

a) Título do Projeto: Variabilidade genética e distribuição geográfica da piramutaba – *Brachyplatystoma vaillantii* (valenciennes, 1840) (siluriformes:pimelodidae) na Amazônia brasileira e peruana

b) Tipo de bolsa solicitada: Doutorado

c) Instituição de ensino/programa: Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia – INPA/Programa Pós-Graduação em Genética, Conservação e Biologia Evolutiva – GCBEV

d) Nome do Aluno:

– Nome: Kyara Martins Formiga; Titulação: Mestrado

– Currículo Lattes:

– Endereço profissional:

e) Orientador do Projeto:

– Nome: Jacqueline da Silva Batista; Titulação: Pós-Doutorado

– Currículo Lattes:

– Endereço profissional:

f) Detalhamento do Projeto:

– **Introdução e justificativa:** Conhecida também como, pira-botão, piaba e mulher ingrata, a piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) (Siluriformes: Pimelodidae), é o recurso pesqueiro da referida Ordem mais abundante do estuário amazônico (responsável por 77% da captura total) e um dos mais importantes da bacia amazônica (Barthem e Goulding, 2007). De acordo com Ruffino e Isaac (2000), a piramutaba pode ser classificada como sazonal, cujo comportamento migratório tem como objetivo adaptar seu ciclo de vida à dinâmica do meio ambiente (Winemiller, 1989). Em paralelo a sua migração e, provavelmente como consequência desta, a piramutaba é pescada de diferentes formas ao longo da bacia amazônica sendo alvo da frota de pesca artesanal ao longo do rio Solimões-Amazonas, e dos barcos de pesca industrial no estuário (Isaac *et al.*, 1996; Barthem e Goulding, 1997; Fabré *et al.*, 2000; Isaac *et al.*, 2000; Araujo-Lima e Ruffino, 2003; Frédou *et al.*, 2010; Agudelo *et al.*, 2011; Almeida *et al.*, 2012).

Com base na revisão das evidências de desembarque de pesca e complementado por análises de amostras obtidas em rios da bacia amazônica, Barthem&Goulding (1997, 2007) estabeleceram um modelo de migração para a piramutaba no qual cabeceiras de afluentes do rio Solimões representa a principal área de desova da piramutaba; o estuário, área com maior produção primária, corresponde à área de criação; e a calha do sistema Estuário-Amazonas-Solimões (EAS), pelo fato de apresentar uma maior biomassa de peixes, serve de habitat de alimentação dos pré-adultos e adultos (Figura 01).



Figura 01. Hipótese Migratória da Piramutaba na Bacia amazônica. Fonte: Barthem e Goulding (2007).

Desde 1977, ano em que a pescaria obteve o máximo de piramutabas (34.700 ton.), a captura vem sofrendo um decréscimo, com uma grande queda em 1992, com captura menor que a metade do ocorrido em 1977 (6.900 ton.). Mesmo com produções menores, a exploração da piramutaba pelas frotas pesqueiras, principalmente a industrial, continua intensa e atualmente sabe-se que esta espécie encontra-se em sobrepesca de crescimento (Barthem e Goulding, 1997; SANYO, 1998; Chaves *et al.*, 2003; Alonso e Pirker, 2005; Jimenez *et al.*, 2013; ICMBio, 2016) (Figura 02).

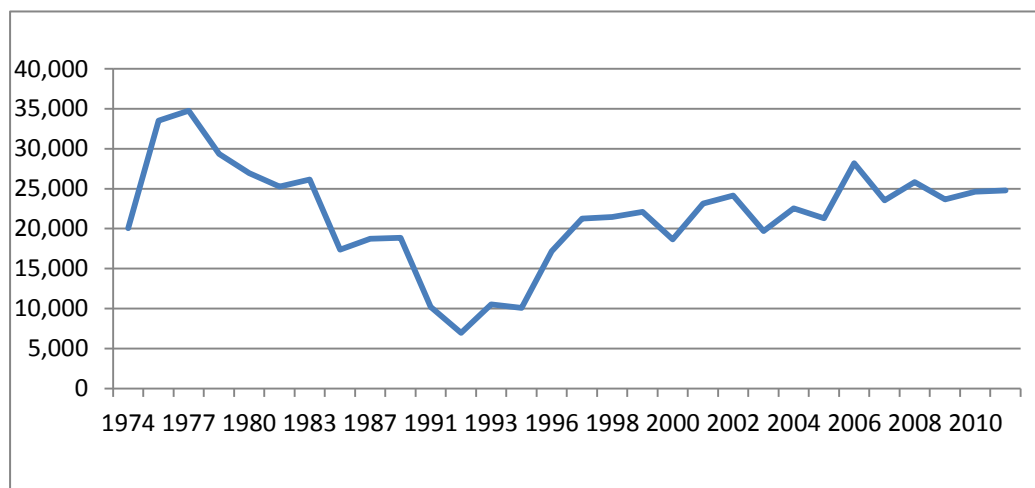


Figura 02. Desembarque de piramutaba na região norte. Fonte: ICMBio (2016).

Para a identificação de estoques pesqueiros, os marcadores moleculares tem sido cada vez mais utilizados, principalmente região controle e microssatélites, como ferramenta de caracterização genética, além da estimativa da variabilidade e estrutura genética de populações de peixes, sendo subsídios para implementação de estratégias de conservação e manejo dos recursos pesqueiros na Amazônia. Esses marcadores são mais utilizados devido ao seu alto conteúdo informativo e acessibilidade, sendo os

marcadores moleculares microssatélites preferenciais na obtenção de informação para conservação e manejo dos mais variados organismos.

Atualmente encontram-se disponíveis 37 marcadores microssatélites específicos para *B. vaillantii* e o grupo de pesquisa em Biologia Evolutiva de Peixes possui uma ampla amostragem para a espécie incluindo o rio Solimões-Amazonas e quatro tributários desse rio: rio Içá, rio Japurá, rio Madeira e rio Tapajós, dos quais apenas o rio Madeira consta na distribuição geográfica postulada por Barthem e Goulding (2007). Cordoba *et al.* (2000), em um estudo de recursos pesqueiros da amazônia colombiana, indicaram que a piramutaba nesta região representa cerca de 5% do total de bagres comercializados nos anos de 1996 e 1997 nos municípios de Puerto Leguizamo (rio Putumayo/Içá), Araracuara e La Pedrera (rio Caquetá/Japurá).

Assim como foi feito para *B. rousseauxii* (Batista, 2010), *B. capapretum* (Lira-Cordeiro, 2013), *B. filamentosum* (Huergo, 2009; Huergo et al, 2011; Neves-Brasil, 2016) e para *B. Platynemum* (Ochoa *et al.*, 2015), é possível se testar a hipótese migratória de *B. vaillantii* sob o ponto de vista genético, em uma abrangência geográfica mais próxima possível da área de migração da piramutaba na Amazônia. a partir do sequenciamento da RC do DNA mitocondrial e da genotipagem de pelo menos 15 locos microssatélites.

Ainda que se tenha realizado trabalhos sob o ponto genético (Marão-Siqueira, 2003; Rodrigues, 2009; Carvalho, 2015; Rocha, 2015), alguns aspectos da migração da espécie não estão completamente esclarecidos, como por exemplo o rio Madeira ser o único tributário utilizado para migração (Barthem e Goulding, 2007). A hipótese migratória de *B. vaillantii* em sua maior parte foi estabelecida em função das informações oriundas da pesca sobre esta espécie, porém, em se tratando da pesca artesanal, os apetrechos de pesca são seletivos e a medida que uma espécie diminui seu estoque, outras espécies que exigem menor esforço de pesca tornam-se mais interessantes e vulneráveis de serem pescadas. Além disso, podem ocorrer divergências entre os dados de desembarque pesqueiro e o que de fato é pescado. Assim a pesca nem sempre captura a espécie em toda a sua completa área de distribuição.

Segundo Barthem e Goulding (2007), atualmente os rios Juruá e Purus não fazem parte da área de migração da piramutaba. Porém dados de desembarque pesqueiro indicam capturas desta espécie entre os anos de 1975 e 1977 no estado do Acre, o qual corresponde à área do alto Purus e alto Juruá (SUDEPE, 1975, 1979a, b). Almeida et al. (2012) apresentaram uma caracterização da pesca no alto rio Purus em 2004 em três municípios [Manoel Urbano (AC), Sena Madureira (AC) e Boca do Acre (AM)], no qual foi verificado, embora em um pequeno percentual, o desembarque de piramutaba nestes municípios. Neste contexto não se sabe ao certo se a piramutaba realmente não entra nestes rios ou se a pesca deixou de capturá-la em função da diminuição do estoque pesqueiro da espécie.

De acordo com as características físico-químicas (ânions, condutividade elétrica, pH, Nitrogênio total, Fósforo total e volume de sedimentos em suspensão), os rios, Içá, Japurá, Juruá e Purus são classificados como rios de águas brancas, assim como o rio Madeira, possuindo estes parâmetros bem semelhantes (Ríos-Villamizar et al., 2014). Ademais, não ocorreram alterações geográficas e/ou antrópicas que possam impedir

a entrada de *B. vaillantii* nestes rios visto que, como apresentado anteriormente, nosso grupo de pesquisa obteve amostras dos rios Japurá e Içá, além de se ter registros de desembarque pesqueiro em anos anteriores a 2000 em três destes tributários citados.

Levando-se em consideração as hidroelétricas já instaladas no rio Madeira, com impactos tanto para o rio quanto para a espécie, uma vez seja detectada a ocorrência da piramutaba nos rios Juruá e Purus, estes podem ser incluídos também como parte da de sua rota migração. Neste contexto, é crucial a conservação destes tributários, visto que nos dois rios já existem unidades de conservação (UC) estabelecidas e poderia estar sendo melhor investigada. Além disso, as áreas do alto Juruá e alto Purus estão localizadas no Estado do Acre que é um Estado cujas leis de defeso incluem espécies de bagres há mais tempo de que o Amazonas pois somente em 2015 incluíram no defeso os bagres surubim, caparari e mapará. Desta forma, é necessário porém a confirmação deste cenário para *B. vaillantii*. O uso da metodologia do DNA ambiental pode elucidar esta questão e, uma vez desenvolvido para rios de água branca como o Purus e o Juruá, será uma excelente ferramenta de monitoramento da piramutaba no rio Solimões-Amazonas e seus tributários além da região do estuário amazônico que é a área onde a piramutaba é mais explorada pela pesca.

Assim, utilizando marcadores mitocondriais (região controle) e locos microsatélites, este projeto se propõe a estimar os níveis de variabilidade genética, fluxo gênico e verificar se a espécie compõe um único estoque genético, considerando a maior área geográfica de distribuição possível, testando assim a hipótese migratória de Barthem e Goulding (1997). Já com o uso do DNA ambiental, será possível detectar pioneiramente, se a distribuição geográfica atual da piramutaba inclui os rios Juruá e Purus.

– **Objetivo geral e objetivos específicos:**

Objetivo Geral – Estimar a variabilidade genética da piramutaba (*Brachyplatystoma vaillantii*) na amazônia brasileira, por meio de marcadores moleculares de DNA mitocondrial (região controle) e microsatélites e, com o uso da metodologia do DNA ambiental, verificar a presença da espécie em tributários de água branca sem evidências de desembarque pesqueiro.

Objetivos específicos – 1) Verificar se *Brachyplatystoma vaillantii* corresponde a uma única população panmítica geneticamente homogênea na área amostrada por meio de marcador molecular mitocondrial (região controle) e microsatélites; 2) Desenvolver a metodologia do DNA ambiental para *B. vaillantii*; 3) Detectar a presença de *B. vaillantii* nos rios Juruá e Purus por meio da metodologia de DNA ambiental.

– **Metodologia a ser utilizada:**

1) Coleta de amostras – As amostras de piramutaba a serem estudadas foram coletadas pelo projeto Pirada (Genética dos grandes bagres da amazônia), com as autorizações de coleta de número 130 e 14278-1 do IBAMA, ao longo de 22 localidades na Amazônia (Figua 03), agrupadas em nove macrorregiões para se realizar o estudo populacional conforme tabela 01. As amostras encontram-se disponíveis na Coleção de Recursos Genéticos do INPA.

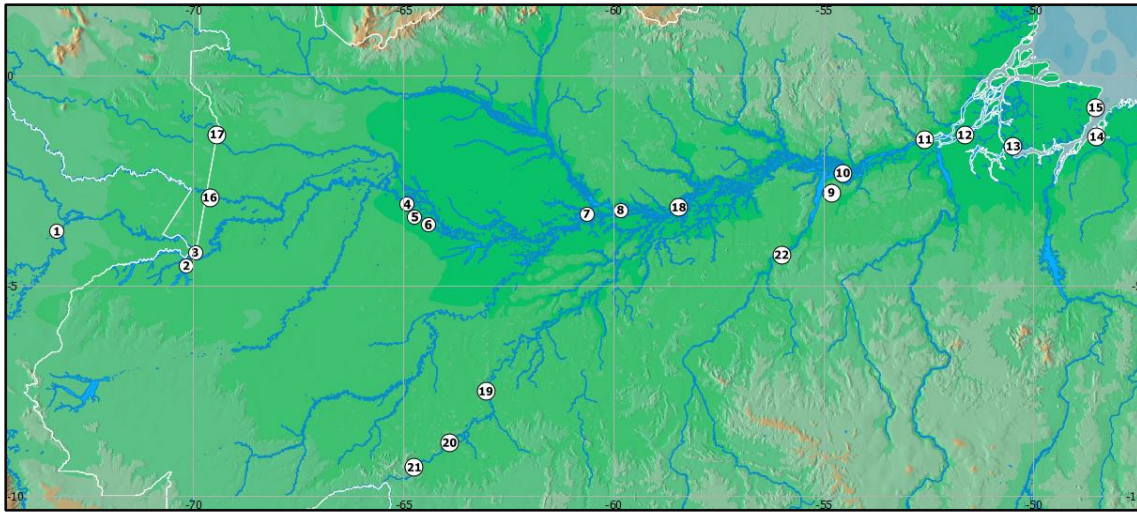


Figura 03. Amostragem de *Brachyplatystoma vaillantii*. Localidades: **Sistema Estuário-Amazonas-Solimões:** Alto Solimões (1- Iquitos/Peru, 2- Benjamin Constant/AM, 3-Tabatinga/AM), **Tefé/AM** (4-lago Mucura, 5-Tefé, 6-Vila Nova), **Manaus/AM** (7- Manacapuru, 8-Careiro da Várzea), **Santarém/PA** (9-Santarem, 10-Tapara) e **Estuário** (11-Almerim/PA, 12-Gurupa/PA, 13- Breves/PA, 14-Belém/PA, 15-Salvaterra/PA). **Afluentes Margem Esquerda:** rio Içá (16-Vila Ipiranga/AM) e rio Japurá (17- Vila Bitencourt/AM). **Afluentes Margem Direita:** rio Madeira (18- Itacoatiara/AM, 19-Humaitá/AM, 20-Porto Velho/RO, 21- Cachoeira do Jirau) e rio Tapajós (22-Itaituba/PA).

Algumas destas localidades porém necessitam de mais coletas para completar o tamanho amostral de 30 indivíduos por macrorregião as quais correspondem á: Eirunepé (rio Juruá), Lábrea (rio Purus) e Itaituba (rio Tapajós). As atividades laboratoriais de biologia molecular serão realizados no Laboratório Temático de Biologia Molecular do INPA (LTBM/INPA).

MacroRegião	No. no Mapa	local pesca	Coordenadas
Alto Solimões	1	Iquitos	3°42'33''S e 73°14'14''W
	2	Benjamim Constant/AM	4°22'56,7''S e 69°59'13,7''W
	3	Tabatinga/AM	4°21'03''S e 69°43'25''W
Tefé	4	Lago Mucura	3°07'30''S e 64°52'30''W
	5	Tefé/AM	3°21'27,0''S e 64°40'21,0''W
	6	Vila Nova/AM	3°25'57''S e 64°29'39''W
Manaus	7	Manacapuru/AM	3°20'56''S e 60°17'44''W
	8	Careiro da Varzea/AM	3°09'59''S e 59°43'00''W
Santarem	9	Santarém/PA	02°26'35''S e 54°42'30''W
	10	Tapará/PA	2°19'02,7''S e 54°31'54,7''W
Estuário	11	Almerim/PA	1°31'24''S e 52°34'54''W
	12	Gurupá/PA	01°24'19''S e 51°38'25''W
	13	Breves/PA	01°40'55''S e 50°28'48''W
	14	Belém/PA	01°27'21''S e 48°30'14''W
	15	Salvaterra/PA	00°45'10''S e 48°31'01''W
Rio Içá	16	Vila Ipiranga/AM	02°55'48''S e 69°41'43''W
Rio Japurá	17	Vila Bitencourt/AM	1°23'52,80''S e 69°25'30,20''W
Rio Madeira	18	Itacoatiara/AM	3° 9'5.57''S e 58°26'17.35''O
	19	Humaitá/AM	7°30'59.36''S e 63° 1'48.27''W
	20	Porto Velho/RO	8°44'21.88''S e 63°53'40.42''W
	21	Cachoeira do Jirau	9°19'34.89''S e 64°44'1.30''W
Rio Tapajós	22	Itaituba/PA	4°16'25''S e 55°58'46''W

2) Extração de DNA– O DNA genômico será extraído, segundo Sambrook *et al.* (1989) no qual utiliza SDS/fenol/clorofórmio/álcool isoamílico, e dependendo do material biológico disponível, serão utilizados kits comerciais de extração de DNA. O DNA extraído será quantificado por comparação com marcador de concentração conhecida (DNA fago lambda), em eletroforese em gel de agarose 0,8%. A visualização e análise do DNA no gel serão feitas no fotodocumentador BioDoc– It (UVP).

3) Região controle –Amplificação da Região controle do DNAm_t (PCR) –A reação da polimerase em cadeia (*Polimerase Chain Reaction* - PCR) ou a amplificação da região controle do DNAm_t será realizada conforme protocolo descrito em Batista e Alves-Gomes, 2006.

Purificação do produto de PCR – As amostras serão purificadas com Polyethyleneglycol 8000 (PEG) a 20% e NaCl 2,5 M seguindo a metodologia descrita por Sambrook e Russell (2001).

As etapas de extração de DNA, PCR e purificação serão verificadas por meio de eletroforese em gel de agarose 1% corada com Diamond (Promega) com visualização do gel no fotodocumentador BioDoc– It (UVP).

Sequenciamento da Região controle do DNAm_t – O produto da PCR será submetido ao sequenciamento de DNA com o Kit BigDye 3.1 (*Thermo Fisher*), seguindo as instruções do fabricante. Após a reação, as amostras serão precipitadas com EDTA e etanol conforme recomendações do fabricante, e posteriormente eletroinjetadas em analisador automático de DNA ABI 3130xl (*Thermo Fisher*).

Análise das Sequências Nucleotídicas e estudo populacional –As sequências da região controle do DNAm_t serão editadas e alinhadas Com o auxílio do programa GENEIOUS (version R6, <http://www.geneious.com>) (Kearse *et al.*, 2012), gerando uma matriz de dados para as estimativas de genética populacional. As genealogias entre os haplótipos serão inferidas por uma rede de haplótipos a partir do método da parcimônia no programa TREEFINDER (JOBBER, 2004) e posteriormente será importada para o programa HAPLOVIEWER (Salzburger *et al.*, 2011) para visualização da rede de haplótipos. Para verificar se há estrutura genética populacional na amostragem de *B. vaillantii* será realizada a análise de variância molecular (AMOVA) no programa ARLEQUIN 3.5 (Excoffier e Lischer, 2010), sendo que os níveis de significância estatísticos serão ajustados através da correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989) para múltiplas comparações par a par. Para verificar e avaliar a ocorrência de populações geneticamente estruturadas será utilizado o método de agrupamento bayesiano através do programa BAPS 6.0 (*Bayesian Analysis of Genetic Population Structure*) (Corander *et al.*, 2008). Para estimativas de fluxo gênico serão calculadas a partir de análises realizadas com o programa MIGRATE (Beerli e Felsenstein, 1999).

4) Microssatélites–Para o estudo populacional também serão genotipados em torno de 15 locos microssatélites que serão selecionados dentre os disponíveis para *B. vaillantii* (Rodrigues *et al.*, 2009; Carvalho, 2015) para os quais seguirão os procedimentos descritos a seguir:

PCR para Microssatélites – A PCR de genotipagem seguirá o protocolo econômico de Schuelke (2000). A reação de PCR será processada em termociclador, nas seguintes condições de termociclagem: 68 °C por 1

minuto; 92°C por 20 segundos; amplificação do loco microssatélite em questão composto por 30 ciclos (92 °C por 20 segundos; a respectiva temperatura de anelamento/pareamento dos *primers* de cada loco microssatélite por 35 segundos; 68 °C por 40 segundos) e o pareamento do primer M13F universal, marcado com fluorescência NED, FAM ou HEX, aos fragmentos sintetizados anteriormente, por meio da termociclagem composta por 15 ciclos com temperatura inicial a 92 °C por 30 segundos, 53 °C por 30 segundos e 72 °C por 30 segundos. Em seguida é realizada uma extensão final a 72 °C por 30 minutos. O produto de PCR será verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1,5% e a visualização do gel será feita no fotodocumentador BioDoc– It (UVP).

Genotipagem – Serão desenvolvidos sistemas *multiplex* para genotipagem dos 15 locos a partir da combinação de fluorescências (NED, FAM ou HEX) e do tamanho dos alelos de cada loco. Posteriormente, o produto amplificado será genotipado no Analisador automático de DNA ABI 3130xl (*Thermo Fisher*).

Análise das genotipagens dos locos microssatélites e estudo populacional – O resultado das genotipagens será analisado com o auxílio do programa GENE MARKER (Soft Genetics LLC). Após a obtenção da matriz com o genótipo de todos os indivíduos para todos os locos, erros de genotipagem e indivíduos idênticos serão verificados com o auxílio do programa MSTOOLS (Park, 2001), em seguida será averiguada a presença de alelos nulos, *stutters* e *dropout* com o auxílio do programa MICROCHECKER (Van Oosterhout *et al.*, 2004). Índices e parâmetros de variabilidade genética serão calculados com os programa FSTAT (Goudet, 2001); o número de alelos exclusivos e a sua frequência serão obtidos com o auxílio do programa GENALEX 6.41 (Peakall e Smouse, 2006); e o desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (EHW) será calculado no programa GENEPOP 4 (Raymond e Rousset, 1995). Os níveis de significância estatísticos serão ajustados através da correção sequencial de Bonferroni (Rice, 1989). Para verificar se as populações analisadas apresentam diferenciação genética ou estoques distintos, será realizada uma análise bayesiana implementada no programa STRUCTURE 2.3.1 (Pritchard *et al.*, 2000). O número de clusters (k) será inferido pelo método proposto por Evanno *et al.*, (2005) utilizando-se o programa STRUCTURE HARVESTER 0.56.3 (Earl, 2009). O Fluxo gênico será estimado com o auxílio do programa GENALEX (Peakall e Smouse, 2006). O programa IMA2 (Hey e Nielsen, 2007) será utilizado para estimar parâmetros demográficos.

5) DNA ambiental (DNAa)–O desenho e validação dos *primers* seguirá a metodologia de Herde *et al.* (2014) e Bellemain *et al.* (2016) no qual segue:

Desenho e validação dos *primers In silico*– Serão desenhados *primers* para amplificar fragmentos de até 150 pb de regiões do gene mitocondrial Citocromo Oxidase I (COI). Os *primers* serão desenhados a partir de sequências de espécies da família Pimelodidae, disponíveis no banco de sequências do projeto Pirada, além de sequências de espécies que estejam disponíveis em bancos públicos de DNA (Genebank e BOLD Systems). Além do COI também serão desenhados *primers* para a região controle do genoma mitocondrial. Os dois fragmentos serão testados no intuito de verificar qual apresenta maior especificidade para

identificação do DNA *B. vaillantii*. As sequências nucleotídicas obtidas serão alinhadas com o auxílio do programa GENEIOUS (version R9, <http://www.geneious.com>, Kearse et al., 2012). O programa PRIMERQUEST (IDT, Coralville, EUA. <http://www.idtdna.com/Scitools>) será utilizado para desenhar os *primers* e sondas específicas para *B. vaillantii*, que em seguida serão validados, avaliando sua especificidade utilizando o programa eco PCR, específico para desenhos de *primers* para amplificar DNAa (Ficetola et al., 2010; Riaz et al., 2011).

Validação *In vitro*– Amostras de DNA genômico de diferentes indivíduos de *B. vaillantii*, a partir de diferentes localidades serão utilizadas para a validação dos *primers*. Além disso deverão ser testados juntamente com espécies da mesma família e outros geneticamente próximos para avaliar a especificidade dos *primers* e das sondas.

Validação *In vitro*– Os *primers* serão testados com as amostras de água coletadas em localidades com presença de *B. vaillantii*, as quais serão consideradas controle positivo, e como controle negativo será utilizada água ultra-pura.

Coletas de água– A coleta das amostras de água nos rios Juruá e Purus ocorrerá no período da vazante dos rios que é entre agosto e novembro (Barthem e Goulding, 1997). Para cada um dos rios a serem estudados será feita uma estratificação geográfica em três partes correspondendo a baixo, médio e alto e em seguida, em cada uma destas regiões os pontos serão georeferenciados de modo que fiquem equidistantes ao longo da amostragem. As amostras de água serão coletadas em uma garrafa *Van Dorn* de 1 L entre o meio e o fundo do rio em cada um dos pontos selecionados a serem amostrados para, em seguida ser transferida para garrafas autoclavadas de 1 litro (Nalgene – ThermoScientific). Os pontos de coleta serão registrados utilizando GPS. Além disso, características físico-químicas dos locais de coleta como ânions, condutividade elétrica, pH, Nitrogênio total, Fósforo total e volume de sedimentos em suspensão, serão coletados para posteriormente incorporar possíveis relações com os resultados encontrado.

Filtragem das amostras de água – As amostras de água serão filtradas a vácuo utilizando membrana HA em éster de celulose 0,45µm de poro, 47mm de diâmetro (Millipore) em suportes de filtro com receptor de polisulfono (Nalgene).

Extração do DNA ambiental – Após a filtração, os filtros serão enrolados e cortados em pequenas fatias e posteriormente macerados com o auxílio do equipamento *TyssueLyser II*. Em seguida as amostras serão armazenadas em tubos de 2 mL juntamente com esferas de Zircônia/Sílica *Beads* de 0,3g e 0,5 mm (*BiospecProducts*, Bartlesville, EUA). O produto dessa maceração será submetido à extração de DNA com o Kit *Blood&Tissue DNA easy* da (Qiagen), seguindo recomendações do fabricante. A concentração do DNA extraído será obtida com o auxílio do fluorímetro Qubit (Invitrogen).

PCR quantitativo (qPCR) –Serão realizados PCRs quantitativos (qPCRs) utilizando o termociclador em tempo Real Illumina (Uniscience) usando condições de concentrações de reagentes e protocolo sugerido pelo fabricante. Para o qPCR serão utilizados os *primers*, as sondas específicas para *B. vaillantii* e o kit de reagentes para PCR em tempo real *TaqMan gene expresion* (Thermo Fisher). Uma vez que todas as análises de PCR adicionais tenham sido realizadas, o programa PRESENCE 6.4 (Mackenzie *et al.*, 2002) será utilizado para estimar taxas de presença. Conforme abordado por Rees *et al.* (2014).

Sequenciamento do DNAa – Para confirmar a especificidade dos *primers*, descritos para *B. vaillantii*, alguns dos amplicons de qPCR que forem positivos serão sequenciados após tratamento com enzima ExoSAP. A sequência de DNA obtida será comparada com a sequência nucleotídica do segmento de cerca de 150 pb da região do DNAm_t flanqueada (COI ou Região controle) pelos *primers* desenhados na etapa 3.2.1. Será considerada a presença de *B. vaillantii* no rio em que a qPCR e seguido do sequenciamento nucleotídico, ocorrer com a amostra de DNAa de pelo menos um ou mais pontos de coleta.

– **Atividades previstas:**

Coleta de amostras de tecido muscular de *B. vaillantii*;

Coletas de Amostras de água para DNA ambiental;

Extração, Amplificação e Sequenciamento de DNA;

Genotipagem dos locos microssatélites;

Desenho e validação de *primers* e sondas para DNA ambiental;

Extração de DNA ambiental;

PCR quantitativo para DNA ambiental;

Análise dos resultados

– **Detalhamento da infraestrutura física e tecnológica a ser utilizada:** A estrutura física do Laboratório Temático de Biologia Molecular – LTBM/INPA, é utilizada por cerca de 23 pesquisadores dos 4 focos institucionais (citar os focos aqui), representando 22 dos 69 grupos de pesquisa do INPA e outros 20 grupos de pesquisa de outras instituições parceiras. Atualmente é utilizado por mais de 90 alunos de graduação e pós graduação. Os estudantes de graduação são oriundos de universidades públicas (UFAM, UEA, IFAM) e privadas (Nilton Lins, Fametro, Estácio) e os de pós-graduação de 05 dos 10 Programas de Pós-graduação do INPA e mais 4 programas da Universidade Federal do Amazonas e Universidade Estadual do Amazonas.

Atualmente no LTBM são executados projetos que rotineiramente utilizam varias técnicas de biologia molecular entre elas o seqüenciamento de DNA e genotipagem de fragmentos no qual inclui a metodologia do DNA barcode, marcadores microssatélites, entre outros, que hoje é possível com o Sequenciador ABI 3130XL disponível no Laboratório. A demanda da tecnologia do desenvolvimento de marcadores moleculares na plataforma Sanger é alta em muitos projetos de pesquisa realizados no LTBM. Além disso o LTBM dispõe de toda a estrutura de espaço e equipamentos para realização das etapas de Extração e amplificação de DNA e sistema de eletroforese em gel da agarose. Com toda esta tecnologia o LTBM já tem a metodologia de estudos com sequenciamento e microssatélites bem estabelecida. Além disso recentemente foram iniciados experimentos que envolvem a metodologia do DNAa na abordagem espécie-específica na qual utiliza-se a detecção do DNA de espécies alvo por meio de PCR quantitativo (qPCR). Assim, o LTBM apresenta todas as condições necessárias para a execução das atividades laboratoriais deste projeto.

– Linhas gerais do cronograma a ser cumprido:

ATIVIDADES	1º Ano				2º Ano			
	Trimestre				Trimestre			
	1º	2º	3º	4º	1º	2º	3º	4º
Coletas de Amostras tecido muscular de <i>B. vaillantii</i>			X	X				
Extração de DNA	X	X	X	X	X	X		
Amplificação e Sequenciamento de DNA		X	X	X	X	X	X	
Genotipagem dos locos microssatélites		X	X	X	X	X		
Desenho e validação de <i>primers</i> e sondas para DNA ambiental	X	X	X					
Coletas de Amostras para DNA ambiental			X	X				
Extração de DNA e PCR quantitativo para DNA ambiental			X	X	X			
Análise dos resultados					X	X	X	
Redação do relatório final							X	X

– Planilha de orçamento com estimativa dos gastos previstos;

Categoria de despesa	Descrição dos itens	Material será cedido para Instituição	Quant.	Unidade (un; litro; metro; dia; km)	Valor Unitário (R\$)	Valor Total (R\$)
Uso e consumo	Membrana de filtração	Não	2	caixa com 100 unidades	1.400,00	2.800,00
	Kit de extração de DNA	Não	1	kit para 50 reações	1.255,00	1.255,00
	Síntese de primers	Não	4	Microtubo liofilizado a 25 uMol	49,48	197,92
	Gotaq coloress master mix	Não	1	kit	1.024,00	1.024,00
	Taq DNA Polimerase	Não	4	Microtubo com 500U	120,00	480,00
	ponteiras com filtro 10 ul	Não	6	Pacote com 1000 unidades	275,32	1.651,92
	ponteiras com filtro 200 ul	Não	5	Pacote com 1000 unidades	235,70	1.178,50
	ponteiras com filtro 1000 ul	Não	3	Pacote com 1000 unidades	64,49	193,47
	tubos de PCR	Não	6	Pacote com 1000 unidades	242,37	1.454,22
	Tubos de 1,5 mL	Não	5	Pacote com 1000 unidades	52,24	261,20
	Placas de sequenciamento de DNA	Não	4	caixa com 10 unidades	134,04	536,16
	Tubos falcon de 15 mL	Não	3	Pacote com 50 unidades	38,29	114,87
	Luvas de procedimento	Não	10	caixa com 100 unidades	38,69	386,90
	Sondas RGB/FAM	Não	2	Microtubos com primers marcados com fluorescencia	1.711,27	3.422,54
	Polymero POP-7 para sequenciador ABI 3130xl	Não	2	Microtubo com 3,5ml	1.021,50	2.043,00
Serviço de Terceiros Pessoa Física	Serviços de Barqueiro	Não	2	contratação de serviço	450,00	900,00
Serviço de Terceiros Pessoa Jurídica	Serviço de revisão/tradução de artigos científicos	não	1	pacote de revisão para 10 paginas	966,00	966,00
Viagens	Passagem	Não	2	Passagem	1.330,00	2.660,00

Kyara Martins Formiga

	fluvial/aérea: Manaus-Eirunepé- Manaus					
	Passagem fluvial/aérea: Manaus-Lábrea- Manaus	Não	2	Passagem	950,00	1.900,00
	Passagem aérea: Manaus-Itaituba- Manaus	Não	2	Passagem	780,00	1.560,00
	Despesas hospedagem e alimentação em Eirunepé	Não	12	diária	320,00	3.840,00
	Despesas hospedagem e alimentação em Lábrea	Não	12	diária	320,00	3.840,00
	Despesas hospedagem e alimentação em Itaituba	Não	8	diária	320,00	2.560,00
Equipamentos	No break 1500VA	Sim	2	Unidade	760,00	1.520,00
	Mini-centrifuga	Sim	1	Unidade	1.200,00	1.200,00
	Pipetas monocanal	Sim	2	Unidade	1.000,00	2.000,00
Total						39.945,70

– Resultados esperados e impacto previsto do projeto:

Com a realização deste projeto, espera-se obter os seguintes resultados: 1) Identificação de estoques pesqueiros de piramutaba (*B. vaillantii*) na Amazônia sob o ponto de vista genético; 2) detecção de *B. vaillantii* pela metodologia do DNAa (abordagem espécie-específica) em rios de água branca da Amazônia; 3) Consolidação da metodologia do uso do DNA ambiental, na abordagem espécie-específica no Laboratório Temático de Biologia Molecular – LTBM/INPA; 4) definição do ciclo de vida da *B. vaillantii* a partir da estrutura genética e DNA ambiental. 5) Capacitação de recursos humanos, nos níveis de graduação e pós-graduação; 6) Publicação de artigos científicos.

Com os resultados obtidos os principais impactos serão: 1) Disponibilizar informações para conservação e manejo da piramutaba na Amazônia; 2) Subsidiar políticas que possam controlar a pesca da piramutaba em regiões específicas de acordo com seu ciclo de vida, visando diminuir os efeitos da sobrepesca na espécie; 3) validar e propor uma nova metodologia capaz de tornar mais eficiente e eficaz a detecção e monitoramento de espécies de peixes de importância econômica como a piramutaba, tanto na sua distribuição espacial, como ao longo do regime anual do nível de água dos rios da bacia amazônica; 4) Disponibilizar *Primers* e sondas validados para a detecção da piramutaba em DNAa, para ser utilizado em todo ou qualquer sistema aquático na bacia amazônica. 5) Formação de recursos humanos capacitados na área de genética ambiental

com o uso do DNAa, bem como em metodologias de ponta da biologia molecular como PCR quantitativo ou em Tempo Real (qPCR). Esse impacto é singular uma vez que o LTBM/INPA é qualificado e utilizado como Laboratório Multiusuário atendendo demandas internas e externas ao INPA e de Programas de Pós-graduação do INPA, UFAM, UEA por seus estudantes nos níveis de mestrado e doutorado, além de também atender demanda de cidades dentro e fora do Estado do Amazonas.

– **Referencias bibliográficas:**

- Agudelo, E.; Páez, C.L.S.; Fernández, C.A.R.; Bonilla-Castillo, C.A.; Hurtado, G.A.G. 2011. Diagnóstico de la pesquería en la cuenca del Amazonas. *In: Lasso, C.A.; Paula-Gutiérrez, F.; Morales-Betancourt, M.A.; Agudelo, E.; Ramírez-Gil, H.; Ajiaco-Martínez, R.E., (Eds.), Pesquerías continentales de Colombia: cuencas del Magdalena-Cauca, Sinú, Canalete, Atrato, Orinoco, Amazonas y vertiente del Pacífico.* Instituto de Investigación de los Recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá. p. 143-167.
- Almeida, O.T.; Amaral, L.; Rivero, S.; Silva, C.N. 2012. Caracterização do pescador e da frota pesqueira comercial de Manoel Urbano e Sena Madureira (AC) e Boca do Acre (AM). *Novos Cadernos NAEA*, 15: 291-309.
- Alonso, J.C.; Pirker, L.E.M. 2005. Dinâmica populacional e estado atual da exploração de piramutaba e de dourada. *In: Fabré, N.N.; Barthem, R.B., (Eds.), O manejo da pesca dos grandes bagres migradores: piramutaba e dourada no eixo Solimões-Amazonas.* IBAMA/Pro Várzea, Coleção Estudos Estratégicos. Manaus. p. 21-28.
- Araujo-Lima, C.R.M.; Ruffino, M.L. 2003. Migratory Fishes of the Brazilian Amazon. *In: Carolsfeld, J.; Harvey, B.; Ross, C.; Baer, A., (Eds.), Migratory Fishes of South America: Biology, Fisheries and conservation Status.* IDRC & The world Bank. p. 233-301.
- Barthem, R.B.; Goulding, M. 1997. *Os bagres balizadores: Ecologia, Migração e Conservação de peixes amazônicos* Sociedade Civil Mamirauá MCT-CNPq. Brasília. 140 p.
- Barthem, R.B.; Goulding, M. 2007. *Um Ecossistema inesperado: A Amazônia revelada pela pesca.* Brasília. 241 p.
- Batista, J.S.; Alves-Gomes, J.A. 2006. Phylogeography of *Brachyplatystoma rousseauxii* (Siluriformes - Pimelodidae) in the Amazon Basin offers preliminary evidence for the first case of “homing” for an Amazonian migratory catfish. *Genetics and Molecular Research*, 5: 723-740.
- Batista, J.S.; Farias, I.F.; Formiga-Aquino, K.; Sousa, A.C.B.; Alves-Gomes, J.A. 2010. DNA microsatellite markers for “dourada” (*Brachyplatystoma rousseauxii*, Siluriformes: Pimelodidae), a migratory catfish of utmost importance for fisheries in the Amazon: development, characterization and inter-specific amplification. *Conservation Genetics Resources*, 2: 5-10.
- Beerli, P.; Felsenstein, J. 1999 Maximum likelihood estimation of migration rates and effective population numbers in two populations using a coalescent approach. *Genetics* 152: 763-773.
- Bellemain, E.; Patricio, H.; Gray, T.; Guegan, F.; Valentini, A.; Miaud, C.; Dejean, T. 2016. Trails of river monsters: Detecting critically endangered Mekong giant catfish *Pangasianodon gigas* using environmental DNA. *Global Ecology and Conservation* 7: 148-156.
- Carvalho, K.C.G.d. 2015. *Marcadores de dna microsatélites e estimava da variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii) no rio madeira-am no contexto da construção de hidrelétricas.* Dissertação de Mestrado, Biotecnologia e Recursos Naturais da Amazônia, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus, 72 p.
- Chaves, R.A.; Silva, K.C.d.A.; Ivo, C.T.C.; Cintra, I.H.A.; Aviz, J.d.S. 2003. Sobre a pesca da piramutaba, *Brachyplatystoma vaillantii* (Valenciennes, 1940) em pescarias da frota industrial no estado do Pará. *Boletim Técnico Científico CEPNOR* 3: 163-177.
- Corander, J.; Marttinen, P.; Sirén, J.; Tang, J. 2008. Enhanced Bayesian modelling in BAPS software for learning genetic structures of populations. *BMC Bioinformatics*, 9: 539.
- Earl, D.A. 2009. *Structure Harvester* v0.3, from website: http://users.soe.ucsc.edu/~dearl/software/struct_harvest/.

- Evanno, G.; Regnaut, S.; Goudet, J. 2005. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study. *Molecular Ecology*, 14: 2611-2620.
- Excoffier, L.; Lischer, H.E.L. 2010. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources* 10: 564-567.
- Fabré, N.N.; Donato, J.C.; Alonso, J.C. 2000. *Bagres de la Amazonia Colombiana: Um Recurso sin Fronteiras*. Instituto Amazónico de Investigaciones Científicas SINCHI. Bogotá. 252 p.
- Ficetola, G.; Coissac, E.; Zundel, S.; Riaz, T.; Shehzad, W.; Bessièrre, J.; Taberlet, P.; Pompanon, F. 2010. An In silico approach for the evaluation of DNA barcodes. *BMC Genomics*, 11: 434.
- Frédou, F.L.; Almeida, O.; Rivero, S.; Mourão, K.; Barbosa, C.; Thompson, R. 2010. Aspectos econômicos da pesca industrial no Pará: Entraves e perspectivas. *Papers do NAEA*, 238: 25.
- Goudet, J. 2001. *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>. Updated from Goudet (1995).
- Hey, J.; Nielsen, R. 2007. Integration with the Felsenstein equation for improved Markov chain Monte Carlo methods in population genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104: 2785-2790.
- Huergo, G.M. 2009. *Estimativa da diversidade genética da piraíba (Brachyplatystoma filamentosum Lichtenstein, 1919) e da piraíba negra (B. capapretum Lundberg & Akama, 2005), na Amazônia brasileira, inferidas através de DNA mitocondrial: subsídio para manejo e conservação*. Tese de Doutorado, BADPI, INPA, Manaus, 114 p.
- Huergo, G.M.; Filgueiras-Souza, R.J.; Batista, J.S.; Formiga-Aquino, K.; Alves-Gomes, J.A. 2011. Molecular genetics as a tool for fisheries management in the Brazilian Amazon: Piraíba (*Brachyplatystoma filamentosum* and *Brachyplatystoma capapretum*)(Siluriformes: Pimelodidae) in white-water rivers. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 6: 280-289.
- ICMBio 2016. *Estatística da Pesca*. www.icmbio.gov.br/cepsul/acervo-digital/37-download/estatistica/111-estatistica.html, Acesso em 16/05/2016.
- Isaac, V.J.; Milstein, A.; Ruffino, M.L. 1996. A pesca arsenal no Baixo Amazonas: análise multivariada da captura por espécies. *Acta Amazônica*, 26: 33.
- Isaac, V.J.; Ruffino, M.L.; Melo, P. 2000. *Considerações sobre o método de amostragem para coleta de dados sobre captura e esforço pesqueiro no Médio Amazonas*. In: IBAMA, (Ed.), *Coleção Meio Ambiente. Série Estudos de Pesca*, 22. IBAMA. Brasília. p. 175-199.
- Jimenez, E.A.; Filho, M.A.; Frédou, F.L. 2013. Fish bycatch of the laulao catfish *Brachyplatystoma vaillantii* (valenciennes, 1840) trawl fishery in the Amazon Estuary. *Brazilian Journal of Oceanography*, 61: 129-140.
- JOB, G.V.H., A.; STRIMMER, K. 2004. TREEFINDER: a powerful graphical analysis environment for molecular phylogenetics. *BMC evolutionary biology*, 4: 18.
- Kearse, M.; Moir, R.; Wilson, A.; Stones-Havas, S.; Cheung, M.; Sturrock, S.; Buxton, S.; Cooper, A.; Markowitz, S.; Duran, C.; Thierer, T.; Ashton, B.; Mentjies, P.; Drummond, A. 2012. Geneious Basic: an integrated and extendable desktop software platform for the organization and analysis of sequence data. *Bioinformatics*, 28(12): 1647-1649.
- Lira-Cordeiro, A. 2013. *Estimativa da variabilidade genética da piraíba negra Brachyplatystoma capapretum (Siluriformes: Pimelodidae), por meio de marcadores mitocondriais e microssatélites*. Mestrado em Biotecnologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 107 p.
- Mackenzie, D.I.; Nichols, J.D.; Lachman, G.B.; Droegge, S.; Royle, J.A.; Langtim, C.A. 2002. Estimating site occupancy rates when detection probabilities are less than one. *Ecology*, 83: 2248-2255.
- Marão-Siqueira, T. 2003. *Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii - Valenciennes 1840) do rio madeira na Amazônia*. Uninilton Lins/INPA, Manaus, 48 p.
- Neves-Brasil, L.M.d. 2016. *Isolamento e caracterização de locos microssatélites e sua aplicação na identificação de estoque pesqueiro da piraíba - brachyplatystoma filamentosum - Pimelodidae-Siluriformes*. Mestrado em Ciências Pesqueiras Nos Trópicos, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 70 p.
- Ochoa, L.E.; Pereira, L.H.G.; Costa-Silva, G.J.; Roxo, F.F.; Batista, J.S.; Formiga, K.; Foresti, F.; Oliveira, C. 2015. Genetic structure and historical diversification of catfish *Brachyplatystoma platynemum*

- (Siluriformes: Pimelodidae) in the Amazon basin with implications for its conservation. *Ecology and Evolution*, 5: 2005–2020.
- Park, S.D.E. 2001. *The Excel Microsatellite Toolkit (version 3.1)* Animal Genomics Laboratory, UCD, Ireland, <http://animalgenomics.ucd.ie/sdepark/ms-toolkit/>.
- Peakall, R.; Smouse, P.E. 2006. genalex 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6: 288-295.
- Pritchard, J.K.; Stephens, M.J.; Donnelly, P. 2000. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945-959.
- Raymond, M.; Rousset, F. 1995. GENEPOP (Version 1.2): Population Genetics Software for Exact Tests and Ecumenicism. *J Hered*, 86: 248-249.
- Rees, H.C.; Bishop, K.; Middleditch, D.J.; Patmore, J.R.M.; Maddison, B.C.; Gough, K.C. 2014. The application of eDNA for monitoring of the great crested newt in the UK. *Ecology and Evolution*, 4 (21) 4023-4032.
- Riaz, T.; Shehzad, W.; Viari, A., Pompanon, F.; Taberlet, P.; Coissac, E. 2011. ecoPrimers: inference of new DNA barcode markers from whole genome sequence analysis. *Nucleic Acids Research*, 9: e145.
- Rice, W.R. 1989. Analyzing tables of statistical tests. *Evolution*, 43: 223-225.
- Ríos-Villamizar, E.A.; Pieadade, M.T.F.; Da Costa, J.G.; Adeney, J.M.; Junk, W.J. 2014. Chemistry of different Amazonian water types for river classification: a preliminary review. *WIT Transactions on Ecology and the Environment (Print)*, 178: 17-28.
- Rocha, A.d.A. 2015. *Variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii) no rio Madeira*. Bacharelado em Ciências Biológicas Faculdade Estácio do Amazonas Manaus, 34 p.
- Rodrigues, F.; Farias, I.; Batista, J.; Alves-Gomes, J. 2009. Isolation and characterization of microsatellites loci for piramutaba • (*Brachyplatystoma vaillantii*, Siluriformes: Pimelodidae), one of the commercially most important migratory catfishes in the Amazon Basin. *Conservation Genetics Resources*, 1: 365-368.
- Rodrigues, F.C. 2009. *Estimativa da variabilidade genética da piramutaba (Brachyplatystoma vaillantii) por meio de marcadores moleculares microssatélites e D-loop em quatro localidades da Amazônia: diferenças entre calha e tributários*. Dissertação de Mestrado, GCBEv, INPA, Manaus, 96 p.
- Salzburger, W.; Ewing, G.B.; Von Haeseler, A. 2011. The performance of phylogenetic algorithms in estimating haplotype genealogies with migration. *Molecular ecology*, 20: 1952-1963.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F.; Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Springs Harbor Laboratory Press. Cold Springs Harbor, NY
- Sambrook, J.; Russell, D.W. 2001. *A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York
- SANYO 1998. *The fishery resources study of the Amazon and Tocantins River mouth areas in the Federative Republic of Brazil: Final report*. Page 332. Japan International Cooperation Agency (JICA), Tokio.
- Schuelke, M. 2000. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nature Biotechnology*, 18: 233-234.
- SUDEPE 1975. *Estatística da pesca - Produção:1975*. Page 22. Superintendencia de Desenvolvimento da Pesca, Brasília.
- SUDEPE 1979a. *Estatística da pesca - Produção:1976*. Page 33. Superintendencia de Desenvolvimento da Pesca, Brasília.
- SUDEPE 1979b. *Estatística da pesca - Produção:1977*. Page 39. Superintendencia de Desenvolvimento da Pesca, Brasília.
- 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: 535-538.
- Winemiller, K.O. 1989. Patterns of variation in life history among South American fishes in seasonal environments. *Oecologia*, 4: 225-241.