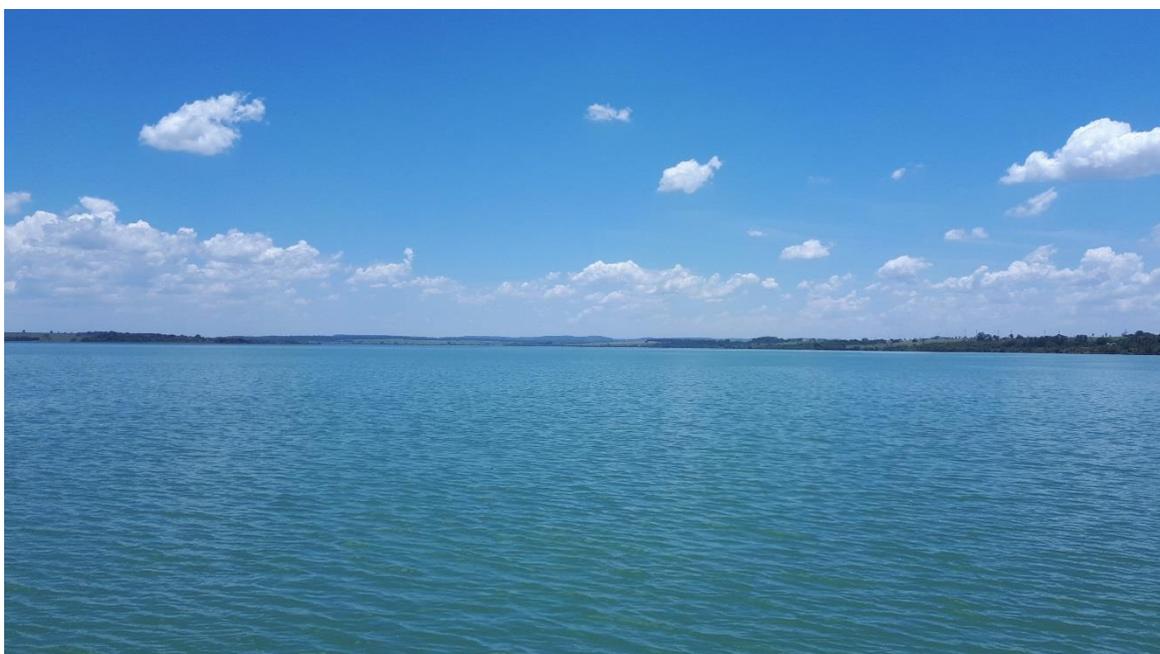


Enel Green Power Cachoeira Dourada S/A

PROJETO PIRACANJUBA LIVRE - PARANAÍBA VIVO



Andréia Franco – Responsável Técnico

CRBIO 086333

Flávio Soares

CREA BA20170094174

Soraya Cavalieri B. Lima

CRBIO 32287

ANO - 2019**ÍNDICE**

1.	EMPREENDIMENTO	3
2.	RESUMO	4
3.	INTRODUÇÃO	5
4.	CARACTERÍSTICAS DA DA ESPÉCIE-CHAVE (PIRACANJUBA) <i>BRYCON ORBIGNYANUS</i> (VALENCIENNES, 1850).....	7
5.	GENÉTICA PARA CONSERVAÇÃO.....	7
6.	REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO.....	9
7.	OBJETIVOS	10
7.1	OBJETIVO GERAL.....	10
7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	10
8.	MATERIAL E MÉTODOS	11
8.1	COLETA.....	11
8.2	FORMAÇÃO DO BANCO GENÉTICO DE REPRODUTORES E CONDIÇÕES DE MANTENEDOR	11
8.3	ESTUDOS GENÉTICOS.....	12
8.4	REPRODUÇÃO	15
9.	CORREDORES DE BIODIVERSIDADES.....	17
9.1	CORREDORES DE BIODIVERSIDADES: OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
10.	CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO	24
10.1	ETAPA I (1º ANO).....	24
10.2	ETAPA II (2º ANO).....	24
10.3	ETAPA III (3º ANO).....	25
11.	CRONOGRAMA FÍSICO E FINANCEIRO ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
11.1	ANO I.....ERRO! INDICADOR NÃO DEFINIDO.	
12.	REFERÊNCIAS	26

DOCUMENTO TÉCNICO:

Revisão nº 1 de 15/02/2019

CONTROLE:**1. EMPREENDIMENTO****Razão social:** Enel Green Power Cachoeira Dourada S.A.**CNPJ:** 01.672.223/0001-68**Licença de Operação:** 401/2004**LOCALIZAÇÃO E CONTATO:****Endereço:** Rodovia 206 KM 0, s/n,

Zona Rural. Cachoeira Dourada – GO.

Fone de contato: (64) 3434-9010

E-mail: andrea.franco@enel.com**Responsável ambiental:** Andréia Franco**Responsável técnico pela Usina**

Andréia Franco

Fone de contato: 64 3434-9010; 64 99901-5011;

e-mail: andrea.franco@enel.com**CRBIO:** 086333

2. RESUMO

Impactos no ambiente aquático devido à ação antrópica exigem estratégias emergenciais para atenuar os efeitos na flora e fauna silvestre. O comprometimento da ictiofauna é um dos principais efeitos causados por alterações no ambiente aquático ou terrestre (região marginal), o que gera efeitos ecológicos e econômicos danosos para toda a sociedade. Diante dos fatos, dentre outros objetivos, este projeto visa adotar estratégias de conservação sinérgicas, combinando um banco genético com tecnologias de Propagação Artificial e Identificação Genética para constituir um banco genético ex-situ do peixe piracanjuba (*Brycon orbignyanus*), sendo esta, no contexto deste projeto, uma “espécie bandeira” enquanto estratégia de conservação. Foco em uma “espécie bandeira” propicia o resgate de outras espécies ameaçadas com pouco ou nenhum esforço técnico e financeiro adicional. A partir da constituição do banco genético, será realizada propagação artificial, e reforço de estoque no seu ambiente de origem, tributários da Bacia Hidrográfica do Rio Paranaíba. Os procedimentos acima mencionados serão referência ao peixamento (reforço de estoque) do rio e dos tributários selecionados. Paralela e concomitantemente serão desenvolvidas ações que propiciem a constituição de micros e médios corredores de biodiversidade em um recorte territorial que será o piloto de futuras intervenções que poderá alcançar toda a bacia hidrográfica do rio Paranaíba.

Palavras-chave: Banco genético, peixe, Reprodução, peixamento, revegetação, corredores ecológicos, biodiversidade.

3. INTRODUÇÃO

A bacia do alto rio Paraná constitui-se, sem dúvidas, na região com a maior concentração de represamentos para fins de aproveitamento de geração de energia elétrica do Brasil, respondendo por, aproximadamente, 70% de toda energia produzida no País. Seus afluentes de grande porte, rios Tietê, Paranapanema e Iguaçu, bem como seus formadores, rio Grande e Paranaíba, encontram-se totalmente represados. O próprio rio Paraná com uma extensão de 809 km no território brasileiro ficaria com cerca de apenas 200 km de trecho lótico após o completo enchimento do reservatório de Porto Primavera (Agostinho et al., 2007). O ecossistema formado pelo rio Paranaíba (Fig 1), Segunda maior unidade hidrográfica da bacia do Paraná (25,4% de sua área), com área total da bacia de 222.767 Km², possui 21 barramentos e seus tributários rios São Marcos, Corumbá, Piracanjuba, Meia Ponte, Verde, Corrente, Claro, dos Bois e Aporé, pela margem direita, e os rios Dourados, Perdizes, Bagagem, Araguari, Piedade, Tijuco e Prata, pela margem esquerda são grandes contribuintes para a manutenção da biodiversidade da bacia do alto Paraná, contribuindo com aproximadamente 119 espécies de peixes na Bacia do Paranaíba.



PROJETO PARANAÍBA VIVO

Figura 1 - Bacia hidrográfica do rio Paranaíba

A ictiofauna original do alto rio Paraná, representada por 350 espécies, além de perderem enormes extensões de seu habitat preferencial, sofreu, também, outras interferências, como o repovoamento com espécies alóctones à bacia ou mesmo exóticas, por força de imposições legais, acrescido de outras espécies advindas de escape de criação em cativeiro, como é o caso das pisciculturas, ou mesmo por solturas voluntárias por parte de associações ambientalistas, com emprego de espécies não pertencentes à mesma bacia hidrográfica.

As modificações ocorridas neste ecossistema acentuaram-se, principalmente, a partir da década de 50, decorrentes do aumento da densidade demográfica, pressionando sobremaneira a exploração de seus recursos naturais. Dentre os principais eventos que contribuíram para estas alterações ambientais, podem-se destacar o uso do solo para a agricultura, o desmatamento, incluso de vegetação ciliar, a destruição de lagoas marginais, o lançamento de efluentes urbanos e industriais e, os grandes barramentos de rios para fins de geração de energia elétrica realizados no rio Grande, que excluíram significativa área do ecossistema original que compreendiam os sistemas denominados rios-planícies de inundação por Junk et al. (1989), que eram anteriormente utilizadas para a realização das migrações tróficas e reprodutivas das espécies reofílicas. Desta forma, tais impactos podem ter refletido, ao longo do tempo, na composição da fauna e flora regional e, conseqüentemente, na ictiofauna.

4. CARACTERÍSTICAS DA ESPÉCIE-CHAVE (PIRACANJUBA) *Brycon orbignyanus* (VALENCIENNES, 1850).

Espécie amplamente distribuída e outrora abundante nas bacias dos rios Paraná e Uruguai, no Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai; não ocorre na bacia do rio Paraguai, onde é substituída por uma espécie semelhante, a piraputanga (*B. hilarii*). Praticamente extinta da maior parte da bacia do alto Paraná, com registros recentes esporádicos na bacia dos rios Grande (cf. Machado et al., 1998) e Paranapanema; frequente apenas no trecho não represado do rio Paraná, entre os reservatórios de Itaipu e Porto Primavera (Agostinho et al., 2004). Muito provavelmente extinto na bacia do rio Tietê. A extinção da espécie na bacia do rio Mogi-Guaçu (afluente do rio Pardo, bacia do rio Grande) foi documentada por Godoy (1975). A piracanjuba era relativamente comum, e outrora teve grande importância na pesca da região, como documentado por Schubart (1943, 1949) no rio Mogi-Guaçu; por Monteiro (1953) no rio Piracicaba; e por Machado et al. (1968) no rio Tietê. Há mais de 20 anos não há registro de captura da espécie no alto rio Uruguai, quer pela pesca científica quer pela pesca artesanal (Zaniboni Filho & Schulz, 2003), estando praticamente desaparecida do baixo rio Uruguai (Espinach Ros & Ríos, 1997) sendo suas principais ameaças uma combinação de quatro fatores: destruição das florestas ciliares, represamentos, poluição e introdução de outras espécies.

5. GENÉTICA PARA CONSERVAÇÃO

Com os recentes avanços da biologia molecular, muitos marcadores genéticos foram desenvolvidos nos últimos anos e, dentre as aplicações destes marcadores, ressalta-se sua utilização nos estudos de genética de populações, fornecendo dados de variabilidade e estrutura genética populacional, taxas de fluxo gênico e números efetivos de machos e fêmeas nos complexos populacionais (Sivasundar et al., 2001). Embora o avanço na obtenção de informações neste tipo de pesquisa que utiliza a genética molecular como ferramenta seja cada vez mais rápido, estudos populacionais em peixes

migradores neotropicais ainda são escassos. Devido a este fato, o processo migratório ainda não está totalmente esclarecido, faltando dados robustos sob o ponto de vista genético-populacional.

O estudo da genética de peixes é relevante em diversas situações, sobretudo em relação aos processos reprodutivos, tendo papel fundamental na conservação de populações selvagens onde pode ser avaliado o impacto determinado por mudanças no ambiente sobre as populações naturais de peixes (Purdom, 1993). Dentre os diversos marcadores moleculares existentes, os microssatélites, também chamados de SSR (Simple Sequence Repeats) apresentam uma série de características desejáveis em estudos genéticos por serem de característica codominante, ou seja, permitem a distinção entre indivíduos homozigotos e heterozigotos, o que os torna, portanto, altamente informativos (Powell, 1996). São multialélicos, devido ao processo recorrente de expansão e contração no número de unidades repetitivas ao longo das gerações, possibilitando a discriminação de indivíduos geneticamente distintos; podem ser amplificados via PCR, com a utilização de um par de iniciadores específicos, complementares às regiões flanqueadoras, o que facilita sua obtenção, mesmo com pouca quantidade de DNA; e uma vez desenvolvidos os iniciadores que amplificam tais regiões do genoma, estes podem ser compartilhados entre laboratórios para a realização de diversos estudos. Além disso, o resultado da amplificação via PCR revela polimorfismos resultantes da presença de diferentes números de elementos simples repetidos na região microssatélite (Grattapaglia e Kirst, 2007).

Entre os marcadores que têm por base as sequências genômicas, os genes mitocondriais são os mais comumente utilizados em estudos populacionais. O tamanho do genoma mitocondrial (DNAm_t) é bastante variável, apresentando valores em torno de 16 quilobases (kb) nos vertebrados até 570kb em algumas espécies de plantas (Lewin, 1994). Apresenta-se altamente conservado nos animais, variando de 14 a 26kb (Billington e Hebert, 1991), sendo representado por 2 genes que codificam RNAs ribossômicos (12S e 16S do rRNA), 22 genes que codificam RNAs transportadores (tRNA) e 13 genes que codificam proteínas

envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP. A molécula de DNAm_t possui uma região controle, de cerca de 1kb, que é rica em sequencias AT e desprovida de genes, embora exerça importante papel no início da replicação do DNAm_t e da transcrição do RNA. Esta região controle é conhecida como “D-loop” (displacement loop).

6. REPRODUÇÃO EM CATIVEIRO

A manutenção de espécimes em seu habitat natural é denominada de conservação *in situ*. Essa é, sem dúvidas, a melhor estratégia para a preservação da diversidade biológica, pelo fato de permitir a continuação dos processos evolutivos naturais e o ciclo de vida natural das espécies (Primack e Rodrigues, 2002). Contudo, a conservação *ex situ* é uma alternativa muito utilizada nos dias de hoje para a preservação de espécies ameaçadas de extinção, propiciando a criação de bancos genéticos para aquelas espécies que perderam seus habitats pela degradação ambiental (Degreef et al. 2002; Pompelli e Guerra, 2004).

Deve ser levado em consideração que peixes reofílicos, em sua maioria não se reproduzem naturalmente em cativeiro, sendo necessária a indução da reprodução com o uso de hormônios hipotalâmicos e gonadotróficos (Ninhaus-Silveira, 2007). Na reprodução de espécies em cativeiro, é viável empregar técnicas de reprodução assistida para o aumento do número de indivíduos, que poderão ser encaminhados para programas de reintrodução ou acréscimo de espécimes ao meio ambiente (Foose e Wiese, 2006).

Muito embora exista tecnologia de propagação artificial para diferentes espécies nativas e esta tecnologia vem sendo relativamente desenvolvida no Brasil, a concentração de estudos foca principalmente espécies com potencial para aquicultura, sendo escassas pesquisas voltadas para “conservação”. Nesse contexto é que se fundamenta o presente projeto, que tem por objetivo implementar e desenvolver estudos de genética populacional, fisiologia reprodutiva, e propor ações para recuperar e manter a espécie ameaçada na

Bacia do rio Piracanjuba, tributário da rio Paranaíba que será a área piloto do presente projeto.

7. OBJETIVOS

7.1 Objetivo geral

- Determinar a estrutura genética populacional de grupos selvagens de *Brycon orbignyianus*, a partir de amostras coletadas em diversos pontos da bacia do rio Piracanjuba, tributário do rio Paranaíba, para que possam servir de subsídio para a formulação de modelos de gestão, planejamento e conservação destas espécies. Além disso, formar um banco genético “ex situ” para a implementação de estudos da fisiologia reprodutiva em cativeiro para possível reforço de estoques.
- Mapear remanescentes de vegetação nativas localizadas em parte da bacia hidrográfica do rio Paranaíba e de alguns tributários, bem como de áreas marginais desprovidas de vegetação, estabelecendo nas mesmas, propostas-piloto de reconexão que propicie a constituição de corredores de biodiversidade.

7.2 Objetivos específicos

- Identificar pontos de coleta da Piracanjuba (*Brycon orbignyianus*) e outras espécies de peixes ameaçadas na bacia do rio Paranaíba;
- Realizar coleta de reprodutores e formação de banco genético das espécies coletadas;
- Realizar estudos genéticos populacionais;
- Realizar estudos reprodutivos, larvicultura, e soltura de juvenis;
- Mapear remanescentes de vegetação nativa em áreas marginais ao rio Paranaíba e de tributários;

- Mapear áreas desprovidas de vegetação e ou degradadas que sejam estratégicas para recuperação, propiciando um continuum vegetacional, constituindo corredores de biodiversidade em diferentes escalas e importância ecológica, e
- Estabelecer um programa de revegetação espontânea e ou induzida de áreas degradadas.

8. MATERIAL E MÉTODOS

8.1 Coleta

Os exemplares de *Brycon orbignyanus*, serão coletados na bacia do Paranaíba (figura 1) que é considerado área de reprodução e alimentação dessa espécie. Este ambiente constitui um interessante modelo das consequências de alterações ambientais das espécies estudadas neste projeto.

As amostragens serão realizadas na calha superior do rio e seus tributários, todos pertencentes à Bacia do rio Paranaíba, sendo que em todas as coletas serão tomados os devidos cuidados para a manutenção da integridade e sobrevivência dos peixes. Para as análises genéticas serão retiradas somente um pequeno fragmento da nadadeira adiposa, que serão armazenadas em tubos contendo álcool 95° para futuras análises em laboratório.

8.2 Formação do banco genético de reprodutores e Condições de Mantenedor

Após captura os peixes receberão uma injeção intramuscular de poli vitamínico e serão transportados inicialmente para o local do acampamento, permanecendo ali até o transporte para a piscicultura Água Viva, em Bela Vista de Goiás. O veículo para esse deslocamento será uma caminhonete, adaptada com uma caixa de transporte com capacidade de 500 litros, com suprimento de oxigênio. Na chegada a Piscicultura, os peixes serão marcados individualmente

com um microchip e mantidos em quarentena. Posteriormente, serão estocados em viveiros de criação, separados por local de captura.

Os peixes destinados ao banco genético e estudos biológicos, serão mantidos em 2 viveiros protegidos com tela contra predação, medindo 50mx20m, com profundidade média de 1,8 metros. Serão alimentados diariamente com ração balanceada segundo exigências da espécie, além de acompanhamento e controle da qualidade da água e exames parasitológicos.

8.3 Estudos genéticos

Na realização dos estudos populacionais, o DNA total será obtido a partir de amostras de fragmentos de nadadeiras dos indivíduos capturados em cada localidade, utilizando o kit de extração NucleoSpin® Tissue XS (USB/Affimetrix). Para as análises de microssatélites serão utilizados os loci, descritos na literatura para as espécies parentais.

Os produtos de PCR serão genotipados em sequenciador ABI 3130 (Applied Biosystems), segundo a metodologia proposta por Schuelke (2000). Para a análise de possíveis artefatos da genotipagem, como stuttering, dropout e alelos nulos será utilizado o programa Microchecker 2.2.1 (van Oosterhout et al. 2004). O software Fstat (Goudet, 1995) será utilizado para a determinação do número total de alelos (N_a), alelos privados (N_p) e para a exportação das matrizes utilizadas em outros programas. A riqueza alélica que permite normalizar o número de alelos para comparar amostras de tamanhos distintos será obtida usando o método de rarefação (Kalinowski, 2004) implementado no mesmo software. O programa Fstat será também utilizado para estimar heterozigosidade esperada (H_e), heterozigosidade observada (H_o) e a média do número de alelos por loco (A), que serão calculados para estimar a diversidade genética (Nei, 1987).

Os eventuais desvios do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) serão verificados por teste exato. A magnitude do sinal de desvios em cada loco será obtida através da estatística FIS. Estas análises serão realizadas utilizando o

software GENEPOP 4.2 (Rousset, 2008). Os valores de significância de testes múltiplos serão também ajustados considerando a correção de Bonferroni ($P = 0,05/\text{número de combinações}$).

Para a estimativa de diferenciação populacional, dois índices serão utilizados. Valores para o índice θ (Weir e Cockerham 1984), um análogo do FST de Wright (1951), serão estimados por alelo, por loco e valor total utilizando o programa Fstat (Goudet, 1995). Para estimar os valores de ρ , uma estimativa RST, o software utilizado será o Rstcalc (Goodman 1997). RST é um índice proposto por Slatkin (1995), também análogo ao FST de Wright, descrito especificamente para análises com microssatélites. Slatkin (1995) sugere que a utilização dos dois índices (θ e ρ) em conjunto pode fornecer mais informações para elucidar questões sobre diferenciação populacional.

O fluxo gênico entre as populações será estimado a partir de dois métodos: Nm e MR. Nm será calculado através da fórmula $FST = 1 / (1 + 4\alpha Nm)$. Nesta fórmula, FST é estimado a partir de θ (Weir e Cockerham, 1984) e $\alpha = (n / n - 1)^2$, onde n é o número de subpopulações. A partir do índice RST (Slatkin, 1995), o fluxo gênico será estimado também através da fórmula $MR = (ds - 1)(1 - RST) / (4dsRST)$, com ds sendo o número de subpopulações ou número de demes.

Para detectar possíveis sinais de seleção (ou desvios de neutralidade), o método estatístico utilizado será o de Beaumont e Nichols (1996). Este método fornece evidência para seleção divergente ou estabilizadora a partir de outliers com valores de FST mais elevados ou abaixo dos esperados, respectivamente, sob neutralidade. Os testes serão realizados utilizando os softwares Fdist (Beaumont e Nichols, 1996) e Bayescan (Foll e Gaggiotti, 2008) baseados em diferentes aproximações estatísticas.

Para a amplificação e sequenciamento da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) serão utilizados dois conjuntos de primers, sendo o primeiro (F-TTF:GCCTAAGAGCATCGGTCTTGTA e F-12R:GTCAGGACCATGCCTTTGTG) utilizado para as PCRs e o segundo conjunto (PDF2:TCTATGCAAAGATCCA ACTA, PDR2:

GTGGTTATTTAAGCAATGTC e PDR2-2:GAGAGTGTATGCACCTGAT) para o sequenciamento, conforme relatado no trabalho de Sivasundar et al. (2001).

Os segmentos de DNA amplificados nas reações de PCR serão visualizados em gel de agarose 0,8%. O DNA purificado será sequenciado com o kit BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems) ou outro similar. O DNA será sequenciado em um sequenciador automático de DNA modelo ABI 377 e as sequências de DNA obtidas serão alinhadas usando-se o editor ClustalW (Thompson et al., 1997) acoplado ao programa DAMBE (Xia e Xie, 2001).

Para inferir as relações entre os haplótipos serão utilizadas análises de máxima parcimônia (MP) com o programa PAUP* 4.0b10 (Swofford, 2002). Para construir as árvores de haplótipos (Network Design), com base na conexão de máxima parcimônia entre dois haplótipos, será utilizado o programa TCS ver. 1.06 (Clement et al., 2000).

Para a determinação do número de haplótipos e de sítios segregantes, frequência e diversidade de haplótipos, assim como valores de diversidade nucleotídica e haplotípico DNAmT será utilizado o programa DNAsp Sequence Polymorphism (Librando & Rozas et al. 2003). A matriz de distância genética e a árvore de haplótipos serão obtidas utilizando o programa MEGA 5.0 (Tamura et al. 2011). A rede de haplótipos será criada com critério de parcimônia estatística, calculada pelo algoritmo Median-Joining utilizando o programa Network 4.6 (Bandelt et al. 1999).

A Análise de Variância Molecular (AMOVA) a ser aplicada testa a heterogeneidade genética particionando a variância molecular em variância interpopulacional e variância intrapopulacional, de acordo com estruturas populacionais definidas a priori (Excoffier, 2010). O programa utilizado para esta análise, Arlequin 3.01, possui um algoritmo que, a partir de uma matriz de distância entre os haplótipos, calcula os valores estatísticos Φ , que são análogos às estatísticas F de Wright (Wright, 1951, 1965; Excoffier, 2010), sendo a significância estatística da FST determinada pelas permutações não-paramétricas, considerando-se 1000 permutações (Excoffier et al., 2005).

Os testes de neutralidade Tajima D (Tajima, 1989) e FS de Fu (Fu, 1996) serão realizados com o uso do programa Arlequin 3.01 para verificar a existência de desvio na hipótese nula de neutralidade nas sequências da região controle do DNAm (Excoffier et al. 2005). Estes testes foram desenvolvidos para verificar a ocorrência de seleção em regiões do genoma, sendo que se considerado um desvio significativo, é possível detectar expansão ou redução (bottleneck) populacional recente (Fu e Li, 1993; Tajima, 1996; Rand e Kann, 1998).

8.4 Reprodução

A seleção dos reprodutores marcados individualmente para formação de casais com vistas a garantir a conservação da variabilidade genética, será realizada pela observação de características morfológicas externas: fêmeas com o ventre abaulado, poro genital dilatado e avermelhado; nos machos, a liberação de sêmen após leve pressão do abdômen. Os reprodutores selecionados serão pesados e mantidos separados por sexo e espécie em 4 tanques retangulares com capacidade de 3.000 l, fluxo de água constante, vazão de 24 l/min, a uma temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$.

Para a indução à reprodução será utilizado o método de hipofisação desenvolvido por Von Ihering & Azevedo (1936) e modificado por Bernardino et al. (1993). As fêmeas receberão uma dose preparatória de 0,5 mg/kg de extrato bruto de hipófise de carpa (EBHC), e após 10 horas de intervalo, uma dose decisiva de 5,0 mg EBHC/kg, ambas as doses aplicadas intraperitonealmente. Similarmente, os machos receberão dose única de 1,0 a 2,0 mg EBHC/kg de peixe, administrado na mesma hora da segunda dose das fêmeas.

A extrusão dos ovócitos para algumas espécies será realizada manualmente, e a sua fertilização realizada pelo método a seco. O momento da desova será estimado pelo cálculo:

$$\text{Hora-grau} = \text{TD2} + tA$$

onde: TD2 é o tempo necessário para a desova a partir da administração da segunda dose de EBHC (h) e tA é a temperatura da água ($^\circ\text{C}$).

DOCUMENTO TÉCNICO:

Revisão nº 1 de 15/02/2019

CONTROLE:

Os embriões serão mantidos em incubadoras do tipo funil, confeccionadas em fibra de vidro, com capacidade de 60 ou 200 L, até a eclosão em uma densidade de 1000 a 1500 ovos/litro (Desarrollo, 1992), sendo que um quilo de ovos recém coletados possui em torno de 800 mil ovos (ALCÂNTARA and BERNARDINO, 1988). Nas incubadoras de 60 litros, o fluxo de água inicialmente utilizado será de 1,5 a 2,0 l/min, elevado gradativamente até no máximo 5,0 l/min, quando do enchimento da bexiga natatória. Para as de 200 litros, o fluxo utilizado será de 10 a 15 l/min. A eclosão dá-se de 17 a 19 horas após a fertilização. A absorção do saco vitelínico, o enchimento da bexiga natatória, a abertura da boca e do ânus, e o movimento natatório horizontal ocorrem entre 100 e 120 horas, isto é, do quarto para o quinto dia, dependendo da temperatura da água.

Em algumas situações, torna-se necessário efetuar tratamento para ovos e larvas, que consiste na aplicação de 7,5 ml de formaldeído/incubadora de 60 l, realizado após uma hora de incubação e depois, a cada 12 horas, podendo ser aplicado até cinco vezes. Será realizada a higienização das incubadoras, no mínimo uma vez ao dia, por meio de sifonagem, utilizando-se uma mangueira fina, tomando-se o devido cuidado para não retirar ovos e larvas saudáveis. Quando aptas, as larvas serão transferidas para viveiros previamente preparados, transportadas em sacos plásticos, colocando-se de 50 a 80 mil larvas em cada saco, contendo 10 a 15 litros de água e 15 a 20 l de oxigênio sob pressão (Woynarovich and Horváth, 1983).

Para indução à reprodução nas espécies de peixes que respondem à desova semi-artificial (indução hormonal sucedida de desova espontânea) serão utilizados por desova grupos de 3 machos e 3 fêmeas; será utilizada metodologia preconizada por Ceccarelli et al.(2005), Lopera-Barrero et al.(2007; 2008) em que, após a aplicação da segunda dosagem, machos e fêmeas serão colocados juntos em uma caixa circular, que simula o fenômeno natural da piracema (ambiente de correnteza), onde ocorrerá naturalmente a desova e a fecundação dos óvulos, e estes são conduzidos por gravidade para um conjunto de incubadoras.

Após a constatação da “desova”, será verificada, por pressão abdominal, se as fêmeas utilizadas desovaram completamente, a falta de saída de ovócitos indicará que ocorreu liberação total dos gametas. A sobrevivência dos reprodutores usados nos acasalamentos será quantificada, e os animais mortos serão substituídos por peixes de outras desovas.

Três dias depois da eclosão, 200 larvas serão coletadas de forma aleatória nas incubadoras, armazenadas em microtubos de 1,5 ml, contendo álcool etílico 100%, para análise genética e verificação do grau de endogamia (não previstas nesse projeto).

Após a absorção do saco vitelínico, as larvas serão criadas conforme protocolo usual para cada espécie, utilizando as técnicas descritas em nossos prévios trabalhos (Senhorini et al., 1998; Senhorini et al., 2002; Ceccarelli et al., 2005).

Estatística

Os dados serão apresentados como médias \pm erro-padrão. As médias serão resultantes de pelo menos três repetições, proveniente de desovas diferentes. Os dados serão verificados para a distribuição normal utilizando-se o teste de normalidade de Liliefors e, se apropriado, será então sucedida de ANOVA e teste de Newman-Keuls para a comparação múltipla entre as médias.

9. CORREDORES DE BIODIVERSIDADES

Cursos d'águas e vegetação têm relações intrínsecas. Desenvolver ações que busquem paralisar a perda de espécies que tem a água como habitat e especialmente no resgate do que já foi perdido, como as espécies de peixes no presente projeto, requer lançar sobre o ambiente uma visão holística e integradora. As vegetações ciliares e periféricas ao longo dos cursos d'águas colaboram para uma série de serviços ambientais, neutralizar ou reduzir o ritmo de assoreamento é uma delas. Entretanto a relação entre vegetação e água é retroalimentada. Estudos recentes comprovam que até 25% da vegetação ciliar

DOCUMENTO TÉCNICO:

Revisão nº 1 de 15/02/2019

CONTROLE:

ocorre devido a dispersão de sementes realizadas por peixes (Ciência Hoje, 2018).

Corredores ecológicos, ou de biodiversidade como também são denominadas trechos de vegetação que conectam áreas preservadas por força de lei, como Unidades de Conservação e Áreas de Reserva Legal, são importantes mecanismos de qualificação ambiental. O rio Piracanjuba (figura X), um dos tributários do rio Paranaíba, apresenta-se como um bom estudo de caso (área piloto) para a viabilização da implantação de um corredor ecológico. Ao longo do curso desse rio ou de seus pequenos tributários identifica-se preliminarmente a existência duas UCs estaduais: Parque da Mata Atlântica e Parque da Serra de Caldas e uma UC municipal: Parque das Orquídeas (Piracanjuba). Estas UCs por si só já justificam esforços públicos e privados na constituição de um corredor ecológico.

Além deste aspecto, a pré existência de UCs e remanescentes de áreas nativas, constatadas em observações superficiais via imagens de satélites disponíveis no sistema Google Earth, o rio Piracanjuba, que empresta o nome de uma das espécies de peixes ameaçados de extinção, a *Brycon orbignyanus*, é um dos raros tributários da bacia hidrográfica do rio Paranaíba isento até o presente momento, da interferências de represamento em seu curso, situação que tende a assim permanecer visto que, para o mesmo não há previsão de “aproveitamento hidrelétrico” (PRH Paranaíba, ANA, fls 86).

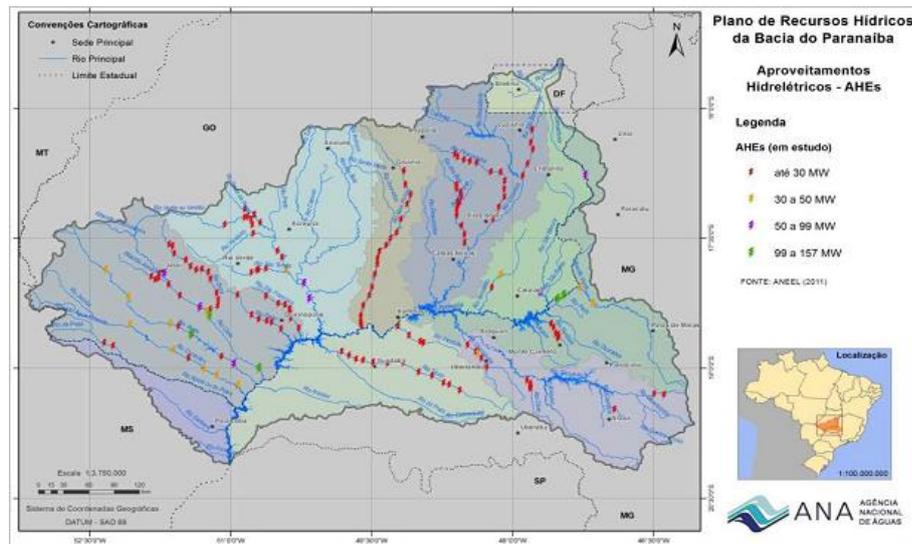


Figura 2 - Plano de Recursos hídricos da Bacia do Paranaíba.

Aspectos legais são importantes incrementos numa estratégia de conservação, especialmente no que se refere à implantação de corredores ecológicos aos moldes do aqui proposto. A constituição, manutenção ou recuperação de Áreas de Reserva Legal e de Áreas de Preservação Permanente exigidas pelo Código Florestal (Brasil, 2012), são obrigações legais que podem, em ações articuladas entre proprietários; sindicatos rurais; prefeituras e ministério público, se configurarem como corredores ecológicos altamente efetivos na requalificação ambiental, contribuindo para a sustentabilidade do que se almeja no resgate de espécies de peixes ameaçadas de extinção e mesmo no reforço de estoque das outras espécies de peixes nativos, com impacto positivo para toda a biodiversidade local e regional a custo financeiro extremamente baixo.

9.1 Corredores de biodiversidades: Objetivos específicos

- **Etapa I (1º. Ano) – Caracterização**

1. Mapear remanescentes de vegetação nativa, de 10 há ou mais, ao longo da bacia hidrográfica do rio Piracanjuba;

2. Classificar remanescentes por categoria legal: Unidades de Conservação; Reservas Legais (cruzando coordenadas geográficas com o CAR);
3. Identificar áreas estratégicas para a recomposição da conectividade dos remanescentes;
4. Identificar e articular uma rede de atores públicos e privados que possam contribuir direta ou indiretamente, com ou sem aporte financeiro, para a consecução dos objetivos do projeto (Prefeituras; MPE; universidades; empresas públicas e privadas);
5. Subsidiar os órgãos ambientais com as informações levantadas sobre a situação de conservação das APPs e RLs ao longo do Rio;
6. Definir áreas (trechos do rio) para monitoramento das espécies foco de resgate em longo-prazo (áreas com potencial de soltura e recaptura das espécies em estudo);
7. Elaborar e executar um programa de monitoramento em longo prazo, das espécies foco de resgate;

- **Etapa II (2º. Ano)**

8. Fomentar a criação de uma rede de Reserva Particular do Patrimônio Natural – RPPN junto a detentores de remanescentes de vegetação nativa mapeadas;
9. Conhecer o uso do Rio pelas espécies-alvos considerando-se as diferentes características e composições ao longo de seu curso;
10. Levantar informações sobre a influência da dinâmica das águas (cheia e seca) na movimentação e sobrevivências das espécies alvo do estudo;

11. Monitorar, via entrevistas com ribeirinhos e pescadores e esforços pontuais de capturas e recapturas, ocorrência e eventual migração das espécies em estudos, ao longo do corredor Piracanjuba e principais tributários;
12. Elaborar e executar ações de informação e conscientização visando a conservação e proteção das espécies monitoradas;
13. Conhecer e diagnosticar a percepção da comunidade regional em relação à constituição e conservação do corredor de biodiversidade do Rio Piracanjuba.

- **Etapa III (3º. Ano)**

14. MONITORAMENTO E AJUSTES DAS ETAPAS I E II

METODOLOGIA

Para a consecução das atividades, trechos do Rio Paranaíba e tributários pilotos serão percorridos por meio de barcos a motor, canoa a remo ou caiaque. Via terrestre, serão utilizados carros de passeio, camionetes 4 x 4 e/ou van, dependendo das demandas e dificuldades de acessos.

Conforme a evolução do projeto e de parcerias a serem firmadas com outros patrocinadores e instituições de pesquisas, armadilhas-fotográficas serão instaladas em pontos específicos, pré-selecionados, com o objetivo de detectar, registrar e monitorar a fauna.

- **Etapa I – (primeiro ano)**

1. Mapear remanescentes de hábitat nativo ao longo do corredor;

O mapeamento de remanescentes de vegetação nativa será realizado através de informações geográficas com ferramentas SIG. Nesta etapa de

diagnóstico, serão utilizadas imagens de satélite com as quais serão gerados mapas de uso do solo atualizados para delimitar e caracterizar a vegetação nativa remanescente na área de abrangência do Corredor. Ferramentas de SIG serão a base para a execução dessa atividade.

Uma análise a posteriori permitirá caracterizar e diagnosticar os remanescentes de acordo com as importâncias estratégicas de cada fragmento mapeado (exemplo: tamanho e localização). Os resultados dessa análise também permitirão identificar áreas de “lacunas” estratégicas para a recomposição da conectividade desses remanescentes.

2. Identificar áreas estratégicas para a recomposição da conectividade de habitats com base em remanescentes de vegetação;

As áreas serão identificadas após o mapeamento de remanescentes de vegetação nativa utilizando-se informações geográficas com ferramentas SIG associadas às declarações contidas no Cadastro Ambiental Rural – CAR.

3. Mapear e avaliar as condições das APPs ao longo do Rio;

Ao longo dos trechos do rio Paranaíba e tributários priorizados para constituírem corredores de biodiversidade, serão levantadas informações a respeito de: impactos antrópicos (áreas sem APP, ocorrência de erosões, presença de casas, ranchos, pesqueiros, pontes, aguadas de gado, dragas de mineração, áreas de lavoura, áreas de pasto) e outras atividades econômicas e ou de lazer. Todas as informações serão registradas por meio de GPS.

4. Subsidiar os órgãos ambientais e MPE com as informações levantadas sobre a situação de conservação das APPs e RL's ao longo dos rios e articular junto aos mesmos, apoio material e financeiro para maior alcance do projeto;

Este subsídio visará possibilitar a articulação de acordos entre os proprietários e o poder público sobre conservação de remanescentes de

DOCUMENTO TÉCNICO:

Revisão nº 1 de 15/02/2019

CONTROLE:

vegetação nativa e ou reconstituição de áreas a serem revegetadas ou relocação dessas em benefício das conexões de ambientes pretendidas no âmbito do projeto bem como a criação de RPPNs. A identificação de outras linhas de financiamento a fundo perdido e outras formas de apoio material ou logístico serão constantemente buscadas na execução do projeto.

DOCUMENTO TÉCNICO:

Revisão nº 1 de 15/02/2019

CONTROLE:

10. CRONOGRAMA DE EXECUÇÃO

10.1 Etapa I (1º Ano)

ATIVIDADES	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Aprovação do Projeto ENEL	X											
Submissão do Projeto ao IBAMA	X	X										
Submissão do Projeto ao SISBIO	X	X										
Contratações	X	X	X									
Mapeamentos		X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Articulações e Mobilizações	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração do Programa de Monitoriamento						X	X	X	X	X	X	X
Elaboração de Relatórios			X			X			X			X

10.2 Etapa II (2º Ano)

ATIVIDADES	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Identificação dos pontos de coletas da Ictiofauna	X	X	X	X	X	X	X					
Coleta de Matrizes	X	X	X	X	X	X	X					
Análise Genética				X	X	X	X					
Reprodução					X	X	X	X	X	X	X	X
Larvicultura					X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração de Relatórios			X			X			X			X

10.3 Etapa III (3º Ano)

ATIVIDADES	MESES											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Reprodução	X	X	X	X	X	X	X					
Larvicultura			X	X	X	X	X					
Peixamento				X	X	X	X					
Monitoramento	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Elaboração de Relatórios			X			X			X			X
Publicação dos Trabalhos	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

11. REFERÊNCIAS

ABREU, M.M.; PEREIRA, L.H.G; VILA, V.B.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C. **Genetic variability of two populations of *Pseudoplatystoma reticulatum* from the Upper Paraguayan River Basin: Genetics and Molecular Biology.** p. 868-873, 2009.

AGOSTINHO, A. A.; GOMES, L. C.; PELICICE, F. M. (2007) Ecologia e manejo de recurso pesqueiro em reservatórios do Brasil. Maringá: Eduem.

Bandelt, H.J., Forster, P., Röhl, A. (1999) Median-joining networks for inferring intraspecific phylogenies. *Molecular Biology and Evolution.*; 16: 37-48.

AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS (Brasil). **Plano de recursos hídricos e do enquadramento dos corpos hídricos superficiais da bacia hidrográfica do rio Paranaíba** / Agência Nacional de Águas. Brasília, 2015.

BEAUMONT, M.A., NICHOLS, R.A. **Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. Proceedings of the Royal Society Lond.** p. 1619–1626, 1996.

BILLINGTON, N.; HEBERT, P. **Mitochondrial DNA diversity in fishes and its implications for introductions.** p. 80-94, 1991.

Brasil. **LEI Nº 12.727, DE 17 DE OUTUBRO DE 2012. (Código Florestal)**

CARVALHO C.; L.F.; HATANAKA, T.; GALETTI, P.M. **Evidence of lack of population substructuring in the Brazilian freshwater fish *Prochilodus costatus*.** *Genetics and Molecular Biology.* p. 377-380, 2008.

CECCARELLI, P.S., J.A. SENHORINI; R.F. REGO. **Piracanjuba, *Brycon orbignyanus*** .p. 121-147, 1849.

B BALDISSEROTTO Y L.C. GOMES. **Espécies Nativas para Piscicultura no Brasil.** Editora da Universidade Federal de Santa Maria. Santa Maria, Brasil. 2005.

Decreto Estadual/SP nº 60.133/2014, de 07/02/2014, publicado no Diário Oficial do Estado de São Paulo em 08/02/2014.

DEGREEF, J.; ROCHA, O. J.; VANDERBORGHT, T.; BAUDOIN. J. P. **Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of Lima Bean (*Fabaceae*): Considerations for in situ and ex situ conservation.** *American Journal of Botany.* p. 1644–1650, 2002.

EXCOFFIER, L. **An Integrated Software Package for Population Genetics Data Analysis**. p. 1–140, 2010.

FOOSE, T. J.; WIESE, R. J. **Population management of rhinoceros in captivity**. *International Zoo Yearbook*. v. 40, p. 174-196, 2006.

GREGOR K. et al. **Flagship umbrella species needed for the conservation of overlooked aquatic biodiversity**. *Conservation Biology*, Volume 31, No. 2, 2017.

GOUDET, J. **A Computer Program to Calculate F-Statistics**. *Journal of Hereditary*. p. 485-486, 1995.

GRATTAPAGLIA, D.; KIRST, M. **Eucalyptus applied genomics: from gene sequences to breeding tools**. 2007.

GUO, S.; THOMSON, E. **Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles**. p. 1933-1940, 1992.

HYLSLOP, E.J.. **Stomach contents analysis a review of methods and heir application** . *J. Fish. Biol.*, v 17, p 411-25, 1980.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA (IBGE). **Folhas topográficas**. São Paulo, 1972.

IBAMA. **Corredores ecológicos: uma abordagem integradora de ecossistemas no Brasil** / Moacir Bueno Arruda, Luís Fernando S. Nogueira de Sá (organizadores). – Brasília: Ibama, p. 220, 2003.

IYENGAR, A., PIYAPATTANAKORN, S.; HEIPEL, D.A.; STONE, D.M.; HOWELL, B.R.; CHILD, A.R.; MACLEAN, N. **A suite of highly polymorphic microsatellite markers in turbot (*Scophthalmus maximus L.*) with potential for use across several flatfish species**. p. 365-378, 2000.

JEZIERSKA B; LUGOWSKA K; WITESKA M; SARNOWSKI, P. **Malformations of newly hatched common carp larvae**. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities, Fisheries*, v.3, n.2. .2000.

JUNK, W. J. Wetlands of tropical South America. In: D.F. Whigham, S., Hejny, Dykyjova, D. **Wetlands of the World**. **Kluwer Publishers, The Netherlands**. p. 679-739, 1993.

LEE, W.J.; KOCHER, T.D. **Microsatellite DNA markers for genetic mapping in *Oreochromis niloticus***. *Journal of Fish Biology*. p.169-171, 1996.

Ministério do Meio Ambiente, **Lista Nacional Oficial de Espécies da Fauna Ameaçadas de Extinção - Peixes e Invertebrados Aquáticos**. Disponível em: >http://www.icmbio.gov.br/portal/images/stories/biodiversidade/fauna-brasileira/avaliacao-do-risco/PORTARIA_N%C2%BA_445_DE_17_DE_DEZEMBRO_DE_2014.pdf< acessado em 05/11/2018.

LIBRADO, P., & ROZAS, J. **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data**. Bioinformatics. p. 1451–1452, 2009.

OKE, C.S.; CROZIER, Y.C.; CROZIER, R.H.; WARD, R.D. **Microsatellites from a teleost, orange roughy (*Hoplostethus atlanticus*), and their potential for determining population structure**. p. 2141-2152, 1999.

PALOHEIMO, J.E. **Indices of food type preference by a predator**. J. Fish Res Board Can., v. 36, p.470-73, 1979.

Pereira, L.H.G.; Foresti, F.; Oliveira, C. **Genetic structure of the migratory catfish *Pseudoplatystoma corruscans* (Siluriformes: Pimelodidae) suggest homing behavior**. Ecology of Freshwater Fish. p. 215-225, 2009.

Plano de Ação Nacional para a Conservação das Espécies da Fauna Aquática Ameaçadas de Extinção do Ecosistema Mogi/Pardo/Sapucai-Mirim/Grande, disponibilizado em ><http://www.icmbio.gov.br/portal/biodiversidade/fauna-brasileira/plano-de-acao/1345-plano-de-acao-nacional-para-conservacao-do-mogi-pardo-e-grande.html><

Portaria MMA nº 445/2014, de 17/12/2014, publicada no Diário Oficial da União de 18/12/2014, Seção 1, p.126-130.

POWELL W., MORGANTE M., ANDRE C., HANAFEY M., VOGEL J., TINGEY S., RAFALSKI A. **The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis**. p. 225-238, 1996.

PRIMACK, R. B.; RODRIGUES, E. **Biologia da conservação**. Londrina. p. 327, 2002.

PURDOM, C.E. **Genetics and Fish breeding**. Chapman and Hall editors. London. 1993.

RAND, D.M., KANN, L.M. **Mutation and selection at silent and replacement sites in the evolution of animal mitochondrial DNA**. p. 393-407, 1998.

Revista Ciência Hoje: **Peixes ajudam na dispersão de sementes**. Edição 346, agosto de 2018. Disponível em: ><http://cienciahoje.org.br/peixes-ajudam-na-dispersao-de-sementes/>< Acessado em 10.09.2018

Revista (O)eco: **O que é uma espécie bandeira**. Disponível em: ><https://www.oeco.org.br/dicionario-ambiental/28190-o-que-e-uma-especie-bandeira/>< Acessado em 05.11.2018

ROUSSET, F. **Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux**. Molecular Ecology Resources. p. 103-106, 2008

SANCHES, A; GALETTI JR, P.M.; GALZERANI, F., DERAZO, J.; CUTILAK-BIANCHI, B.; HATANAKA, T. **Genetic population structure of two migratory freshwater fish species (*Brycon orthotaenia* and *Prochilodus argenteus*) from the São Francisco River in Brazil and its significance for conservation**. p. 177-186, 2012.

SCHUELKE, M. **An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments**. Nature Biotechnology. p. 233–234, 2000.

SENHORINI, J. A.; GASPAR, L. A.; FRANSOZO, A. **Crescimento, sobrevivência e preferência alimentar de larvas de matrinxã (*Brycon cephalus*) e de piracanjuba (*Brycon orbignyanus*) em viveiros**. Boletim Técnico do CEPTA, Pirassununga, SP, v. 15, p. 9-21, 2002.

SENHORINI, J.A. **Desenvolvimento larval do pacu, *Piaractus mesopotamicus*, Holmberg 1887 (Pisces characidae) em viveiros**. Botucatu. p. 112, 1995.

SHIKANO, T.; TANIGUCHI, N. **Heterosis for neonatal survival in the guppy**. J. Fish Biol. p. 715-725, 2002.

SIEGEL, S. **Nonparametric statistics for the behavioral sciences**. New York: McGraw-Hill, p. 321, 1956.

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

SLATKIN M. **A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies**. p. 139:457–462, 1995.

STEEL, R.G.D., TORRIE, D.H. **Principles and procedures of statistica**. p. 633, 1984.

SWOFFORD, D. L. **Phylogenetic Analysis Using Parsimony**. 1993.

TAJIMA F. **The amount of DNA polymorphism maintained in a finite population when the neutral mutation rate varies among sites.** p. 1457-1465, 1996.

TAJIMA, F. **Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism.** p. 585-595, 1989.

TAMURA K, PETERSON D, PETERSON N, STECHER G, NEI M, AND KUMAR S. **Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods.** p. 2731-2739, 2011.

Thompson, J. D.; Gibson, T.J.; Plewniak, F.; Jeanmougin, F.; Higgins, D. G. (1997) The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res*, 24: 4876-4882.

Van Oosterhout, C., Hutchinson, W. F., Wills, D. P. M., & Shipley, P. (2004). MICRO-CHECKER: Software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data. *Molecular Ecology Notes*, 4(3), 535–538. doi:10.1111/j.1471-8286.2004.00684.x

Wirth, T.; Saint-Laurent, R.; Bernatchez, L. (1999) Isolation and characterization of microsatellite loci in the walleye (*Stizostedion vitreum*), and cross-species amplification within the family Percidae. *Mol. Ecol.* 8: 1957-1969