

PROJETO BÁSICO AMBIENTAL – UHE SÃO MANOEL

Programa de Investigação Genética da Ictiofauna

CONTROLE DE REVISÃO		
CÓDIGO	REVISÃO	DATA
P00.SM-021/14	00	30/01/2014
P00.SM-021/14	01	30/04/2014
P00.SM-021/14	02	08/10/2014

PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA

SUMÁRIO

21	PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA.....	1
21.1	Justificativa	1
21.2	Objetivos	5
21.3	Metas	5
21.4	Base legal e Normativa	5
21.5	Área de Abrangência do Programa	6
21.6	Metodologia	6
21.6.1	Obtenção das amostras	6
21.6.2	Obtenção de dados moleculares	7
21.6.3	Análise de dados para caracterização genética de populações	8
21.7	Indicadores	11
21.8	Produtos	12
21.9	Interface com outros Planos, Programas e Projetos.....	12
21.10	Parcerias Recomendadas	12
21.11	Equipe Técnica Envolvida	12
21.12	Referências Bibliográficas.....	13
21.13	Cronograma Físico.....	17

21 PROGRAMA DE INVESTIGAÇÃO GENÉTICA DA ICTIOFAUNA

21.1 Justificativa

O Programa de Investigação Genética da Ictiofauna (PIGI) foi elaborado com base no disposto na Nota Técnica nº 06/2012 – COHID/CGENE/DILIC/IBAMA e Nota Técnica nº 006822/2013 CGENE/IBAMA. Atende à condicionante 2.1 e aos itens a, b e c da condicionante 2.23 da Licença Prévia nº 473/2013, de 29 de novembro de 2013.

A variabilidade genética em populações naturais pode estar estruturada no tempo e no espaço. O desenvolvimento e a manutenção dessa estrutura dizem respeito ao “*pool*” gênico da espécie, a organização dos genótipos e sua distribuição espacial, eventos estocásticos como deriva gênica, e processos ecológicos como recrutamento, crescimento populacional, mortalidade e fecundidade (WRIGHT, 1931, 1943; GILPIN; SOULÉ, 1986). A estruturação genética espacial pode ser favorecida por barreiras geográficas (por exemplo, cachoeiras) ou por uma distribuição espacial agrupada, que proporcionam um certo grau de isolamento entre populações, promovendo restrição ao fluxo gênico e, conseqüentemente, um acúmulo de diferenças genéticas entre as populações isoladas. Quando uma espécie possui uma distribuição geográfica ampla, o tamanho da área ocupada comparada à capacidade de dispersão dos indivíduos pode impedir a formação de uma unidade panmítica única. Dessa forma, as restrições ao fluxo gênico podem levar as populações a se diferenciarem geneticamente, ocasionando uma estruturação espacial da variabilidade genética. Este modelo de diferenciação genética é conhecido como “isolamento por distância”, e foi proposto por Sewall Wright (“*isolation by distance*”, WRIGHT, 1931; 1943). Assim, a diferenciação genética entre populações pode ser o resultado da restrição ao fluxo gênico, e pode estar correlacionada com a distância geográfica.

O processo de “isolamento por distância” apresenta um padrão de mudanças genéticas semelhantes à endogamia, na medida em que leva a um excesso de indivíduos homocigotos nas populações. Desta forma, os efeitos desse processo nas populações podem ser medidos em relação ao decréscimo na frequência de heterocigotos pelas estatísticas de Wright (WRIGHT, 1951). Nesse caso, uma população subdividida teria três níveis de complexidade estrutural: (i) os indivíduos; (ii) as subpopulações; (iii) a população como um todo. Os efeitos da subdivisão são medidos, nestes três níveis, em relação ao desvio de uma população panmítica: a redução da heterocigosidade devido a acasalamentos não aleatórios dos indivíduos dentro das subpopulações (coeficiente de endogamia - F_{IS}); a redução na heterocigosidade da subpopulação devido a deriva gênica (índice de fixação - F_{ST}); redução na heterocigosidade em relação à população total, devido a acasalamentos não aleatórios dentro das subpopulações e deriva gênica (coeficiente de endogamia total - F_{IT}). Se todas as subpopulações estiverem em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com a mesma frequência alélica, então F_{ST} é igual a zero. Valores negativos de F_{IS} e F_{IT} indicam que a heterocigosidade observada nas subpopulações é maior que a esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Em populações subdivididas, a diferenciação genética deve refletir as diferenças locais em pressões seletivas, alta frequência de endogamia, ou podem ser resultado de processos aleatórios como mutação e deriva gênica. Entretanto, o fluxo gênico pode representar um mecanismo homogeneizador, mantendo as subpopulações conectadas e diminuindo a divergência genética (SLATKIN, 1985).

O fluxo gênico pode ser interpretado como um processo de dispersão à longas distâncias, no qual todas as subpopulações têm a mesma probabilidade de enviar migrantes para qualquer outra subpopulação. Nesse caso, as subpopulações podem ser consideradas equivalentes, com uma taxa de migração constante e igual para todas as subpopulações. De acordo com este modelo de migração, conhecido por “modelo de ilhas”, uma população grande é dividida em várias subpopulações dispersas geograficamente, como ilhas em um arquipélago (WRIGHT, 1931). O número de migrantes por geração pode ser estimado pelo tamanho efetivo da população e pelo efeito da deriva gênica na heterozigosidade (F_{ST}). Wright (1969) demonstrou que se uma fração “m” da população for repostada por migrantes não haverá diferenciação genética entre as subpopulações se $N_m > 1$, onde “N” é o tamanho efetivo da população. Com o aumento do número de migrantes, o índice de fixação (F_{ST}) diminui rapidamente. Com níveis muito baixos de migração há uma tendência à fixação de alelos nas subpopulações ($F_{ST} \sim 1,0$).

Kimura (1953) propôs um modelo de migração, conhecido como *stepping stone*. O modelo considera que as populações naturais estão subdivididas em “colônias” (subpopulações ou demes), e a migração dos indivíduos é restrita a “colônias” adjacentes. Os pares de subpopulações podem estar organizados espacialmente em uma (fluxo gênico entre uma subpopulação e dois vizinhos mais próximos), duas ou três dimensões, com a mesma fração de indivíduos movendo-se entre pares de subpopulações adjacentes. Este modelo representa o extremo em fluxo gênico a curta distância.

Apesar das populações estarem arranjadas de forma distinta no espaço, o modelo para duas dimensões apresenta as mesmas previsões que o “modelo de ilhas” (KIMURA; MARUYAMA, 1971; SLATKIN; BARTON, 1989). A estimativa do fluxo gênico pelo método proposto por Wright (1931; 1943) é igualmente eficiente para ambos os modelos pois é sensível a mudanças nos valores de N_m , relativamente insensível a diferenças nas taxas de mutação e seleção, ao número de demes, ou subpopulações no “modelo de ilhas”, e prevê uma boa estimativa de N_m no modelo *stepping stone*, para demes mais próximos (Slatkin; Barton, 1989). Entretanto, o número de migrantes por geração (N_m), estimado pelo “modelo de ilhas” considera que a população está em equilíbrio, com taxa de mutação desprezível e taxa de migração constante (WRIGHT, 1943). Esta condição raramente é encontrada, principalmente quando existe um “isolamento por distância”, com correlação positiva entre a diferenciação e distância geográfica (WHITLOCK; MCCAULEY, 1999).

A subdivisão de uma população grande e amplamente distribuída em pequenas subpopulações isoladas pode aumentar a susceptibilidade da espécie à extinção local, e posteriormente à extinção global, pois cada subpopulação se torna mais vulnerável aos

efeitos deletérios da imprevisibilidade demográfica, ambiental, genética e a catástrofes naturais (TERBORGH; WINTER, 1980; GILPIN; SOULÉ, 1986). As variações genéticas estocásticas resultam da deriva gênica, depressão endogâmica e efeito de fundador, resultado da perda de variabilidade, diminuição do tamanho efetivo e isolamento das subpopulações decorrentes da fragmentação.

As subpopulações remanescentes podem ser produtos de um efeito de amostragem (sub-amostra dos alelos da população original). Parte da variabilidade genética original, portanto, pode ser perdida, inicialmente, somente por uma redução do tamanho da população, efeito conhecido como *genetic bottleneck* (REED; FRANKHAM, 2003; REED, 2005). A perda de variabilidade genética pode limitar a população a responder às mudanças em longo prazo no ambiente. Características neutras em condições atuais podem se tornar vantajosas em condições ambientais diferentes. Quando há a perda de alelos, a subpopulação tem poucas opções disponíveis e, portanto, tem menor probabilidade de sobreviver que populações maiores (FRANKLIN, 1980; REED; FRANKHAM, 2003, REED, 2005).

A deriva gênica pode mudar a distribuição da variabilidade genética pela perda de variação dentro da população (perda de alelos) e pelo aumento da diferenciação entre populações por fixação de alelos. Por outro lado, pode provocar a fixação de alelos deletérios e provocar a diminuição do valor adaptativo dos indivíduos da população e, conseqüentemente, aumentar as chances de extinção (FRANKHAM *et al.*, 2003, REED *et al.*, 2003, REED; FRANKHAM, 2003).

A maior frequência de acasalamentos entre parentes (endogamia), em populações pequenas e isoladas, resulta em uma perda da variabilidade genética por aumento da homozigose, e pode levar a uma depressão endogâmica (FRANKLIN, 1980). A depressão endogâmica consiste na diminuição do valor adaptativo pela expressão de alelos deletérios em homozigose e depende de fatores como sistema reprodutivo e tamanho da população. Em populações tipicamente grandes, com pouca estruturação espacial, ou em populações que se tornaram pequenas por qualquer fator (por exemplo, antrópico), a endogamia provoca depressão endogâmica com o aumento do nível de homozigose (CHARLESWORTH; CHARLESWORTH, 1987; HASTING; HARRISON, 1994; FRANKHAM *et al.*, 2003; REED *et al.*, 2003; REED; FRANKHAM, 2003; REED, 2005).

O nível de fluxo gênico geralmente é alto o suficiente para contrabalançar os efeitos de níveis moderados de deriva gênica, endogamia e seleção. Entretanto, a taxa de fluxo gênico é fortemente dependente do tamanho da subpopulação e distância entre as subpopulações. Em curtas distâncias, subpopulações maiores recebem menor taxa de fluxo gênico que populações pequenas. Entretanto, com o aumento da distância, a tendência se reverte e as populações pequenas se tornam mais isoladas que as grandes. Populações maiores devem exportar maior quantidade de migrantes que populações pequenas, criando um fluxo gênico fortemente assimétrico (SLATKIN, 1987).

Uma vez que os efeitos da deriva gênica e a depressão endogâmica são especialmente pronunciados em populações pequenas e isoladas, o planejamento de reservas para

conservação de espécies e planos de manejo de espécies exploradas economicamente ou afetadas por grandes empreendimentos devem levar em conta estes riscos. O monitoramento periódico das subpopulações restritas, considerando as mudanças na frequência gênica, permite uma preservação em longo prazo, uma vez que a perda de variabilidade e depressão endogâmica podem ser detectadas e amenizadas com introdução de indivíduos de outras subpopulações ou facilitação do fluxo gênico. O monitoramento pode ainda dar informações sobre a distribuição da variabilidade genética entre e dentro das subpopulações. Se a maior quantidade de variabilidade estiver entre subpopulações, então a preservação de um maior número de subpopulações pode ser necessária, a fim de preservar uma maior quantidade de diversidade genética (FRANKLIN, 1980).

Aspectos da conservação genética têm sido mais extensivamente apresentados para peixes da América do Norte, como no caso de peixes do deserto (VRIJENHOEK *et al.*, 1985, MEFFE; VRIJENHOEK, 1988) ou peixes de riachos (VRIJENHOEK *et al.*, 1987) permitindo analisar a estrutura de comunidades, sua ecologia evolutiva e, desta forma, fornecer subsídios para recomendar o manejo e, conseqüentemente, manter a variabilidade genética. Com o avanço da genética molecular, nas últimas décadas, técnicas utilizando marcadores de DNA foram desenvolvidas permitindo, entre outros aspectos, estimar as distâncias genéticas entre subpopulações e espécies e a heterozigosidade em regiões específicas do genoma. Estes recursos também começaram a ser utilizados no estudo da variabilidade genética em peixes, especialmente em relação a aspectos evolutivos e sua relação com a biogeografia, a assim chamada filogeografia (AVISE *et al.*, 1987; AVISE, 2000; SIVASUNDAR *et al.*, 2001).

No Brasil, as pesquisas sobre variabilidade genética de populações naturais de peixes e sua relação com o ambiente, visando à conservação, vêm aumentando. Alguns marcadores moleculares da variabilidade genética têm sido empregados na conservação de peixes neotropicais (HATANAKA; GALETTI, 2003; TELLES *et al.*, 2011; OLIVATTI *et al.*, 2011). Os marcadores de DNA são reconhecidos como importantes em estudos de identificação de linhagens comerciais de peixes (TOLEDO FILHO *et al.*, 1992), fornecendo instrumentos de investigação que tornam possível distinguir populações geográficas com grande eficiência através da identificação de haplótipos (PERDICES *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2004; KARTAVTSEV *et al.*, 2007), na identificação de espécies (MACHIDA; TSUDA, 2010), em análises de estoques estruturados e misturados e na identificação de híbridos (THANGARAJ; LIPTON, 2010). Recentes estudos populacionais com peixes têm utilizado os padrões de diferenciação genética também na determinação de regiões de berçários e caracterização de filopatria em diversas espécies (SCHREY; HEIST, 2003; PEREIRA *et al.*, 2009). Entre os segmentos do DNA mitocondrial, a região não codificadora, conhecida como *D-loop*, é especialmente relevante em estudos filogeográficos, em razão de apresentar as maiores taxas evolutivas de todo o genoma mitocondrial.

Os dados deste Programa serão relevantes para o conhecimento da estruturação genética populacional neste trecho do rio Teles Pires, promovida pela existência da cachoeira de Sete Quedas, os quais serão fundamentais para a tomada de decisões

sobre a necessidade ou não de construção e operação e, para o caso positivo, no fornecimento de subsídios para a definição do tipo de mecanismo de transposição de peixes (MTP) a ser implantado no barramento da UHE São Manoel e o método de operação desse mecanismo.

Novamente cabe destacar que deverão ser envidados esforços para a execução integrada desse Programa com os demais previstos no âmbito do PMI da UHE São Manoel, bem como com os Programas similares em desenvolvimento pelos demais empreendimentos hidrelétricos instalados ou em instalação na bacia do rio Teles Pires, em especial com a UHE Teles Pires. Assim, a metodologia desse Programa poderá ser flexibilizada para a adequação à execução conjunta com os demais empreendimentos hidrelétricos previstos para o rio Teles Pires.

21.2 Objetivos

O objetivo geral do Programa é 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. Para tanto, deverão ser estabelecidos os seguintes 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; e,
- Utilizar a avaliação da estrutura genética para estimar o fluxo gênico entre subpopulações.

21.3 Metas

O Programa tem como meta para atingir seus objetivos a obtenção de 30 amostras para análises genéticas, de um mínimo de seis espécies alvo.

21.4 Base legal e Normativa

O presente Programa tem como base legal a Instrução Normativa do IBAMA nº 146, de 10/01/2007, que considera o Artigo 225, parágrafo 1º, inciso VII da Constituição da República Federativa do Brasil, o Artigo 1º da Lei nº 5.197, de 03/01/1967, Artigo 1º, inciso III, e o Artigo 6º, inciso I, item b, da Resolução CONAMA nº 001, de 23/01/1986 e o Artigo 4º, inciso V, parágrafo 2º, da Resolução CONAMA nº 237 de 16/12/1997, o Artigo 15 do Decreto nº 5.718 de 13/03/2006.

Esta Instrução Normativa estabelece os critérios para procedimentos relativos ao manejo de fauna silvestre (levantamento, monitoramento, salvamento, resgate e destinação) em áreas de influência de empreendimentos e atividades consideradas efetiva ou potencialmente causadoras de impactos à fauna e que estão sujeitas ao licenciamento ambiental, como definido pela Lei nº 6.938/81 e pelas Resoluções CONAMA nº 001/86 e nº 237/97.

O Programa de Genética de Populações de Peixes dependerá de autorização da DILIC/IBAMA para coleta dos exemplares e das amostras de material a ser analisado, o que já será contemplado no Programa de Monitoramento da Ictiofauna. Para as análises populacionais, os laboratórios estão dispensados de autorização específica, de acordo com Resolução nº 21, de 31/08/2006 do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético.

Por fim, serão observadas as disposições das Notas Técnicas emitidas pelo IBAMA, em especial as Notas Técnicas nº 06/2012 e nº 6822/2013.

21.5 Área de Abrangência do Programa

A área de estudo do Programa de Monitoramento da Ictiofauna está inserida na Área Diretamente Afetada (ADA), na Área de Influência Direta (AID) e na Área de Influência Indireta (AII), definidas no EIA da UHE São Manoel (EPE/LEME-CONCREMAT, 2010), além de trechos no rio Teles Pires à jusante do eixo do futuro barramento da UHE São Manoel, incluindo os corpos d'água situados em terras indígenas.

21.6 Metodologia

As atividades do Programa de Investigação Genética da Ictiofauna serão desenvolvidas de maneira complementar às atividades desenvolvidas pela UHE Teles Pires, buscando atender os interesses comuns aos dois empreendimentos, dentre eles a elucidação de questões afetas à transposição da ictiofauna. Os resultados obtidos no âmbito do Programa de Investigação Genética da Ictiofauna deste empreendimento servirão de base para a continuidade dos estudos aqui propostos.

21.6.1 Obtenção das amostras

Amostras de tecido serão obtidas durante a execução do Programa de Monitoramento da Ictiofauna e do Programa de Telemetria e Marcação da Ictiofauna, priorizando a escolha de espécies migratórias e não migratórias, de interesse comercial, endêmicas,

ameaçadas de extinção ou de importância alimentar. Para a escolha das espécies serão levadas em consideração as possibilidades de obtenção das mesmas nas coletas e junto aos pescadores da região. O número de espécies primárias para esse estudo deverá ser composto por, ao menos, seis espécies com 30 trinta amostras coletadas ao longo das campanhas, escolhidas de modo justificado.

Para a obtenção das amostras, será retirado de cada peixe um pequeno fragmento de tecido muscular (cerca de 1cm^3), que será transferido para um microtubo de 1,5ml, contendo etanol absoluto. Esta amostra pode ser mantida a temperatura ambiente até o final da campanha, para o posterior envio para o laboratório.

21.6.2 Obtenção de dados moleculares

As amostras serão armazenadas em freezer a -20°C . Deverá ser criado um banco de tecidos para cada espécie amostrada, as quais deverão ser depositadas em um Banco de Tecidos de instituições de ensino/pesquisa a ser previamente definidas.

O DNA será extraído a partir de pequenas quantidades de tecido muscular (aproximadamente 200 mg), para cada indivíduo, utilizando um protocolo de extração de DNA de amostras de tecido, conforme descrito por Taggart *et al.* (1992). Depois de extraído, o DNA de todas as amostras será quantificado em gel de agarose 1% (com adição de brometo de etídeo para a coloração das amostras) utilizando tampão de eletroforese TBE 1X (0,89M Tris, pH 8,0; 0,89M ácido bórico; 0,02M EDTA) em uma cuba horizontal, utilizando-se como parâmetro de comparação o marcador de peso molecular *Low DNA Mass Ladder*. Cada amostra, incluindo o marcador, será preparada em solução contendo 3 μl de DNA/marcador e 3 μl de tampão de carregamento. O gel será submetido a uma voltagem constante igual a 80 V, durante cerca de duas horas. Ao final do processo, o gel será fotografado sob luz ultravioleta, com o auxílio de um fotodocumentador. Depois de quantificado, o DNA de cada indivíduo será diluído para a concentração final de 5 $\text{ng}/\mu\text{L}$, para ser usado nas reações de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase).

Para detecção da variabilidade genética nos *loci* microssatélites serão utilizados *primers* descritos na literatura para as espécies alvo. No caso de existir espécies que não possuem marcadores microssatélites, estes deverão ser desenvolvidos pela equipe do Programa. A amplificação de cada par de *primers* padronizado será realizada por PCR em termociclador. O volume final da reação será de 15 μL , constituído de 5 μL de DNA ($\sim 5\text{ng}/\mu\text{L}$); 4,4 μL dos dois iniciadores (1,8 μM); 1,5 μL tampão da enzima 10X (500 mM KCl, 100mM Tris-HCl pH 8,4, 1% Triton X-100); 0,5 μL de MgCl_2 (50 mM); 1,3 μL de d’NTP (2,5mM); 1,3 μL de BSA (Albumina Bovina – 10 mg/ml); 0,2 μL da enzima Taq-Polimerase (5 unidades/ μL), completando-se o volume com 0,8 μL de Água Milli-Q. Em seguida, a mistura desses reagentes da PCR (mix) será acondicionada em tubos e levadas ao termociclador que será programado conforme os passos descritos a seguir: desnaturação do DNA por aquecimento à 95°C por cinco minutos; 30 ciclos de amplificação que ocorrerá em a 94°C por um minuto, um minuto para o anelamento dos *primers* (temperatura específica para cada *primer*) e extensão da molécula de DNA a 72°C por um minuto, seguido de uma extensão final de 72°C por sete minutos.

Para confirmar a padronização dos *loci* microsatélites, os produtos da amplificação serão submetidos à eletroforese vertical em gel de acrilamida 6%. Para a eletroforese será utilizado tampão TBE 1x concentrado e corrente elétrica constante em 70 W por um tempo médio de duas horas. Para a visualização dos alelos (produtos da amplificação), os géis serão corados com nitrato de prata conforme o protocolo descrito por Creste *et al.* (2001).

Depois de padronizados, as amostras serão injetadas em um analisador automático de fragmentos, para a análise dos fragmentos amplificados produzidos pelas reações de PCR (*amplicons*). A identificação dos fragmentos produzidos pelas reações de PCR no analisador automático de fragmentos será realizada via eletroforese capilar, seguida pela detecção de sinal fluorescente, uma vez que os *primers* usados serão marcados com fluorocromos *HEX* (verde), *NED* (amarelo) ou *6-FAM* (azul) nas suas extremidades 5'. O tamanho dos fragmentos da amostra será determinado usando marcadores internos de tamanho padrão (*size standard*) marcados com fluorescência vermelha (*ROX*), através da eletroforese conjunta do marcador de massa molecular (*ladder*) com cada amostra genotipada. Esses fragmentos serão identificados por intermédio de um laser.

21.6.3 Análise de dados para caracterização genética de populações

Estimativa de frequências alélicas e parâmetros genéticos básicos

Para cada espécie, os *loci* microsatélites serão caracterizados para o número de alelos por *locus* e a heterozigosidade observada e esperada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg, em cada população (NEI, 1978). O coeficiente de endogamia (*f*), para cada *locus* e para todos os *loci* também será estimado. Será utilizado o teste baseado em randomização com correção de Bonferroni para verificar desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg e de equilíbrio de ligação entre pares de *loci* (GOUDET *et al.*, 1996).

Estrutura Genética Populacional

A diferenciação genética entre populações será verificada pelas estatísticas de Wright *F*, θ , e *f* (WRIGHT, 1978), obtidas por uma análise de variância de frequências alélicas (COCKERHAM, 1969; WEIR; COCKERHAM, 1984).

Divergência Genética e Padrões Espaciais

Após a estimativa da diferenciação genética, vários métodos multivariados podem ser aplicados. Neste estudo, a matriz de distâncias genéticas será analisada, inicialmente, a partir de uma análise de agrupamento tipo UPGMA (*Unweighted Pair-group Method by Arithmetic Averages*), que produz um arranjo hierárquico de classificação das populações, representado por um dendrograma. A representatividade deste dendrograma será testada por meio da correlação entre as distâncias genéticas originais e as distâncias entre as populações no dendrograma (correlação cofenética).

Apesar de o agrupamento pelo método do UPGMA ser uma das técnicas mais utilizadas neste tipo de estudo, ele tem sido criticado baseado no fato de que os processos evolutivos nem sempre produzem um padrão hierárquico de variação ao nível de população (LESSA, 1990; RODRIGUES; DINIZ-FILHO, 1998). Este tipo de agrupamento hierárquico pode não representar adequadamente as distâncias genéticas, indicando um falso arranjo hierárquico entre as populações, quando existe entre elas, de fato, um padrão contínuo ou reticulado.

Em função desses problemas, as distâncias genéticas também serão analisadas por uma técnica de ordenação que visa representar graficamente a dissimilaridade entre as populações. Segundo Lessa (1990) a técnica mais apropriada para este tipo de trabalho é o escalonamento multidimensional não métrico (*non-metric multidimensional scaling*). Esta técnica parte de uma configuração inicial de pontos (populações) alocados ao acaso em um número reduzido de dimensões, normalmente 2-D ou 3-D. Com base na distribuição ao acaso das subpopulações são calculadas novas distâncias e estas são comparadas com as distâncias genéticas originais, através de um procedimento iterativo, com o objetivo de minimizar as diferenças entre as matrizes. A configuração inicial pode ser aleatória, definindo para cada população um par ordenado (X, Y) de números aleatórios, ou baseada em escores de outras análises multivariadas, tais como uma análise de componentes principais. Essa minimização é mensurada, ao longo do processo iterativo, por uma estatística denominada *estresse* (S) (Kruskall, 1964), dado por:

$$S = \sqrt{\frac{\sum (d_{ij}^* - \hat{d}_{ij})^2}{\sum (d_{ij}^* - \bar{d}_{ij}^*)^2}},$$

onde:

d_{ij}^* são as distâncias entre as populações no espaço de dimensão reduzida;

\hat{d}_{ij} são as distâncias esperadas por um modelo de regressão monotônica das distâncias no espaço de dimensão reduzida sobre as distâncias originais; e,

\bar{d}_{ij}^* é a distância média no espaço de dimensão reduzida.

O somatório é feito ao longo dos pares i, j , mas com $i < j$. Quanto mais próximo de zero for o valor de S, menor a distorção e, portanto, melhor a representatividade das distâncias genéticas. Neste estudo, a matriz inicial de distâncias entre as populações será estabelecida em um espaço de duas dimensões, definidas aleatoriamente.

A fim de se analisar os padrões de variação espacial em um contexto multivariado, será inicialmente feita a estimativa do coeficiente de correlação de Pearson (r) entre as matrizes de distâncias genéticas e as distâncias geográficas entre as populações. O estimador do coeficiente de correlação simples (EPPERSON, 2003), no caso entre duas matrizes X e Y, é dado por:

$$r = \frac{\sum_{i,j=1}^n X_{ij} Y_{ij}}{\sqrt{\sum_{i,j=1}^n X_{ij}^2 \sum_{i,j=1}^n Y_{ij}^2}}$$

onde:

$$x_{ij} = X_{ij} - \bar{X} \text{ e } y_{ij} = Y_{ij} - \bar{Y}.$$

A significância dessa correlação matricial não pode ser testada pelos testes estatísticos usuais, por apresentar problemas de independência entre os elementos nas matrizes. Nesse sentido, a estatística Z de Mantel (1967) tem sido frequentemente utilizada, a fim de se testar a significância da associação entre matrizes contendo diferentes tipos de distâncias entre pares de observações (SMOUSE *et al.*, 1986; Manly, 1997). O valor Z de Mantel é dado por:

$$Z = \sum_{i,j=1}^n X_{ij} Y_{ij}$$

onde:

X_{ij} e Y_{ij} são elementos das matrizes X e Y a serem comparadas (no caso, as matrizes de distância geográfica e genética, respectivamente).

A significância do Z pode ser obtida comparando-se esse valor observado com valores de uma distribuição nula, construída recalculando-se os valores de Z diversas vezes, aleatorizando, em cada uma delas, a ordem dos elementos de uma das matrizes (MANLY, 1997). A estatística Z possui uma relação monotônica com o r de Pearson calculado entre matrizes (correlação matricial), de modo que ela pode ser utilizada para testar a significância de r (MANLY, 1986). Neste programa, 5.000 permutações aleatórias deverão ser utilizadas para se testar a significância das correlações matriciais.

As correlações matriciais e o teste de Mantel serão também utilizados para avaliar o padrão multivariado de estrutura espacial entre as populações. Serão calculados coeficientes de correlação matricial entre as distâncias genéticas e matrizes de conectividade espacial, com valor 1,00 indicando pares de populações “ligadas”, se a distância geográfica entre elas se encontra em cada uma das classes de distância previamente definidas. Essas classes de distância geográfica serão estabelecidas de modo a manter o mesmo número de conexões ente populações. Assim, é possível relacionar o coeficiente de correlação matricial, cuja significância será estabelecida pelo teste de Mantel, com o aumento das distâncias geográficas, gerando assim um correlograma multivariado (SOKAL, 1986).

Análise de descontinuidade genética

Baseados nas distâncias genéticas um procedimento será utilizado para acessar a descontinuidade dos dados genéticos no espaço geográfico (MANEL *et al.*, 2003; TELLES *et al.*, 2003). Para esta análise de descontinuidade, as subpopulações são localizadas em um mapa de acordo com suas posições geográficas relativas e o método de triangulação de Delaunay é utilizado para conectá-las, resultando em uma rede que conecta todas as populações. A rede de Delaunay é formada conectando-se as populações em conjuntos de três (A, B e C), sendo que a ligação entre elas só ocorre se um círculo passando sobre elas não incluir nenhuma outra população (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998).

A partir desta rede de Delaunay e das distâncias genéticas, uma maneira simples de avaliar descontinuidades (presença de barreiras interrompendo o fluxo gênico) em dados multivariados é dividir as distâncias genéticas associadas a cada ligação entre as populações ABC na rede de Delaunay pela distância geográfica (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998). Desta forma, obtêm-se uma razão que expressa se as distâncias genéticas seriam altas ou baixas em função das distâncias geográficas. A análise de descontinuidade é feita mapeando-se uma dada proporção (i.e., 25%) dos valores mais elevados da distribuição global dessas razões ao longo da rede de Delaunay (LEGENDRE; LEGENDRE, 1998; MANEL *et al.*, 2003).

Definição de unidades operacionais para a conservação da variabilidade genética

Segundo Diniz-Filho e Telles (2002), populações locais (amostras) distantes entre si a uma distância geográfica menor do que o intercepto do correlograma podem ser consideradas como unidades operacionais, ou seja, unidades genéticas que seriam independentes para a conservação da variabilidade genética. Isso porque populações situadas a distâncias menores seriam de certo modo redundantes do ponto de vista da variabilidade genética. Esse procedimento pode ser aplicado de forma bem sucedida se o correlograma espacial indicar processos estacionários na estrutura espacial da variabilidade genética, como por exemplo, um perfil de estabilização seguindo um modelo de “isolamento por distância” ou um modelo de “alondras” (TELLES *et al.* 2003). Nessas situações de estruturação do fluxo gênico, o perfil do correlograma é menos dependente da configuração espacial da amostragem das populações (FENSTER *et al.*, 2003; VEKEMANS; HARDY, 2004).

Neste programa esse procedimento deverá ser aplicado a fim de discutir, com base no correlograma de Mantel, quantas unidades operacionais seriam necessárias para conservar a variabilidade genética medida pelos marcadores ISSR (*Inter Simple Sequence Repeats*), microsatélites e mitocondriais para as espécies de peixes ao longo do rio Teles Pires. A eficiência desse conjunto reduzido de subpopulações, no sentido de representar efetivamente a variabilidade genética, será avaliada pela proporção de unidades operacionais que contém pelo menos um indivíduo com bandas para todos os *loci* de cada marcador molecular.

21.7 Indicadores

Os indicadores de desempenho para a avaliação deste programa são:

- O número de espécies de peixes efetivamente analisadas;
- Número de amostras de DNA extraídas e submetidas a análise, por espécie alvo.

21.8 Produtos

Serão apresentados relatórios semestrais em atendimento ao órgão ambiental, consubstanciando, sempre que possível, informações obtidas junto aos demais programas relativos ao monitoramento da Ictiofauna.

21.9 Interface com outros Planos, Programas e Projetos

O Programa de Genética de Populações terá interfaces diretas com o Programa de Monitoramento da Ictiofauna, bem como com o Programa de Telemetria e Marcação da Ictiofauna e servirá para o auxílio na tomada de decisão sobre a necessidade ou não de construção e operação e, para o caso positivo, no fornecimento de subsídios para a definição do tipo de MTP a ser implantado no barramento da UHE São Manoel e o método de operação desse mecanismo.

21.10 Parcerias Recomendadas

Para o Programa de Investigação Genética da Ictiofauna recomenda-se o estabelecimento de parcerias com instituições de ensino e pesquisa que tenham interesse em receber o material testemunho coletado, objetivando incrementar coleções ictiológicas e o conhecimento sobre a variabilidade genética das populações de interesse, bem como com empresa de consultoria com experiência em estudos de genética de populações de peixes.

Recomendam-se em particular parcerias com a Universidade Federal do Pará (UFPA), particularmente nos seus *campi* de Bragança e Belém, notadamente nos seus laboratórios especializados em genética de peixes. Também se recomenda contatos no âmbito nacional o Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), a Universidade Federal do Mato Grosso (UFMT), o Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) e o Museu Nacional do Rio de Janeiro (MNRJ), dentre outros.

21.11 Equipe Técnica Envolvida

A equipe a ser formada para execução das atividades do Programa de Investigação Genética da Ictiofauna deverá apresentar os seguintes profissionais:

- Especialista Sênior em Genética de Populações;

- Biólogo Pleno;
- Técnicos de laboratório;
- Auxiliares de campo, que serão responsáveis pela coleta dos peixes.

21.12 Referências Bibliográficas

AVISE, J. C. Phylogeography. 2000. The history and formation of species. Harvard University Press, Cambridge, Massachusetts, 447 p.

AVISE, J. C.; ARNOLD, J.; BALL, R. M.; BERMINGHAM, E.; LAMB, T.; NEIGEL, J. E.; REEB, C. A.; SAUNDERS, N. C. 1987. Intraespecific phylogeography: the mitochondrial DNA bridge between population genetics and systematics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 18: 489-522.

BROWNE, M.; MELS, G. 2000. SYSTAT 10 - Statistics II. SPSS Inc. Chicago.

CHARLESWORTH, D.; CHARLESWORTH, B. 1987. Inbreeding depression and its evolutionary consequences. *Annual Review of Ecology Systematics*, 18: 237-268.

COCHERHAM, C. C. 1969. Variance of gene frequencies. *Evolution*, 23: 72-84.

CRESTE, C. TULMAN NETO, A.; FIGUEIRA, A. 2001. Detection of single sequence repeat polymorphisms in denaturing polyacrylamide sequencing gels by silver staining. *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 299-306.

DINIZ-FILHO J. A. F.; TELLES, M. P. C. 2002. Spatial autocorrelation and the identification of operational units for conservation in continuous populations. *Conservation Biology*, 16: 924-935.

EPPERSON. 2003. *Geographical Genetics*. Princeton University Press. New Jersey.

FENSTER C. B.; VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. 2003. Quantifying gene flow from spatial genetic structure data in a metapopulation of *Chamaecrista fasciculata* (Leguminosae). *Evolution*, 57: 995-1007.

FRANKHAM, R.; BALLOU, J. D.; BRISCOE, D. A. 2003. *Introduction of conservation genetics*. Cambridge University Press, New York.

FRANKHAM, R. 2003. Genetics and conservation biology. *Comptes Rendus Biologies*, 326: 22-29.

FRANKLIN, I. R. 1980. Evolutionary changes in small populations. Pp: 135-149, In Conservation biology, an evolutionary-ecological perspective. SOULÉ, M. E.; WILCOX, B. A. (eds). Sunderlands, Sinauer Associates.

GILPIN, M. E.; SOULÉ M. E. 1986. Minimum viable populations: process of species extinction. Pp: 19-34, In Conservation biology, the science of scarcity and diversity. SOULÉ, M. E. (eds.). Sunderlands, Sinauer Associates.

GOUDET, J. 2002. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (version 2.9.3.2). Available from <http://www.unil.ch/izea/software/fstat.html>.

GOUDET, J.; RAYMOND, M.; MEEDS, T.; ROUSSET, F. 1996. Testing differentiation in diploid populations. *Genetics*, 144: 1933-1940.

HASTING, A.; HARRISON, S. 1994. Metapopulation dynamics and genetics. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 25: 167-188.

HATANAKA, T.; GALETTI Jr, P. M. 2003. RAPD markers indicate occurrence of structured populations in a migratory freshwater fish species. *Genetics and Molecular Biology*, 26: 19-25.

KARTAVTSEV, Y. P.; JUNG, S. O.; LEE, Y. M.; BYEON, H. K.; LEE, J. S. 2007. Complete mitochondrial genome of the bullhead torrent catfish, *Liobagrus obesus* (Siluriformes, Amblycipididae): Genome description and phylogenetic considerations inferred from the Cytb and 16S rRNA genes. *Gene*, 396: 13-27.

KIMURA, M. 1953. "Stepping stone" model of population. *Annual Report National Institute of Genetics*, 3: 62-63.

KIMURA, M.; MARUYAMA, T. 1971. Pattern of neutral polymorphism in a geographically structured population. *Genetics Research*, 18: 125-131.

KRUSKALL, J. B. 1964. Nonmetric multidimensional scaling: a numerical method. *Psychometrika*, 29: 115-129.

LEGENDRE P.; LEGENDRE, L. 1998. *Numerical Ecology*. Elsevier. Amsterdam.

LESSA, E. 1990. Multidimensional analysis of geographic genetic structure. *Systematics Zoology*, 39: 242-252.

MACHIDA, R. J.; TSUDA, A. 2010. Dissimilarity of Species and Forms of Planktonic Neocalanus Copepods Using Mitochondrial COI, 12S, Nuclear ITS, and 28S Gene Sequences. *Plos One* 54, 5: 1-6.

MANEL S.; SCHWARTZ, M. K.; LUIKART, G.; TABERLET, P. 2003. Landscape genetics: combining landscape ecology and population genetics. *Trends in Ecology and Evolution*, 18: 189-197.

- MANLY, B. F. J. 1986. *Multivariate Statistical Methods: A Primer*. Chapman & Hall. London.
- MANLY, B. F. J. 1997. *Randomization, Bootstrap and Monte Carlo methods in biology*. Chapman & Hall. London.
- MANTEL, N. A. 1967. The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, 27: 209-220.
- MEFFE, G. K; VRIJENHOEK, R. C. 1988. Conservation genetics in the management of desert fishes. *Conservation Biology*, 2: 1-13.
- MILLER, M. P. 1997. Tools for population genetics analyses (TFPGA) 1.3: A Windows program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. Disponível em: <http://herb.bio.nau.edu/~miller/tfpga.htm>
- NEI, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individual. *Genetics*, 89: 583-590.
- OLIVATTI, A. M.; BONI, T. A.; SILVA JÚNIOR, N. J.; RESENDE, L. V.; GOUVEIA, F. O.; TELLES, M. P. C. 2011. Heterologous amplification and characterization of microsatellite markers in the Neotropical fish *Leporinus friderici*. *Genetics and Molecular Research*, 10: 1403-1408.
- PERDICES, A.; CUNHA, C.; COELHO, M. M. 2004. Phylogenetic structure of *Zacco platypus* Teleostei, Cyprinidae. populations on the upper and middle Chang Jiang – Yangtze drainage inferred from cytochrome b sequence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 192-203.
- PEREIRA, L. H. G.; FORESTI, F; OLIVEIRA, C. 2009. Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggests homing behavior. *Ecology of Freshwater Fish*, 18: 215–225.
- REED D. H. 2005. Relationship between population size and fitness. *Conservation Biology*, 19: 563-568.
- REED D. H.; FRANKHAM, R. 2003. Correlation between fitness and genetic diversity. *Conservation Biology*, 17: 230-237.
- REED D. H.; LOWE, E.; BRISCOE D. A.; FRANKHAM, R. 2003 Inbreeding and extinction: effects of rate of inbreeding. *Conservation Genetics*, 4: 405-410.
- RODRIGUES F. M.; DINIZ-FILHO, J. A. F. 1998. Hierarchical structure of genetic distances: effects of matrix size, spatial distribution and correlation structure among gene frequencies. *Genetics and Molecular Biology*, 21: 233-240.

ROHLF, F. J. 1989. NTSYS-Pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System. New York: Exeter publishers. New York.

SCHREY, A.W.; HEIST, E. J. 2003. Microsatellite analysis of population structure in shortfin mako (*Isurus oxyrinchus*). Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 60: 670–675.

SIVASUNDAR, A.; BERMINGHAM, E.; ORTÍ, G. 2001. Population structure and biogeography of migratory freshwater fishes (*Prochilodus*: Characiformes) in major South American rivers. Molecular Ecology, 10: 407- 417.

SLATKIN, M. 1985. Gene flow in natural populations. Annual Review of Ecology Systematics, 16: 393-430.

SLATKIN, M. 1987. Gene flow and the geographic structure of natural populations. Science, 236: 787-792.

SLATKIN, M.; BARTON, N. H. 1989. A comparison of three indirect methods for estimating average levels of gene flow. Evolution, 43: 1349-1368.

SMOUSE, P. E.; LONG, J. C.; SOKAL, R. R. 1986. Multiple regression and correlation extensions of the Mantel test of matrix correspondence. Systematic and Zoology, 35: 627-632.

SOKAL, R. R. 1986. Spatial data analysis and historical processes. Pp: 29-43, In data analysis and informatics IV. DIDAY et al, (eds.). Science Publishers. Holland.

TAGGART, J. B.; HYNES, R. A.; PRODOHL, P. A.; FERGUSON, A. 1992. A simplified protocol for routine total DNA isolation from salmonid fishes. Journal of Fish Biology, 40: 963-965.

TELLES, M. P. C.; COELHO, A. S. G.; CHAVES, L. J.; DINIZ-FILHO, J. A. F.; VALVA, F. A. 2003. Genetic diversity and population structure of *Eugenia dysenterica* DC ("cagaiteira" - Myrtaceae) in Central Brazil: implications for conservation and management. Conservation Genetics, 4: 685-595.

TELLES, M. P. C.; COLLEVATTI, R. G.; COSTA, M. C.; BARTHEM, R. B.; SILVA JÚNIOR, N. J.; SOUZA-NETO, A. C.; DINIZ-FILHO, J. A. F. 2011. A geographical genetics framework for inferring homing reproductive behavior in fishes. Genetica, 139: 243-253.

TERBORGH, J.; WINTER, B. 1980. Some causes of extinction. Pp: 119-133, In Conservation biology, an evolutionary-ecological perspective. SOULÉ, M. E.; WILCOX, B. A. (eds). Sunderlands, Sinauer Associates.

THANGARAJ, M.; LIPTON, A. P. 2010. Genetic Identity of three indian populations of three spotted seahorse, *Hippocampus trimaculatus*. *Advances in Biological Research*, 41: 37-41.

TOLEDO FILHO, S.; ALMEIDA-TOLEDO, L. F.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. 1992. Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento de reservatórios. *Cadernos de Ictiogenética*, São Paulo, USP. 39 p.

VEKEMANS, X.; HARDY, O. J. 2004. New insights from fine-scale spatial genetic structure analyses in plant populations. *Molecular Ecology*, 13: 921-935.

VRIJENHOEK, R. C.; DOUGLAS, M. E; MEFFE, G. K. 1985. Conservation genetics of endangered fish populations in Arizona. *Science*, 229: 400-402.

VRIJENHOEK, R. C.; MARTEINSDOTTIR, G.; SCHENCK, R. 1987. Genotypic and phenotypic aspects of niche diversification in fishes. In *Evolutionary and community ecology of North American stream fishes*: MATTHEWS, W. J.; D. C. HEINS (eds.). University of Oklahoma Press. Norman.

WANG, J.; LIN, H.; HUANG, S.; PAN, C.; CHEN, X.; CHIANG, T. 2004. Phylogeography of *Varicorhinus barbatulus* (Cyprinidae) in Taiwan based on nucleotide variation of mtDNA and allozymes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 31: 1143-1156.

WEIR B. S.; COCKERHAM, C. C. 1984. Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, 38: 1358-1370.

WHITLOCK, M. C.; MCCAULEY, D. E. 1999. Indirect measures of gene flow and migration: F_{ST} not equal $1/(4N_m + 1)$. *Heredity*, 82: 117-125.

WRIGHT, S. 1931. Evolution in mendelian populations. *Genetics*, 16: 97-159.

WRIGHT, S. 1943. Isolation by distance. *Genetics*, 28: 114-138.

WRIGHT, S. 1951. The genetic structure of populations. *Annual Eugenics*, 15: 323-354.

WRIGHT, S. 1978. *Evolution and genetics of population, variability within and among natural populations*. The University of Chicago Press, Chicago.

WRIGHT, S. 1969. *Evolution and genetics of populations. The theory of gene frequencies*. Chicago: University of Chicago Press, 511 p.

21.13 Cronograma Físico

A seguir é apresentado o cronograma do Programa de Investigação Genética da Ictiofauna, a ser executado na área de influência da UHE São Manoel.

