
IMPLANTAÇÃO DO PROJETO BÁSICO AMBIENTAL UHE SÃO MANOEL

PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA




RELATÓRIO CONSOLIDADO

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

FEVEREIRO - 2017

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

EQUIPE TÉCNICA RESPONSÁVEL PELO DESENVOLVIMENTO, ACOMPANHAMENTO E GESTÃO DO PROGRAMA			
Nome	Cargo	CTF	Assinatura
Dr. Victor Tabliacollo	Biólogo	3741374	
Esp. Karoliny da Silva Batista Borges	Bióloga	2027740	
Msc. Aristides Ferreira Sobrinho	Eng. De Pesca	1851827	

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	6
2.	ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO.....	9
2.1	SELEÇÃO DAS ESPÉCIES ALVOS	9
2.2	PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	9
2.3	AMPLIFICAÇÃO DO GENE ATPASE.....	10
2.4	SEQUENCIAMENTO.....	10
2.5	ANÁLISES DE DISTÂNCIAS GENÉTICAS	11
2.6	REDES DE HAPLÓTIPOS	11
3.	ATENDIMENTO AS METAS E INDICADORES DO PROGRAMA.....	11
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	13
4.1	AMOSTRAS	13
4.2	EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	13
4.3	PUREZA E CONCENTRAÇÃO DOS DNA(S) EXTRAÍDOS.....	14
4.4	PCR.....	16
4.5	SEQUENCIAMENTO.....	17
4.6	ESPÉCIES SEQUENCIADAS	17
5	JUSTIFICATIVA (ANÁLISE DE CONFORMIDADE).....	29
6	CRONOGRAMA.....	30
7	PROPOSTA PARA CONTINUIDADE – FASE DE OPERAÇÃO.....	31
8	ANEXOS	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Bandas dos DNA extraídos de 36 exemplares de *Brycon falcatus*.

Figura 2: Bandas de DNA de quatro das cinco espécies salvos de peixes.

Figura 3: Whiskerplots 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.

Figura 4: 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.

Figura 5: Gel de agarose ilustrando os resultados da amplificação de fragmentos do gene ATPase das espécies-alvos. Note que neste gel duas amostras não amplificaram (ausência de bandas no gel).

Figura 6: Resultado do sequenciamento de *Brycon falcatus*. Os picos no electroferogramas indicam os nucleotídeos do gene ATPase. Cada nucleotídeo possui uma cor: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Quanto maior o pico, melhor a qualidade da leitura do sequenciador (consequentemente das reações de PCR).

Figura 7: Alinhamento de nucleotídeos de *Brycon falcatus*. As cores no alinhamento indicam os seguintes nucleotídeos: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Note que entre os indivíduos de *Brycon falcatus* dois grupos (A e B) podem ser identificados com base em seus graus de variação genética.

Figura 8: Árvores de distâncias entre os indivíduos das espécies *Brycon falcatus*. O grupo A é composto (até este momento) por indivíduos coletados na localidade “UHE Teles Pires”, enquanto o grupo B é composto por indivíduos mais amplamente distribuídos na área de estudo. Comprimento das árvores: *Brycon falcatus*-A = 0.286; *Brycon falcatus*-B = 0.095.

Figura 9: Rede de haplótipos para *Brycon falcatus*, grupos A e B. Cada círculo representa um haplótipo e os pontos entre os círculos indicam o número de diferentes nucleotídeos entre os haplótipos.

Figura 10: Resultado do sequenciamento de *Pseudoplatystoma punctifer*. Os picos no electroferogramas indicam os nucleotídeos do gene ATPase. Cada nucleotídeo possui uma cor: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Quanto maior o pico, melhor a qualidade da leitura do sequenciador (consequentemente das reações de PCR).

Figura 11: Alinhamento de nucleotídeos de *Pseudoplatystoma punctifer*. As cores no alinhamento indicam os seguintes nucleotídeos: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Note que entre há elevada variação genética entre os indivíduos de *Pseudoplatystoma punctifer*.

Figura 12: Árvores de distâncias entre os indivíduos das espécies *Pseudoplatystoma punctifer*. Essa árvore é composta por indivíduos presentes a montante e jusante da região de instalação

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

da UHE São Manoel. A inclusão de mais indivíduos permitirá compreender melhor a estrutura populacional e o fluxo gênico entre possíveis metapopulações. Comprimento das árvores: *Pseudoplatystoma punctifer* = 0.392.

Figura 13: Rede de haplótipos para *Pseudoplatystoma punctifer*. Cada círculo representa um haplótipo e os pontos entre os círculos indicam o número de diferentes nucleotídeos entre os haplótipos. Quando mais semelhantes os haplótipos, mais próximos os círculos. Ainda, se mais de um indivíduo apresenta o mesmo haplótipos estes são combinados em um gráfico de pizza.

LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Status de atendimento dos objetivos estabelecidos no programa.

Quadro 2: Status de atendimento das metas e indicadores estabelecidos no programa.

Quadro 3: Número de exemplares sequenciados para programa de investigação genética de ictiofauna.

Quadro 4: Índices de variabilidade genética entre populações de *Brycon falcatus*.

Quadro 5: Índices de variabilidade genética em *Pseudoplatystoma punctifer*.

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 bem maior de espécies para os ecossistemas aquáticos brasileiros (ex. Ota et al., 2015). Algumas destas espécies possuem um potencial econômico (ex. Tambaqui - *Colossomamacropomum*, Matrinhã – *Bryconfalcatius*, Jurupoca - *Hemisorubimplatyrhynchos*), 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 um excelente 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*) vem reduzindo drasticamente (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 outros países (ex. Japão, China). A piscicultura é um atrativo para investidores, uma vez que produz alimento altamente nutritivo em espaços pequenos e em curtos períodos de tempo. 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 possuem uma rede ecológica em equilíbrio 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

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

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° 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

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

“*phylogenetic diversity*”). O uso de sequências de DNA, particularmente, genes mitocondriais os quais não sofrem recombinação gênica, 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 hidrelétricos possibilitam avaliar os graus de variabilidade genética entre populações (estrutura populacional) e 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 empreendimento.

As ações do presente Programa seguem em sintonia com as ações realizadas 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 considerou as recomendações do relatório da UHE Teles Pires; do Programa de Monitoramento por Telemetria (PMT) deste empreendimento (ver o Programa Básico Ambiental da UHE São Manoel) e Parecer Técnico elaborado por especialista na área. Das espécies-alvo, foram coletados e analisados, até o momento, 76 indivíduos, sendo 46 exemplares de *Brycon falcatus*, 25 exemplares de *Pseudoplatystoma punctifer*, 3 exemplares de *Brycon pesu*, 1 exemplar de *Hemisorubim platyrhynchos*, e 1 exemplar de *Leiarinus marmoratus*.

Este relatório inclui os resultados quantitativos das extrações de DNA dos 76 indivíduos e análises preliminares sobre variação genética entre populações de espécies-alvo coletados à montante e jusante do local de instalação da UHE São Manoel. Embora preliminares, os resultados do sequenciamento do gene mitocondrial ATPase unidades 6 e 8 sugerem elevada variação genética intra-populacional nas espécies *Brycon falcatus* e *Pseudoplatystoma punctifer* e sugerem ainda provável estruturação populacional em *Brycon falcatus*. Vale ressaltar que esta hipótese sobre estruturação populacional será frequentemente reavaliada com a continuidade deste programa de monitoramento.

2. ATIVIDADES REALIZADAS NO PERÍODO

As coletas do programa de investigação genética de ictiofauna ocorreram em conjunto com as atividades dos programas de Monitoramento e Telemetria da Ictiofauna. Todas as amostras do programa de genética foram coletadas em campanhas trimestrais durante julho de 2015 a outubro de 2016.

2.1 SELEÇÃO DAS ESPÉCIES ALVOS

Em atenção às considerações contidas no Parecer no 02001.000996-2016-44, bem como as recomendações realizadas pelo IBAMA durante seminário técnico para apresentação dos resultados da execução dos programas ambientais. No âmbito do Programa de Investigação Genética, numa nova análise da lista de espécies prioritárias para os estudos na UHE São Manoel foi elaborada. A seleção das espécies-alvo como para o PIG baseou-se nos critérios propostos e discutidos no parecer técnico emitido por agente competente (**Anexo I**). O parecer técnico é assinado pelo Dr. Angelo Antônio Agostinho, docente titular da Universidade Estadual de Maringá (UEM), membro do conselho consultivo do Instituto Nacional de Limnologia e pesquisador 1A do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq). A extração do DNA das espécies-alvo foi realizada através de kits comerciais seguindo o procedimento metodológico proposto pelo fabricante. O procedimento de extração 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. As concentrações das extrações de DNA foram avaliadas por espectrometria UV através da estimativa de valores para a unidade OD. Os graus de pureza das amostras de DNA foram estimados por espectrofotometria UV através da razão 260/230 nm.

2.2 PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

As reações de PCR foram padronizadas para otimizar a amplificação do gene ATPase para o maior número de amostras. Foram conduzidos 10 experimentos visando otimizar as concentrações dos reagentes da PCR. Em cada experimento, alterou-se apenas a concentração de um dos reagentes da solução de PCR (ex. primers, cloreto de magnésio). Para cada experimento foi também empregado um gradiente de temperatura para o anelamento dos primers. Cada experimento durou em média 4 horas. Ao final dos experimentos, obteve-se um protocolo otimizado para amplificação do gene ATPase com os seguintes reagentes e suas concentrações: 5 ul de 10x buffers, 2.5 ul de cloreto de magnésio, 1 ul de dNTPmix à

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

concentração de 10 mM cada nucleotídeo, 2 ul de cada primer (forward e backward) à concentração de 10 uM, 0.2 ul de Taq DNA polymerase à concentração 1 U, 2 ul de DNA, e 37.3 ul de água milli-Q. Para algumas amostras de DNA, essa solução não se mostrou eficiente e, portanto, ela precisará ser ajustada para a amplificação do gene ATPase de algumas amostras.

2.3 AMPLIFICAÇÃO DO GENE ATPASE

O protocolo otimizado da PCR foi utilizado para amplificar o gene ATPase das amostras de DNA extraídos. O restante das amostras está em fase de ajustes dos reagentes da PCR para facilitar a amplificação. Para a amplificação destas amostras foi utilizado o seguinte programa no termociclador:

- **Passo 1:** 1 minuto à 94°C para ativação da enzima Taq polimerase (enzima HotStart)
- **Passo 2:** 3 minutos à 94°C para desnaturação inicial da dupla hélice do DNA
- **Passo 3:** 30 segundos à 94°C para desnaturação da dupla hélice do DNA
- **Passo 4:** 45 segundos à 52°C para o anelamento dos primers
- **Passo 5:** 60 segundos à 72°C para a inclusão de dNTPs pela Taq nas fitas moldes de DNA
- **Passo 6:** repetição de 25 vezes dos passos 3 à 5
- **Passo 7:** 5 minutos à 72°C para inclusão final de dNTPs pela Taq nas fitas moldes de DNA
- **Passo 8:** 30 minutos à 4°C para resfriamento das amostras

Após aproximadamente 4 horas de reação, os resultados das amplificações foram visualizados através de eletroforese em géis de agarose à concentração de 1% (100 ml TAE e 1.0 g agaroseultra-pura). Os comprimentos dos fragmentos amplificados do gene ATPase foram comparados a um marcador molecular (1 Kb DNA ladder)

2.4 SEQUENCIAMENTO

As amostras amplificadas foram preparadas no Laboratório de Genética da Universidade Federal do Tocantins e submetidas para o sequenciamento em uma empresa especializada. O preparo das amostras para o envio incluiu a limpeza da reação de PCR através de enzimas de clivagens, e adição de *primers* e DNA amplificado em placas de sequenciamento. Essas placas foram enviadas pelo correio para a empresa a qual conduziu o PCR de sequenciamento. Os resultados do sequenciamento (arquivos em *.ab1 - electroferogramas) foram enviados por e-mail para realização das análises dos dados.

2.5 ANÁLISES DE DISTÂNCIAS GENÉTICAS

As distâncias genéticas entre as amostras podem ser calculadas através da comparação aos pares dos números de mutações dado um modelo evolutivo de evolução de bases nucleotídicas. O número de mutações considera as diferenças de nucleotídeos entre os pares de sequências e o modelo evolutivo representa as probabilidades de mutação de um nucleotídeo para outro nucleotídeo (ex. A para C ou C para T). Essa análise gera em uma matriz N x N, onde N é o número indivíduos analisados, e esta matriz é utilizada para produzir uma árvore de distância. Para esta análise utilizou-se o método de *Neighborjoining* e o modelo *General Time Reversal* (GTR). Essa análise foi conduzida no programa Geneious v. 10 (Kearse *et al.*, 2012).

2.6 REDES DE HAPLÓTIPOS

A rede de haplótipos foi realizada no programa Network 3.1.1.1 (Bandelt *et al.* 1999), para verificar a distribuição dos haplótipos nas populações, estabelecer a relação filogenética entre os alelos encontrados, e avaliar a existência de correlação entre a estrutura genética e geográfica. Tais dados foram calculados com critérios de parcimônia estatística por meio do algoritmo MedianJoining. Os resultados foram plotados com o programa R.

3. ATENDIMENTO AS METAS E INDICADORES DO PROGRAMA

A seguir são apresentadas as informações referentes aos objetivos estabelecidos no Programa de Investigação Genética da Ictiofauna (**Quadro - 1**).

Quadro - 1: Status de atendimento dos objetivos estabelecidos no programa

OBJETIVOS GERAIS DO PROGRAMA	STATUS DE ATENDIMENTO
Avaliar e monitorar a variabilidade genética de peixes migratórios no rio Teles Pires, na área de influência direta e indireta da UHE São Manoel, visando esclarecer o nível de estruturação genética populacional nestas áreas	Em atendimento
OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROGRAMA	STATUS DE ATENDIMENTO

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

OBJETIVOS GERAIS DO PROGRAMA	STATUS DE ATENDIMENTO
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;	Em atendimento
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;	Em atendimento
OBJETIVOS ESPECÍFICOS DO PROGRAMA	STATUS DE ATENDIMENTO
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;	Em atendimento
Utilizar a avaliação da estrutura genética para estimar o fluxo gênico entre subpopulações	Em atendimento

O **Quadro - 2** apresenta o *status* de atendimento obtido até o momento para as metas e indicadores de desempenho do programa.

Quadro - 2: Status de atendimento das metas e indicadores estabelecidos no programa.

METAS	INDICADORES	STATUS DE ATENDIMENTO
Obtenção de 30 amostras para análises genéticas, de um mínimo de seis espécies alvo.	O número de espécies de peixes efetivamente analisadas;	Em atendimento (5 espécies)
	Número de amostras de DNA extraídas e submetidas a análise, por espécie alvo.	Em atendimento (76 amostras)

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 AMOSTRAS

Foram capturados para o programa de investigação genética de ictiofauna até o momento 404 indivíduos de 16 espécies (**Quadro - 3**). Destes indivíduos foram analisados 76 exemplares de 5 espécies alvos, sendo 46 exemplares de *Brycon falcatus*, 25 exemplares de *Pseudoplatystoma punctifer*, 3 exemplares de *Brycon pesu*, 1 exemplar de *Hemisorubim platyrhynchos*, e 1 exemplar de *Leiarinus marmoratus*. Esses indivíduos foram capturados a montante e jusante da área de instalação a futura UHE São Manoel (**Quadro 3**).

Quadro 3: Número de exemplares sequenciados para programa de investigação genética de ictiofauna.

ESPÉCIES	COMPORTAMENTO	MONTANTE	JUSANTE	TOTAL
Brycon falcatus	Migrador de longa distância	1	45	46
Pseudoplatystoma punctifer	Migrador de longa distância	21	4	25
Brycon pesu	Migrador de longa distância	1	2	3
Hemisorubim platyrhynchos	Migrador de longa distância	0	1	1
Leiarinus marmoratus	Migrador de curta distância	0	1	1

4.2 EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Foram realizados 7 ciclos de extrações de DNA até o momento, sendo que cada ciclo incluiu 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). Três amostras da espécie *Brycon falcatus* (SM83, SM87, SM239 – **Anexo II**) precisaram ser novamente extraídas. Após a segunda extração, essas amostras passaram por

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

desidratação à 50°C por 1 hora e, posteriormente, foram padronizadas na concentração de ~ 2.5 ul/ml através da adição de solução de eluição disponibilizada no kit comercial.

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*) (**Figuras - 1 e 2**). 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. *Leiariinus marmoratus* – SM018) e, por isso estas amostras serão (se necessário) desidratadas e padronizadas através da adição de solução de eluição como descrito no item anterior.

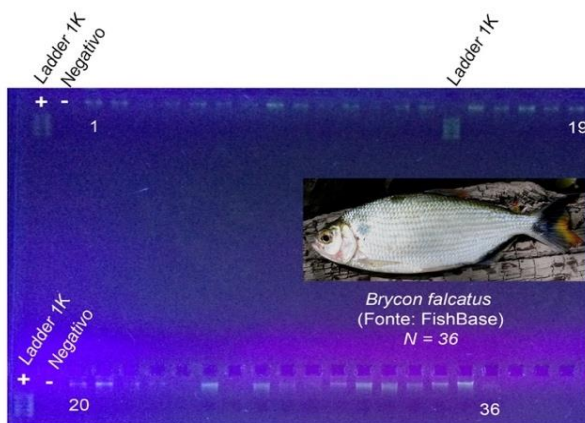


Figura - 1: Bandas dos DNA extraídos de 36 exemplares de *Brycon falcatus*.

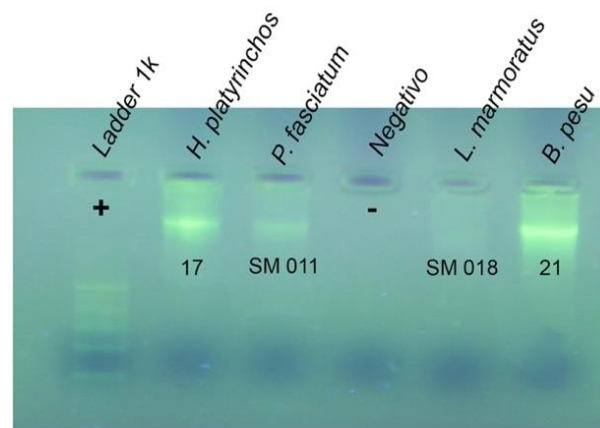


Figura - 2: Bandas de DNA de quatro das cinco espécies salvas de peixes.

4.3 PUREZA E CONCENTRAÇÃO DOS DNA(S) EXTRAÍDOS

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 pois variaram entre 2.5 ug/ml (*Brycon falcatus* – amostra SM239) à 19.5 ug/ml (*Brycon pesu* –

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

amostra 13). Os valores estimados para a razão 260/230 nm também se mostraram satisfatórios, com valores entre 0.07 (*Brycon falcatus* – SM 144) e 1.59 (*Pseudoplatystoma punctifer*). Esses valores sugerem que há proteínas junto ao DNA, porém não representa um empecilho para a amplificação de genes. Caso em alguma amostra estas proteínas comprometam a amplificação do gene ATPase, enzimas proteolíticas (que degradam proteínas), serão adicionadas às amostras para aumentar o grau de pureza.

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 que o DNA extraído é viável para amplificação de genes.

Pureza do DNA estimada por espectrofotometria

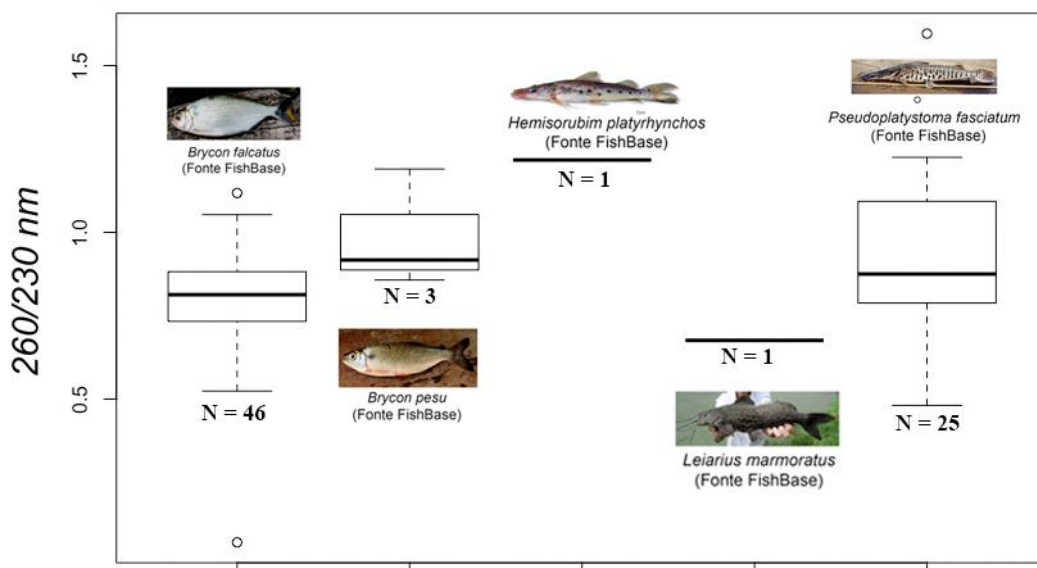


Figura - 3: Whiskerplots demonstrando os valores médios por espécies da pureza do DNA estimados pela razão 260/230 nm. Números ao lado da barra horizontal indicam as médias e N representa o número de amostras.

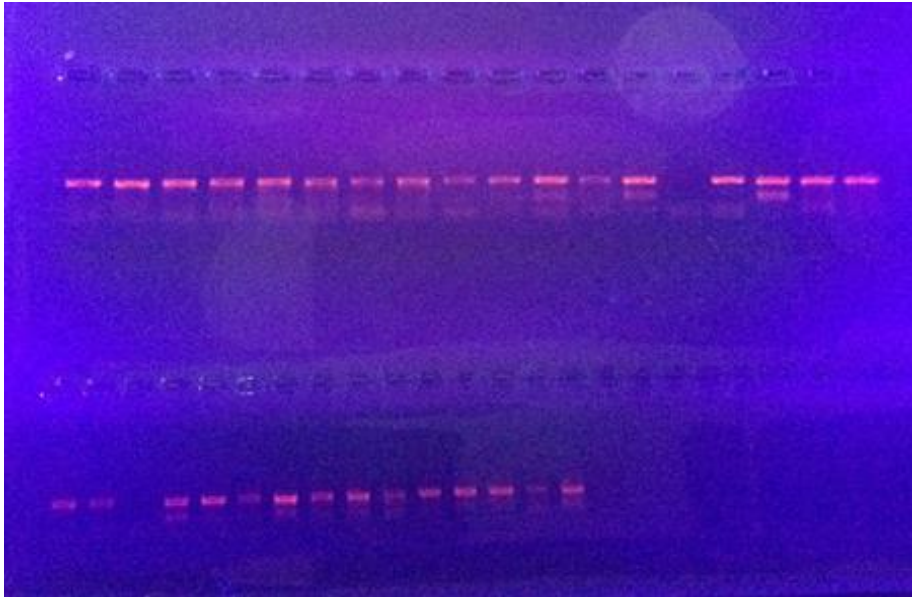


Figura - 5: Gel de agarose ilustrando os resultados da amplificação de fragmentos do gene ATPase das espécies-alvos. Note que neste gel duas amostras não amplificaram (ausência de bandas no gel).

4.5 SEQUENCIAMENTO

Após o envio dos resultados pela empresa, a qualidade das amostras sequenciadas foi avaliada pela inspeção dos electroferogramas no programa Geneious v. 10 (Kearse et al., 2012). Foram enviadas 152 amostras para sequenciamento, sendo 76 para o *primer F* e 76 para o *primer R* do gene ATPase. Essas amostras representam 76 indivíduos sequenciados de cinco espécie-alvos: *Brycon falcatus* (n = 46), *Brycon pesu* (n = 3), *Pseudoplatystoma punctifer* (n = 25), *Hemisorubim platyrhynchos* (n = 1), *Leiarinus marmoratus* (n = 1). Algumas sequências apresentam padrões de qualidade baixa e foram excluídas deste relatório. Essas amostras serão re-sequenciadas e os resultados apresentados no próximo relatório. O tamanho médio das sequências, após a remoção dos resíduos e processamento dos dados foi de ~ 550 bp. Estes valores representam quase a totalidade do gene ATPase 6, o qual possui aproximadamente 680 pares de bases (pb).

4.6 ESPÉCIES SEQUENCIADAS

Foram submetidas 152 amostras para o sequenciamento. Após a inspeção visual dos electroferogramas, observou que muitas sequencias apresentam caracteres ambíguos indicando prováveis problemas durante o sequenciamento. Todas as etapas do programa de investigação

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

genética da ictiofauna foram conduzidos no Laboratório de Genética da Universidade Federal do Tocantins, exceto o sequenciamento já que a instituição não possui o equipamento. Portanto, o material foi enviado para o sequenciamento externo. As etapas, desde a extração até a purificação do PCR para o sequenciamento foram rigorosamente examinadas para garantir a excelência no controle de qualidade. Nota-se, por exemplo, que todas as amostras foram quantificadas para identificar a quantidade/qualidade dos DNA extraídos e concentração de proteínas. Os produtos da PCR também passaram pelo mesmo procedimento de qualidade. Não se sabe o motivo do possível problema no sequenciamento. O produto da PCR pode ter sido danificado ou contaminado durante o envio das amostras pelo correio para a empresa. Para o próximo relatório, o sequenciamento será realizado e/ou inspecionado presencialmente pelo responsável deste relatório. Todo o material aqui apresentado será re-sequenciado para garantir a qualidade dos resultados. Abaixo são apresentados os resultados de duas espécies alvos que apresentaram sequencias com padrões aceitáveis de qualidade. Este padrão baseou-se na qualidade dos picos de sequenciamento. Devido ao reduzido número de sequencias viáveis para analisar as outras espécies-alvos (ex. *Brycon pesu*, *Pseudoplatystoma punctifer*, *Leiarinus marmoratus*), os dados não serão apresentados neste relatório. Está programado para o próximo semestre a inclusão de resultados de todas as espécies-alvos.

4.6.1 *BRYCON FALCATUS*

Foram enviados para o sequenciamento 46 amostras de *Brycon falcatus*, incluindo indivíduos coletados a montante e jusante das instalações da UHE São Manoel. Das 46 amostras, 30 apresentaram os padrões aceitáveis de qualidade, portanto foram utilizadas em análises populacionais (**Figura - 6**). Após a inspeção visual das sequencias e remoção dos resíduos do sequenciamento (processo chamado trim), o tamanho médio das sequencias de *Brycon falcatus* foi de aproximadamente 560 pares de bases. Para minimizar os problemas do sequenciamento nas análises, utilizou-se o código IUPAC em situações onde os nucleotídeos eram ambíguos.

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

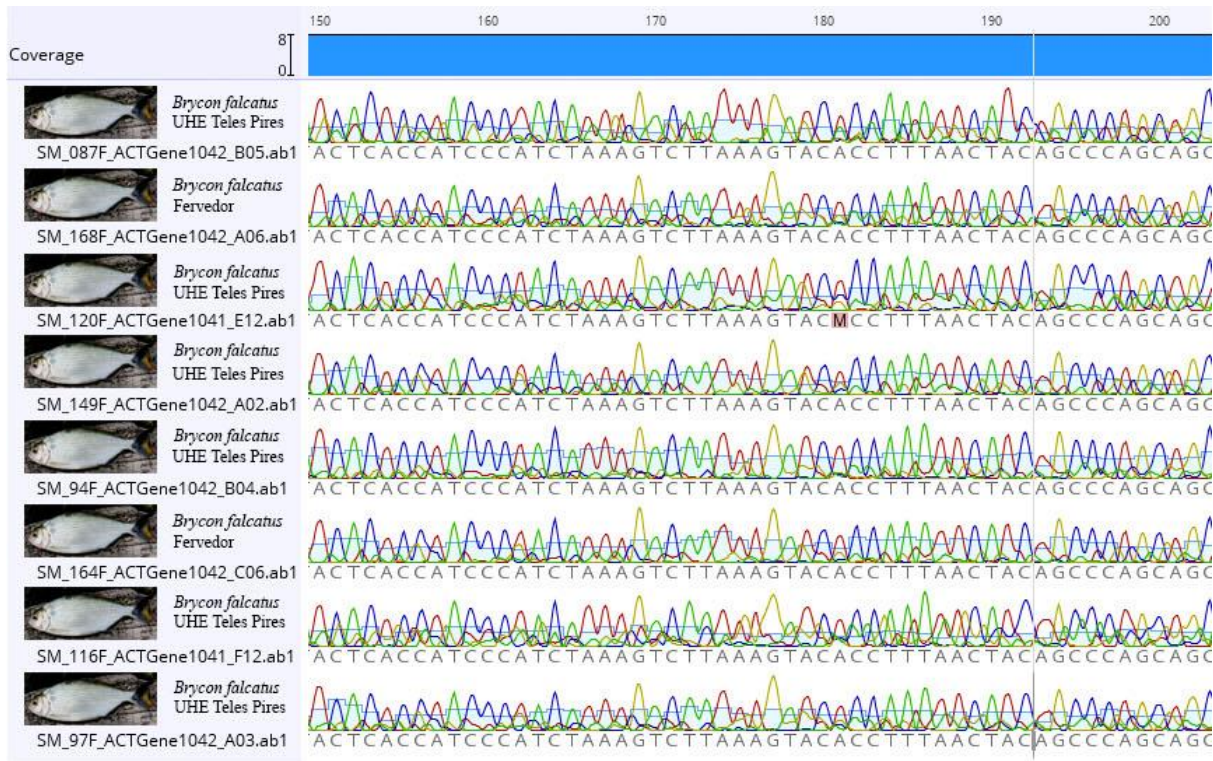


Figura - 6: Resultado do sequenciamento de *Brycon falcatus*. Os picos no electroferogramas indicam os nucleotídeos do gene ATPase. Cada nucleotídeo possui uma cor: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Quanto maior o pico, melhor a qualidade da leitura do sequenciador (consequentemente das reações de PCR).

As sequências de *Brycon falcatus* foram alinhadas utilizando o programa Muscle (Edgar, 2004). O alinhamento consistiu em comparar as sequências dos indivíduos para localizar regiões homologas e, assim, identificar substituições (mutações), deleções, inserções, entre outros eventos. O alinhamento de *Brycon falcatus* indica a presença de dois grupos: grupo A e grupo B (**Figura - 7**). Os níveis de variação genética entre estes dois grupos são elevados e sugerem: i) estrutura populacional; ii) uma provável nova espécie para o gênero, iii) contaminação, iv) pseudogenes. A segunda hipótese exige estudos morfológicos e análises de outros genes para ser melhor avaliada. Embora improvável, existe também a possibilidade de contaminação durante a amplificação/sequenciamento ou presença de pseudogenes. Pseudogenes são cópias de genes, porém que evoluem independentemente após a duplicação. Nestes casos, as amostras dos indivíduos precisam ser re-amplificadas e re-sequenciadas para eliminar essa hipótese. Caso seja comprovado a existência de um pseudogene, será necessário otimizar os

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

PCRs para estas amostras (através de ajustes de reagentes) ou elaborar primers mais específicos.



1. B_falcatus_SM_108F_ACTGene1042_H04.ab1
2. B_falcatus_SM_102F_ACTGene1042_F01.ab1
3. B_falcatus_SM_133F_ACTGene1041_G11.ab1
4. B_falcatus_SM_144F_ACTGene1042_D04.ab1
5. B_falcatus_SM_114F_ACTGene1041_G12.ab1
6. B_falcatus_SM_095F_ACTGene1042_E04.ab1
7. B_falcatus_SM_103F_ACTGene1042_H02.ab1
8. B_falcatus_SM_104F_ACTGene1041_H11.ab1
9. B_falcatus_SM_105F_ACTGene1042_E05.ab1
10. B_falcatus_SM_82F_ACTGene1042_A04.ab1
11. B_falcatus_SM_133F_ACTGene1042_C04.ab1
12. B_falcatus_SM_97F_ACTGene1042_A03.ab1
13. B_falcatus_SM_168F_ACTGene1042_A06.ab1
14. B_falcatus_SM_028F_ACTGene1042_G05.ab1
15. B_falcatus_SM_132F_ACTGene1041_F11.ab1
16. B_falcatus_SM_116F_ACTGene1041_F12.ab1
17. B_falcatus_SM_142F_ACTGene1042_H03.ab1
18. B_falcatus_SM_145F_ACTGene1042_C05.ab1
19. B_falcatus_SM_119 ACTGene1042_G01.ab1
20. B_falcatus_SM_120F_ACTGene1041_E12.ab1
21. B_falcatus_SM_121F_ACTGene1041_D12.ab1
22. B_falcatus_SM_100F_ACTGene1041_C12.ab1
23. B_falcatus_SM_159F_ACTGene1042_H05.ab1
24. B_falcatus_SM_94F_ACTGene1042_B04.ab1
25. B_falcatus_SM_165F_ACTGene1042_G06.ab1
26. B_falcatus_SM_161F_ACTGene1042_H06.ab1
27. B_falcatus_SM_087F_ACTGene1042_B05.ab1
28. B_falcatus_SM_149F_ACTGene1042_A02.ab1
29. B_falcatus_SM_139F_ACTGene1042_A05.ab1
30. B_falcatus_SM_164F_ACTGene1042_C06.ab1

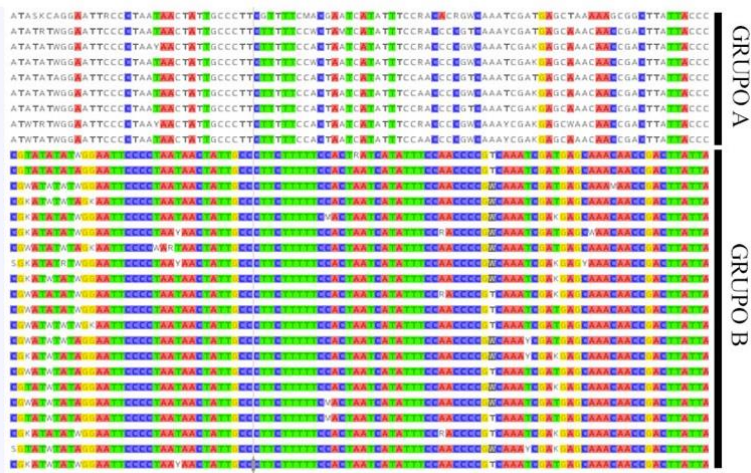


Figura - 7: Alinhamento de nucleotídeos de *Brycon falcatus*. As cores no alinhamento indicam os seguintes nucleotídeos: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Note que entre os indivíduos de *Brycon falcatus* dois grupos (A e B) podem ser identificados com base em seus graus de variação genética.

Para as demais análises, os dois grupos de *Brycon falcatus* foram individualizados e considerados populações independentes. O quadro a seguir mostra métricas de diversidade nucleotídicas para os dois grupos.

Quadro - 4: Índices de variabilidade genética entre populações de *Brycon falcatus*.

ESPÉCIES	SÍTIOS NO ALINHAMENTO			MÉDIAS DE DIVERSIDADE		
	NÚMERO	VARIÁVEIS	SINGLETON	NA POPULAÇÃO	INTERPOLAÇÃO	COEFICIENTE
<i>BRYCONFALCATUS A</i>	568	139	77	0.083	-	-
<i>BRYCONFALCATUS B</i>	568	57	20	0.015	2.15	1.45

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

Os resultados indicam que a diversidade no número de nucleotídeos variáveis e maior em *Brycon falcatus* (grupo A) quando comparado ao grupo B (139 vs. 57). Isso indicou que há mais mutações, portanto maior variabilidade genética, no grupo A. Este fato pode também ser constatado pela as médias de diversidade estimadas para as populações. Até o momento, *Brycon falcatus* (grupo A) foi coletado apenas à montante da área de instalação da UHE São Manoel, por isso não há resultados sobre índices de interpolação e coeficiente de diversidade. Porém, veja o quadro 4-2 que a variação genética da população *Brycon falcatus* (grupo A) é mais elevada comparada com a população de *Brycon falcatus* B (0.083 vs. 0.015). Para a população de *Brycon falcatus* (grupo B), exemplares foram coletados e sequenciados tanto à montante quanto jusante da área de instalação da UHE São Manoel. Os resultados sugerem menor variabilidade genética na população (0.015), e elevado fluxo de alelos como indicado pelo cálculo de interpolação (2.15).

Os resultados das análises de distância (as árvores evolutivas) reforçam que *Brycon falcatus* possui pelo menos dois grupos bem estruturados os quais são aqui denominados de grupos A e B (**Figura - 8**). O grupo A é composto (até o momento) por indivíduos coletados somente na localidade “UHE Teles Pires”, ou seja, à montante da área de instalação da UHE São Manoel, enquanto o grupo B por indivíduos com distribuição ampla na região. O comprimento da árvore de *Brycon falcatus* grupo SM A foi de 0.286. Esse valor representa a média do número de mutações nos sítios.

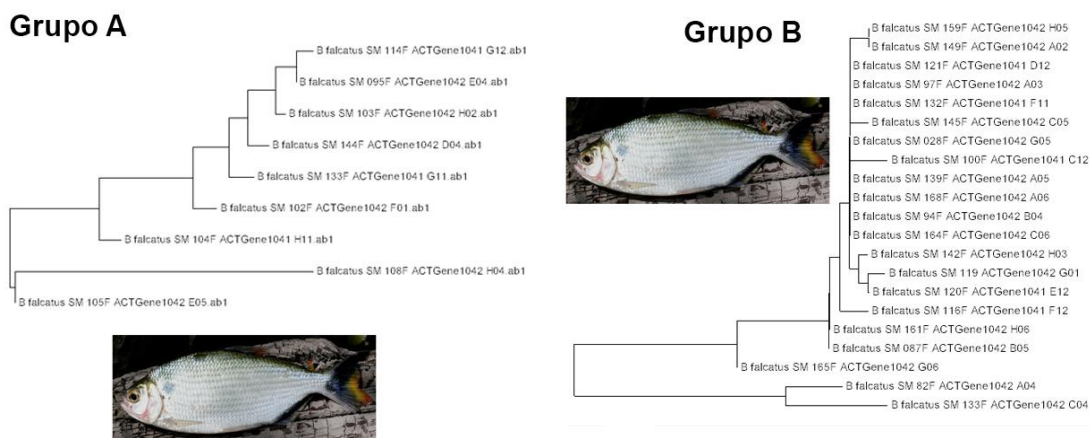


Figura - 8: Árvores de distâncias entre os indivíduos das espécies *Brycon falcatus*. O grupo A é composto (até este momento) por indivíduos coletados na localidade “UHE Teles Pires”, enquanto o grupo B é composto por indivíduos mais amplamente

distribuídos na área de estudo. Comprimento das árvores: *Brycon falcatus*-A = 0.286;
Brycon falcatus-B = 0.095.

Utilizou-se rede de haplótipos para analisar a estrutura populacional de *Brycon falcatus* grupo A e grupo B (Figura - 9). Esses resultados são preliminares, portanto, faz-se necessário a inclusão de novos indivíduos nas análises para obter-se uma conclusão robusta. *Brycon falcatus* (grupo A) possui padrões de haplótipos com elevado grau de variação genética e haplótipos únicos. *Brycon falcatus* (grupo B) possui a menor variação genética entre os grupos analisados. Vários indivíduos neste grupo B possuem os mesmos haplótipos, o que sugere maior fluxo gênico. Além disso, a maioria dos haplótipos apresentam poucas diferenças de nucleotídeos reforçando a hipótese de estrutura populacional na espécie *Brycon falcatus* (grupo B).

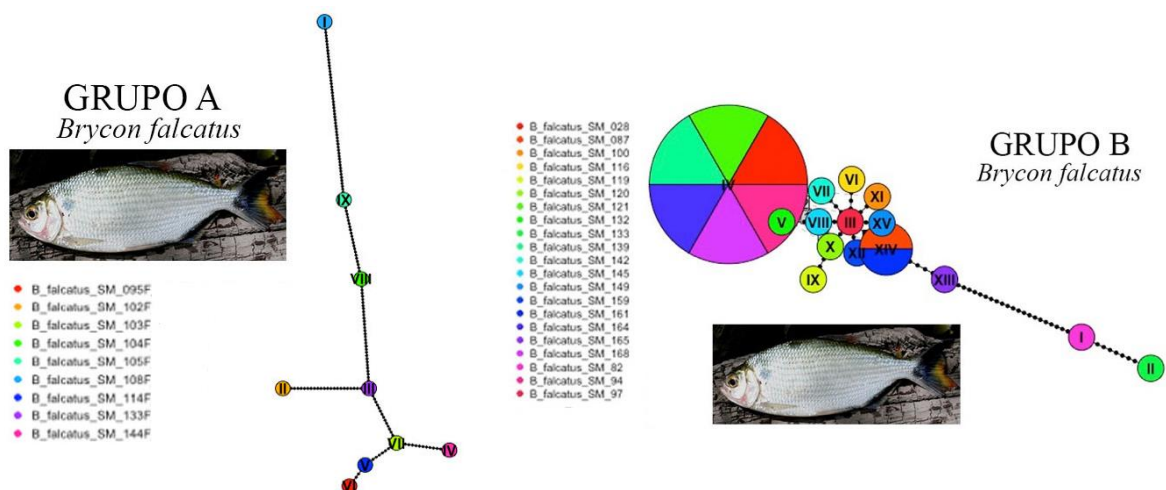


Figura 9: Rede de haplótipos para *Brycon falcatus*, grupos A e B. Cada círculo representa um haplótipo e os pontos entre os círculos indicam o número de diferentes nucleotídeos entre os haplótipos.

4.6.1.1 COMPARAÇÃO: UHE TELES PIRES

As conclusões até momento para *Brycon falcatus* são semelhantes aquelas apresentadas pelo programa de investigação genética de ictiofauna conduzido pela UHE Teles Pires. Embora tenham sido utilizados genes diferentes, os índices de diversidade genética podem ser qualitativamente comparados e indicam as seguintes conclusões: elevada variabilidade genética

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

na espécie *Brycon falcatus* e baixa à moderada estrutura populacional entre meta-populações a montante e jusante das corredeiras do Rio Teles Pires.

4.6.1.2 CONCLUSÕES PRELIMINARES

Vale ressaltar que as conclusões são preliminares e precisam ser reavaliadas após o re-sequenciamento e inclusão de novas amostras de *Brycon falcatus*. As amostras já foram coletadas (**Quadro - 1**), algumas já estão amplificadas e serão submetidas para o sequenciamento.

- Das 46 amostras enviadas para o sequenciamento, 30 amostras apresentaram qualidade adequada para análises populacionais. É provável que os *amplicons* foram danificados durante o envio pelo correio do material para o sequenciamento. Os próximos sequenciamentos serão realizados ou acompanhado presencialmente pelo responsável deste programa.
- A análise do alinhamento sugere dois grupos em *Brycon falcatus*. O re-sequenciamento e inclusão de novas amostras devem corroborar/rejeitar esta conclusão.
- Os índices de variabilidade genética indicam:
 - ✓ Elevada diversidade genética em *Brycon falcatus* (grupo A)
 - ✓ Moderada diversidade genética em *Brycon falcatus* (grupo B)
 - ✓ Elevada interpolação entre metapopulações de *Brycon falcatus* (grupo B)
 - ✓ Pouca endogamia – como indicado pelo coeficiente de diferenciação
- As árvores evolutivas de *Brycon falcatus* indicam:
 - ✓ Elevada taxa de mutações em *Brycon falcatus* (grupo A): comprimento de ramos = 0.286
 - ✓ Baixa taxa de mutações em *Brycon falcatus* (grupo B): comprimento de ramos = 0.095
- A rede de haplótipos indica fluxo gênico entre as populações de *Brycon falcatus* (grupo B) nas áreas de influência da UHE São Manoel. A inclusão de novas amostras deve corroborar/rejeitar esta conclusão.
- Até o momento, as conclusões sobre *Brycon falcatus* (grupo B) são semelhantes aquelas apresentadas para a mesma espécie pelo programa de genética conduzido pela UHE

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

Teles Pires. Ou seja, populações de *Bryconfalcatius* apresentam moderada estrutura genética, possivelmente devido à capacidade de dispersão de seus indivíduos espécie.

4.6.2 PSEUDOPLATYSTOMA PUNCTIFER

Foram enviados para o sequenciamento 25 amostras de *Pseudoplatystoma punctifer*, incluindo indivíduos coletados a montante e jusante das instalações da UHE São Manoel. Das 25 amostras, 12 apresentaram padrões aceitáveis de qualidade, portanto foram utilizadas para análises populacionais (**Figura - 10**). Após a inspeção visual das sequencias e remoção dos resíduos do sequenciamento (processo chamado trim), o tamanho médio das sequencias de *Pseudoplatystoma punctifer* foi de aproximadamente 531 pares de bases. Para minimizar os problemas do sequenciamento nas análises, utilizou-se o código IUPAC em situações onde os nucleotídeos eram ambíguos.

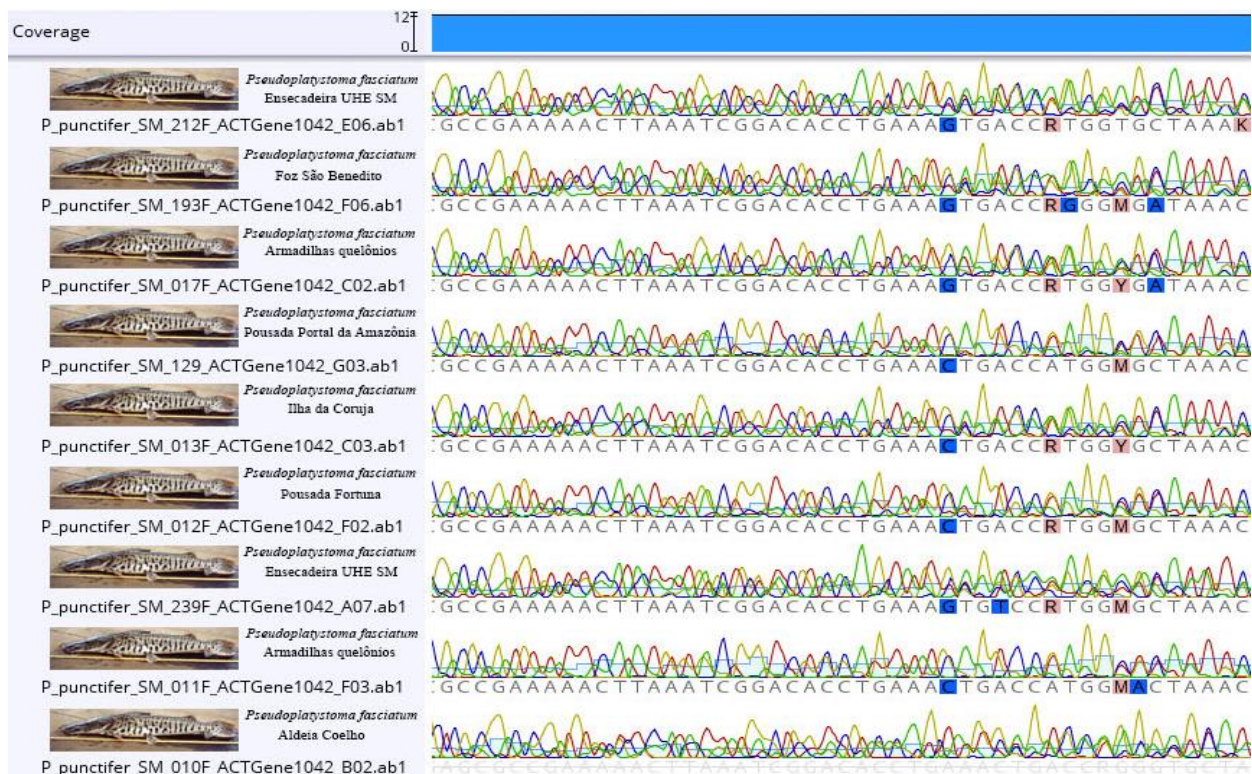


Figura - 10: Resultado do sequenciamento de *Pseudoplatystoma punctifer*. Os picos no electroferogramas indicam os nucleotídeos do gene ATPase. Cada nucleotídeo possui uma cor: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Quanto maior o pico, melhor a qualidade da leitura do sequenciador (consequentemente das reações de PCR).

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

As sequências de *Pseudoplatystoma punctifer* foram alinhadas utilizando o programa Muscle (Edgar, 2004). O alinhamento consistiu em comparar as sequências dos indivíduos para localizar regiões homologas e, assim, identificar substituições (mutações), deleções, inserções, entre outros eventos. O alinhamento dos indivíduos de *Pseudoplatystoma punctifer* indicou considerável níveis de variação genética, incluindo várias mutações, porém sem divisão populacional até o momento (**Figura - 11**).



1. P_punctifer_SM_17F_ACTGene1042_D02.ab1
2. P_punctifer_SM_239F_ACTGene1042_A07.ab1
3. P_punctifer_SM_15F_ACTGene1042_C01.ab1
4. P_punctifer_SM_212F_ACTGene1042_E06.ab1
5. P_punctifer_SM_017F_ACTGene1042_C02.ab1
6. P_punctifer_SM_013F_ACTGene1042_C03.ab1
7. P_punctifer_SM_012F_ACTGene1042_F02.ab1
8. P_punctifer_SM_197F_ACTGene1042_B06.ab1
9. P_punctifer_SM_189F_ACTGene1042_F05.ab1
10. P_punctifer_SM_129F_ACTGene1042_G03.ab1
11. P_punctifer_SM_011F_ACTGene1042_F03.ab1
12. P_punctifer_SM_193F_ACTGene1042_F06.ab1

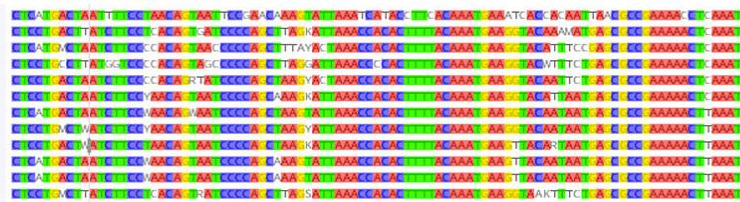


Figura - 11: Alinhamento de nucleotídeos de *Pseudoplatystoma punctifer*. As cores no alinhamento indicam os seguintes nucleotídeos: verde (T), amarelo (G), vermelho (A) e azul (C). Note que entre há elevada variação genética entre os indivíduos de *Pseudoplatystoma punctifer*.

O **Quadro - 5** mostra métricas de diversidade nucleotídicas para *Pseudoplatystoma punctifer*.

Quadro - 5: Índices de variabilidade genética em *Pseudoplatystoma punctifer*.

ESPÉCIES	SÍTIOS NO ALINHAMENTO			MÉDIAS DE DIVERSIDADE		
	NÚMERO	VARIÁVEIS	SINGLETON	NA POPULAÇÃO	INTERPOLAÇÃO	COEFICIENTE
<i>Pseudoplatystoma punctifer</i>	531	163	110	0.071	2.15	3.02

Os resultados indicam que a diversidade no número de nucleotídeos variáveis é mais elevada em *Pseudoplatystoma punctifer* do que nas outras populações analisadas neste estudo (163 vs. 139 e 57 em *Brycon falcatus*). Isso indica que há mais mutações, portanto maior variabilidade genética, na população de *Pseudoplatystoma punctifer*. Este fato pode também ser constatado pela as médias de diversidade estimadas entre os indivíduos sequenciados de *Pseudoplatystoma punctifer*. Veja no **Quadro - 5** que a variação genética da população de

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

Pseudoplatystoma punctifer é semelhante à de *Brycon falcatus*(grupo A) (0.083 vs. 0.071) e que há fluxo de alelos como inferido pelo cálculo de interporlação (2.15). O coeficiente de diferenciação sugere pouca endogamia.

O resultado da análise de distância (árvore evolutiva) para *Pseudoplatystoma punctifer* indicou a presença de uma população com elevada variação genética (**Figura 12**). Com a continuidade do monitoramento mais indivíduos serão coletados e sequenciados o que permitirá inferir se existem metapopulações e quais os graus de fluxo gênico entre elas.

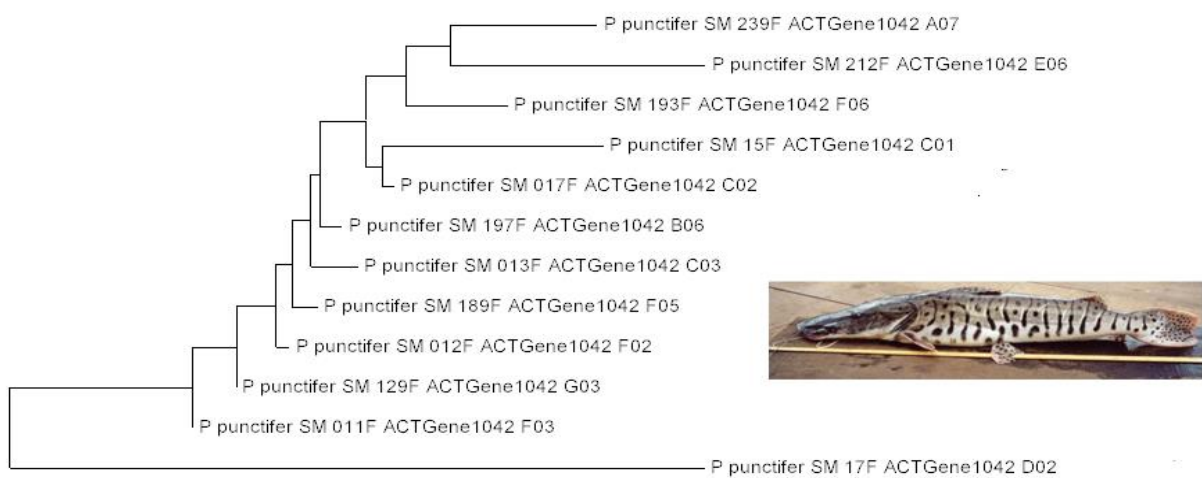


Figura - 12: Árvores de distâncias entre os indivíduos das espécies *Pseudoplatystoma punctifer*. Essa árvore é composta por indivíduos presentes a montante e jusante da região de instalação da UHE São Manoel. A inclusão de mais indivíduos permitirá compreender melhor a estrutura populacional e o fluxo gênico entre possíveis metapopulações. Comprimento das árvores: *Pseudoplatystoma punctifer* = 0.392.

Baseado nos dados preliminares, não é possível concluir se há fluxo gênico nas áreas de influência do empreendimento da UHE São Manoel (**Figura 13**). É provável que a inclusão de novos indivíduos altere o padrão observado.

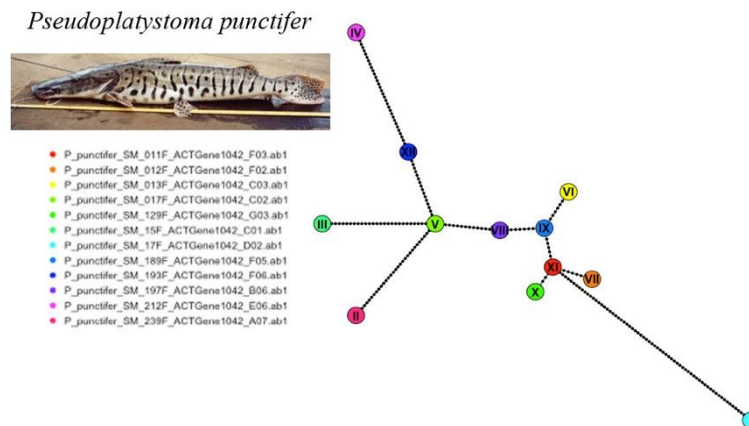


Figura 13: Rede de haplótipos para *Pseudoplatystoma punctifer*. Cada círculo representa um haplótipo e os pontos entre os círculos indicam o número de diferentes nucleotídeos entre os haplótipos. Quando mais semelhantes os haplótipos, mais próximos os círculos. Ainda, se mais de um indivíduo apresenta o mesmo haplótipos estes são combinados em um gráfico de pizza.

4.6.2.1 CONCLUSÕES PRELIMINARES

Vale ressaltar que as conclusões são preliminares e precisam ser reavaliadas após o re-sequenciamento e inclusão de novas amostras de *Pseudoplatystoma punctifer*. As amostras já foram coletadas (**Quadro 1**), algumas já estão amplificadas, e serão submetidas para o sequenciamento.

- Das 25 amostras enviadas ao sequenciamento, 12 amostras apresentaram qualidade adequada para as análises populacionais. É provável que os *amplicons* foram danificados durante o envio pelo correio do material para o sequenciamento. Os próximos sequenciamentos serão realizados ou acompanhado presencialmente pelo responsável por este programa
- A análise do alinhamento sugere um grupo/população de *Pseudoplatystoma punctifer*. O re-sequenciamento e inclusão de novas amostras devem corroborar/rejeitar esta conclusão.
- Os índices de variabilidade genética indicam:
 - ✓ Elevada diversidade genética em *Pseudoplatystoma punctifer*
 - ✓ Elevada interpolação entre metapopulações de *Pseudoplatystoma punctifer*

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

- ✓ Pouca endogamia (elevado coeficiente de diferenciação)
- A árvore evolutiva de *Pseudoplatystoma punctifer* indica:
 - ✓ Elevada taxa de mutações: comprimento de ramos = 0.392
- A rede de haplótipos de *Pseudoplatystoma punctifer* não permite concluir se há fluxo gênico nas áreas de influência do empreendimento UHE São Manoel. É necessário a inclusão e sequenciamento de novas amostras.

4.6.2.2 ESPÉCIES NÃO SEQUENCIADAS

A maioria das amostras coletadas das espécies-alvos já foram amplificadas e serão sequenciadas ou inspecionadas presencialmente pelo responsável por este relatório. Parte das amostras coletadas foram submetidas para o sequenciamento, porém ocorreram problemas, provavelmente, durante o transporte dos amplicons para a empresa que realizou o sequenciamento. Todos os cuidados e recomendações da empresa para o envio dos amplicons foram adotados (ex. gelo, envio via sedex, etc). O próximo relatório incluirá um número maior de amostras. Embora o relatório ainda esteja com um baixo número de sequências, é possível deduzir com base nos dados de *Brycon falcatus*, *Pseudoplatystoma punctifer*, e das demais espécies investigadas pelo programa genético da UHE Tele Pires (CHTP, 2013) que:

- A diversidade genética dos peixes do rio Rio Teles Pires é elevada,
- Há populações estruturadas e não estruturadas no Rio Teles Pires,
- Há fluxo gênico entre metapopulações à montante e jusante das corredeiras do rio Teles Pires.

Em relação aos processos de padronização e amplificação do gene ATPase, experimentos permitiram obter um protocolo otimizado para a reações de PCR das espécies alvos. O protocolo otimizado e apresentado neste relatório foi utilizado com sucesso para amplificar a maioria das amostras das espécies-alvo. Porém ajustes serão necessários para amplificar as amostras que apresentaram pouco DNA ou DNA de baixa qualidade. Quanto ao sequenciamento, houve (provavelmente) problemas durante o envio das amostras para a empresa responsável pelo sequenciamento. Para o próximo relatório, o sequenciamento será realizado e/ou inspecionado presencialmente pelo responsável deste relatório. Todo o material será re-sequenciado para assegurar a confiabilidade dos resultados. Para as espécies-alvos as quais sequencias apresentaram qualidade aceitável, os resultados corroboram as conclusões apresentadas pelo programa genético da UHE Teles Pires. Ou seja, os resultados indicam elevada variação

UHE São Manoel no rio Teles Pires

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

genética, baixo à moderada estruturação populacional, e fluxo gênico entre indivíduos à montante e jusante da área de instalação da UHE São Manoel.

5 JUSTIFICATIVA (ANÁLISE DE CONFORMIDADE)

Amostras das espécies-alvo selecionadas para o programa de investigação genética de ictiofauna da UHE São Manoel foram coletas e seus DNA extraídos com sucesso. Estas amostras são de espécimes que estão sendo monitoradas pelo os programas de telemetria, o que é importante para que dados genéticos e comportamentais, os quais estão sendo analisados separadamente, possam ser comparados. Portanto, espera-se que as conclusões sobre os deslocamentos das espécies migradoras indicadas pelo programa comportamental (Telemetria) sejam semelhantes às conclusões indicadas pelo programa genético. Vale ressaltar que PBA da UHE São Manoel prevê também 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 outras escalas espaciais e temporais.

6 CRONOGRAMA

Atividades		Marcos																				
		Previsão/Realizado	↓ LI ↓ Encadeira de 1ª Fase				↓ Encadeira de 2ª Fase				↓ Início enchimento do reservatório ↓ Comissionamento Unidade Geradora 1				↓ Entrada geração comercial última UG							
Item	Atividade	2014				2015				2016				2017				2018				
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	
ETAPAS		P/R																				
		IMPLANTAÇÃO																OPERAÇÃO COMERCIAL				
P21 - Programa de Investigação Genética da Ictiofauna																						
1	Obtenção de autorização de captura junto ao órgão ambiental	P																				
		A																				
		R																				
2	Obtenção de dados e nivelamento de informações junto ao PBA UHE Teles Pires	P																				
		A																				
		R																				
3	Obtenção de amostras junto ao Programa de Telemetria e Marcação da Ictiofauna	P																				
		A																				
		R																				
4	Realização das análises genéticas	P																				
		A																				
		R																				
5	Relatório Semestral	P																				
		R																				

Previsão
 Ajustado
 Realizado

7 PROPOSTA PARA CONTINUIDADE – FASE DE OPERAÇÃO

Novas amostras das espécies-alvo selecionadas para o PIG da UHE São Manoel serão coletadas e seus DNA extraídos. As coletas continuarão até que o número mínimo de amostras por espécie (n=30) seja atingido.

Ressalta-se que, tendo como direcionamento as espécies alvo apresentados no presente relatório, esforços serão empregados para a realização do sequenciamento das amostras estocadas no banco de amostras, bem serão intensificadas coletas para amostrar espécies com baixo número de material coletado. Além disso, será solicitado a Companhia Hidrelétrica Teles Pires a disponibilização de amostras coletadas a montante para a que o sequenciamento seja realizado no mesmo laboratório. Essas medidas serão adotadas de imediato para que na oportunidade da realização do Workshop, previsto para o mês de abril, tenhamos resultados que nos auxiliem na tomada de decisão.

Atividades		Marcos																																																																																																																																																																																																	
		Previsão/Realizado	Encerrada de 2ª Fase				Início enchimento do reservatório				Comissionamento Unidade Geradora 1																																																																																																																																																																																								
Item	Atividade	2017				2018				2019																																																																																																																																																																																									
		T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4	T1	T2	T3	T4																																																																																																																																																																																						
ETAPAS		P/R IMPLANTAÇÃO				P/R OPERAÇÃO COMERCIAL				P/R OPERAÇÃO COMERCIAL																																																																																																																																																																																									
P21 - Programa de Investigação Genética da Ictiofauna																																																																																																																																																																																																			
1	Renovação da autorização de captura junto ao órgão ambiental	P														A														R												2	Continuidade de obtenção de amostras genéticas das espécies alvo (montante e jusante)	P														A														R												3	Realização das análises genéticas	P														A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R											
		A														R												2	Continuidade de obtenção de amostras genéticas das espécies alvo (montante e jusante)	P														A														R												3	Realização das análises genéticas	P														A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																									
		R												2	Continuidade de obtenção de amostras genéticas das espécies alvo (montante e jusante)	P														A														R												3	Realização das análises genéticas	P														A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																							
2	Continuidade de obtenção de amostras genéticas das espécies alvo (montante e jusante)	P														A														R												3	Realização das análises genéticas	P														A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																					
		A														R												3	Realização das análises genéticas	P														A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																			
		R												3	Realização das análises genéticas	P														A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																																	
3	Realização das análises genéticas	P														A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																																															
		A														R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																																																													
		R												4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																																																																											
4	Realização de Workshop para apresentação dos resultados obtidos até o momento	P														A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																																																																																									
		A														R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																																																																																																							
		R												5	Relatório Semestral	P														R																																																																																																																																																																					
5	Relatório Semestral	P														R																																																																																																																																																																																			
		R																																																																																																																																																																																																	

Previsão
Ajustado
Realizado

8 ANEXOS

- Anexo I- Parecer técnico
- Anexo II- Quadro com dados brutos
- Anexo III- Quantitativo do banco de amostras
- Anexo IV- Registro fotográfico
- Anexo V- Planilha de dados brutos