Abreu Machado Diretor de Meio Ambiente	

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

Nome	Cargo	CTF	Assinatura
Victor Tagliacollo		3741374	

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>7</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>9</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA .....</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS PARCIAIS.....</b>	<b>15</b>
<b>5</b>	<b>– CONSIDERAÇÕES FINAIS .....</b>	<b>19</b>
<b>6</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>20</b>
<b>7</b>	<b>ANEXOS.....</b>	<b>22</b>
	<b>ANEXO I – PARECER TÉCNICO: SELEÇÃO DAS ESPÉCIES.....</b>	<b>22</b>
	<b>ANEXO II – RESULTADOS DAS ANÁLISES POR ESPECTROFOTOMETRIA.....</b>	<b>25</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 3-1: COLETA E PROCESSAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO PARA ANÁLISES MOLECULARES. A) COLETA DE ~ 1 GRAMA DE NADADEIRA DORSAL DE <i>BRYCON FALCATUS</i> B) ACONDICIONAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO EM ÁLCOOL ETÍLICO PA; TODOS OS MATERIAIS COLETADOS FORAM CONDUZIDOS AO LABORATÓRIO DE GENÉTICA E BIOQUÍMICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS E ARMAZENADO À -20°C ATÉ A EXTRAÇÃO DO DNA.....</b>	<b>10</b>
<b>FIGURA 3-2: DNA GENÔMICO: PROCEDIMENTOS. IMAGENS DOS PROCEDIMENTOS EMPREGADOS PARA EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DAS AMOSTRAS DE DNA. A) EXTRAÇÃO DE DNA REALIZADO COM AUXÍLIO DO KIT COMERCIAL. B) QUANTIFICAÇÃO DE DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA. C) ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE. D) VISUALIZAÇÃO DE BANDAS EM TRANSLUMINADOR UV.....</b>	<b>13</b>
<b>FIGURA 4-1: PUREZA DAS AMOSTRAS DE DNA GENÔMICO POR ESPECTROFOTOMETRIA. . A) WHISKER PLOTS DEMONSTRANDO OS VALORES MÉDIOS POR ESPÉCIES DA PUREZA DO DNA ESTIMADOS PELA RAZÃO 260/230 NM. NÚMEROS AO LADO DA BARRA HORIZONTAL INDICAM AS MÉDIAS E N REPRESENTA O NÚMERO DE AMOSTRAS. B) CORRELAÇÃO ENTRE A RAZÃO 260/230 NM E CONCENTRAÇÃO DE PROTEÍNAS NA DILUIÇÃO 1:25 NAS AMOSTRAS. OS NÚMEROS NO GRÁFICO INDICAM AS ESTIMATIVAS DA CONCENTRAÇÃO DE DNA EM UG/ML E AS CORES REPRESENTAM AS CINCO ESPÉCIES ALVOS COLETADAS NAS ÁREAS DE INFLUÊNCIA DA UHE SÃO MANOEL. AS CONCENTRAÇÕES DE DNA DAS AMOSTRAS FORAM CALCULADAS ATRAVÉS DA FORMULA INDICADA NO ITEM METODOLOGIA.....</b>	<b>17</b>
<b>FIGURA 4-2: GÉIS DE AGAROSE E AS BANDAS DE DNA GENÔMICO. A) BANDAS DE DNA DE QUATRO DAS CINCO ESPÉCIES ALVOS DE PEIXES. OS NÚMEROS 17, SM11, SM18, E 21 REPRESENTAM AMOSTRAS DAS ESPÉCIES: HEMISORUBIM PLATYRINCHOS, PSEUDOPLATYSTOMA FASCIATUM, LEIARIUS MARMORATUS, E BRYCON PESU, RESPECTIVAMENTE. B) BANDAS DOS DNA EXTRAÍDOS DE 36 EXEMPLARES DE BRYCON FALCATUS COLETADOS A JUSANTE E MONTANTE DA ÁREA DE INFLUÊNCIA DA UHE SÃO MANOEL.....</b>	<b>18</b>

## **APRESENTAÇÃO**

As coletas de material genético ocorreram durante as 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> campanhas do Programa de Investigação Genética da ictiofauna (PIG), que foram realizadas durante o período de 03 a 09 de março e 03 a 08 de maio de 2016, e também durante as atividades do Programa de Marcação e Telemetria da Ictiofauna da UHE São Manoel nos meses de março, abril e maio de 2016

As ações deste Programa seguem em sintonia com os realizados pela UHE Teles Pires, para que os dados atendam os interesses comuns aos dois empreendimentos. Deste modo, a seleção das espécies-alvo de peixes para o PIG levou em consideração as recomendações do relatório da UHE Teles Pires e do Programa de Monitoramento por Telemetria (PMT) deste empreendimento (ver o Programa Básico Ambiental da UHE São Manoel). Entre as espécies-alvo, foram coletados 48 indivíduos, sendo 36 exemplares de *Brycon falcatus*, 7 exemplares de *Pseudoplatystoma fasciatum*, 3 exemplares de *Brycon pesu*, 1 exemplar de *Hemisorubim platyrhynchos*, e 1 exemplar de *Leiarinus marmoratus*. Este relatório inclui os resultados das extrações e análises de qualidade do DNA de todos os 48 indivíduos coletados à montante e jusante do local de instalação da UHE São Manoel. Com esse material genético, iniciaremos os procedimentos de amplificação do gene mitocondrial ATPase unidades 6 e 8 e o sequenciamento de algumas amostras para avaliar a biodiversidade molecular e estruturas populacionais com o objetivo de auxiliar na elaboração de um plano de manejo sustentável para as espécies-alvo potencialmente afetadas pelo empreendimento.

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil, em particular a região amazônica, inclui a maior biodiversidade de peixes do planeta. Estima-se que o país inclua 21% da ictiofauna mundial, com aproximadamente 2.300 espécies dulciaquícolas e 1.298 espécies marinhas (Nelson et al., 2016). Estes são números preliminares, já que as estimativas de biodiversidades indicam um número maior de espécies para os ecossistemas aquáticos brasileiros (ex. Ota et al., 2015). Algumas destas espécies possuem um potencial econômico (ex. Tambaqui - *Colossoma macropomum*, Matrinhã – *Brycon falcatus*, Jurupoca - *Hemisorubim platyrhynchos*), porém são pouco exploradas em escala industrial para o consumo humano. Com o crescimento estimado para população humana, conseqüentemente aumento na demanda por alimentos, a indústria pesqueira desponta como uma fonte rentável para investimento (Araki e Schmid, 2010). Entretanto, as populações de peixes nativos vêm sendo exploradas sem estudos sobre dinâmica populacionais e os estoques pesqueiros em algumas regiões do planeta (ex. Irlanda - *Salmo salar*) estão reduzindo rapidamente (Ardren, 2015). É necessário, portanto, um plano de manejo no Brasil para que não haja problemas como a sobrepesca, prejuízo para famílias ribeirinhas que sobrevivem da pesca artesanal, e extinção de espécies nativas.

A piscicultura é uma realidade econômica em muitos países (ex. Japão, China). A piscicultura é um atrativo para investimentos, uma vez que produz alimento altamente nutritivo em espaços pequenos e períodos curtos. O Brasil possui fatores favoráveis ao crescimento deste setor, principalmente devido seu vasto sistema de rios e várias espécies nativas com potencial para o cultivo. Entre vários pontos, dois são revelantes para o crescimento da piscicultura brasileira: 1) a exploração de espécies nativas e a 2) a variabilidade genética destas espécies. Uma piscicultura sustentável exige a exploração de espécies nativas. As espécies nativas compõem uma rede ecológica em equilíbrio dinâmico que se estruturou ao longo de milhões de anos de evolução (Seehausen e Wagner, 2014). A quebra deste equilíbrio, seja devido a sobrepesca ou pela introdução de espécies exóticas, pode ocasionar o colapso do ecossistema (Ricciardi et al., 2013). A introdução de espécies não-nativas (ex. tilápia) e a perda de habitat (desmatamento) são consideradas as maiores ameaças à biodiversidade da ictiofauna brasileira (Carvalho et al., 2009). Espécies exóticas são geralmente introduzidas através de escapes de tanque redes e representam uma séria ameaça ao equilíbrio ecológico (Matsuzaki et al., 2013). Ou seja, as introduções de espécies não-nativas são prejudiciais às populações nativas de peixes pois reduzem a variabilidade genética através da competição desigual por recursos naturais levando as vezes a extirpação de população e extinção de espécies (Oliveira et al., 2006).

O outro ponto relevante é a variabilidade genética das espécies nativas com potencial para a piscicultura. Recursos genéticos são unidades funcionais da hereditariedade que mantêm a biodiversidade dos estoques. É fundamental que a variabilidade genética dos indivíduos esteja elevada ou cruzamentos aleatórios podem aumentar o número de genes recessivos deletérios que resultam em anomalias indesejáveis à produção e a biodiversidade (Ribeiro e Godinho, 2003). O processo de cultivo de peixes leva naturalmente à perda de variabilidade genética devido a seleção de características desejáveis para os plantéis de matrizes. No Brasil existe uma tendência de os plantéis serem compostos por indivíduos com elevado grau de parentesco o que aumenta a possibilidade de pareamento de gene recessivo (Alves et al., 2013). Outro problema relacionado à endogamia é a baixa capacidade reprodutiva, o que é indesejável para a produção comercial pesqueira e para os programas de conservação de recursos genéticos como a criopreservação de gametas. A criopreservação é uma técnica que emprega baixíssimas temperaturas ( $-196^{\circ}\text{C}$ ), para que a estrutura e funcionalidade da célula não sejam comprometidas, conservando assim gametas viáveis por longos períodos (Carneiro et al., 2012).

No ambiente natural, a redução da variabilidade genética está relacionada às atividades antropogênicas como a sobrepesca (redução no número de alelos), construção de barragens (quebra do fluxo gênico entre metapopulações), e exploração de mineração e práticas agrícolas (extirpação de subpopulações, ou seja, redução do “*gene pool*” devido à poluição dos sistemas aquáticos). Essas atividades ocasionam o declínio de populações pois ocorre perda de habitats naturais e redução da qualidade da água (O’Reilly e Kozfkay, 2014). Uma alternativa para a conservação do “*gene pool*” das espécies que serão afetadas pela construção de empreendimento são os bancos de sêmen, os quais armazenam amostras de espermatozoides para reprodução assistida. O armazenamento de gametas nos bancos permite estabelecer planos de manejo mais eficazes, exploração racionais dos recursos pesqueiros naturais e, em caso de perda natural de variabilidade genética, a reintrodução de alelos originais nas metapopulações de peixes para o repovoamento do ecossistema.

Para o estabelecimento de estratégias de preservação eficientes, é importante compreender a estrutura populacional e as relações evolutivas das espécies alvo incluídas nos projetos de manejo. Em outras palavras é preciso compreender a dinâmica do fluxo gênico (troca de alelos) entre metapopulações de peixes à montante e jusante do empreendimento e a representatividade em escala evolutiva das espécies alvo para o meio ambiente (o chamado “*phylogenetic diversity*”). O uso de sequências de DNA, particularmente, genes mitocondriais os quais não sofrem recombinação molecular, permitem avaliar tanto as dinâmicas populacionais



quanto a representatividade evolutivas das espécies para as bacias. Entre os marcadores mitocondriais mais empregados para estudos desta natureza está o gene *ATP sintetase* unidades 6 e 8. Este gene produz enzimas que disponibilizam energia para a célula através da síntese do Trifosfato de Adenosina (ATP). Em conclusão, os estudos moleculares de peixes em áreas de empreendimento hidrelétrico possibilitam avaliar os graus de variabilidade genética entre populações (estrutura populacional) e entre as espécies (riqueza evolutiva) de grupos migradores e não-migradores presentes nos trechos de influência à montante e jusante do empreendimento. Estes estudos são, portanto, relevantes para o manejo de peixes e para preservação de biodiversidade molecular em ecossistemas impactados por empreendimentos.

## **2 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.

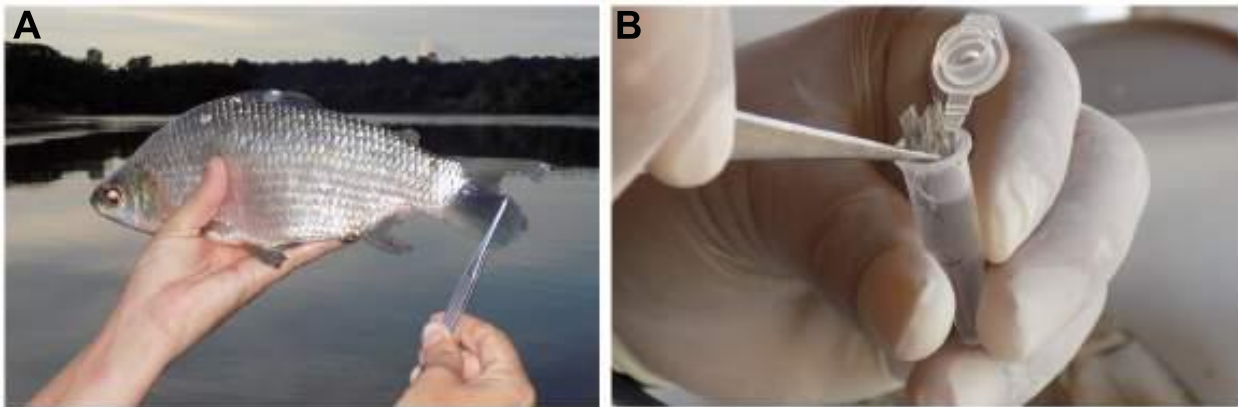
### **Objetivos específicos:**

- 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.

## **3 METODOLOGIA**

### **3.1 COLETAS**

As coletas de material genético ocorreram durante as 3<sup>o</sup> e 4<sup>o</sup> campanhas do Programa de Investigação Genética da ictiofauna (PIG), que foram realizadas durante o período de 03 a 09 de março e 03 a 08 de maio de 2016, e também durante as atividades do Programa de Marcação e Telemetria da Ictiofauna da UHE São Manoel nos meses de março, abril e maio de 2016 (Figuras 3-1 e 3-2). Durante este período foram coletadas amostras de 48 indivíduos para extração de DNA e análises qualitativas. Os materiais biológicos (ex. nadadeira) foram em sua maioria coletados de espécimes que estão também sendo monitorados por telemetria (45 das 48 amostras). Esse fato é importante pois permitirá compreender os processos genético-ecológicos que podem estar correlacionados com a estrutura populacional das espécies presentes nas áreas de influência da UHE São Manoel.



**Figura 3-1: Coleta e processamento do material biológico para análises moleculares. A) Coleta de ~ 1 grama de nadadeira dorsal de *Brycon falcatus* B) Acondicionamento do material biológico em Álcool Etílico PA; todos os materiais coletados foram conduzidos ao laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade Federal do Tocantins e armazenado à -20°C até a extração do DNA.**

### **3.2 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES-ALVO**

A seleção das espécies-alvo para o PIG baseou-se nos critérios propostos no parecer emitido por agente competente (anexo I). Assim, para a seleção destas espécies foram considerados os seguintes critérios: 1) serem espécies migradoras; 2) não apresentarem graus elevados de variabilidade genética comprovado em estudo anterior (ex. CHTP, 2013); 3) possuírem registros a montante e jusante da corredeira de Teles Pires comprovado em levantamentos prévios; 4) serem de interesse para a pesca e/ou conservação; e 5) apresentarem viabilidade logística de coleta de material para análises moleculares. Com base nestes critérios, foram consideradas prioritárias as espécies: Matrinchã (*Brycon falcatus*), Piabano (*Brycon pesu*), Jurupoca (*Hemisorubim platyrhynchos*), Jundiá (*Leiarius marmoratus*), e a Cachara (*Pseudoplatystoma fasciatum*) e *Leporinus fasciatus*.

Entretanto, durante a execução dos PIG e PMI foram coletadas amostras de diversas espécies de peixes considerando as espécies migratórias, não migratórias, de interesse comercial, de importância alimentar, dentre outros. Este banco de amostras está devidamente armazenado e poderá ser objeto de estudo caso o órgão ambiental licenciador – IBAMA achar necessário a inclusão de mais alguma espécie-alvo. Na tabela abaixo é apresentado o quantitativo de amostras coletadas até o momento.

**Tabela 3-1: Quantidade de amostras coletadas para o Programa de Investigação Genética até o mês de julho/2016.**

<b>Número</b>	<b>Espécie</b>	<b>Nº. de Indivíduos</b>
1	<i>Zungaro zungaro</i>	42
2	<i>Plagioscion squamosissimus</i>	1
3	<i>Hemisorubim platyrinchos</i>	5
4	<i>Cicla pinima</i>	32
5	<i>Brycon pesu</i>	3
6	<i>Curimata inornata</i>	7
7	<i>Prochilodus nigricans</i>	15
8	<i>Pinirampus pirinampu</i>	45
9	<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	35
10	<i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	52
11	<i>Brycon falcatus</i>	52
12	<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	19
13	<i>Colossoma macropomum</i>	20
14	<i>Leiarius marmoratus</i>	2
15	<i>Leporinus fasciatus</i>	2
16	<i>Prochilodus cf. britski</i>	58
<b>Total</b>		<b>390</b>

### 3.3 AMOSTRAS

Neste semestre foram coletadas amostras de 48 indivíduos, sendo 36 exemplares de *Brycon falcatus* (Charciformes), 7 exemplares de *Pseudoplatystoma fasciatum* (Siluriformes), 3 exemplares de *Brycon pesu* (Characiformes), 1 exemplar de *Hemisorubim platyrhynchos*, e 1 exemplar de *Leiarius marmoratus*. Os exemplares dessas espécies foram coletados nas áreas de influência tanto a jusante quanto a montante da UHE São Manoel.

Cada amostra recebeu um número de registro, os tecidos dos indivíduos que estão sendo monitorados receberam as iniciais “SM” quando provenientes das coletas da equipe de Telemetria, as amostras registradas apenas com números são relativas à equipe de Monitoramento de Ictiofauna. Todas as amostras de tecidos correspondem a pequenos pedaços de nadadeiras caudais de aproximadamente 1 grama. Essas nadadeiras foram acondicionadas em tubos de polipropileno (popularmente conhecido com “ependorf”) e

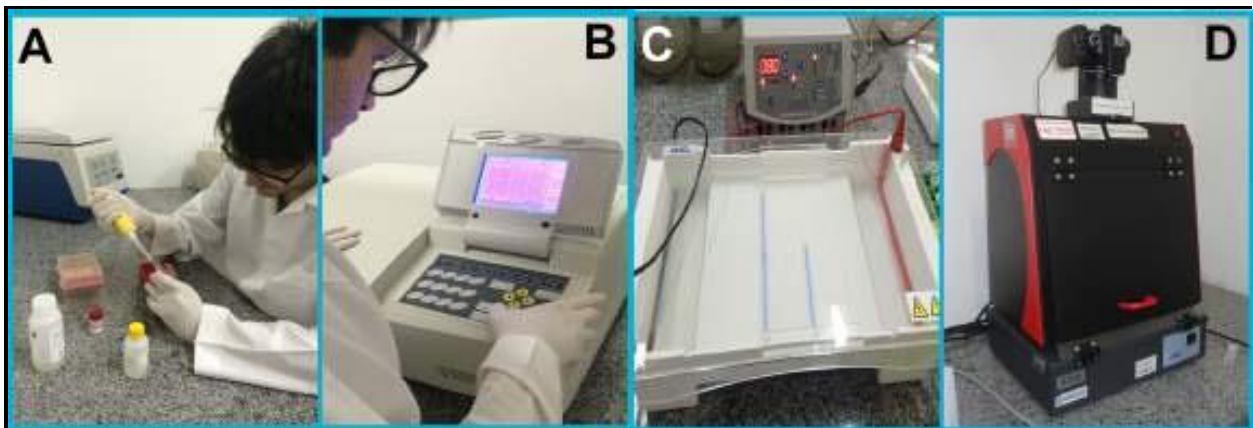
submersos em Álcool Etílico PA. As nadadeiras foram recebidas pela Universidade Federal do Tocantins (Laboratório de Genética e Bioquímica, UFT - Porto Nacional) e estão em processo de catalogação junto ao Museu de Zoologia José Hidasí, Porto Nacional, Tocantins.

### **3.4 EXTRAÇÃO DE DNA**

A extração do DNA das espécies-alvo foi realizada através de kits comerciais seguindo o procedimento metodológico proposto pelo fabricante. Este procedimento ocorreu em cinco etapas: 1) homogeneização das amostras, 2) quebra das membranas celulares, 3) remoção de componentes celulares, 4) limpeza das amostras, e 5) eluição do DNA genômico. A homogeneização das amostras (1<sup>o</sup> etapa) ocorreu em solução Tampão Fosfato-Salino (PBS). A preparação da solução PBS deu-se com os seguintes reagentes: NaCl (8 g), KCl (0.2 g), Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (1.44 g), KH<sub>2</sub>PO (0.24 g) e água destilada (1L).

Este procedimento ajustou o pH e eliminou alguns resíduos das amostras, principalmente álcool e outros componentes (ex. solventes) que poderiam prejudicar as extrações dos DNAs. Para cada amostra, 15 mg de nadadeira foi transferida para um *ependorf* contendo um volume de 1 ml da solução PBS. Os tubos foram centrifugados por 2 minutos à 13.500 rpm e, posteriormente, os sobrenadantes foram descartados. Em seguida, 50 ul de PBS foi adicionado a cada tubo e o material individualmente homogeneizado com auxílio de homogeneizador por um período de 3 minutos. A quebra das membranas celulares (2<sup>o</sup> etapa) ocorreu por meio de digestão celular por proteinase K. A preparação da solução deu-se pela adição de 1.5 ml de água ultrapura (milliQ) à 30 mg de proteinase K (concentração: 20mg/ml). Este procedimento rompeu as membranas celulares (citoplasmáticas, nucleares e mitocondriais) e liberou o material genético para o meio externo. Nesta etapa, 50 ul de solução de lise (chamada *type 1*, Fig. 1A - reagente de tampa vermelha) e 10 ul de proteinase K foram adicionados aos tubos previamente homogeneizados. Os conteúdos foram homogeneizados (*vortex* por 15 segundos) e incubado por 1 hora à 56°C. A remoção de componentes celulares (3<sup>o</sup> etapa), exceto o material genético e pequenas proteínas, ocorreu através de filtragens nas chamadas mini colunas celulares disponibilizadas junto com o kit comercial. Estas mini colunas celulares filtraram o conteúdo da etapa anterior (2<sup>o</sup> etapa) e aprisionaram o material genético em membranas ultrafinas, o qual foram liberados posteriormente pela solução de eluição. Para esta etapa, 500 ul de solução tampão de lise (chamada *type 4* - Fig 1A - reagente de tampa branca) foram adicionadas nos tubos e o volume total permaneceu em repouso por 10 minutos à temperatura ambiente (~ 24° C). Cerca de 700 ul desta solução foi transferida para mini colunas e centrifugados à 11.500 rpm por 1 minuto. Os filtrados presentes nos tubos coletores

foram descartados e o DNA nas membranas das mini colunas foram armazenados para a próxima etapa. O processo de limpeza das amostras (4<sup>o</sup> etapa) ocorreu através de duas séries composta pela adição de solventes do kit comercial seguido por centrifugações. Este processo eliminou os resíduos, exceto o DNA, aprisionados nas membranas das minis colunas celulares. Primeiro, 500 ul de solução tampão de lise (chamada *type 4*, Figura 3-2A - reagente de tampa branca) foi adicionado nas mini colunas celulares que foram então centrifugadas à 11.500 rpm por 1 minuto. Os filtrados presentes nos tubos coletores foram descartados. Segundo, 500 ul de solução tampão de lavagem (chamada *type 6*, Figura 3-2A - reagente de tampa amarela) foi adicionado nas mini colunas celulares que foram então centrifugadas à 11.500 rpm por 3 minutos. Os filtrados presentes nos tubos coletores foram descartados e as moléculas de DNA nas membranas das minis colunas foram armazenadas para a última etapa. A eluição do material genético (5<sup>o</sup> etapa) deu-se pela adição de uma solução presente no kit comercial o qual liberou o DNA aprisionado nas mini colunas para tubos coletores (*"ependorf"*) marcados com os números das respectivas amostras originais. Para esta última etapa, 200 ul da solução de eluição (*type 5*, Figura 3-2A - reagente de tampa cinza) foi pré-aquecida à 70°C e adicionada a cada mini coluna. Esta solução permaneceu à temperatura ambiente (~24°C) por 1 minuto. Em seguida, as mini colunas foram centrifugadas à 11.500 rpm por 1 minuto. Os tubos coletores com os DNAs extraídos das amostras foram armazenados à - 20°C.



**Figura 3-2: DNA genômico: procedimentos. Imagens dos procedimentos empregados para extração e quantificação das amostras de DNA. A) Extração de DNA realizado com auxílio do kit comercial. B) Quantificação de DNA por espectrofotometria. C) Eletroforese em gel de agarose. D) Visualização de bandas em transluminador UV.**

### **3.5 AVALIAÇÃO DA QUALIDADE DO DNA**

As extrações de DNA das espécies-alvo foram avaliadas por espectrofotometria de UV para estimar a concentração de DNA em ul/ml e pureza das amostras, e por géis de agarose à concentração de 0.8 % para avaliar a integridade dos fragmentos por meio da visualização de bandas de DNA com comprimento de ~ 20kb.

### 3.6 ESTIMATIVAS DA CONCENTRAÇÃO DE DNA

As concentrações das extrações de DNAs foram avaliadas por espectrometria UV (Figura 3-2B) através da estimativa de valores para a unidade OD. Ácidos nucleicos absorvem ondas com comprimento de 260 nm. Para estimar as concentrações de DNA, espectrofotômetros utilizam-se da unidade padrão OD (em inglês: *Optical Density*) no comprimento de onda de 260 nm. Unidade 1 OD à 260 nm equivale a 50ug/ml de dupla-hélice (Regitano, 2001; Sambrook, 2002). Assim, para estimar a concentração de DNA nas amostras, foi utilizado a seguinte fórmula:

$$F(cDNA) = OD_{A260} \times 50 \frac{\mu g}{ml} \times 0.2 ml \times 25$$

onde  $OD_{A260}$  é o valor da unidade OD registrado pelo aparelho,  $50 \frac{\mu g}{ml}$  representa a concentração de DNA esperado em 1 OD,  $0.2 ml$  indica o volume total da amostra obtida durante a extração, e 25 representa o fator de diluição (1:25) das amostras para análise no Espectrofotômetro (80 ul de amostra e 2000 ul de água destilada).

### 3.7 ESTIMATIVAS DO GRAU DE PUREZA DAS AMOSTRAS

Os graus de pureza das amostras de DNA foram estimados por espectrofotometria UV através da razão 260/230 nm. Enquanto ácidos nucleicos absorvem comprimentos de ondas à 260 nm, proteínas absorvem comprimentos de ondas à 230 nm. Assim, a razão entre  $OD_{A260}$  e  $OD_{A230}$  indica o grau de pureza das amostras. Valores para esta razão usualmente variam entre 2.0 e 0.0, sendo que valores próximos a 2.0 indicam presença de apenas RNA, valores entre 1.9 e 1.7 indicam presença de apenas DNA, e valores inferiores à 1.7 (mais comuns) indicam presença de DNA e proteínas nas amostras. Quanto mais próximo de 1.7 esta razão entre  $OD_{A260}$  e  $OD_{A230}$ , maior a concentração de DNA e menor a proteínas nas amostras (e vice-versa).

### 3.8 INTEGRIDADE DOS DNA: GÉIS DE AGAROSE

Os géis de agarose foram preparados através da adição de 0.8 g de agarose em 100 ml de solução tampão de Tris-Acetato-EDTA (TAE) na concentração de 1X. A TAE na concentração de 10X (solução estoque) é preparada com os seguintes reagentes: 48.4 g de Tris Base, 11, 44 ml de Ácido Acético Glacial, 20 ml de 0.5 EDTA em pH 8,0, e 1000 ml de água deionizada. Logo, esta solução estoque foi diluída na proporção de 1 volume de TAE 10X para 10 volumes de água deionizada (TAE 1X). A solução de 100 ml de TAE 1 X e 0.8 g de agarose foram aquecidos até a homogeneização. Com 1 minuto de resfriamento (~ 60°C), 5 ul do corante intercalante de ácidos nucleicos (*UniSafe Dye*) foram misturados aos géis para, em seguida, a solução ser despejada em uma bandeja para eletroforese com os pentes de aplicação acoplados.

Após a solidificação (~ 40 minutos), os géis foram transferidos para uma cuba de eletroforese preenchida com solução TAE 1X (Fig. 1C). Próximo passo, alíquotas de 0.3 ul das extrações e uma amostra de padrão de corrida (*ladder*) foram adicionados à 0.3 ul de solução de corrida 5 X (*loading buffer*). O volume foi transferido para os poços dos géis de agarose, sendo que primeiro poço incluiu o padrão de corrida (*ladder*), o segundo o controle negativo, e os demais as respectivas extrações de DNAs. Para a eletroforese, ajustou-se o aparelho há 80 volts para uma corrida de 1 hora. Finalmente, os padrões de bandas de DNA nos géis de agarose foram avaliados em translumidador UV e registrado por câmera fotográfica digital.

## 4 RESULTADOS PARCIAIS

### 4.1 EXTRAÇÃO

Foram realizados 4 ciclos de extrações de DNA durante o período que compreende as campanhas deste semestre, sendo que cada ciclo abrangeu 12 amostras de tecidos e uma amostra denominada controle negativo. Um ciclo adicional foi realizado para extrair materiais genéticos de amostras que resultaram em baixíssima concentração de DNA (< 1.0 ul/ml). A amostra negativa, que permite avaliar se houve contaminação da reação, seguiu o mesmo protocolo metodológico das outras amostras com material genético, exceto pelo processo de homogeneização dos tecidos (ver metodologia). As ausências das bandas nos géis de agarose (i.e. negativo) indica que não houve contaminações durante as etapas de extração. Este fato foi comprovado também por espectrofotometria (ver item abaixo). Duas amostras da espécie *Brycon falcatus* (SM83, SM87 – anexo III) precisaram ser novamente extraídas. Após a segunda extração, essas amostras passaram por desidratação à 50°C por 1 hora e,

posteriormente, foram padronizadas na concentração de 2.75 ul/ml através da adição de solução de eluição disponibilizada no kit comercial.

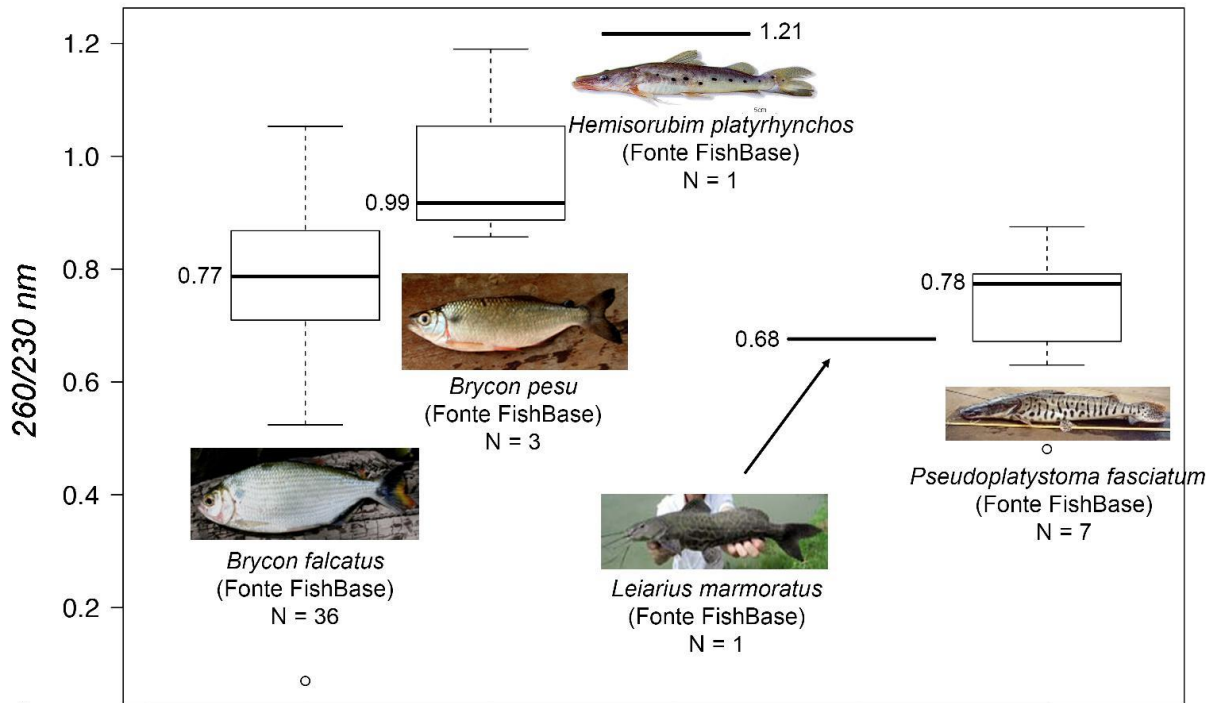
#### **4.2 QUALIDADE DO DNA**

As concentrações de DNA foram estimadas por espectrofotometria em alíquotas de 2080 ul de solução presentes em cubetas, sendo 80 ul de extração e 2000 ul de água destilada (Fator 1:25). A cubeta “branco” de igual volume, que representa o solvente da amostra (neste caso a água destilada), foi utilizada para calibrar o espectrofotômetro nos comprimentos de ondas 260 nm (ácidos nucleicos) e 230 nm (proteínas). A cada 10 amostras o equipamento foi recalibrado utilizando a cubeta “branco” original. As concentrações de DNA das amostras estimadas pela função  $F(cDNA)$  mostraram-se satisfatórias para a amplificação do gene mitocondrial ATPase 6 e 8, pois variaram entre 2.75 ug/ml (*Brycon falcatus* – amostra SM83) à 19.5 ug/ml (*Brycon pesu* – amostra 13)(Fig. 2). Os valores estimados para a razão 260/230 nm também se mostraram satisfatórios, com valores entre 0.68 (*Leiarius marmoratus*) e 1.21 (*Hemisorubim platyrhynchos*)(Fig. 2). Esses valores sugerem que há proteínas junto ao DNA, o que não representa um empecilho para a amplificação de genes. Caso em alguma amostra estas proteínas comprometam a amplificação do gene ATPase 6 e 8, enzimas proteolíticas (que degradam proteínas) serão adicionadas às amostras para aumentar o grau de pureza.

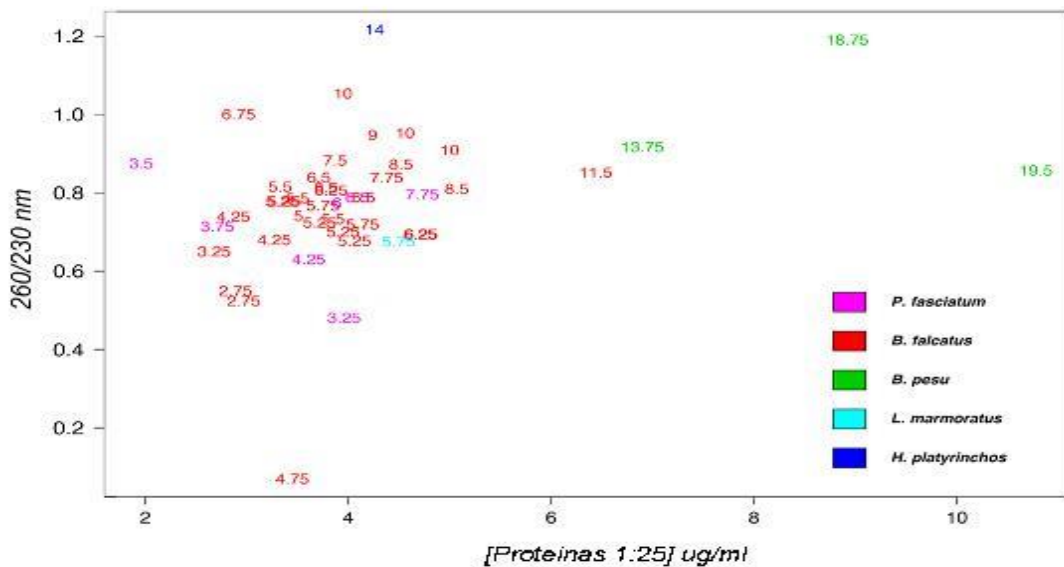
A Figura 4-1 mostra que a pureza da extração foi avaliada por espectrofotometria de UV através da razão 260/230 nm. Valores da razão 260/230 nm geralmente variam entre 2.0 e 0.0, sendo que valores superiores a 2.0 indicam presença de RNA e valores inferiores à 1.8 indicam presença de proteínas nas amostras. Quanto mais próximo de 0.0, maior a concentração de proteínas e menor a concentração de DNA nas amostras. Nossas extrações estão em conformidade com os valores esperados de razão 260/230 nm, o que indica o DNA extraído é viável para amplificação de genes.



**Pureza do DNA estimada por espectrofotometria**



**B** **Concentração do DNA estimada por amostra (ug/ml)**

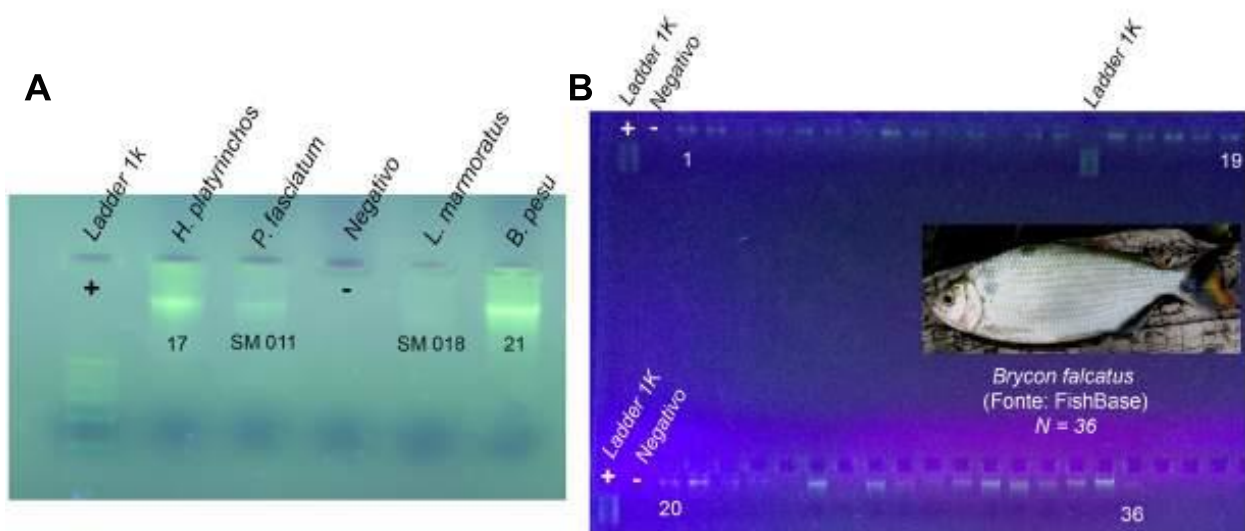


**Figura 4-1:** Pureza das amostras de DNA genômico por espectrofotometria. A) Whisker plots demonstrando os valores médios por espécies da pureza do DNA estimados pela razão 260/230 nm. Números ao lado da barra horizontal indicam as médias e N representa o número de amostras. B) Correlação entre a razão 260/230 nm e concentração de proteínas na diluição 1:25 nas amostras. Os números no gráfico indicam as estimativas da concentração de DNA em ug/ml e as cores representam as

**cinco espécies alvos coletadas nas áreas de influência da UHE São Manoel. As concentrações de DNA das amostras foram calculadas através da fórmula indicada no item Metodologia.**

A avaliação dos géis de agarose submetidos à eletroforese indicam que o extraído está íntegro e com peso molecular adequado (~ 20 kb), visto que não ocorreu nos géis bandas secundárias de DNA de menor peso molecular (ver exemplo no *ladder* 1k). Observou-se também que os chamados “arrastos”, ou seja, as marcas que partem dos poços de aplicação são bem claras ou mesmo invisíveis em algumas amostras; isto indica que há poucas proteínas e impurezas nas extrações e que estas estão, portanto, viáveis para a amplificação. Pela visualização dos géis, constatou-se ainda que algumas amostras possuem baixa concentração de DNA (ex. *Leiarius marmoratus* – SM018) e, por isso estas amostras serão (se necessário) desidratadas e padronizadas na concentração de 2.75 ul/ml através da adição de solução de eluição como descrito no item anterior.

A Figura 4-2 mostra a corrida por eletroforese: 80V por 1 hora. Cada banda do gel inclui fragmentos de DNA de aproximadamente 20 Kbp. Maior intensidade na coloração das bandas sugere maior concentração de DNA em ug/ml. Ladder 1k: marcador molecular composto por fragmentos de comprimentos padronizados (controle positivo). Negativo: amostras preparadas com os reagentes do kit comercial de extração, porém sem incluir o material biológico (ex. nadadeiras). Ausência de bandas nos géis sugere que não houve contaminação no procedimento de extração de DNA das amostras.



**Figura 4-2: Géis de agarose e as bandas de DNA genômico. A) Bandas de DNA de quatro das cinco espécies alvos de peixes. Os números 17, SM11, SM18, e 21 representam amostras das espécies: *Hemisorubim platyrinchos*, *Pseudoplatystoma fasciatum*,**

***Leiarius marmoratus*, e *Brycon pesu*, respectivamente. B) Bandas dos DNA extraídos de 36 exemplares de *Brycon falcatus* coletados a jusante e montante da área de influência da UHE São Manoel.**

## **5 – CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Neste semestre, 48 amostras de 5 espécies-alvo selecionadas para o PIG da UHE São Manoel foram coletadas e o DNA extraído com sucesso. Estas amostras em sua maioria são de espécimes que estão sendo monitoradas por métodos de telemetria, o que é essencial para que dados genéticos e comportamentais, os quais são avaliados independentemente, possam ser comparados e contrastados. Portanto, espera-se que as conclusões sobre os deslocamentos das espécies migradoras indicadas pelo programa comportamental (i.e. telemetria) sejam semelhantes às conclusões indicadas pelo PIG. Vale ressaltar que PBA da UHE São Manoel prevê a integração com os outros empreendimentos hidrelétricos previstos para o rio Teles Pires; ou seja, as conclusões sobre os impactos nas espécies alvo migradoras serão avaliadas em maiores escalas espaciais e temporais.

Com o sucesso das extrações de DNA destas novas amostras, iniciou-se os processos de padronização das reações de *polymerase chain reaction* (PCR). Essas reações amplificam fragmentos gênicos, no caso deste projeto o gene mitocondrial ATPase 6 e 8, para o sequenciamento e posterior análises populacionais. Esses resultados serão apresentados no próximo relatório. Neste momento, conjuntos de *primers* da ATPase 6 e 8 e suas respectivas temperaturas de anelamento, concentrações de reagentes, e enzimas polimerases estão sendo avaliadas e as reações padronizadas no laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade Federal do Tocantins.

Para a próxima campanha novas amostras de materiais das espécies-alvo deverão ser coletadas pela equipe de campo e encaminhadas ao laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade Federal do Tocantins para extrações de material genético. Espera-se ainda que para a próxima campanha as reações de PCR estejam padronizadas e as primeiras amostras de DNA sejam utilizadas para a amplificação do gene mitocondrial ATPase 6 e 8. Algumas amostras amplificadas deverão ainda ser preparadas e submetidas para o sequenciamento.

Com os resultados do sequenciamento será possível avaliar dados preliminares sobre as estruturas populacionais das espécies-alvos e inferir fluxo gênico entre metapopulações presentes nas áreas de influência da UHE São Manoel através de análises evolutivas e filogeográficas.

A seleção das espécies alvos para o presente estudo adotou integralmente os critérios propostos no parecer técnico emitido por responsável competente com comprovada

experiência profissional (Anexo I). Tais critérios para a seleção das espécies incluem: (i) ser espécies migradora de longa distância, (ii) possuir baixa diferenciação genética entre metapopulações, (iii) apresentar ampla distribuição na área de influência da UHE São Manoel, (iv) ser espécies de interesse para a pesca e/ou conservação, e (v) possuir disponibilidade de material biológico. Duas espécies encaixam-se em todos esses critérios, porém não foram consideradas prioritárias: *Zungaro zungaro* (jaú) e *Prochilodus lineatus* (curimatá). Essas duas espécies não foram consideradas prioritárias pois estudos entre metapopulações presentes no rio Teles Pires já foram avaliadas anteriormente, o resultado deste estudo prévio sugere que ambas as espécies apresentam diferenciação genética avaliados em estudos anteriores (CHTP, 2013). Entretanto, foi montado um banco de amostras, caso seja necessário incluir novas espécie-alvo.

## **6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

ARDREN, W.R. 2015. **Atlantic and Pacific Salmon Biologists Team up to Enhance Recovery of Endangered Salmon Populations.** *145<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Fisheries Society.*

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.

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.

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.

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.

MATSUZAKI, S.I.S., SASAKI, T. AND AKASAKA, M. 2013. **Consequences of the introduction of exotic and translocated species and future extirpations on the functional diversity of freshwater fish assemblages.** *Global Ecology and Biogeography*, 22, 1071-1082.

NELSON, J. S., GRANDE, T. C., & WILSON, M. V. 2016. **Fishes of the World**. 5<sup>o</sup> Ed., John Wiley & Sons.

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.

OTA, R.R., DA GRAÇA, W.J. AND PAVANELLI, C.S., 2015. **Neotropical Siluriformes as a Model for Insights on Determining Biodiversity of Animal Groups**. *PloS one*, 10(7), p.e0132913.

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.

REGITANO, L.C.A. Extração de DNA para aplicação em reação em cadeia da polimerase (PCR). In: **Biologia molecular aplicada à produção animal**. Embrapa. 2001.

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.

RICCIARDI, A., HOOPES, M.F., MARCHETTI, M.P. AND LOCKWOOD, J.L. 2013. **Progress toward understanding the ecological impacts of nonnative species**. *Ecological Monographs*, 83(3), 263-282.

SAMBROOK, J. E.; RUSSEL, D. W. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 3 ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2700 p., 2002.

SEEHAUSEN, O. AND WAGNER, C.E. 2014. **Speciation in freshwater fishes**. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 45, 621-651

## **7 ANEXOS**

### **ANEXO I – Parecer técnico: seleção das espécies**


**BioSystems**  
 Consultoria Ambiental

*Melanocharacidium dispilomma*, apresentaram alto nível de diferenciação genética, sugerindo ausência de trocas gênicas. Outras espécies reconhecidas como migradoras de moderada a longa distância, como o pacu-prata *Myleus torquatus* ou a pirapitinga *Brycon falcatus*, apresentaram nível de diferenciação moderado. É possível que alguma similaridade genética entre os estratos populacionais a montante e a jusante das corredeiras, antes da formação do reservatório da UHE Teles Pires decorresse da deriva de ovos e larvas a partir de locais de desova a montante. Isso, no entanto, deve ser comprovado, visto que se essa for a razão, a espécie não deve ser transposta de jusante para montante.

**Crítérios para a seleção de espécies:** Para a seleção das espécies listadas ao final, seguiu-se alguns critérios, na ordem, (i) ser reconhecidamente uma espécie migradora de longa distância, dada as dificuldades de passagem oferecido pelas corredeiras de Sete Quedas; (ii) não ter seus estratos populacionais a montante e a jusante classificados como de alto ou baixo nível de diferenciação genética em estudo anterior (CHTP, 2013); (iii) ter registros a montante e a jusante da corredeira de Teles Pires em levantamentos prévios; (iv) interesse para a pesca e/ou conservação; (v) disponibilidade de material biológico conservado para as análises. Esse último critério é mantido com a premissa que ele indica a baixa disponibilidade de outras espécies migradoras no trecho amostrado. Dessa maneira, são consideradas apenas as espécies para as quais foi possível a obtenção de tecidos para os estudos

**Conclusão:** O quadro abaixo mostra o resultado na aplicação desses critérios. Ele mostra as informações acerca das possíveis espécies para estudos genéticos para subsidiar as decisões acerca da necessidade de transposição. I = estratégia reprodutiva (MLD=migradora de longa distancia; MCD=migradora de curta distância; NMIG=não migradora); ii = existência de informações acerca do nível de diferenciação genética entre os trechos a montante e a jusante (Alto=ausência de fluxo gênico; Baixo=existência de fluxo gênico; Moderado=fluxo esporádico ou unidirecional; nd=dados não disponíveis); iii= distribuição (M-J = montante e jusante das corredeiras de Sete Quedas; J = registrada apenas abaixo das corredeiras); (iv) = importância na pesca (+++=alta, ++=moderada, +=baixa); v = número de indivíduos com amostras de tecidos disponível). Fontes em vermelho indicam a razão da não classificação entre as prioritárias.

Espécie	(i)	(ii)	(iii)	(iv)	(v)	PRIORIDADE
<i>Prochilodus nigricans</i>	MLD	BAIXA	M-J	++	15	0
<i>Zungaro zungaro</i>	MLD	BAIXA	M-J	+++	41	0
<i>Curimata inornata</i>	MCD	ALTA	M-J	++	7	0
<i>Plagioscion squamosissimus</i>	NMIG	ALTA	M-J	++	1	0
<i>Cichla pinima</i>	NMIG	nd	M-J	+++	32	0
<i>Pinirampus pirinampu</i>	MLD	nd	J	++	22	0
<i>Colossoma macropomum</i>	MLD	nd	J	+++	3	0
<i>Phractocephalus hemiliopterus</i>	MLD	nd	J	+++	46	0
<i>Brachyplatystoma filamentosum</i>	MLD	nd	J	+++	8	0
<i>Brycon falcatus</i>	MLD	MODERADO	M-J	+++	43	1

**BioSystems**  
Consultoria Ambiental

<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	MLD	nd	M-J	+++	12	2
<i>Hemisorubim platyrinchos</i>	MLD	nd	M-J	+++	5	3
<i>Brycon pesu</i>	MLD	nd	M-J	++	3	4
<i>Leporinus fasciatus</i>	MLD	nd	M-J	++	2	5
<i>Leiarius marmoratus</i>	MCD	nd	M-J	++	2	6

Assim, as espécies de jáú *Zungaro zungaro*, curimatã *Prochilodus nigricans*, curvina *Plagioscion squamosissimus* e branquinha *Curimata inornata* foram consideradas não prioritárias em razão da diferenciação genética ter sido avaliada em estudos anteriores (CHTP, 2013), na mesma área. O tucunaré *Cichla pinima* é uma espécie que a despeito de sua importância para a pesca, tem uma estratégia não migradora (cuida da prole). Finalmente, a piraiba ou filhote *Brachyplatystoma filamentosum*, a pirarara *Phractocephalus hemiliopterus*, o barbado *Pirirampus pirinampu* e o pacu *Colossoma macropomum* não foram registrados, até o momento, nas amostragens realizadas a montante das corredeiras de Sete Quedas, não apenas nas áreas de influência a montante das barragens da UHE Teles Pires, como nas de Colider e Sinop. Algumas ponderações são, entretanto, oportunas: (a) embora não tenha sido registrados adultos de filhote ou piraiba, larvas coletadas na área de influência de Sinop tem sido registrada como dessa espécies, fato que carece de comprovação. A presença do pacu, por outro lado, tem sido mencionada por alguns pescadores desse trecho, atribuindo isso a escapes de pisciculturas. Há que se considerar como objeto de transposição apenas as espécies que realizavam a travessia pelas corredeiras de Sete Quedas, não tendo sentido o emprego de esforço e recursos sobre aquelas que realizavam essa passagem. A transposição de espécies presentes apenas a jusante para o trecho a montante se configuraria como introdução de espécies não nativas e, portanto, uma ilegalidade.

Maringá, 20 de maio de 2016

Angelo Antonio Agostinho, Dr



**ANEXO II – Resultados das análises por espectrofotometria**

Local captura	Lat	Long	ID	Espécies	A1 260n m	A2 230n m	A1/A 2	DNA ug/m l	Prot	Gel band a
Aldeia Coelho	-493588	-8997129	SM1 0	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0.026	0.033	0.788	6.50	4.09	+
Pousada Fortuna	-493433	-8990222	SM1 2	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0.017	0.027	0.630	4.25	3.61	+
Ilha da Coruja	-495898	-8993078	SM1 3	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0.014	0.016	0.875	3.50	1.96	+
Ilha da Coruja	-495898	-8993078	SM1 5	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0.015	0.021	0.714	3.75	2.71	+
Foz S'ò Benedito	-495977	-8994256	SM2 8	<i>Brycon falcatus</i>	0.025	0.036	0.694	6.25	4.71	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM8 2	<i>Brycon falcatus</i>	0.022	0.030	0.733	5.50	3.85	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM8 3	<i>Brycon falcatus</i>	0.011	0.020	0.550	2.75	2.89	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM8 4	<i>Brycon falcatus</i>	0.027	0.027	1.000	6.75	2.92	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM8 5	<i>Brycon falcatus</i>	0.026	0.033	0.788	6.50	4.15	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM8 6	<i>Brycon falcatus</i>	0.021	0.030	0.700	5.25	3.95	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM8 7	<i>Brycon falcatus</i>	0.011	0.021	0.524	2.75	2.97	+
Ilha da Praia	-521640	-8973133	SM9 3	<i>Brycon falcatus</i>	0.041	0.044	0.932	10.25	5.03	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM9 4	<i>Brycon falcatus</i>	0.040	0.044	0.909	10.00	5.00	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM9 5	<i>Brycon falcatus</i>	0.036	0.038	0.947	9.00	4.24	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM9 7	<i>Brycon falcatus</i>	0.040	0.038	1.053	10.00	3.95	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM9 8	<i>Brycon falcatus</i>	0.021	0.027	0.778	5.25	3.35	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM9 9	<i>Brycon falcatus</i>	0.050	0.049	1.020	12.50	5.15	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 00	<i>Brycon falcatus</i>	0.034	0.039	0.872	8.50	4.52	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 02	<i>Brycon falcatus</i>	0.022	0.027	0.815	5.50	3.33	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 03	<i>Brycon falcatus</i>	0.025	0.036	0.694	6.25	4.72	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 04	<i>Brycon falcatus</i>	0.038	0.044	0.864	9.50	5.21	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 05	<i>Brycon falcatus</i>	0.026	0.032	0.813	6.50	3.78	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 08	<i>Brycon falcatus</i>	0.023	0.032	0.719	5.75	4.14	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 14	<i>Brycon falcatus</i>	0.022	0.028	0.786	5.50	3.50	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 15	<i>Brycon falcatus</i>	0.031	0.037	0.838	7.75	4.38	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 16	<i>Brycon falcatus</i>	0.013	0.020	0.650	3.25	2.68	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 18	<i>Brycon falcatus</i>	0.025	0.031	0.806	6.25	3.83	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 19	<i>Brycon falcatus</i>	0.030	0.034	0.882	7.50	3.87	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 20	<i>Brycon falcatus</i>	0.017	0.023	0.739	4.25	2.87	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 21	<i>Brycon falcatus</i>	0.023	0.030	0.767	5.75	3.75	+
Pousada P. Amazônia	-522830	-8971986	SM1 29	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0.013	0.027	0.481	3.25	3.96	+
UHE Teles	-524324	-8966708	SM1	<i>Brycon falcatus</i>	0.021	0.027	0.778	5.25	3.37	+

**UHE São Manoel no rio Teles Pires**  
**Programa de Investigação Genética da Ictiofauna**

Pires			31							
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 32	<i>Brycon falcatus</i>	0.021	0.029	0.724	5.25	3.72	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 33	<i>Brycon falcatus</i>	0.021	0.031	0.677	5.25	4.06	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 36	<i>Brycon falcatus</i>	0.020	0.027	0.741	5.00	3.51	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 39	<i>Brycon falcatus</i>	0.034	0.042	0.810	8.50	5.07	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 42	<i>Brycon falcatus</i>	0.040	0.042	0.952	10.00	4.56	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 44	<i>Brycon falcatus</i>	0.019	0.270	0.070	4.75	3.45	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 45	<i>Brycon falcatus</i>	0.017	0.025	0.680	4.25	3.27	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 46	<i>Brycon falcatus</i>	0.026	0.031	0.839	6.50	3.71	+
UHE Teles Pires	-524324	-8966708	SM1 49	<i>Brycon falcatus</i>	0.046	0.054	0.852	11.50	6.44	+
tp07 Rio Teles Pires	-493941	-8984326	13	<i>Brycon pesu</i>	0.078	0.091	0.857	19.50	10.78	+
tp03 Rio Teles Pires	-502226	-8979616	21	<i>Brycon pesu</i>	0.055	0.060	0.917	13.75	6.90	+
tp08 Rio Teles Pires	-495261	-8991859	84	<i>Brycon pesu</i>	0.075	0.063	1.190	18.75	8.92	+
Armadilhas quelônios	-494386	-8987498	SM1 8	<i>Leiarius marmoratus</i>	0.023	0.034	0.676	5.75	4.50	+
Armadilhas quelônios	-494128	-8991164	SM1 1	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0.031	0.039	0.795	7.75	4.73	+
Armadilhas quelônios	-494386	-8987498	SM1 7	<i>Pseudoplatystoma fasciatum</i>	0.024	0.031	0.774	6.00	3.89	+
ap01 Rio Apiacas	-492449	8983753	17	<i>Hemisorubim platyrinchos</i>	0.056	0.046	1.217	14.00	4.26	+