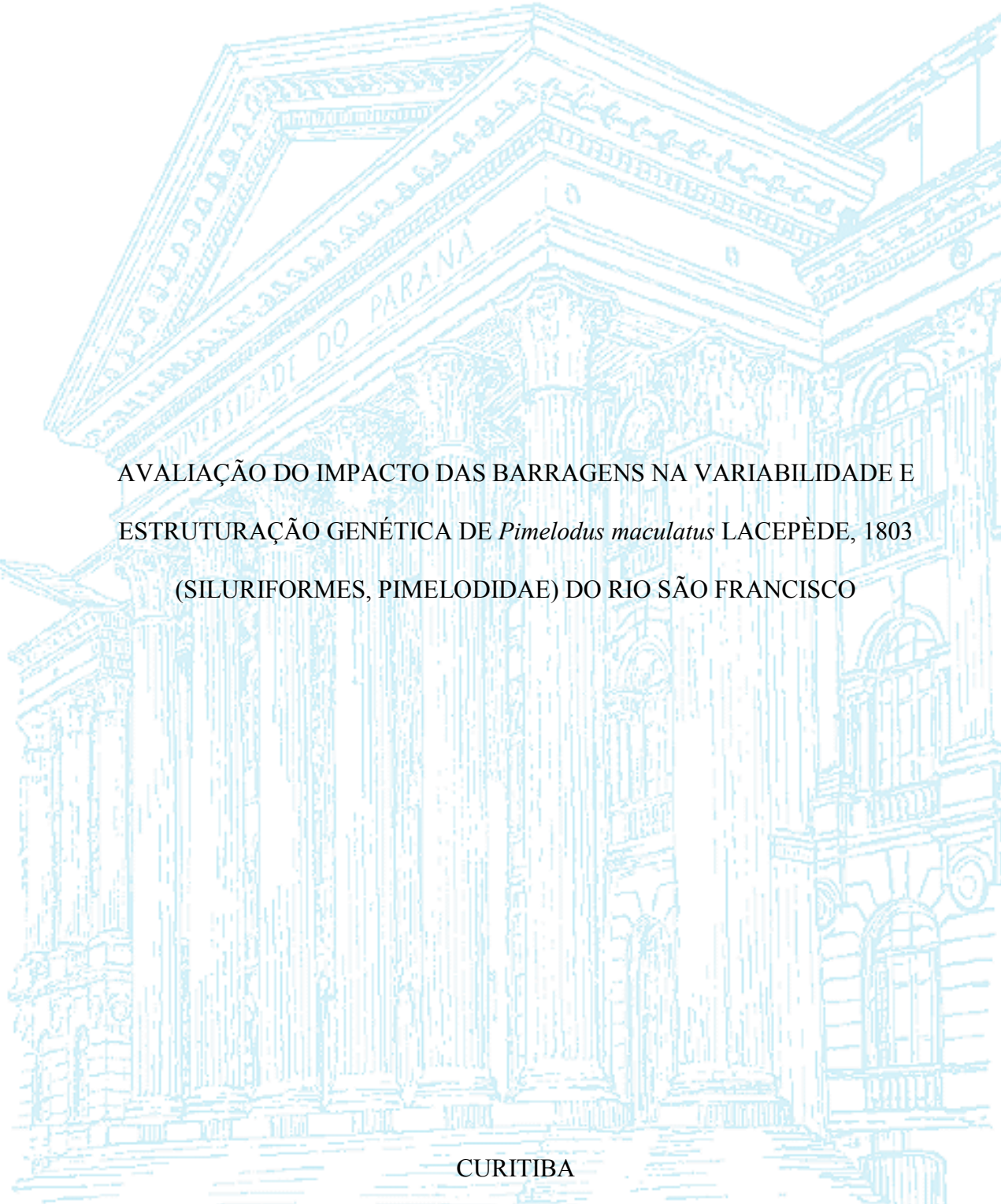


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

LETÍCIA DE BITTENCOURT ZAGONEL



AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS BARRAGENS NA VARIABILIDADE E
ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Pimelodus maculatus* LACEPÈDE, 1803
(SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DO RIO SÃO FRANCISCO

CURITIBA

2009

LETÍCIA DE BITTENCOURT ZAGONEL

AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS BARRAGENS NA VARIABILIDADE E
ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Pimelodus maculatus* LACEPÈDE, 1803
(SILURIFORMES, PIMELODIDAE) DO RIO SÃO FRANCISCO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas – Zoologia, Setor de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como
requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas área de concentração Zoologia.
Orientador: Dr. Walter Antonio Pereira Boeger

CURITIBA

2009

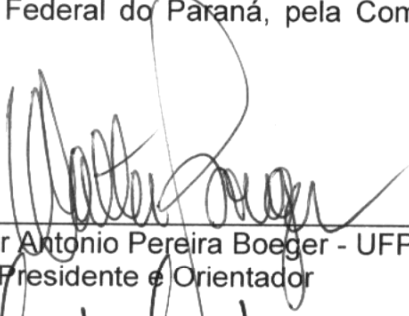
Termo de aprovação

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DAS BARRAGENS NA VARIABILIDADE E
ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Pimelodus maculatus* (PIMELODIDAE,
SILURIFORMES) DO RIO SÃO FRANCISCO**


por

Letícia de Bittencourt Zagonel

Dissertação aprovada como requisito parcial para a obtenção do Grau de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Zoologia, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Zoologia, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, pela Comissão formada pelos professores



Dr. Walter Antonio Pereira Boeger - UFPR
Presidente e Orientador



Dr. Fausto Foresti - UNESP/Botucatu



Dr. Luiz Roberto Malabarba - UFRGS

Curitiba, 19 de fevereiro de 2009.

*“Those who have never entered upon scientific pursuits
know not a tithe of the poetry by which they are
surrounded.”*

Herbert Spencer

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer as principais pessoas que ajudaram para que este trabalho se tornasse possível:

Primeiramente ao meu orientador, Walter Antonio Pereira Boeger, pela oportunidade do trabalho, pela motivação que sempre o acompanha (e que acaba contagiando a todos) e pela confiança depositada no meu trabalho.

Ao Marcio R. Pie, pelas “aulas” de teoria, pelas sugestões de leitura, e pelo incentivo.

Aos meus pais, que sempre acreditaram no meu trabalho e estiveram sempre presentes, me incentivando desde o começo e sempre querendo entender o que era aquilo que eu estava fazendo...

Ao meu amado Júnior, que sempre esteve ao meu lado, vibrando comigo a cada passo alcançado, desde o dia da minha aprovação; era o ombro no qual eu encontrava calma, serenidade e força para continuar. Jú, você encheu minha vida de felicidade e de amor, e conquistou meu coração para sempre.

A toda a equipe do LEMPE, em especial a Luciana Patella, pelo suporte técnico dentro do laboratório, sempre colocando ordem naquele pessoal todo e nunca deixando faltar nada; ao José Francisco, pelas longas e intermináveis conversas sobre o que queriam dizer todos aqueles parâmetros estatísticos super-esquisitos à primeira vista e como fazer para entender todos aqueles programas (inclusive nos sábados de manhã! – “Zé, eu não esqueci do barreado...”); ao Raphael O. Ribeiro, Flávio M. Marteleto, Nefertires Curi, Pablo Learth e Raquel Patella pela ajuda prática nos procedimentos de laboratório dentre aquelas intermináveis extrações, géis, purificações e PCRs; e aos demais integrantes do

laboratório, Marcel Tschá, Marlus Bueno, Rafael Baggio e Sandra Ludwig pela sempre agradável companhia.

A todos que ajudaram e deram suporte técnico nas coletas, principalmente ao Marcelo Chammas e a toda a sua equipe da Aquatrix e a Kenia Marcelino, gerente de desenvolvimento territorial da CODEVASF e a toda a sua equipe.

Ao professor Osvaldo Oyakawa, do museu de zoologia da USP, que gentilmente nos ajudou na identificação do material coletado.

A Laura Pioli Kremer e Flávia Gazola da Silva, pela amizade e companheirismo durante todos esses os anos de faculdade.

Aos ex-integrantes do laboratório Leslie Córdova e Rogério T. Viana, amigos que hoje estão a muitos quilômetros de distância, mas que sempre estarão por perto nas minhas lembranças.

Aos colegas da turma de mestrado, aquela galera super-animada que não perdia tempo quando o assunto era fazer festa... ou descer para a praia para dar uma surfadinha.

A banca avaliadora desta dissertação, composta pelos professores Dr. Luiz Roberto Malabarba (UFRGS) e Dr. Fausto Foresti (UNESP/Botucatu), que tão solícitamente atenderam ao nosso pedido para compor a banca, oferecendo-nos a oportunidade de compartilhar seus conhecimentos e maior experiência no debate das idéias centrais deste trabalho. Aos dois, meus sinceros agradecimentos.

Por fim, ao curso de Pós-Graduação em Zoologia e a todos que garantiram suporte financeiro para que o projeto pudesse ser desenvolvido: ao CNPq e ao GIA (Grupo Integrado de Aquicultura).

ÍNDICE GERAL

Epígrafe.....	iv
Agradecimentos.....	v
Lista de Figuras.....	viii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Anexos.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xii
Introdução.....	1
Materiais e Métodos	
Coleta de Dados.....	09
Procedimento Molecular.....	09
Análises Moleculares.....	11
Resultados.....	15
Variação Genética.....	16
Estrutura das Populações.....	17
Passado Demográfico.....	18
Alinhamento.....	18
Discussão.....	20
Referências Bibliográficas.....	33
Figuras.....	45
Tabelas.....	49
Anexos.....	54

LISTA DE FIGURAS

Figura I. Mapa com as localizações dos pontos de coleta dos exemplares de <i>Pimelodus maculatus</i> ao longo do rio São Francisco.....	45
Figura II. Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de <i>Pimelodus maculatus</i> no Rio São Francisco.....	46
Figura III. Gráfico da distribuição das freqüências do número de diferenças pareadas (<i>Mismatch distribution</i>) das amostras de <i>Pimelodus maculatus</i> do alinhamento curto com todas as localidades agrupadas.....	47
Figura IV. Gráfico da distribuição das freqüências do número de diferenças pareadas (<i>Mismatch distribution</i>) das amostras de <i>Pimelodus maculatus</i> do alinhamento longo com todas as localidades agrupadas.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela I. Dados de coleta dos espécimes de <i>Pimelodus maculatus</i> utilizados no estudo.....	49
Tabela II. Número de indivíduos seqüenciados de <i>Pimelodus maculatus</i> , número de haplótipos e diversidade de nucleotídeos apresentado pelas amostras nos oito pontos de coleta, assim como em todos os pontos juntos.....	50
Tabela III. Tabela da freqüência de haplótipos nas oito populações de <i>Pimelodus maculatus</i> , assim como suas freqüências relativas, baseada no alinhamento curto.....	51
Tabela IV. Tabela da freqüência de haplótipos nas oito populações de <i>Pimelodus maculatus</i> , assim como suas freqüências relativas com base no alinhamento	

longo..... 52

Tabela V. Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva nas amostras
examinadas de *Pimelodus maculatus*..... 53

LISTA DE ANEXOS

Anexo I. Alinhamento das amostras de *Pimelodus maculatus* utilizadas nas
análises..... 54

RESUMO

As demandas energéticas e de água para irrigação têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas no Brasil, gerando a necessidade da construção de diversas barragens de grande porte para suprir estas demandas. O rio São Francisco tem sido bastante visado para este fim, devido ao seu grande potencial hidroelétrico advindo dos rios de planalto que compõem a bacia. Embora os benefícios econômicos e sociais dessas obras sejam substanciais, os seus impactos sobre ambientes naturais podem ser bastante severos. A fragmentação da distribuição de populações de peixes causada por barragens pode afetar o tamanho da população, interromper ou reduzir o fluxo gênico entre populações, reduzir a diversidade genética e aumentar a diferença genética entre populações isoladas, além de poder levar à extinção populações locais em poucas gerações. Para subsidiar a definição de estratégias de manejo de populações naturais que possam reverter tais processos, este projeto buscou identificar padrões gerais de impacto sobre a variabilidade e estrutura genética de estoques de *P. maculatus* no rio São Francisco, associados com a construção de barragens. Fragmentos da região controladora do mtDNA (D-loop) foram seqüenciados de oito populações em diferentes trechos ao longo de toda a extensão do rio. Estatisticamente, não houve estruturação entre os estoques das oito populações amostradas. A análise de variância molecular (AMOVA) mostrou haver mais variabilidade dentro das populações do que entre elas. A diversidade genética de todas as populações foi bastante baixa. O padrão unimodal proposto pela análise de *Mismatch distribution* sugere que esta baixa variabilidade encontrada pode ser resultado de um evento de gargalo populacional, que provavelmente ocorreu anteriormente à construção das barragens. Esta conclusão foi corroborada pelo parâmetro τ , o qual estimou a data do evento entre 250.000 e 130.000

anos. Existem pelo menos duas hipóteses alternativas mais prováveis para explicar o evento em questão: fortes secas que tenham promovido um gargalo populacional, ou um efeito fundador da espécie no rio São Francisco.

ABSTRACT

Demands of energy and water for irrigation have increased considerably in the last decades in Brazil with subsequent increase in the construction of dams in major rivers and tributaries. The basin of the São Francisco river, in northeastern Brazil, has an extensive hydroelectric potential due to the upland rivers that forms the basin and is, thus, of great interest for these sectors of the economy. Although the economic and social benefits of such dams are substantial, their impacts on natural environments can be severe. The fragmentation of the population distribution caused by dams can affect population size, interrupt or reduce gene flow between populations, reduce genetic diversity and increase genetic differences among isolated riverine fish populations. Besides, it may lead local populations to extinction in few generations. In order to subsidize natural populations management strategies that could revert this process, this project looks for the identification of general patterns of impacts on the variability and genetic structure of the *P. maculatus* in the São Francisco river, in association with the construction of dams. Fragments of the mtDNA control region (D-loop) were sequenced from eight populations collected in different sections of the river (from its entire course). Statistically, no structure was observed between all eight populations. The Molecular Variance Analyses (AMOVA) shows that the variability was higher within population than among them. The genetic diversity of all the populations was particularly low. The unimodal pattern detected by the mismatch distribution analyses suggested that the low variability found can be associated to a population bottleneck that probably occurred before the constructions of the hydroelectric dams. This conclusion was corroborated by the τ parameter, which estimated the date of the event between 250.000 and 130.000 years ago. There are at least two

putative hypotheses to explain the event in question: strong droughts that could have promoted populational bottleneck or a founder effect for this species on the São Francisco river.

**Avaliação do Impacto das Barragens na Variabilidade e Estruturação Genética de
Pimelodus maculatus Lacepède, 1803 (Siluriformes, Pimelodidae) do Rio São
Francisco ⁽¹⁾**

Palavras Chaves: *Pimelodus maculatus*, barragem, estruturação, D-loop, Rio São Francisco

INTRODUÇÃO

As demandas de água e energia têm aumentado consideravelmente nas últimas décadas, principalmente devido ao aumento das grandes cidades, ao crescente avanço econômico (principalmente industrial) e às práticas de irrigação (Tucci *et al.* 2001). Segundo a Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL), 73,40% da fonte geradora de energia elétrica nacional é proveniente de usinas hidroelétricas. Isto evidencia o alto grau de dependência do país por fontes de energia de origem hídrica. Embora outras fontes de energia também venham sendo exploradas, a capacidade de geração destes empreendimentos ainda é pouco representativa. As usinas térmicas, eólicas e nucleares representam apenas 22,04%, 0,27% e 1,96% da produção energética nacional, respectivamente. Segundo Tucci *et al.* (2000), ainda que existam projetos de diversificação das formas de geração de energia, as hidroelétricas continuarão contribuindo com a maior parte da produção de energia nos próximos anos.

Nas últimas décadas, em concordância com o aumento da necessidade de geração de energia, tem havido um crescente aumento da demanda por usinas hidroelétricas de grande porte nos rios das bacias brasileiras. A partir do início dos anos 40, houve um aumento significativo na quantidade de usinas no Brasil e até o final da década de 60,

¹ Artigo formatado para apresentação na revista *Molecular Ecology*

algumas empresas praticamente quadruplicaram a quantidade de usinas em funcionamento (ex. CEMIG - Companhia Energética de Minas Gerais S.A.). Atualmente, existem no Brasil 706 usinas hidroelétricas instaladas e em funcionamento, 89 em fase de construção, além de outros 258 projetos de usinas já outorgados (ANEEL 2008).

Embora os benefícios econômicos e sociais dessas obras sejam substanciais, seus impactos sobre ambientes naturais podem ser bastante severos. Por constituir uma barreira física, barragens podem influenciar diretamente o padrão de migração de diversas espécies animais (ex. Antonio *et al.* 2007; Gosset *et al.* 2006), e promover a alteração da composição da fauna (Loureiro-Crippa & Hahn 2006). Segundo Mol *et al.* (2007), o fechamento de uma represa pode causar alteração na riqueza das espécies, na diversidade e na equitabilidade dos sistemas, passando a existir dominância de espécies onde antes não havia. Além disso, a modificação ambiental pode eliminar da área populações de espécies com maior exigência de hábitat, as quais não suportam grandes alterações.

Estudos com salmonídeos mostram que não só a barragem propriamente dita, mas também os reservatórios podem se tornar barreiras para determinadas espécies (Clarke *et al.* 2007). Analisando a composição química da água em diferentes partes do rio e comparando esta com a composição química dos otólitos de diversos indivíduos, o autor revelou que a espécie em estudo não se movia para dentro de um reservatório recentemente inundado e que esse havia se tornado uma barreira, interrompendo a interconectividade do sistema, fragmentando a população pré-existente no curso d'água.

Além de afetar diretamente o ecossistema do curso de água represado, o ambiente do entorno também pode sofrer mudanças. Áreas de várzeas marginais periodicamente inundáveis podem sofrer períodos de seca extensos, afetando diretamente as comunidades de peixes e de outros grupos de vertebrados e invertebrados que habitam estes ambientes

(Pompeu & Godinho 2006). Além disso, os períodos de enchente de rios podem ser alterados afetando espécies cujos processos biológicos estão fortemente ligados à sua sazonalidade (Agostinho *et al.* 2004). O curso natural dos rios pode ser modificado e vales podem ser inundados. Dentro deste contexto, as características bióticas e abióticas do ambiente podem sofrer mudanças, alterando todo o seu equilíbrio. Estudos mostram como estas mudanças ambientais podem causar alterações na disponibilidade dos recursos alimentares e estes, na composição da dieta de algumas espécies, além de modificações na composição dos grupos tróficos que dela dependiam (e.g. Silva *et al.* 2008; Mérona *et al.* 2001; Albrecht & Pellegrini-Caramaschi 2003; Mérona *et al.* 2003; Loureiro-Crippa & Hahn 2006). Além disso, a construção de reservatórios pode eliminar ambientes naturais do rio, tais como corredeiras e córregos, os quais são utilizados por muitas espécies migratórias como locais de desova, podendo causar sérios impactos a estas espécies (Baumgartner *et al.* 2004).

Barragens podem, ainda, afetar o tamanho da população, interromper o fluxo gênico entre populações, reduzir a diversidade genética e aumentar a diferença genética entre populações isoladas (Neraas & Spruell 2001; Meldgaard *et al.* 2003; Yamamoto *et al.* 2004; Heggenes & Røed 2006; Jager *et al.* 2001). Segundo Frankham *et al.* (2004), quando uma população é fragmentada e seu tamanho é reduzido, a perda de diversidade genética ocorre como consequência. Ainda segundo o mesmo autor, quando o tamanho da população é reduzido, aumenta a taxa de endocruzamento e o desempenho reprodutivo é diminuído. A população fica mais vulnerável aos efeitos da deriva e à perda de alelos, já que diminui a probabilidade de alelos raros serem transmitidos. Ocorre redução da heterozigosidade e, conseqüentemente, aumento da exposição de alelos recessivos deletérios. Tudo isso pode afetar de forma drástica uma população, principalmente as de

tamanho reduzido nas quais estes efeitos são sentidos mais rapidamente, diminuindo sua adaptabilidade e reduzindo seu potencial evolutivo. Em particular, a fragmentação da distribuição de populações de peixes causada por barragens pode levar à extinção de populações locais em poucas gerações (Neraas & Spruell 2001; Jager *et al.* 2001; Morita & Yokota 2002; Fagan *et al.* 2002; Fagan *et al.* 2005).

Estratégias de manejo de populações naturais podem reverter tais processos. Segundo Frankham *et al.* (2004), uma das maneiras de reduzir os riscos de extinção em populações fragmentadas é o re-estabelecimento do fluxo gênico. A translocação de indivíduos (ou gametas) de áreas de maior diversidade genética para áreas nas quais esta é reconhecidamente reduzida pode minimizar os riscos causados pelo aumento da taxa de endocruzamento e pela perda de diversidade.

A manutenção da diversidade genética é extremamente importante para que as populações possam responder às contínuas mudanças ambientais (Frankham *et al.* 2004). Porém, para que o manejo seja bem sucedido, o conhecimento prévio de características da população devem ser considerados. Assim, melhores estratégias poderão ser adotadas, levando em consideração as necessidades de cada população individualmente como, qual a quantidade de indivíduos devem ser translocados, quais indivíduos, com que frequência, dentre outros. Apesar de existirem esforços por parte de diversos pesquisadores para a obtenção de informações a respeito da estrutura genética das populações (Reid *et al.* 2008; Meldgaard *et al.* 2003; Nguyen 2008; Yan *et al.* 2008), o conhecimento que possuímos ainda é escasso. Desta forma, mais estudos objetivando noções substanciais a este respeito se fazem necessários.

A Bacia do rio São Francisco é uma das mais importantes do país devido ao seu grande potencial hidroelétrico advindo do predomínio de rios de Planalto em sua formação

(Tucci *et al.* 2001). Ela apresenta uma área de 636.919,60 km² (ANA 2008) e abrange 7,5% do território brasileiro (CBHSF 2008). Seu maior e principal rio é o São Francisco, também conhecido como Rio da Integração Nacional por interligar três regiões geográficas distintas (nordeste, sudeste e centro-oeste). Com aproximadamente 2700 Km de comprimento, banha os Estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Sergipe e Alagoas, além de sua bacia hidrográfica também envolver parte do Estado de Goiás e do Distrito Federal. Nasce na Serra da Canastra, no estado de Minas Gerais e deságua no Atlântico, formando um estuário entre os estados de Alagoas e Sergipe. A Bacia do Rio São Francisco é dividida em quatro segmentos: o Alto São Francisco (desde a nascente até a cidade de Pirapora, MG), o Médio (de Pirapora à Remanso, BA), Sub-Médio (de Remanso até a cachoeira de Paulo Afonso, BA) e Baixo São Francisco (de Paulo Afonso até a foz, no Oceano Atlântico) (Sato & Godinho 2004). Devido a sua extensão, atravessa regiões que apresentam condições climáticas bastante distintas, com a temperatura média anual variando de 23 à 27°C; a vegetação varia desde Florestas até Cerrado e Caatinga; e o clima varia de tropical-úmido a semi-árido (CODEVASF 2008).

A ictiofauna da bacia do Rio São Francisco é bastante rica, compreendendo aproximadamente 158 espécies de peixes conhecidas (Sato & Godinho 1999; Britski *et al.* 1988; Rizzo & Godinho 2003). Diversas espécies são endêmicas e muitas, migradoras. O Mandi, *Pimelodus maculatus* Lacepède, 1803, é uma das espécies representantes da grande família de Siluriformes Pimelodidae, a qual possui cerca de 31 gêneros e pelo menos 85 espécies (Nelson 2006). *Pimelodus maculatus* vive em água-doce em regiões de clima subtropical, geralmente entre 20-24°C (Froese & Pauly 2008). Essa espécie tem distribuição na América do Sul nos rios das bacias do São Francisco e do Paraná. É encontrada ao longo de todo o rio São Francisco, desde a nascente até a foz. São animais

bento-pelágicos e potamódromos (Froese & Pauly 2008), além de considerados migradores de grandes distâncias (Agostinho *et al.* 2007a).

O Brasil possui 6 milhões de hectares de reservatórios sendo 23% localizados no vale do São Francisco (Sato & Godinho 2004). Nesse rio, os maiores reservatórios foram construídos sobre o seu leito principal, sendo eles: Três Marias, Sobradinho, Itaparica, o complexo de Paulo Afonso e Xingó. Nenhum deles apresenta qualquer tipo de passagem que facilite a movimentação dos peixes para cima e para baixo da represa, aumentando as chances de isolamento entre as populações fragmentadas.

Ainda que exista a possibilidade de alguns indivíduos passarem de um lado para outro de uma represa através da construção de escadas e outros mecanismos de transposição, estudos mostram que ainda assim pode haver isolamento entre as populações devido ao desequilíbrio causado na distribuição de alelos decorrentes do fluxo unidirecional de algumas espécies, principalmente das migradoras (Jager *et al.* 2001). Desta forma, as populações que ficarem isoladas e deixarem de receber o aporte genético de outras populações sofrerão de forma mais acirrada os efeitos da deriva genética com a conseqüente perda de diversidade (Yamamoto *et al.* 2004).

Segundo Pelicice & Agostinho (2008), a movimentação dos peixes geralmente ocorre no sentido rio acima, na época das chuvas, quando o nível dos rios aumenta. Os peixes sobem em busca de locais mais apropriados para desova e para o desenvolvimento dos jovens e, segundo os mesmos autores, raramente retornam para baixo da represa. Agostinho *et al.* (2007b) descreve que a movimentação de peixes migradores está diretamente associada a comportamentos reofilicos. Segundo Pelicice & Agostinho (2008), quando deparados com uma barreira, os peixes são atraídos pelo fluxo de água e turbidez vindo de escadas de peixes, as quais simulam condições ambientais naturais e se tornam

atrativas para estes organismos que se encontram no ambiente de reservatório. Porém, o mesmo não ocorre no sentido inverso (à jusante) já que o estímulo na direção oposta da escada não possui o mesmo grau de atração para os peixes; pelo contrário, por geralmente serem migradores, estes evitam ambientes lânticos como os dos grandes reservatórios. Corroborando esta idéia, Agostinho *et al.* (2007c) evidenciaram uma drástica diminuição no número de ovos e larvas de peixes abaixo da barragem de Lajeado (rio Tocantins). Segundo os autores, esta diminuição está associada principalmente ao aumento da mortalidade dos ovos causada pela baixa concentração de oxigênio existente no fundo dos reservatórios, onde os ovos sedimentam, e ao aumento da predação sobre as larvas devido ao aumento na transparência da água causada por mudanças no padrão de transporte dos sedimentos. Além disso, através de experimento, os mesmos autores constataram que o movimento de subida dos peixes é 250 vezes maior que o de descida, demonstrando de forma eficiente a existência de fluxo unidirecional e que este ocorre no sentido rio acima.

Em contraste, Hänfling & Weetman (2006) encontraram populações de peixe-escorpião (Cottidae) com menor diversidade genética em trechos a montante do rio Rye e de seus tributários (no nordeste da Inglaterra) quando comparadas com as populações residentes nas partes mais a jusante. Segundo os autores, esta assimetria no fluxo gênico está associada ao fluxo da corrente do rio e é aumentada pela dificuldade da subida criada pela construção de barreiras. Outros autores também encontraram o mesmo tipo de padrão. Yamamoto *et al.* (2004) encontrou menor diversidade genética em populações que ficaram isoladas acima da represa. Hernandez-Martich & Smith (1997), comparando a frequência alélica em diferentes porções de três rios na Flórida, encontraram maior diversidade de alelos e maior heterozigosidade nas populações da parte mais baixa do rio quando comparadas com as de cima. No entanto esta maior diversidade parece estar mais associada

com a história geológica de formação das drenagens dos rios da Florida do que com a movimentação dos espécimes ao longo do rio (ver também Hernandez-Martich *et al.* 1995). Congdon (1995) evidenciou baixa variação na frequência alélica de peixes Poeciliidae em regiões mais próximas a cabeceira dos rios estudados, concluindo que barreiras estavam impedindo a movimentação dos peixes rio acima. Jager *et al.* (2001) demonstrou através de simulações computacionais que, quando a taxa de migração é maior no sentido montante-jusante, as populações que estão à montante ficam mais vulneráveis à perda de diversidade e conseqüentemente, tem suas chances de permanência na população diminuídas. Segundo Fraser *et al.* (2004), a ocorrência de assimetria no fluxo gênico tem papel fundamental na definição da estrutura genética de uma população. Segundo o mesmo autor, a assimetria do fluxo parece estar associada ao tamanho efetivo da população sendo que a população de maior tamanho efetivo tende a ser a doadora de indivíduos para as populações de menor tamanho efetivo.

Levando em conta estas hipóteses relacionadas à movimentação dos organismos e à direção do fluxo gênico, pode-se esperar que a diversidade seja deslocada para uma das extremidades do rio (montante-jusante), dependendo das condições físicas, geográficas e históricas do próprio rio, assim como das características biológicas de cada espécie.

Assim, com base nos efeitos negativos que podem ser causados nas populações de peixes pela construção de barragens e tendo em vista a importância futura destes estoques como fonte de subsistência, este projeto busca identificar padrões gerais de impacto sobre a variabilidade e estrutura genética de *P. maculatus* ao longo do rio São Francisco para fundamentar estratégias de manejo apropriadas que garantam a sobrevivência não apenas destes estoques mas também de outros que apresentarem características semelhantes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Coleta de dados

As coletas foram realizadas em oito trechos ao longo de todo o curso do rio São Francisco durante o ano de 2008 com o auxílio de pescadores profissionais (Figura I). São eles: 1) Montante de Três Marias (no lago de Três Marias – MG); 2) Jusante de Três Marias (entre as cidades de Três Marias e Januária – MG); 3) Montante de Sobradinho (na região de Bom Jesus da Lapa – BA); 4) Lago de Sobradinho; 5) Jusante de Sobradinho (no lago da represa de Itaparica); 6) Jusante de Itaparica (entre as hidroelétricas de Itaparica e Paulo Afonso); 7) Montante de Xingó (entre as hidrelétricas de Paulo Afonso e Xingó); e 8) Jusante de Xingó (entre Xingó e a foz do rio). No total, foram coletados 171 exemplares. O número de indivíduos por localidade assim como os locais de coleta e demais dados de campo estão apresentados na Tabela I. As amostras de tecido obtidas de brânquias e nadadeiras foram preservadas em tampão de EDTA-DMSO (Seutin *et al.* 1991). Um indivíduo de cada localidade foi identificado morfológicamente por especialista do grupo e os exemplares estão depositados no Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo (MZUSP) sob o seguinte número de catálogo: 102695, 102696, 102697, 102698, 102699, 102701 e 102702.

Procedimento molecular

Extrações do DNA genômico foram realizadas utilizando-se o robô iPrepTM (InvitrogenTM), com o uso do iPrepTM ChargeSwitch® gDNA Tissue Kit, conforme orientações do fabricante (InvitrogenTM). Entre 4 e 23 indivíduos de cada ponto foram utilizados para a obtenção de seqüências da região controladora do DNA mitocondrial (D-

loop), região bastante variável e com alta taxa de mutação (de 5 a 10 vezes mais rápida do que o DNA nuclear) (Brown *et al.* 1979). Para a amplificação do fragmento desejado, foi realizada a Reação da Polimerase em Cadeia (PCR) (Mullis & Faloona 1987) em termocicladores Eppendorf (Personal Thermocycler). Cada 25 µl da reação continha concentrações finais de 2 µM de cada primer (forward / reverse), 0,4 mM de dNTP, 3 mM de MgCl, 2,5 U de Taq polimerase, tampão (buffer) 1x, e aproximadamente 2 ng/µl de amostra do DNA do peixe. Os *primers* utilizados para amplificação do fragmento do D-loop foram H16498 (senso) - 5' CACCTGAAGTAGGAACCAGATG 3' (Meyer *et al.* 1990) e L15774M (anti-senso) - 5' ACATGAATTGGAGGTATACCAGT 3' (Prioli *et al.* 2002), os quais juntos, amplificam fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases.

A reação da PCR foi realizada com 35 ciclos. Cada ciclo teve as seguintes temperaturas de desnaturação, anelamento e extensão, respectivamente: 94°C por 45 segundos, 58°C por 45 segundos e 72°C por 60 segundos. No início do primeiro ciclo a temperatura foi mantida a 95°C por 4 minutos (desnaturação inicial) e no término do último ciclo, a 72°C por 5 minutos (extensão final). A visualização do produto do PCR foi realizada através de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz ultra-violeta (no equipamento Vilber Lourmat®). O produto de PCR foi purificado através dos kits MinElute PCR Purification Kit (Qiagen) ou Montage® PCR Cleanup Kit (Milipore), conforme orientação dos respectivos fabricantes. O produto resultante foi utilizado diretamente nas reações de seqüenciamento sendo os *primers* os mesmos utilizados nas PCRs. As reações de seqüenciamento foram realizadas através do kit Big Dye v3 (Applied Biosystems®) e purificadas com Sephadex™ G-50 medium (GE Healthcare Bio-Sciences AB). As amostras foram seqüenciadas em um seqüenciador ABI3130. As seqüências geradas foram conferidas no Blast-n (Altschul *et al.* 1990),

através do alinhamento dos nucleotídeos com seqüências já conhecidas, para garantir que estas fossem de fato as do animal em estudo (serviço disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>). A edição das seqüências foi realizada através do programa Pregap4 versão 1.5, pertencente ao Staden Package (Staden 1996). As mesmas foram alinhadas com a ajuda do programa Bioedit Sequence Alignment Editor, versão 7.0.5.2 (Hall 1999) e ClustalW versão 1.4 (Thompson *et al.* 1994), além de ajustadas manualmente. Posteriormente, estas seqüências serão depositadas no banco de dados do GenBank (<http://www.ncbi.nih.gov/>).

Análises Moleculares

A diversidade de nucleotídeos assim como as análises de estatística F, AMOVA e *Mismatch distribution* foram realizadas através do programa Arlequin versão 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). O número de haplótipos foi estimado por contagem direta e a diversidade de nucleotídeos foi computada como sendo a probabilidade de que dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso sejam diferentes entre si (Tajima 1983; Nei 1987). Deleções, transições e transversões foram consideradas com pesos iguais. A porcentagem permitida de dados faltantes por sítio (“missing data per site”) foi de 5%. As análises de diversidade genética das populações foram realizadas tanto individualmente como para todas juntas.

Uma rede de haplótipos foi construída para facilitar a visualização do relacionamento entre os haplótipos, assim como do modo pelo qual esses estão distribuídos nas diferentes populações, através do programa TCS versão 1.21 (Clement *et al.* 2000). Este programa utiliza dados estatísticos de probabilidade baseados no critério da

parcimônia para estimar genealogias tendo por base seqüências de DNA, segundo descrito em Templeton *et al.* (1992).

A existência de estruturação genética entre as populações de *P. maculatus* foi testada através da análise de variância molecular (AMOVA) com todos os trechos agrupados, de acordo com o método de Excoffier *et al.* (1992). Dois níveis hierárquicos foram utilizados: dentro e entre as populações. A matriz de distância foi calculada entre todos os haplótipos através do método de distância pareada (“pairwise difference”) com o número de permutações igual a 10.000. O índice de fixação (F_{ST}) foi calculado como sendo análogo ao θ^w , definido por Weir & Cockerham (1984) e sua significância foi calculada através de permutações não-paramétricas como descrito em Excoffier *et al.* (1992).

A história demográfica das populações foi inferida através da análise de *Mismatch Distribution* (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992), a qual é baseada no número de diferenças observadas entre todos os pares de haplótipos e é representada pela freqüência da distribuição destas diferenças. Esta distribuição apresenta padrões gráficos que caracterizam diferentes tipos de histórias demográficas. Segundo simulações, populações em equilíbrio demográfico longo e estável devem apresentar um padrão multimodal, enquanto que populações que experimentaram uma expansão recente apresentam geralmente uma distribuição unimodal (Rogers & Harpending 1992; Hudson & Slatkin 1991). Gargalos populacionais são representados por distribuições próximas a zero ou bimodais (dependendo se o gargalo apenas reduziu ou removeu completamente a diversidade genética) (Frankham *et al.* 2004). Contato secundário entre populações que estiveram isoladas por longos períodos também é representado por um padrão bimodal (Frankham *et al.* 2004).

A partir da curva formada pela distribuição das diferenças pareadas (*mismatch distribution*), três parâmetros foram estimados utilizando o modelo de Rogers & Harpending (1992). São eles: $\theta_0 = 2N_0u$, $\theta_1 = 2N_1u$, e $\tau = 2ut$, onde t é o número de gerações através das quais uma população inicial de tamanho efetivo N_0 passa a ter um tamanho N_1 , e u é a taxa de mutação estimada para todo o haplótipo. A curva (ou onda) “caminha” lentamente para a direita à medida que o tempo transcorrido pelo número de gerações aumenta (Rogers & Harpending 1992). A crista da onda é definida pelo τ , ou seja, se a onda caminha a uma taxa $2u$, então a crista estará a $\tau = 2ut$ depois de t gerações. Em resumo, quanto mais próxima a curva estiver do eixo Y, mais recente será a população e quanto mais afastada, mais gerações t deverão ter se passado. Além disso, através do τ é possível calcular o tempo aproximado de quando o evento proposto pela curva ocorreu através da equação $t = \tau / 2u$, onde u é o número de substituições por gerações de todo o fragmento em estudo (Slatkin & Hudson 1991; Rogers & Harpending 1992). O valor de u é obtido através da equação $u = \mu L$, onde μ é a taxa de mutação por nucleotídeo por gerações do fragmento e L é o tamanho do fragmento (neste caso, do D-loop) (ver Ciofi *et al.* 2006 e Iyengar *et al.* 2007). A taxa de mutação por nucleotídeos adotada foi 3,6% para cada um milhão de anos (Donaldson & Wilson 1999) e o tempo de gerações considerado para *P. maculatus* foi entre 1,4 e 4,4 anos (Froese & Pauly 2008).

Os três parâmetros (θ_0 , θ_1 e τ) foram estimados através de uma abordagem generalizada não linear dos mínimos-quadrados, desenvolvido por Schneider & Excoffier (1999). O intervalo de confiança da distribuição ($\alpha = 0,050$) foi obtido através de bootstrap paramétrico com 10.000 repetições. A análise foi realizada para todos os pontos agrupados já que separadamente algumas populações apresentaram baixa variância na distribuição das diferenças, impedindo que os parâmetros demográficos pudessem ser estimados.

Para testar o equilíbrio entre a perda de alelos por deriva e o aporte causado por mutações, foram utilizados os testes de neutralidade seletiva de Tajima (1989) e Fu (1997). Ambos os testes são baseados no modelo de sítios infinitos (“infinite-site model”) sem recombinação, apropriados para seqüências de pequenos fragmentos de DNA (Fu 1997). O teste de Tajima (1989) compara duas estimativas do parâmetro de mutação θ ($\theta=2Mu$, com $M=N$ em populações haplóides de tamanho efetivo N) independentemente. A primeira estimativa é obtida através do número de sítios polimórficos e a segunda, a partir da média da distribuição dos pares de diferenças (*mismatch distribution*). Já o Fu (1997) compara o número observado de alelos com o número de alelos esperados se a população se mantivesse constante. A partir disso, as estatísticas D e F_S foram calculadas e sua significância foi testada através da geração de re-amostragens aleatórias, por meio do algoritmo de simulação coalescente (modificado por Hudson 1990). Segundo Fu (1997) os valores da estatística F_S são bastante sensíveis à expansão demográfica, resultando em valores negativos elevados quando nesta condição. Segundo Oliveira-Neto (2007), valores negativos para ambas as estatísticas são característicos de expansões populacionais recentes.

RESULTADOS

Fragmentos da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) contendo entre 362 e 650 pares de bases foram amplificados de 114 indivíduos de *Pimelodus maculatus* nas oito regiões amostradas (Tabela II). Devido à existência de seqüências bastante curtas no alinhamento, duas matrizes foram construídas a partir da original para servirem de base na geração dos resultados. A primeira delas foi construída cortando-se as extremidades das seqüências até o tamanho da mais curta (dos dois lados), de modo que todos os indivíduos pudessem ser utilizados (chamamos esta matriz de “alinhamento curto”). A segunda matriz foi gerada retirando-se as seqüências que não alcançavam a região dos *primers*, diminuindo o número amostral, mas garantindo que as variações de nucleotídeos existentes em ambas as extremidades das seqüências fossem aproveitadas (chamamos esta matriz de “alinhamento longo”).

O alinhamento curto resultou em seqüências de 334 pares de bases incluindo todos os indivíduos seqüenciados ($n = 114$). Já o alinhamento longo resultou em seqüências de 640 pares de bases (retirando-se os dois *primers*) porém, o número amostral foi reduzido para 80 indivíduos. No alinhamento curto, 15 sítios foram polimórficos, incluindo 6 substituições (sendo 4 transições e 2 transversões) e um “indel” de nove nucleotídeos (todos no mesmo indivíduo). A freqüência estimada da composição de nucleotídeos foi: A = 33,18%; T = 34,40%; C = 18,34%; e G = 14,08%. No alinhamento longo, 24 sítios foram polimórficos, incluindo 15 substituições (sendo 10 transições e 5 transversões) e um “indel” de 9 nucleotídeos (todos no mesmo indivíduo). A freqüência estimada da composição de nucleotídeos foi: A = 31,72%; T = 32,33%; C = 20,30%; e G = 15,64%.

Variação Genética

O alinhamento curto revelou a existência de seis haplótipos diferentes entre os oito pontos amostrados. A média de haplótipos por ponto foi entre 2 e 3, os quais continham no máximo 4 sítios polimórficos (normalmente de 2 a 3). O alinhamento longo revelou a existência de 9 haplótipos diferentes entre os oito pontos amostrados. A média de haplótipos por ponto se manteve a mesma, entre 2 e 3, porém, a média de sítios polimórficos aumentou para 5 a 7.

A variabilidade genética entre as seqüências de modo geral foi bastante baixa. O número de haplótipos por localidade amostrada não ultrapassou o valor de 4 e a diversidade de nucleotídeos de todas as seqüências não foi maior do que 0,3%, (Tabela II). Todas as populações individualmente apresentaram baixa diversidade: entre 0,20 e 0,36% no alinhamento curto; e entre 0,28 e 0,41% no alinhamento longo. O fato da diversidade ter aumentado um pouco no alinhamento longo mostra a existência de sítios polimórficos próximos às extremidades do alinhamento. Porém, este aumento é resultado de variações de no máximo 4 nucleotídeos por seqüência, não causando alteração na forma de interpretação dos resultados. Os pontos que apresentaram valores fora desta média são resultados de características únicas existentes em alguma seqüência. A presença do “indel” de 9 nucleotídeos subseqüentes em uma única seqüência do ponto 5 no alinhamento curto fez com que o valor da diversidade fosse superestimado para este ponto (0,48%). Apesar deste haplótipo também estar presente no alinhamento longo, o número de sítios polimórficos (no caso, 9) se aproximou da média da variação da maioria das outras seqüências (que foi em torno de 5 a 7), não o tornando discrepante como o fez no alinhamento curto. Os valores próximos a 0,14% ou menores no alinhamento longo são resultados da presença de muitos nucleotídeos duvidosos nas seqüências (representados no

alinhamento por “N”), com exceção dos pontos 1 e 2 cujos baixos valores são resultado do baixo número amostral.

Através da rede de haplótipos (Figura II) é possível observar que a inter-relação existente entre os indivíduos de *P. maculatus* é a de dominância de um dos haplótipos (H1) sobre os demais. Além de estar presente em todas as populações, H1 está distribuído de forma homogênea entre os pontos (Figura II). Ainda, esse haplótipo representa mais de 80% das seqüências no alinhamento curto e por volta de 78% das seqüências no alinhamento longo. Os demais haplótipos aparecem com freqüências relativamente menores e de forma esporádica dentro das populações, como sugerem os baixos valores das suas freqüências relativas (Tabelas III e IV). Uma variação de um a quatro nucleotídeos separa os demais haplótipos do primeiro no alinhamento curto e de um a sete os separa do primeiro no alinhamento longo. Com exceção de dois, todos os demais haplótipos partem de um mesmo ramo genealógico, representando uma única linhagem. A relação de parentesco entre todos os haplótipos, inclusive os que não fazem parte do ramo genealógico principal, fica evidente quando observamos que a semelhança genética existente entre eles é de 99% (Tabela II). Os dados parecem sugerir que todos os haplótipos sejam descendentes de um haplótipo ancestral comum e provavelmente recente, devido ao baixo número de mutações existentes entre o haplótipo mais comum e os demais.

Estrutura das Populações

Estatisticamente não houve estruturação entre os estoques das oito populações amostradas. A análise de estatística F indicou ausência de estruturação tanto no alinhamento curto ($F_{st} = 0,00540$) quanto no alinhamento longo ($F_{st} = -0,00544$). Além

disso, os resultados da AMOVA mostraram que existe mais variação dentro das populações do que entre elas: 99,46% e 0,54% ($P = 0.34931 \pm 0.00470$) respectivamente, no alinhamento curto; e 100,54% e -0,54% ($P = 0,48109 \pm 0,00472$) respectivamente, no alinhamento longo, indicando haver uma grande semelhança entre as populações.

Passado Demográfico

Os padrões de distribuição propostos pela análise de *Mismatch distribution* resultaram em curvas unimodais com a média das diferenças muito próximas de zero (0,76479 e 1,59620 para o alinhamento curto e longo respectivamente) (Figuras III e IV e Tabela V). Este padrão sugere que a baixa variabilidade genética encontrada em *P. maculatus* no rio São Francisco seja resultado da ocorrência de um evento populacional, possivelmente um gargalo ou uma colonização recente, ou até mesmo um evento de seleção, no qual a diversidade foi bastante reduzida resultando em pouquíssimos haplótipos. Apesar disso, as estimativas de θ_0 e θ_1 indicam que as populações estão expandindo. Os valores de D e F_S foram negativos para todas as populações agrupadas (Tabela V). O grau de significância foi positivo para todos os valores de F_S , porém não o foi para os valores de D . Segundo Fu (1997), a estatística F_S é mais eficaz para detectar eventos de expansão. Sendo assim, os resultados corroboram com o evento de expansão demográfica apontada por θ_0 e θ_1 . Através do τ ($\tau = 3,0$) é possível estimar que o evento que ocasionou a redução da diversidade genética, e concomitantemente o início da expansão, deve ter ocorrido entre 250 e 130 mil anos atrás, durante o Pleistoceno Médio.

Alinhamento

Não houve grande diferença entre os resultados dos alinhamentos curto e longo. Apesar da maior variabilidade de nucleotídeos se localizarem nas extremidades das seqüências, como constatado pela redução no número de haplótipos quando as pontas das seqüências foram cortadas, isto não afetou de forma alguma a interpretação dos resultados.

DISCUSSÃO

O resultado deste trabalho indica que não existe estruturação genética detectável entre as populações de *P. maculatus* nos trechos analisados do rio São Francisco. Todavia, esta conclusão deve ser analisada com cuidado, pois ela não necessariamente indica a inexistência de conseqüências genéticas sobre as populações de peixes isoladas pela construção das barragens das hidroelétricas.

Essa ausência de estruturação observada é passível de diferentes interpretações. A primeira delas seria a conclusão mais tradicional nesse tipo de estudo, segundo a qual as populações estariam proximamente ligadas, existindo fluxo gênico entre elas. Porém, estas populações estão separadas por barreiras físicas representadas pelas barragens das hidroelétricas, não sendo possível nenhuma inter-conectividade, já que não existem escadas ou outros mecanismos de passagens para os peixes. Provavelmente, o tempo de isolamento causado pelas barragens pode não ter sido suficiente para permitir diferenciação genética entre as populações (a barragem mais antiga do rio, Angiquinhos, construído por Delmiro Gouveia e hoje pertencente ao complexo de Paulo Afonso, possui 100 anos aproximadamente).

Por outro lado, a falta de estruturação pode ser conseqüência da escolha de um marcador que não apresenta sensibilidade suficiente para a detecção de eventos de fragmentação recente. O fragmento mitocondrial utilizado nesse estudo, entretanto, já foi empregado com objetivos semelhantes no passado (Kawamura *et al.* 2006; Yan *et al.* 2008). O D-loop foi capaz de detectar, por exemplo, eventos de deriva genética em populações recentemente isoladas do “pool” original (Kawamura *et al.* 2006) e testar estruturação decorrente de barramentos no leito do rio (Yan *et al.* 2008). Em geral, o D-

loop é uma região bastante variável do mtDNA. Segundo Donaldson & Wilson (1999), esse fragmento tem sido a região mais frequentemente utilizada em estudos genéticos de peixes, seja no estabelecimento de relações inter-específicas, tais como filogenias (e.g. Koblmüller *et al.* 2006; Bremer *et al.* 1997), quanto intra-específicas, como em estudos de genética populacional (e.g. Bay *et al.* 2004; Dudgeon *et al.* 2000; Rocha-Olivares *et al.* 2000). Todavia, apesar de refutada nesse momento, essa hipótese está sendo adicionalmente testada no Laboratório de Ecologia Molecular (UFPR) com o uso de marcadores de microssatélites.

A baixa variabilidade genética encontrada em *P. maculatus* foi inesperada, pois alta diversidade de haplótipos já foi descrita para o D-loop de diversas espécies de peixes. Bay *et al.* (2004) encontraram valores de diversidade genética altíssimos em peixes de recife, sendo estes muito próximos ou iguais a 1.00 (ou seja, cada indivíduo da população amostrada possuía um haplótipo diferente). E a diversidade de nucleotídeos para todas as populações juntas foi de 4,5%. Dudgeon *et al.* (2000) também encontraram valores altos de diversidade tanto haplotípica (entre 0,93 e 0,971) quanto de nucleotídeos (entre 0,72 e 3,34%) em peixes de recife. Bay *et al.* (2004) atribui esta alta diversidade à variação do nível do mar, a qual foi responsável por múltiplos processos de fragmentação e reagrupamento das populações, gerando períodos cíclicos de isolamento. Alta diversidade dessa região do DNA mitocondrial também foi encontrada em peixes não associados a recifes como em tainhas (Rocha-Olivares *et al.* 2000) e atuns (Bremer *et al.* 1996), cujos valores foram muito próximos de 1,00 para a diversidade de haplótipos e entre 1,1 a 7,2% para a diversidade de nucleotídeos.

Essa alta variabilidade não é característica apenas de peixes marinhos. O D-loop de peixes de água-doce foi reportado como semelhantemente diverso. Martins *et al.* (2003)

encontraram valores elevados em *Leporinus elongatus* Valenciennes, 1850 em diversos rios da bacia do rio Paraná (entre 0,84 e 1,00 para diversidade de haplótipos e entre 1,78 e 7,70 para diversidade de nucleotídeos). Batista & Alves-Gomes (2006) também encontraram altos índices em uma espécie de *Brachyplatystoma* (pertencente à mesma família de *P. maculatus*, Pimelodidae), na Bacia Amazônica; porém, a diversidade de nucleotídeos foi relativamente mais baixa em relação aos demais estudos aqui apresentados. Segundo Grant & Bowen (1998), em seu estudo de revisão feito com base em organismos marinhos, altos índices de diversidade geralmente são indicativos de uma história evolutiva longa e estável, ou são resultado de contato secundário entre diferentes linhagens.

Estudos prévios realizados com *P. maculatus* em rios de outras bacias brasileiras mostram haver alguma variação entre os indivíduos, porém, todos eles foram realizados através de métodos de RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), não sendo possível uma comparação mais precisa. No rio Tibagi, foi encontrado aproximadamente 30% de variação em 95 loci polimórficos (Almeida & Sodré 1998; Almeida *et al.* 2001), enquanto nos rios Tietê e Paranapanema, as propor es de sítios polimórficos foram de até 60,19 e 61,51%, respectivamente (Almeida *et al.* 2003). Assim como no rio São Francisco, não foi detectada estrutura o nas popula es do Rio Tietê apesar da existência de nove hidroelétricas cortando o rio na região amostrada (algumas alcançando até 10 metros de queda). Segundo Almeida *et al.* (2003), as usinas daquele rio possuem comportas que foram construídas para torná-lo navegável, possibilitando a migra o dos espécimes por toda a extensão do rio. Porém, os mesmos autores encontraram evidências de estrutura o entre as popula es do alto com as popula es do médio e baixo rio Paranapanema. Segundo os autores, esta estrutura o   anterior   constru o das seis usinas hidroelétricas

existentes no rio e que esta diferenciação é resultado de um processo natural devido à existência de grandes quedas d'águas que já ocorriam no rio anteriormente, algumas alcançando até 60 metros de altura.

Segundo Grant & Bowen (1998), valores de baixa diversidade (tanto haplotípica quanto de nucleotídeos) são evidências de gargalos populacionais ou de eventos fundadores recentes associados a uma ou poucas linhagens. Este caso parece se aplicar às populações de *P. maculatus* no rio São Francisco, sugerindo-nos uma nova hipótese, segundo a qual a baixa variabilidade genética seria decorrente de um evento histórico que deve ter ocorrido antes da construção das barragens, causando a redução da diversidade genética muito provavelmente através de um dos processos citados anteriormente ou mesmo por um evento de seleção (varredura seletiva - ou “selective sweep” - , por exemplo). Curiosamente, esse padrão de diversidade genética não é exclusivo para *P. maculatus* nesta bacia, sendo também apresentado por outras espécies que habitam o rio São Francisco, tais como *Pygocentrus piraya*, *Leporinus elongatus* e *Prochilodus* spp. (dados não publicados). Através destes fatos rejeitamos a idéia da ocorrência de seleção (“selective sweep”), pois seria não parcimonioso assumir que este evento tivesse ocorrido da mesma forma em quatro espécies diferentes.

O fato de algumas espécies pertencentes ao rio São Francisco terem apresentado grande variabilidade em rios de outras bacias (e.g. *L. elongatus* na Bacia do Paraná - Martins *et al.* 2003) corrobora a hipótese de que eventos históricos tenham tido grande influencia no padrão de diversidade observado. Esses eventos podem estar diretamente relacionados com a história geológica do rio e de suas inter-relações com rios de outras bacias, ou com a história da própria ictiofauna deste ambiente. Infelizmente não existem dados na literatura sobre a diversidade genética de peixes endêmicos do rio São Francisco.

A idade exata do surgimento de uma bacia ou de um rio é algo extremamente subjetivo. Segundo Potter (1997), um rio nunca terá uma datação para o seu começo nem um fim bem definido, pois, segundo palavras do próprio autor: “*Water has always run down hill, has it not?*”; assim como é sabido que diferentes partes de um rio provavelmente tenham idades diferentes. Os rios estão continuamente se acomodando às mudanças tectônicas e climáticas que ocorrem na (ou sobre) a superfície terrestre. Para Potter (1997), um começo razoável para um rio pode ser o último grande evento tectônico, glacial ou até mesmo vulcânico que ocorreu em um determinado sistema de drenagem.

A bacia do rio São Francisco está situada sobre uma região cratônica, o cráton do São Francisco, o qual, assim como os demais crátons, é caracterizado por ser uma região bastante estável do continente, que não esteve envolvida nas orogêneses do Fanerozóico (Ribeiro 2006; Alkmim 2004). O cráton do São Francisco data do Arqueano-Proterozóico (entre 3.400 e 1.800 Ma) (Schobbenhaus *et al.* 1984) e, hoje, é apenas um fragmento de um cráton muito maior que se rompeu devido ao surgimento do Oceano Atlântico, o cráton do São Francisco-Congo. Acima das rochas que formam o embasamento do cráton, diversas camadas foram depositadas formando as unidades litoestratigráficas da bacia, a partir das quais, hoje é possível estabelecer as idades dos sedimentos assim como sua composição. Estas unidades possuem idades distintas, o que confere à bacia um caráter poli-histórico, resultante dos diversos regimes tectônicos que ocorreram durante as fases de sua formação. Segundo Lundberg *et al.* (1998) a bacia deixou de receber sedimentos marinhos a partir do Triássico. Nas formações do Cretáceo, a partir do grupo Areado, são encontrados depósitos sedimentares aluviais indicando a presença de lagos e campos de dunas, além da ocorrência de fósseis de radiolários, foraminíferos, espículas de esponjas e dinoflagelados,

cujas implicações paleogeográficas ainda estão em fase de debates (Alkmim 2004; Almeida 2004).

Apesar da origem da bacia do rio São Francisco ser bastante remota, supõe-se que o rio propriamente dito tenha surgido de fato no final do Cretáceo, em função da separação dos continentes Sul-Americano e Africano (Potter 1997). Durante esta separação, a atuação de forças tectônicas (principalmente extensionais) promoveu o surgimento de diversas dobras e falhas (rifts) na superfície do continente, as quais futuramente viriam a acomodar o leito dos grandes rios. Segundo Potter (1997), a elevação Mantiqueira é a provável origem da nascente do São Francisco, assim como a elevação Nordeste do Brasil é a provável causa da mudança na direção do rio de sul-norte para oeste-leste, a partir do final do Médio e início do Sub-Médio São Francisco. Essas formações megadômicas teriam se formado a partir de correntes de convecções mantélicas divergentes, durante a fase de separação dos continentes. A calha principal do rio (de orientação sul-norte) foi provavelmente causada por uma depressão tectônica proveniente dos esforços atuantes na formação do rift que originou a abertura do Oceano Atlântico nesta região (Almeida 2004).

A diversificação dos peixes de água-doce neotropicais ocorreu por volta do final do período Cretáceo e início da era Cenozóica, a pelo menos 70 Ma, como resultado da evolução geográfica do continente Sul Americano (Lundberg *et al.* 1998). Os primeiros registros fósseis de Siluriformes na América do Sul datam deste período (final do Cretáceo) (Lundberg 1998). Evidências de transgressões marinhas e da formação de mares epicontinentais, além de extensas bacias de água-doce formadas no interior do continente devido principalmente ao soerguimento dos Andes (chamadas bacias de antepaís) parecem ter tido um papel fundamental no padrão atual de distribuição e da diversificação da biota.

Dois megaciclos de inundações marinhas são reconhecidos a nível global, um durante o Paleozóico e outro durante o Mesozóico/Cenozóico (Almeida 2004). No território brasileiro, as inundações marinhas coincidiram com estes dois ciclos, apesar de não acompanharem precisamente suas oscilações. O primeiro deles ocorreu quando o continente Sul Americano ainda estava ligado à África e a cordilheira dos Andes ainda não existia. Por este motivo as incursões marinhas deram-se principalmente do lado sudoeste do continente, inundando a região da bacia do Paraná, e norte, próxima a região da ilha de Marajó, na junção com a África, inundando as bacias do Amazonas, do Alto Tapajós e do Parnaíba. Três seqüências de sedimentos neríticos apontam para a existência de pelo menos três grandes inundações no território brasileiro durante o primeiro megaciclo. As áreas inundadas eram geralmente as mesmas e o intervalo entre as inundações eram de pelo menos algumas dezenas de milhares de anos. É deste período o registro do maior nível já atingido pelo mar no interior do continente, chegando a cobrir a quarta parte do que viria a ser o território brasileiro (Neodevoniano). É também deste período registros da união das bacias do Paraná e do Parnaíba (Neocarbonífero). Nesta época, o rio São Francisco ainda não existia, ou era bastante reduzido. As unidades litoestratigráficas da bacia neste período (representada pelo Grupo Santa Fé) apontam para sedimentos de origem glacio-marinhos evidenciando que a região deveria estar pelo menos em parte encoberta, além de registrar a passagem do continente por regiões próximas ao pólo sul, em torno de 60°S.

Após este período, o continente passou por uma fase de estabilidade de aproximadamente 100 Ma, até ter início o segundo megaciclo. Durante esta fase, quando o nível do mar desceu, muito provavelmente teve início a diversificação da biota ancestral de água-doce na América do Sul.

O segundo megaciclo ocorreu por volta do final do Neocretáceo, durante a separação dos continentes Sul-Americano e Africano (os quais estavam ligados desde o final do Proterozóico) (Potter 1997) e surgimento do Oceano Atlântico. Este período é marcado por intensa atividade tectônica, com a ocorrência de muitos soerguimentos e aberturas de falhas, o que supostamente teria dado origem ao rio São Francisco. É nesta fase que os padrões de drenagens atuais começaram a ser delineados (Potter 1997).

Os depósitos marinhos desta época aparecem intercalados com sedimentos continentais e transicionais, demonstrando que existiram vários ciclos transgressivo-regressivos no continente, que uniram e separaram a biota diversas vezes. O mar chegou a penetrar na bacia Sanfranciscana pelo menos uma vez, mas ainda há discordância se foi através da bacia do Parnaíba ou por águas do Pacífico, via bacia do Paraná (Almeida 2004; Hubert & Renno 2006). Além disso, o soerguimento dos Andes (que se iniciou no final do cretáceo, a aproximadamente 90 Ma), resultou na formação de uma extensa bacia de antepaís, situada em sua base leste (Lundberg *et al.* 1998), a qual produziu grandes habitats lacustres que podem ter unido rios de diversas bacias dentro do continente.

Foi também durante o Cretáceo que ocorreu o soerguimento principal do Arco do Alto Parnaíba, que hoje limita a bacia do rio São Francisco a sudoeste, separando-a da bacia do Paraná, assim como do Arco do São Francisco, que limita a bacia à noroeste, separando-a da Bacia do rio Parnaíba (Mantesso-Neto *et al.* 2004). Muito provavelmente houve união das bacias antes do soerguimento dos arcos, o que pode ser evidenciado pelo compartilhamento da fauna destas bacias, inclusive de parasitos (Sato & Pavanelli 2004). Porém, a ordem exata e a forma com que estes eventos ocorreram ainda não são descritas.

Através desta pequena síntese geológica e histórica é possível perceber que, apesar da origem da bacia ser bastante remota, o rio propriamente dito é muito mais recente, tendo

sido formado muito provavelmente na mesma época que os demais rios que formam as principais bacias brasileiras. Conseqüentemente, a diversificação da fauna componente destas bacias deve ter ocorrido de forma concomitante, não sendo a diferença das idades das bacias o motivo pelo qual a diversidade genética no rio São Francisco se mostrou tão reduzida.

Não obstante, outros fenômenos podem ter sido importantes na diminuição da diversidade além dos processos geológicos de formação da bacia. A baixa variabilidade poderia, ainda, ter sido influenciada pela ocorrência de um evento populacional recente. Nesta hipótese, não teria havido tempo suficiente para o aumento da diversidade genética da população remanescente.

Os padrões de distribuição unimodal (próximos a zero) propostos pela análise de *Mismatch distribution*, assim como os demais parâmetros estimados (D , F_S e τ) parecem corroborar esta hipótese. Além disso, a hipótese sugere que o evento populacional (gargalo, ou colonização recente) não tenha ocorrido em função da construção das barragens, mas muito antes disso, já que todas as populações desde o baixo até o alto São Francisco compartilham, na mesma proporção, os mesmos haplótipos. Se o evento tivesse ocorrido após as construções, a variabilidade genética poderia continuar sendo baixa, mas as proporções dos haplótipos deveriam ser diferentes entre as populações. Além disso, a forma homogênea (ou proporcional) com que os haplótipos estão distribuídos entre todos os trechos do rio parece sugerir uma situação de estabilidade, refletindo o perfil genético da grande população ancestral. Tudo isso é corroborado pela datação deste evento através do τ , o qual sugere que o evento populacional tenha ocorrido durante o Pleistoceno Médio. Esta datação se torna de fato relevante quando percebemos que esta época antecede o surgimento do *Homo sapiens* moderno (White *et al.* 2003), ou seja, o evento ocorreu

naturalmente, sem a intervenção humana. Mudanças ambientais posteriores como fortes secas por exemplo podem ter contribuído com a diminuição da diversidade nesta bacia. Porém, estudos mais aprofundados sobre as paleodrenagens e o paleoclima desta região são bastante escassos, principalmente devido à dificuldade deste tipo de estudo.

Em termos de conservação, é importante atentar para o fato de que o rio São Francisco é um sistema extremamente vulnerável por si só, devido à baixa variabilidade genética das espécies serem, provavelmente, o resultado de processos naturais. Sabemos que a presença de variabilidade é essencial para a sobrevivência de uma população, principalmente frente a mudanças ambientais (Allendorf & Luikart 2007; Frankham *et al.* 2004). O fato de existirem diversas represas fragmentando as populações ao longo do rio torna-o ainda mais vulnerável a estas mudanças, já que estas podem acabar reduzindo algumas populações a tamanhos efetivos pouco viáveis. Apesar das populações parecerem estáveis, a longo prazo sabemos que populações pequenas com pouca variabilidade apresentam reduzida viabilidade (ver Morita & Yokota 2002). Existem estudos baseados em simulações virtuais (Jager *et al.* 2001) que demonstram que uma única população vivendo num grande segmento de rio tem maiores chances de sobrevivência do que várias populações segmentadas em diversos fragmentos menores.

Segundo Frankham *et al.* (2004), os riscos relacionados com a fragmentação de uma população estão associados com a quantidade de fluxo gênico existente entre as partes fragmentadas. Sendo assim, quanto menor for o fluxo entre as populações, maiores serão os riscos de perda de variabilidade. Sabemos que nenhuma barragem do rio São Francisco apresenta escadas ou outros mecanismos de transposição que possibilitem a existência de fluxo gênico entre os segmentos fragmentados, o que torna as populações de peixes do rio ainda mais vulneráveis.

Porém, para que estratégias de manejo eficientes sejam adotadas, é extremamente necessário o conhecimento da fauna da região, saber como ela está estruturada geneticamente, além de conhecer seus aspectos ecológicos e comportamentais. Somente assim, medidas corretas poderão ser adotadas a fim de minimizar ao máximo os impactos causados nestes tipos de ambientes. As escadas de peixes são um exemplo de como a falta de conhecimento específico sobre o funcionamento do ecossistema de um determinado ambiente pode provocar incríveis danos a sua fauna.

Escadas são estruturas construídas artificialmente para interligarem as regiões a montante e a jusante de um rio que foram separadas pela construção de uma represa. É uma estratégia bastante interessante à primeira vista porém, se não estiver bem embasada, pode se tornar extremamente prejudicial para a fauna de peixes de uma determinada região, principalmente dos migradores. Pelicice & Agostinho (2008) sugerem através de seus estudos que escadas podem atrair peixes para locais menos apropriados para reprodução e recrutamento, mesmo havendo estes locais em outras partes do rio. Além disso, os modelos de construção de escadas adotados no Brasil são originários de países norte-americanos, os quais tiveram seus projetos baseados nos padrões de migração de salmonídeos, peixes abundantes e de grande importância comercial daquelas regiões (Agostinho *et al.* 2007a). Evidentemente os mesmos mecanismos não deveriam ser utilizados sem um estudo mais detalhado ou, pelo menos, sem o devido monitoramento genético, em rios neotropicais visto que estes possuem um grau de diversidade e complexidade muito maior se comparado com os anteriores.

Outros mecanismos têm sido propostos para o manejo de peixes em rios fragmentados. Uma abordagem bastante robusta destes métodos, suas implicações e sua utilização nos reservatórios brasileiros são descritos em Agostinho *et al.* (2007a). Segundo

os autores, a estocagem (que pode ser de introdução, manutenção e de suplementação) é um dos métodos mais utilizado e tem como objetivo recompor estoques depauperados de peixes pela introdução de organismos provenientes de outros sistemas naturais. Apenas a estocagem de suplementação visa a utilização de organismos nativos e o aumento da variabilidade genética da população. Desta forma, é a única que pode ser utilizada com finalidades de conservação. É recomendada em ambientes onde há sobrepesca, quando os criadouros de uma região natural não são mais suficientes ou, ainda, quando a capacidade de suporte de um determinado ambiente foi aumentada por intermédio do homem (Agostinho *et al.* 2007).

Almeida *et al.* (2003) propõe o cultivo de espécies para sua re-introdução na natureza como alternativa de manejo, principalmente no caso de espécies ameaçadas. Porém, ele aponta para o fato de cultivos de peixes já terem sido a causa de danos irreparáveis ao meio ambiente e, sendo assim, que se deve ter cuidado extremo e muita responsabilidade para se adotar uma estratégia como esta.

Segundo Haig (1998), os métodos de conservação devem ser adotados com base na estrutura das populações. Se uma população é estruturada, sua diversidade deve ser localmente conservada visto que já devem existir adaptações locais que seriam perdidas se esta população fosse misturada com indivíduos de outras populações. No entanto, se a população é homogênea em todos os pontos de sua distribuição, então pode-se optar por concentrar os esforços de proteção desta espécie em uma determinada área e utilizar estes espécimes como fonte de indivíduos para re-colonização de outras áreas mais impactadas, quando houver necessidade. Porém, esta é uma medida que deve ser tomada apenas em casos nos quais a preservação de todo o ambiente não for possível.

Dentre os diversos métodos possíveis que podem ser adotados como estratégias de manejo para a conservação, o melhor e mais eficiente deverá ser aquele que mantiver estudos de acompanhamento de forma constante, ou pelo menos periódica. Em um estudo que acompanhou o fechamento de uma represa, foi detectado que só depois de 14 anos do fechamento da barragem que a ictiofauna do reservatório atingiu um equilíbrio estável (Mol *et al.* 2007). Sendo assim, monitoramentos genéticos se fazem extremamente necessários e essenciais para garantir a manutenção dos estoques por longos prazos, visto que muitas vezes a taxa de mutação em uma população pode ser bastante lenta (como sugere o resultado deste trabalho) e as mudanças causadas nas populações podem demorar a ser percebidas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agostinho AA, Gomes LC, Pelicice FM (2007a) *Ecologia e Manejo de Recursos Pesqueiros em Reservatórios do Brasil*. Maringá – Edeum, 501p.
- Agostinho AA, Gomes LC, Veríssimo S, Okada EK (2004) Flood regime, dam regulation and fish in the Upper Parana´ River: effects on assemblage attributes, reproduction and recruitment. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, **14**, 11–19.
- Agostinho AA, Marques EE, Agostinho CS, *et al.* (2007c) Fish ladder of Lajeado Dam: migrations on one-way routes? *Neotropical Ichthyology*, **5**, 121-130.
- Agostinho CS, Pereira CR, Oliveira RJ, Freitas IS, Marques EE (2007b) Movements through a fish ladder: temporal patterns and motivations to move upstream. *Neotropical Ichthyology*, **5**, 161-167.
- Albrecht M, Pellegrini-Caramaschi E (2003) Feeding ecology of *Leporinus taeniofasciatus* (Characiformes: Anostomidae) before and after installation of a hydroelectric plant in the upper rio Tocantins, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **1**, 53-60.
- Alkmim FF (2004) *O que faz de um cráton um cráton? O Cráton do São Francisco e as revelações Almeidianas ao delimitá-lo*. IN: Mantesso Neto V., Bartorelli, A., Carneiro C.D.R., Brito-Neves B.B. orgs. 2004. *Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. São Paulo: Ed. Beca. 674p.
- Allendorf FW, Luikart G (2007) *Conservation and the genetics of populations*. Malden (MA): Blackwell Publishing. 642 p.
- Almeida FFM (2004) *Inundações marinhas fanerozóicas no Brasil e recursos minerais associados*. IN: Mantesso Neto V., Bartorelli, A., Carneiro C.D.R., Brito-Neves B.B.

- orgs. 2004. *Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. São Paulo: Ed. Beca. 674p.
- Almeida FS, Fungaro MHP, Sodré LMK (2001) RAPD and isoenzyme analysis of genetic variability in three allied species of catchfish (Siluriformes: Pimelodidae) from the Tibagi River, Brazil. *Journal of Zoology (London)*, **253**, 113-120.
- Almeida FS, Sodr  LMK (1998) Analysis of protein variability in 3 species of Pimelodidae (Ostariophysi, Siluriformes). *Genetics and Molecular Biology*, **21**, 487-492.
- Almeida FS, Sodr  LMK, Contel EPB (2003) Population structure analysis of *Pimelodus maculatus* (Pisces, Siluriformes) from the Tiet  and Paranapanema Rivers (Brazil). *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 301-305.
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology*, **215**, 403-410.
- ANA - Agência Nacional de  guas (2008) *Gef São Francisco – Projeto de Gerenciamento Integrado das Atividades Desenvolvidas em Terra na Bacia do São Francisco - Os Novos Limites da Bacia do São Francisco*. Projeto ANA/GEF/PNUMA/OEA. Disponível em <http://www.ana.gov.br/>
- ANEEL - Agência Nacional de Energia Elétrica (2008) *Banco de Informa es de Gera o - Capacidade de Gera o do Brasil*. Disponível em <http://www.aneel.gov.br/>
- Antonio RR, Agostinho AA, Pelicice FM *et al.* (2007) Blockage of migration routes by dam construction: can migratory fish find alternative routes? *Neotropical Ichthyology*, **5**, 177-184.
- Batista JS, Alves-Gomes JA (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. *Genetic Molecular Research*, **5**, 723-740.
- Baumgartner G, Nakatani K, Gomes LC, *et al.* (2004) Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the upper Paraná River, Brazil. *Environmental Biology of Fishes*, **71**, 115–125.
- Bay LK, Choat JH, van Herwerden L, Robertson DR (2004) High genetic diversities and complex genetic structure in an Indo-Pacific tropical reef fish (*Chlorurus sordidus*): evidence of an unstable evolutionary past? *Marine Biology*, **144**, 757–767.
- Bremer JRA, Naseri I, Ely B (1997) Orthodox and unorthodox phylogenetic relationships among tunas revealed by the nucleotide sequence analysis of the mitochondrial DNA control region. *Journal of Fish Biology*, **50**, 540–554.
- Britski HA, Sato Y, Rosa ABS (1988) *Manual de identificação de peixes da região de Três Marias: com chaves de identificação para os peixes da bacia do São Francisco*. 3. ed. Brasília: Câmara dos Deputados/ Codevasf, 115p.
- Brown WM, George Jr. M, Wilson AC (1979) Rapid evolution of animal mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **76**, 1967-1971.
- CBHSF – Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco (2008). *A Bacia Hidrográfica do Rio São Francisco*. Disponível em <http://www.saofrancisco.cbh.gov.br/>
- Ciofi C, Wilson GA, Beheregaray LB, *et al.* (2006). Phylogeographic History and Gene Flow Among Giant Galápagos Tortoises on Southern Isabela Island. *Genetics*, **172**, 1727–1744.

- Clarke AD, Telmer KH, Shrimpton JM (2007) Habitat use and movement patterns for a fluvial species, the Arctic grayling, in a watershed impacted by a large reservoir: evidence from otolith microchemistry. *Journal of Applied Ecology*, **44**, 1156–1165.
- Clement M, Posada D, Crandall KA (2000) TCS: A computer program to estimate gene genealogies. *Molecular Ecology* **9**, 1657-1660.
- CODEVASF – Companhia de Desenvolvimento dos Vales do São Francisco e do Parnaíba (2008) *Áreas de Atuação – Vale do São Francisco*. Disponível em <http://www.codevasf.gov.br/>
- Congdon BC (1995) Unidirectional gene flow and maintenance of genetic diversity in mosquitofish *Gambusia hoibrooki* (Teleostei: Poeciliidae). *Copeia*, 162 - 172.
- Donaldson KA, Wilson Jr. RR (1999) Amphi-Panamic Geminates of Snook (Percoidae: Centropomidae) Provide a Calibration of the Divergence Rate in the Mitochondrial DNA Control Region of Fishes. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**, 208–213.
- Dudgeon CL, Gust N, Blair D (2000) No apparent genetic basis to demographic differences in scarid fishes across continental shelf of the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, **137**, 1059-1066.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47-50.
- Excoffier L, Smouse P, Quattro J (1992) Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, **131**, 479-491.
- Fagan WF, Aumann C, Kennedy CM, Unmack PJ (2005) Rarity, fragmentation, and the scale dependence of extinction risk in desert fishes. *Ecology*, **86**, 34–41.

- Fagan WF, Unmack PJ, Burgess C, Minckley WL (2002) Rarity, fragmentation, and extinction risk in desert fishes. *Ecology*, **83**, 3250–3256.
- Frankham R, Ballou JD, Briscoe DA (2004) *A Primer of Conservation Genetics*. Cambridge University Press. 220 p.
- Fraser DJ, Lippé C, Bernatchez L (2004) Consequences of unequal population size, asymmetric gene flow and sex-biased dispersal on population structure in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Molecular Ecology*, **13**, 67–80.
- Froese R, Pauly D, Editors (2008) *FishBase*. World Wide Web electronic publication. www.fishbase.org, version (07/2008).
- Fu YX (1997) Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection. *Genetics*, **147**, 915-925.
- Gosset C, Rives J, Labonne J (2006) Effect of habitat fragmentation on spawning migration of brown trout (*Salmo trutta* L.). *Ecology of Freshwater Fish*, **15**, 247–254.
- Grant WS, Bowen BW (1998) Shallow Population Histories in Deep Evolutionary Lineages of Marine Fishes: Insights From Sardines and Anchovies and Lessons for Conservation. *The Journal of Heredity*, **89**, 415-426.
- Haig SM (1998) Molecular Contributions to Conservation. *Ecology*, **79**, 413-425
- Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids. Symposium Series*, **41**, 95-98
- Hänfling B, Weetman D (2006) Concordant Genetic Estimators of Migration Reveal Anthropogenically Enhanced Source-Sink Population Structure in the River Sculpin, *Cottus gobio*. *Genetics*, **173**, 1487–1501.

- Heggenes J, Røed KH (2006) Do dams increase genetic diversity in brown trout (*Salmo trutta*)? Microgeographic differentiation in a fragmented river. *Ecology of Freshwater Fish*, **15**, 366–375.
- Hernandez-Martich JD, Novak JM, Smith MH, Johns PE (1995) Genetic Structure of Mosquitofish Populations in the Altamaha and Ogeechee Drainages of Georgia: Reporting an Undescribed Form in the Ocmulgee River. *Biochemical Systematics and Ecology*, **23**, 617-625.
- Hernandez-Martich JD, Smith MH (1997) Downstream gene flow and genetic structure of *Gambusia hoibrooki* (eastern mosquitofish) populations. *Heredity*, **79**, 295 – 301.
- Hubert N, Renno JF (2006) Historical biogeography of South American freshwater fishes. *Journal of Biogeography*, **33**, 1414–1436.
- Hudson RR (1990) *Gene genealogies and the coalescent proces*, pp. 1-44 IN Oxford Surveys in Evolutionary Biology, edited by Futuyama, and J. D. Antonovics. Oxford University Press, New York.
- Iyengar A, Gilbert T, Woodfine T, *et al.* (2007) Remnants of ancient genetic diversity preserved within captive groups of scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*). *Molecular Ecology* **16**, 2436–2449.
- Jager HI, Chandler JA, Lepla KB, Winkle WV (2001) A theoretical study of river fragmentation by dams and its effects on white sturgeon populations. *Environmental Biology of Fishes*, **60**, 347–361.
- Kawamura K, Yonekura R, Katano O, Taniguchis Y, Saitoh K (2006) Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea. *Molecular Ecology*, **15**, 613–621.

- Koblmüller S, Sturmbauer C, Verheyen E, Meyer A, Salzburger W (2006) Mitochondrial phylogeny and phylogeography of East African squeaker catfishes (Siluriformes: *Synodontis*). *Evolutionary Biology*, **6**, 49-65.
- Loureiro-Crippa VE, Hahn NS (2006) Use of food resources by the fish fauna of a small reservoir (rio Jordão, Brazil) before and shortly after its filling. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 357-362.
- Lundberg JG (1998) *The Temporal Context for the Diversification of Neotropical Fishes*. In L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena e C. A. S. Lucena (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp 13-48). Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS.
- Lundberg JG, Marshall J, Guerrero B, *et al.* (1998) *The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers*. In L. R. Malabarba, R. E. Reis, R. P. Vari, Z. M. S. Lucena e C. A. S. Lucena (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp 13-48). Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS.
- Mantesso Neto V., Bartorelli, A., Carneiro C.D.R., Brito-Neves B.B. orgs. 2004. *Geologia do Continente Sul-Americano: Evolução da obra de Fernando Flávio Marques de Almeida*. São Paulo: Ed. Beca. 674p.
- Martins C, Wasko AP, Oliveira C, Foresti F (2003) Mitochondrial DNA variation in wild populations of *Leporinus elongatus* from the Paraná River basin. *Genetics and Molecular Biology*, **26**, 33-38.
- Meldgaard T, Nielsen EE, Loeschcke V (2003) Fragmentation by weirs in a riverine system: a study of genetic variation in time and space among populations of European grayling (*Thymallus thymallus*) in a Danish river system. *Conservation Genetics*, **4**, 735–747.

- Mérona B, Santos GM, Almeida RG (2001) Short term effects of Tucuruí Dam (Amazonia, Brazil) on the trophic organization of fish communities. *Environmental Biology of Fishes*, **60**, 375–392.
- Mérona B, Vigouroux R, Horeau V (2003) Changes in food resources and their utilization by fish assemblages in a large tropical reservoir in South America (Petit-Saut Dam, French Guiana). *Acta Oecologica*, **24**, 147–156.
- Meyer A, Kocher TD, Basasibwaki P *et al.* (1990) Monophyletic origin of Victoria cichlid fish suggested by mitochondrial DNA sequences. *Nature*, **347**, 550-553.
- Mol JH, de Mérona B, Ouboter PE, Sahdew S (2007) The fish fauna of Brokopondo Reservoir, Suriname, during 40 years of impoundment. *Neotropical Ichthyology*, **5**, 351-368.
- Morita K, Yokota A (2002) Population viability of stream-resident salmonids after habitat fragmentation: a case study with white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) by an individual based model. *Ecological Modelling*, **155**, 85–94.
- Mullis KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, **55**, 335-350.
- Nei M (1987) *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York, NY, USA.
- Nelson JS (2006) *Fishes of the world*. Fourth edition. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey. 601 p.
- Neraas LP, Spruell P (2001) Fragmentation of riverine systems: the genetic effects of dams on bull trout (*Salvelinus confluentus*) in the Clark Fork River system. *Molecular Ecology*, **10**, 1153–1164.

- Nguyen TTT (2008) Population structure in the highly fragmented range of *Tor douronensis* (Cyprinidae) in Sarawak, Malaysia revealed by microsatellite DNA markers. *Freshwater Biology*, **53**, 924–934.
- Oliveira-Neto JF, Pie MR, Boeger WA, Ostrensky A, Baggio RA (2007) Population genetics and evolutionary demography of *Ucides cordatus* (Decapoda: Ocypodidae). *Marine Ecology*, **28**, 460–469.
- Pelicice FM, Agostinho AA (2008) Fish-Passage Facilities as Ecological Traps in Large Neotropical Rivers. *Conservation Biology*, **22**, 180–188.
- Pompeu PS, Godinho HP (2006) Effects of extended absence of flooding on the fish assemblages of three floodplain lagoons in the middle São Francisco River, Brazil. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 427-433.
- Potter PE (1997) The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South America: a Natural History. *Journal of South American Earth Sciences*, **10**, 331-344.
- Prioli SMAP, Prioli AJ, Júlio Jr. HF, *et al.* (2002) Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçú River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers. *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 421-430.
- Reid SM, Wilson CC, Mandrak NE, Carl LM (2008) Population structure and genetic diversity of black redhorse (*Moxostoma duquesnei*) in a highly fragmented watershed. *Conservation Genetics*, **9**, 531–546.
- Ribeiro AC (2006) Tectonic history and the biogeography of the freshwater fishes from the coastal drainages of eastern Brazil: an example of faunal evolution associated with a divergent continental margin. *Neotropical Ichthyology*, **4**, 225-246.

- Rizzo E, Godinho HP (2003) *Superfície de ovos de peixes Characiformes e Siluriformes*, p. 115-132. In: Godinho HP, Godinho AL (org.). *Águas, peixes e pescadores do São Francisco das Minas Gerais*. Belo Horizonte: PUC Minas, 468p.
- Rocha-Olivares A, Garber NM, Stuck KC (2000) High genetic diversity, large inter-oceanic divergence and historical demography of the striped mullet. *Journal of Fish Biology*, **57**, 1134–1149.
- Rogers AR, Harpending H (1992) Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences. *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569.
- Sato MCB, Pavanelli GC (2004) Digenea de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) das bacias dos rios São Francisco e Paraná, Brasil. *Parasitologia Latinoamericana*, **59**, 123 - 131.
- Sato Y, Godinho HP (1999) *Peixes da bacia do rio São Francisco*, p. 401-413. In: Lowe-McConnell RH. *Estudos ecológicos de comunidades de peixes tropicais*. São Paulo: Edusp, 534p.
- Sato Y, Godinho HP (2004) *Migratory fishes of the São Francisco river*. IN: Carolsfeld J, Harvey B, Ross C, Baer A, editors. *Migratory fishes of South America: biology, fisheries and conservation status*. World Fisheries Trust, The World Bank, Ottawa, Canada. 380 p.
- Schneider S, Excoffier L (1999) Estimation of Past Demographic Parameters From the Distribution of Pairwise Differences When the Mutation Rates Vary Among Sites: Application to Human Mitochondrial DNA. *Genetics*, **152**, 1079–1089.
- Schobbenhaus C, Campos DA, Derze GR, Asmus HE (1984) *Geologia do Brasil. Texto explicativo do mapa geológico do Brasil e da área oceânica adjacente incluindo depósitos minerais. Escala 1:2 500000*. Brasília, MME-DNPM. 501p.

- Seutin G, White BN, Boag PT (1991) Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis. *Canadian Journal of Zoology*, **69**, 82-90.
- Silva CC, Ferreira EJG, de Deus CP (2008) Diet of *Bryconops alburnoides* and *B. caudomaculatus* (Osteichthyes:Characiformes) in the region affected by Balbina Hydroelectric Dam (Amazon drainage, Brazil). *Neotropical Ichthyology*, **6**, 237-242.
- Slatkin M, Hudson RR (1991) Pairwise Comparisons of Mitochondrial DNA Sequences in Stable and Exponentially Growing Population. *Genetics*, **129**, 555-562.
- Staden R (1996). The Staden sequence analysis package. *Molecular Biotechnology*, **5**, 233–241.
- Tajima F (1983) Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. *Genetics*, **105**, 437-460.
- Tajima F (1989) Statistical Method for Testing the Neutral Mutation Hypothesis by DNA Polymorphism. *Genetics*, **123**, 585-595.
- Templeton AR, Crandall KA, Sing CF (1992) A cladistic analysis of phenotypic associations with haplotypes inferred from restriction endonuclease mapping and DNA sequence data. III. Cladogram estimation. *Genetics* **132**, 619-633.
- Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research*, **22**, 4673-4680.
- Tucci CEM, Hespanhol I, Cordeiro-Netto OM (2000) Cenários da gestão de água no Brasil: uma contribuição para a “visão mundial da água”. *Revista Brasileira de Recursos Hídricos*, **5**, 31-43.
- Tucci CEM, Hespanhol I, Cordeiro-Netto OM (2001) *Gestão de Água no Brasil*. Brasília: UNESCO, 156 p.

- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population structure. *Evolution*, **38**, 1358-1370.
- White TD, Asfaw B, DeGusta D, *et al.* (2003) Pleistocene *Homo sapiens* from Middle Awash, Ethiopia. *Nature*, **423**, 742-747.
- Yamamoto S, Morita K, Koizumi I, Maekawa K (2004) Genetic differentiation of white-spotted charr (*Salvelinus leucomaenis*) populations after habitat fragmentation: Spatial-temporal changes in gene frequencies. *Conservation Genetics*, **5**, 529–538.
- Yan L, Wang D, Fang Y, *et al.* (2008) Genetic diversity in the bronze gudgeon, *Coreius heterodon*, from the Yangtze River system based on mtDNA sequences of the control region. *Environmental Biology of Fishes*, **82**, 35–40.

FIGURAS

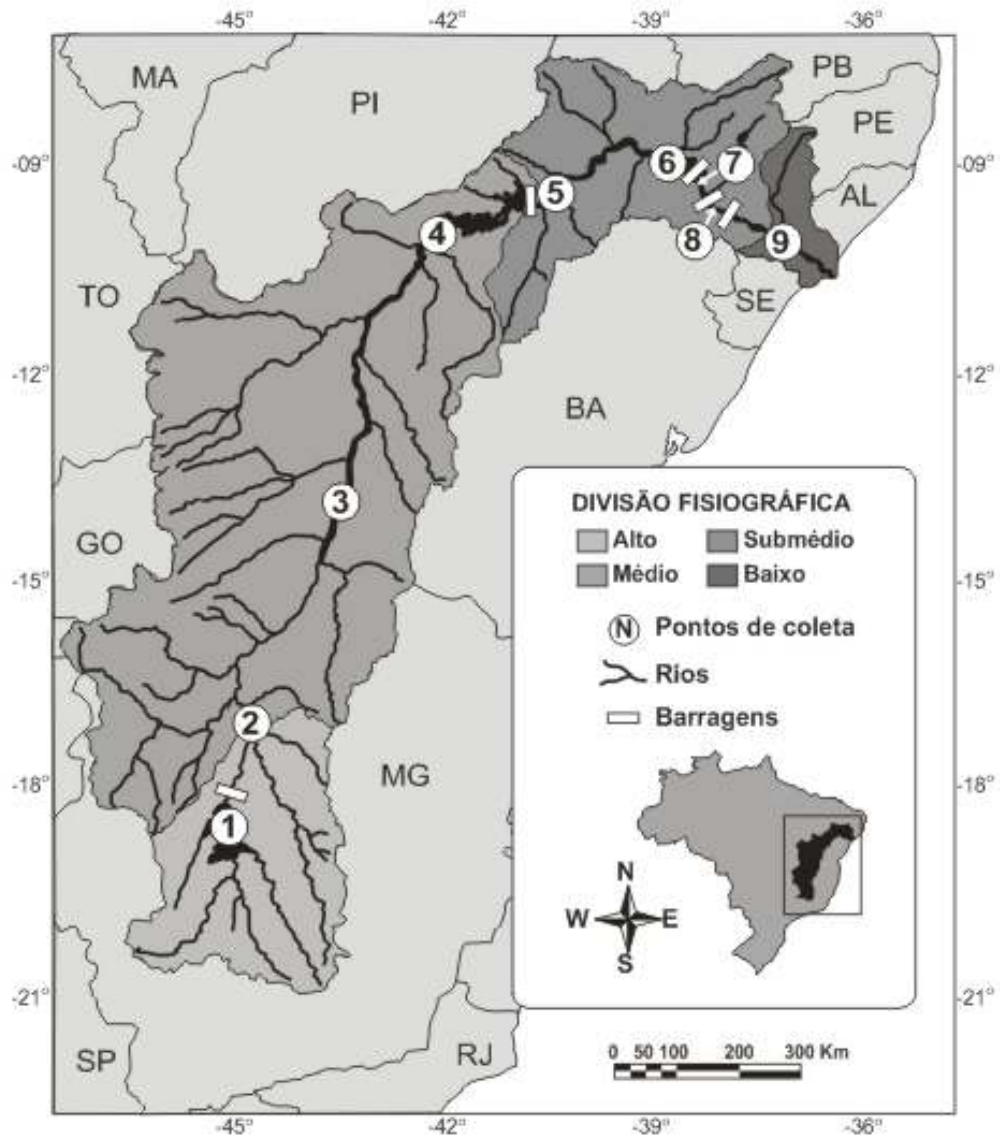


Figura I. Mapa com as localizações dos pontos de coleta dos exemplares de *Pimelodus maculatus* ao longo do rio São Francisco onde os números representam os locais de coleta e as barras representam as barragens das usinas hidroelétricas.

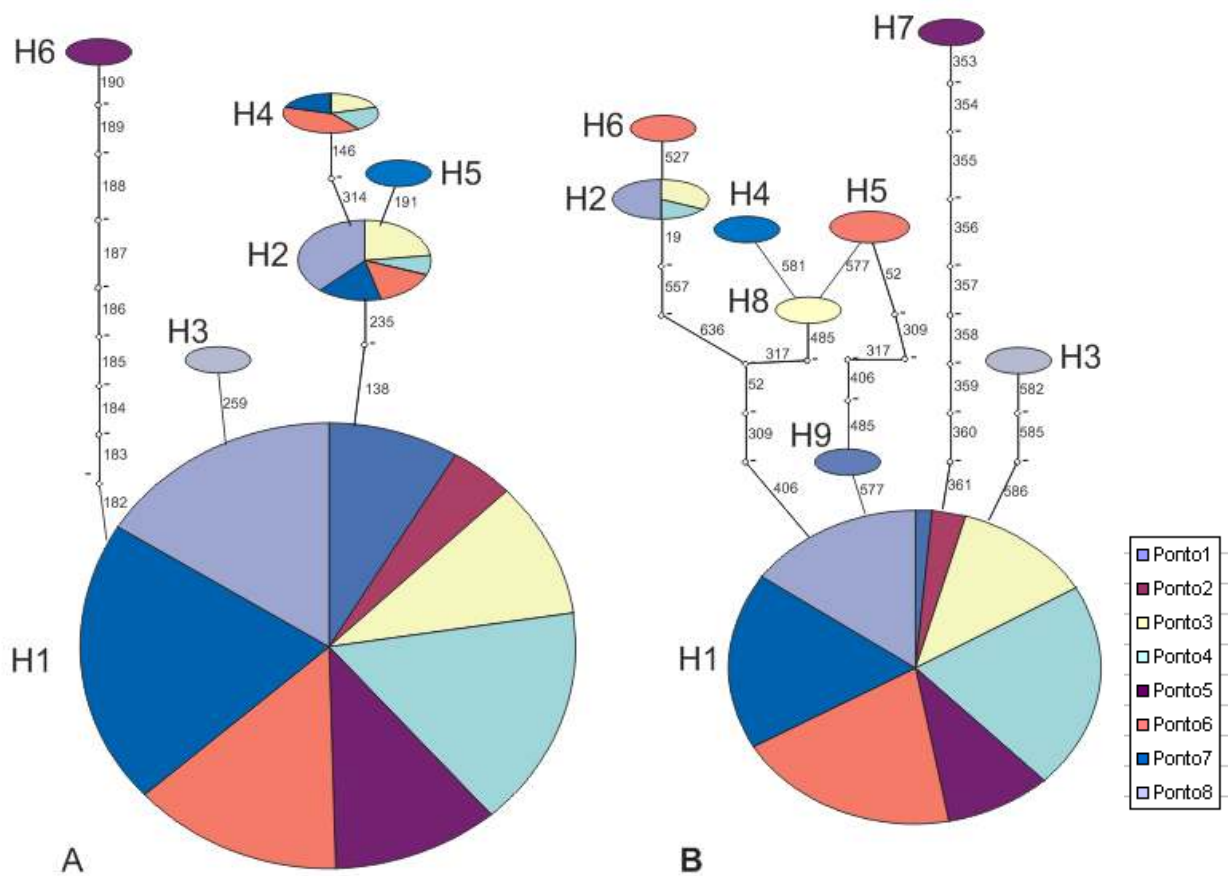


Figura II. Rede de haplótipos mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos de *Pimelodus maculatus* no Rio São Francisco. A rede (A) refere-se ao alinhamento curto (334 pb e 114 indivíduos) e a rede (B), ao alinhamento longo (640 pb e 80 indivíduos). Os pontos brancos em cada traço representam a quantidade de mutações entre um haplótipo e outro. Os valores representam o sítio no qual ocorreu a mutação.

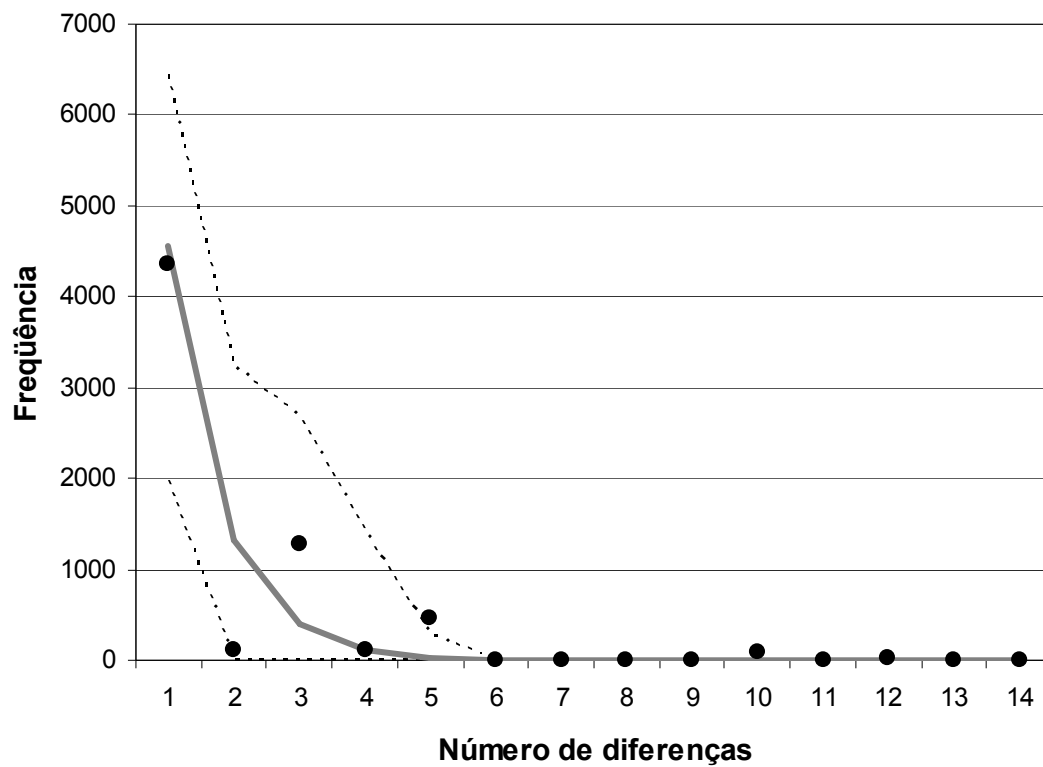


Figura III. Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (*Mismatch distribution*) das amostras de *Pimelodus maculatus* do alinhamento curto com todas as localidades agrupadas. Os pontos representam os dados observados. A linha inteira representa o modelo e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,050$).

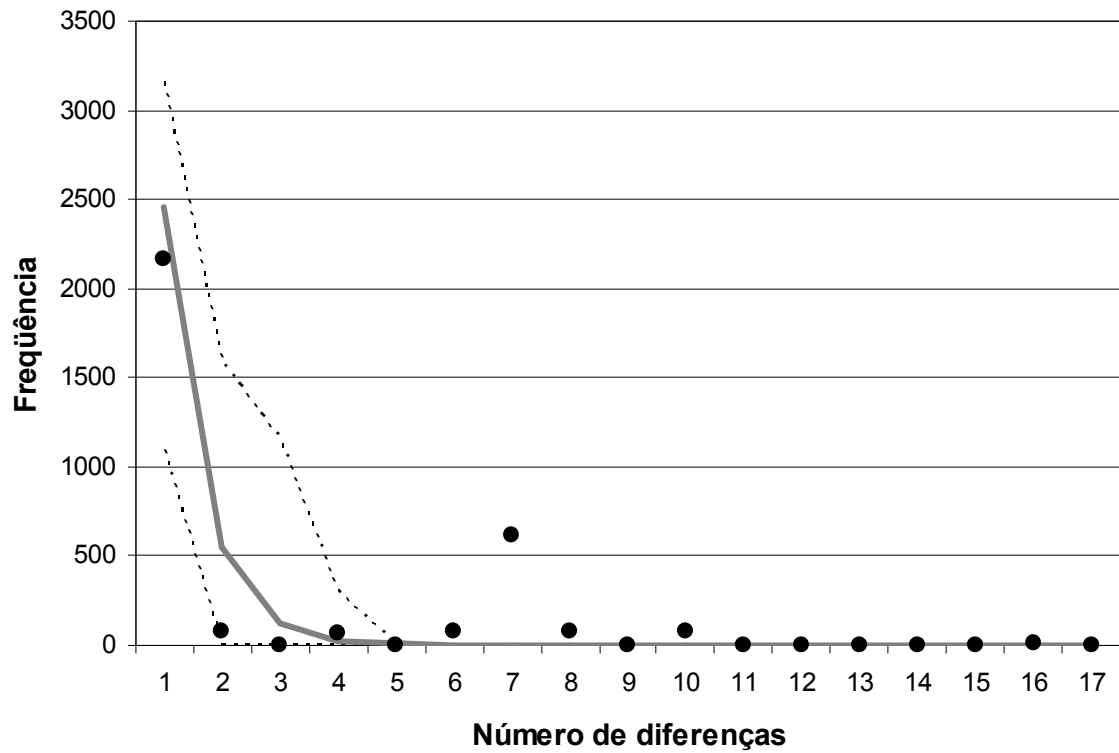


Figura IV. Gráfico da distribuição das frequências do número de diferenças pareadas (*Mismatch distribution*) das amostras de *Pimelodus maculatus* do alinhamento longo com todas as localidades agrupadas. Os pontos representam os dados observados. A linha inteira representa o modelo e as linhas pontilhadas representam o intervalo de confiança ($\alpha = 0,050$).

TABELAS

Tabela I. Dados de coleta dos espécimes de *Pimelodus maculatus* utilizados no estudo.

Estação - Barragem	Número de Indivíduos coletados (N)	Data de coleta	Procedência (coordenada geográfica)	Tecido
1 – Montante Três Marias	20	Jul/08	S 18°14' 35" W 45°14' 02"	Brânquias
2 – Jusante Três Marias	6	Jul/08	S 18°11' 17" W 45°15' 07"	Brânquias
3 – Montante Sobradinho	17	Jul/08	S 13°15' 12" W 43°25' 30"	Brânquias
4 – Lago de Sobradinho	40	Jun/08	S 09°26' 20" W 40°49' 54"	Brânquias
5 – Jusante de Sobradinho	18	Jun/08	S 08°59' 25" W 38°13' 37"	Brânquias
6 – Jusante de Itaparica	20	Jun/08	S 09°11' 10" W 38°16' 46", S 09°23' 24" W 38°14' 14"	Brânquias
7 – Montante de Xingó	25	Fev/08	S 09°30' 36" W 38°00' 29"	Brânquias
8 – Jusante de Xingó	25	Mar/08	S 10°12' 50" W 36°49' 19"	Nadadeira

Tabela II. Número de indivíduos seqüenciados de *Pimelodus maculatus* (n), número de haplótipos (n_h) e diversidade de nucleotídeos (π) apresentado pelas amostras nos oito pontos de coleta, assim como em todos os pontos juntos.

Ponto Amostrado	Alinhamento Curto			Alinhamento Longo		
	Número de Indivíduos (n)	Número de haplótipos (n_h)	Diversidade de nucleotídeos (π)	Número de Indivíduos (n)	Número de haplótipos (n_h)	Diversidade de nucleotídeos (π)
1- Montante Três Marias	08	01	0,0000 \pm 0,0000	02	02	0,0015 \pm 0,0022
2- Jusante Três Marias	04	01	0,0000 \pm 0,0000	02	02	0,0015 \pm 0,0022
3- Montante Sobradinho	13	03	0,0036 \pm 0,0028	11	03	0,0041 \pm 0,0027
4- Lago de Sobradinho	17	03	0,0020 \pm 0,0018	15	02	0,0012 \pm 0,0010**
5- Jusante Sobradinho	11	02	0,0048 \pm 0,0035*	07	02	0,0040 \pm 0,0028
6- Jusante Itaparica	17	03	0,0036 \pm 0,0027	16	03	0,0034 \pm 0,0022
7- Montante Xingo	23	04	0,0025 \pm 0,0021	13	02	0,0014 \pm 0,0012**
8- Jusante de Xingo	21	03	0,0025 \pm 0,0021	14	03	0,0040 \pm 0,0025
Todos os pontos	114	06	0,0027 \pm 0,0021	80	09	0,0028 \pm 0,0018

* Este valor pode estar artificialmente superestimado devido à presença de um gap de 9 nucleotídeos em apenas um indivíduo.

** Valores artificialmente subestimados devido à presença de muitos nucleotídeos duvidosos (N) nas seqüências.

Tabela III. Tabela da frequência de haplótipos nas oito populações de *Pimelodus maculatus*, assim como suas frequências relativas, baseada no alinhamento curto.

Haplótipo	Ponto 1 (n=8)	Ponto 2 (n=4)	Ponto 3 (n=13)	Ponto 4 (n=17)	Ponto 5 (n=11)	Ponto 6 (n=17)	Ponto 7 (n=23)	Ponto 8 (n=21)	Total (n=114)
H1	8 / 1,00	4 / 1,00	9 / 0,692	15 / 0,882	10 / 0,909	13 / 0,765	19 / 0,826	15 / 0,714	93 / 0,816
H2	-	-	3 / 0,231	1 / 0,058	-	2 / 0,118	2 / 0,087	5 / 0,238	13 / 0,114
H3	-	-	-	-	-	-	-	1 / 0,047	1 / 0,008
H4	-	-	1 / 0,076	1 / 0,058	-	2 / 0,118	1 / 0,043	-	5 / 0,043
H5	-	-	-	-	-	-	1 / 0,043	-	1 / 0,008
H6	-	-	-	-	1 / 0,090	-	-	-	1 / 0,008

Tabela IV. Tabela da frequência de haplótipos nas oito populações de *Pimelodus maculatus*, assim como suas frequências relativas com base no alinhamento longo.

Haplótipo	Ponto 1 (n=2)	Ponto 2 (n=2)	Ponto 3 (n=11)	Ponto 4 (n=15)	Ponto 5 (n=7)	Ponto 6 (n=16)	Ponto 7 (n=13)	Ponto 8 (n=14)	Total (n=80)
H1	1 / 0,5	2 / 1,00	8 / 0,727	14 / 0,933	6 / 0,857	13 / 0,812	12 / 0,923	10 / 0,714	66 / 0,825
H2	-	-	2 / 0,182	1 / 0,066	-	-	-	3 / 0,214	6 / 0,075
H3	-	-	-	-	-	-	-	1 / 0,071	1 / 0,012
H4	-	-	-	-	-	-	1 / 0,076	-	1 / 0,012
H5	-	-	-	-	-	2 / 0,125	-	-	2 / 0,025
H6	-	-	-	-	-	1 / 0,062	-	-	1 / 0,012
H7	-	-	-	-	1 / 0,143	-	-	-	1 / 0,012
H8	-	-	1 / 0,090	-	-	-	-	-	1 / 0,012
H9	1 / 0,5	-	-	-	-	-	-	-	1 / 0,012

Tabela V. Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva nas amostras examinadas de *Pimelodus maculatus*, onde N = tamanho da amostra, S = número de sítios variáveis, Pi = média das diferenças pareadas.

Testes	Parâmetros	Alinhamento Curto	Alinhamento Longo
Tajima (1989)	N	114	80
	S	6	14
	Pi	0,76479	1,59620
	D	-0,71155 ± 0,96765	-1,22771 ± 0,94063
	P _D	0,27680	0,09560
Fu (1997)	Nº de alelos obs.	114	80
	Nº de alelos esp.	5,03049	7,46313
	F _S	-30,62755	-27,57607
	P _F	0,00000	0,00000

06MAN15 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCCCTAC
06MAN16 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCCCTAC
06MAN19 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCCCTA
06MAN20 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN01 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCCTA
03MAN03 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGT
03MAN04 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN05 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN07 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN08 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN09 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN10 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN11 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN12 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN13 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGG
03MAN14 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
03MAN16 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
02MAN02 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
02MAN03 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGT
02MAN05 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
02MAN06 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
01MAN01 CCGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGG
01MAN03 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
01MAN04 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
01MAN01B CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
01MAN02B CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
01MAN03B CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
01MAN06 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
01MAN11 CTGTACTAATACATAAAACCTATTGAAGGGTCAGGGGCAAAAATTGTGGGGTTTCACCTACTGCACATTACTGGCATCTGGTTCC
H16498 CATCTGGTTCCCTACTTCAGGTG