

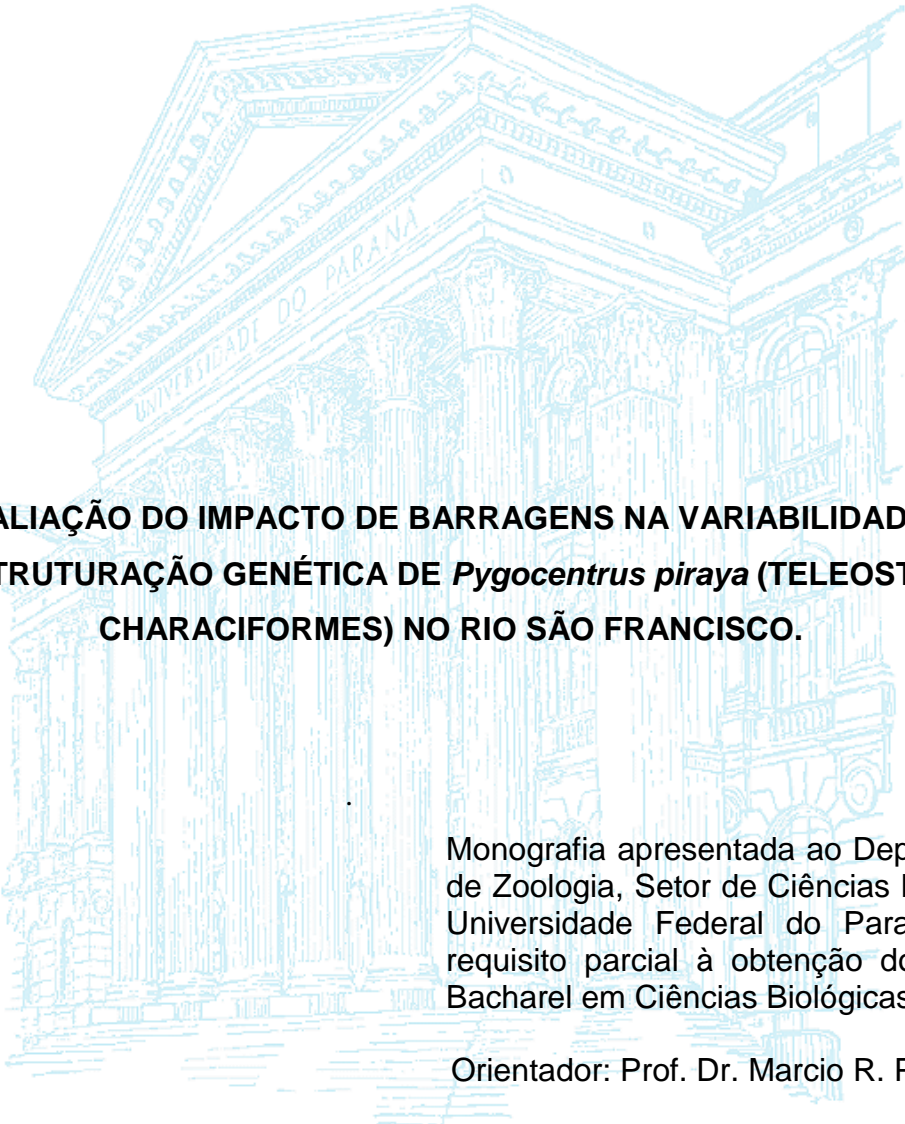
MARCEL KRUCHELSKI TSCHÁ

**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE BARRAGENS NA VARIABILIDADE E
ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Pygocentrus piraya* (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES) NO RIO SÃO FRANCISCO.**

CURITIBA

2009

MARCEL KRUCHELSKI TSCHÁ



**AVALIAÇÃO DO IMPACTO DE BARRAGENS NA VARIABILIDADE E
ESTRUTURAÇÃO GENÉTICA DE *Pygocentrus piraya* (TELEOSTEI:
CHARACIFORMES) NO RIO SÃO FRANCISCO.**

Monografia apresentada ao Departamento de Zoologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientador: Prof. Dr. Marcio R. Pie

CURITIBA

2009

Ao sonho de um mundo justo e digno
aos que lutam pela verdade
Dedico

AGRADECIMENTOS

Expresso aqui meus agradecimentos primeiramente ao Dr. Marcio R. Pie e ao Dr. Walter A. P. Boeger pelas orientações primorosas em todos estudos realizados, proporcionando aprendizado teórico e prático essenciais na formação de um profissional competente.

À toda equipe do Laboratório de Ecologia Molecular, em especial à Luciana Patella pela amizade, pelos ensinamentos iniciais no laboratório e todas as supervisões até hoje; também pela companhia, auxílio e ensino de Raphael O. Ribeiro, Letícia B. Zagonel, José Francisco de O. Neto, Rafael A. Baggio, Flávio M. Marteleto e Raquel Patella.

Aos meus pais Elza Kruchelski e Paulo Tschá pelo carinho, dedicação e educação e à Mateos K. Tschá, exemplos em algumas conquistas.

Aos amigos biólogos que proporcionaram momentos memoráveis durante meia década de graduação, em especial a David D. da Silva, Laercio D. S. Piancini, Luis Felipe S. Manvailer, Luiz Fernando K. Gallego e aos professores que fizeram parte deste convívio.

À amável presença da sempre interessada Daniela Lovato.

Aos médicos que prezaram cuidados a minha saúde.

Por fim á equipe da Aquatrix e à CODEVASF pelo suporte técnico nas coletas, ao Grupo Integrado de Aqüicultura (GIA) da Universidade Federal do Paraná, fundamental na realização de diversos estudos e ao CNPq pelo suporte financeiro.

SUMÁRIO

1. LISTAS	6
1.1. Lista de Figuras	6
1.2. Lista de Tabelas	6
2. RESUMO.....	7
3. INTRODUÇÃO	8
4. OBJETIVOS	11
5. METODOLOGIA.....	12
5.1. Coleta das Amostras.....	12
5.2. Procedimento Molecular	12
5.3. Análises Moleculares	14
6. RESULTADOS	16
6.1. Variação genética	16
6.2. Estrutura das Populações.....	17
6.3. Passado Demográfico.....	17
7. DISCUSSÃO	18
8. CONCLUSÃO.....	22
9. FIGURAS	24
10. TABELAS	27
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	31

1. LISTAS

1.1. Lista de Figuras

Figura 1. Mapa da Bacia do Rio São Francisco indicando a localização dos pontos de coleta e das barragens.....	24
Figura 2. Rede de haplótipos de <i>Pygocentrus piraya</i> , mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos no Rio São Francisco.....	25
Figura 3. Gráfico de <i>Mismatch Distribution</i>	26

1.2. Lista de Tabelas

Tabela 1. Número de indivíduos sequenciados (n), número de haplótipos (n_h) e diversidade de nucleotídeos (π)	27
Tabela 2. Frequência de haplótipos nos nove pontos amostrados, assim como suas frequências relativas.	28
Tabela 3. Análise de variância molecular, AMOVA.	29
Tabela 4. Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva	30

2. RESUMO

A demanda de energia elétrica tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, sendo os recursos hídricos, através da instalação de Usinas Hidrelétricas, extremamente utilizados na geração de energia por todo o Brasil. Na Bacia do Rio São Francisco, graças a seu grande potencial hidroelétrico, não é diferente. Represas são sem dúvida essenciais, visto seus benefícios sociais e econômicos ao ser humano, no entanto, podem gerar danos severos à ecossistemas, alterando a composição da fauna e extinguindo populações em poucas gerações. A piranha do São Francisco, *Pygocentrus piraya*, é uma espécie endêmica, alvo deste estudo que visa identificar padrões gerais de impacto das barragens sobre sua variabilidade e estruturação genética. Fragmentos da região controladora do mtDNA desta espécie foram sequenciados de nove pontos distintos ao longo de todo Rio São Francisco. Análises estatísticas demonstraram não haver estruturação genética entre as populações isoladas, além de uma baixa diversidade genética, havendo mais variabilidade dentro das populações do que entre elas mesmas. O padrão unimodal da análise de *Mismatch Distribution* e a rede de haplótipos gerados são característicos e indicativos de um efeito de gargalo populacional, datado pela estimativa de τ , em 170.000 anos atrás, durante o Pleistoceno Médio. Este evento teria ocorrido muito antes da construção das barragens, porém muito mais recente que a suposta especiação de *P. piraya* há 2,63 milhões de anos, tendo certamente contribuído para a baixa variabilidade genética encontrada.

3. INTRODUÇÃO

Por todo território brasileiro a demanda energética têm aumentado consideravelmente nos últimos anos, impulsionando a construção de diversas barragens de grande e pequeno porte por todo país. Segundo o Banco de Informações da Geração da Agência Nacional de Energia Elétrica (ANEEL) em Novembro de 2008, mais de 75% da geração de energia elétrica brasileira é proveniente de usinas hidrelétricas. Esta grande demanda por fontes de energia a partir de recursos hídricos é também evidenciada pela existência de 706 usinas hidrelétricas em funcionamento gerando mais de 77000MW, mais 89 represamentos em construção, além de 255 projetos de usinas já outorgados (ANEEL, 2008).

O Rio São Francisco, também conhecido como Rio da Integração Nacional, com cerca de 2780 km, interliga três regiões políticas do Brasil, banhando os estados de Minas Gerais, Bahia, Pernambuco, Alagoas e Sergipe, além da bacia hidrográfica também envolver os estado de Goiás e o Distrito Federal. Devido a sua grande extensão, diversas condições climáticas são presentes, variando de tropical-úmido a semi-árido, vegetação de Florestas, Caatinga e Cerrado, com temperatura média anual entre 23 e 27°C (CODEVASF, 2008). O Rio São Francisco nasce na Serra da Canastra em Minas Gerais e deságua no Oceano Atlântico formando um estuário entre Alagoas e Sergipe. A Bacia do Rio São Francisco é dividida em quatro divisões fisiográficas: Alto, Médio, Sub-Médio e Baixo São Francisco (Sato & Godinho, 2004) (Figura 1).

O grande potencial hidrelétrico da Bacia do Rio São Francisco provém basicamente do predomínio de rios de planalto em sua formação (Tucci *et al.*, 2001), gerando 16% da capacidade hidrelétrica nacional (ANEEL, 2008). Uma das mais importantes bacias do país, totalizando 7,5% do território brasileiro (CBHSF, 2008) com uma área de 636.919,60 km² (ANA, 2008). As maiores Usinas Hidrelétricas foram construídas a cerca de cinquenta anos sobre o leito do Rio São Francisco. São elas: Três Marias, Sobradinho, Itaparica, Complexo de Paulo Afonso e Xingo. Sendo que não há em nenhuma delas artifícios que facilitem a passagem de peixes à montante ou à jusante das represas, aumentando as chances de isolamento das populações fragmentadas.

A instalação de usinas hidrelétricas é sem dúvida extremamente necessária visto os benefícios econômicos e sociais que elas proporcionam à vida humana. No entanto, seus impactos ao meio ambiente podem tornar-se severos, seja influenciando o padrão de migração de diversas espécies (Gosset *et al.*, 2006), alterando a composição da fauna (Loureiro-Crippa & Hahn, 2006), ou provocando alteração na riqueza de espécies e na diversidade de sistemas (Mol *et al.*, 2007). A construção de barragens também pode influenciar diretamente as características bióticas e abióticas de ecossistemas, afetando seu equilíbrio, como, por exemplo, acarretando alterações na disponibilidade de alimentos e na composição da dieta de peixes (Mérona *et al.*, 2001; Mérona *et al.*, 2003; Loureiro-Crippa & Hahn, 2006). Barragens ainda podem afetar o tamanho, interromper o fluxo gênico e aumentar a diferença genética entre populações isoladas (Meldgaard *et al.*, 2003). Quando há fragmentação de uma população seu tamanho é reduzido e como consequência há perda de diversidade genética e aumento da taxa de endocruzamento, o que acarreta em um desempenho reprodutivo diminuído (Frankham *et al.*, 2004). O que também diminui a probabilidade de transmissão de alelos raros, deixando as populações isoladas vulneráveis a efeitos de deriva e à perda de alelos. Em suma, afetando a adaptabilidade e reduzindo o potencial evolutivo das populações. Segundo o mesmo autor, estratégias de re-estabelecimento do fluxo gênico diminui os riscos de extinção das populações que foram isoladas.

Não só as barragens, mas também os reservatórios formados pela instalação destas, tornam-se barreiras para algumas espécies de peixes (Clarke *et al.* 2007), eliminando ambientes naturais como córregos e corredeiras, utilizadas por algumas espécies como pontos de desova, gerando impactos a estas espécies (Baumgartner *et al.* 2004).

O Rio São Francisco possui uma ictiofauna muito rica, compreendendo mais de 170 espécies conhecidas (Sato & Godinho, 1999), das quais mais de 60% pertencentes à Ordem Characiformes, sendo algumas destas endêmicas. A espécie alvo deste estudo, *Pygocentrus piraya* (Cuvier, 1819), conhecida popularmente como piranha do São Francisco, é um predador de água doce extremamente voraz, espécie não migradora e de existência restrita ao Rio São Francisco. É considerada a maior espécie de piranha, chegando a 34 cm de comprimento total e podendo pesar mais de 3 kg. Possui coloração ventral alaranjada característica, olhos

prateados e nadadeira adiposa com raios. É utilizada tanto em atividade esportiva quanto comercial, sendo utilizada até mesmo em aquários. Pertence à família Characidae, a qual possui cerca de 300 espécies distribuídas em 53 gêneros. O grupo monofilético *Pygocentrus* abrange três espécies das chamadas 'piranhas verdadeiras', são elas *P. piraya*; *P. cariba*, presente na Colômbia e Venezuela e *P. nattereri* de ampla distribuição na América do Sul, esta espécie a mais próxima de *P. piraya* segundo Hubert *et al.* (2007). Ainda como sugere Hubert *et al.* (2007), utilizando sequências de DNA mitocondrial da região controladora (D-loop) e 16S, a existência de *P. piraya* está atrelada a eventos vicariantes a partir da dispersão pela bacia do Alto Amazonas a cerca de 2,63 milhões de anos.

A região controladora do DNA mitocondrial é uma região muito variável e com alta taxa de mutação, de 5 a 10 vezes mais rápida que o DNA nuclear (Brown *et al.*, 1979), sendo comumente utilizada em estudos de estruturação e variabilidade genética de populações.

Levando-se em conta a influência que as barragens podem causar às populações de peixes como a piranha do São Francisco e a importância desta espécie endêmica, este estudo visa identificar padrões gerais de impacto sobre a variabilidade e estruturação genética de *P. piraya* causados pela existência de represas ao longo do Rio São Francisco.

4. OBJETIVOS

Avaliar a influência da presença de barragens na distribuição da variabilidade genética de *Pygocentrus piraya* ao longo do Rio São Francisco, amostrando regiões a montante e a jusante das barragens.

Relacionar o grau de diferenciação genética com as características do represamento, como o período de existência da barragem, existência de escadas para transposição das barragens pelos peixes e distância entre os represamentos, visando entender os fatores associados ao impacto sobre a estruturação genética das populações.

5. METODOLOGIA

5.1. Coleta das Amostras

As coletas de piranhas (*P. piraya*) foram realizadas em nove pontos ao longo de toda extensão do Rio São Francisco, como especificado na Tabela 1 e ilustrado na Figura 1. Os pontos de coleta foram: 1) Montante a UHE Três Marias (lago de Três Marias - MG); 2) Jusante a UHE Três Marias (município de Januária - MG); 3) Bom Jesus da Lapa - BA; 4) Montante a UHE Sobradinho (lago de Sobradinho – BA); 5) Jusante a UHE Sobradinho (município de Petrolina - PE); 6) Montante a UHE Itaparica (município de Petrolândia – PE); 7) Entre UHE Itaparica e UHE Paulo Afonso (município de Paulo Afonso – BA); 8) Entre UHE Paulo Afonso e UHE Xingo (município de Delmiro Gouvea – AL); 9) Jusante a UHE Xingó (município de Piaçabuçu – AL). Os peixes foram capturados com auxílio de pescadores locais. Todo material coletado foi tombado em livro de registros, no Laboratório de Ecologia Molecular e Parasitologia Evolutiva (LEMPE) na Universidade Federal do Paraná, com detalhamento dos pontos de coleta, tipo de tecido de cada animal coletado e um código para cada indivíduo e seu ponto de coleta. As amostras de tecido (predominantemente brânquias) extraídas de cada indivíduo foram preservadas em tampão salino supersaturado de EDTA (Seutin *et. al.*, 1991) e enviadas em duplicata ao LEMPE.

5.2. Procedimento Molecular

Em laboratório o DNA genômico foi extraído através do kit de extração IPrep™ Chargeswitch™ gDNA Tissue, parte com auxílio do robô de extração automatizado, IPrep™ Purification instrument, seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante (Invitrogen™).

Entre três e vinte indivíduos de cada localidade amostrada foram utilizados para obtenção de sequências do gene D-loop (região controladora do DNA mitocondrial), uma região muito variável como citado anteriormente.

Após a extração, Reações em Cadeia da Polimerase (PCR) (Mullis & Faloona, 1987) em termocicladores Eppendorf™ (Personal Thermocycler) foram empregadas para amplificação de fragmento do gene desejado. As reações ocorreram em volume total de 25µl contendo uma mistura de: 3 mM de MgCl₂; 0,4 mM de dNTPs;

tampão (buffer) 1X; 2,5 U da enzima *Taq polymerase*; 2 μ M de cada iniciador molecular (H16498 e L15774M); 2 ng/ μ l de DNA da devida amostra do extraído de *P. piraya* a ser analisada e volume de água ultra destilada até que se alcance o volume total da reação anteriormente descrito. O DNA é amplificado a uma temperatura de desnaturação inicial de 94°C durante 4 min, seguido de 35 ciclos de desnaturação a 94°C por 45s, anelamento a 58°C por 45s e extensão a 72°C durante 1 min, ocorrendo ao fim do último ciclo uma extensão final a 72°C por 5 min. Também foram amplificados controles negativos, para indicação de não contaminação das reações feitas em laboratório com material genético que não fosse o presente somente nas amostras.

Os iniciadores moleculares utilizados na amplificação da região controladora mitocondrial (D-loop) foram: H16460 (senso) – 5' CACCTGAAGTAGGAACCAGATG 3' (Meyer *et al.*, 1990) e L15774M (anti-senso) – 5' ACATGAATTGGAGGTATACCAGT 3' (Prioli *et al.*, 2002), os quais juntos amplificaram fragmentos de aproximadamente 650 pares de bases.

Após a amplificação, o produto da reação da PCR foi submetido à eletroforese em gel de agarose (1,5%) e em seguida corado por 20 min em brometo de etídio e visualizado em equipamento de luz ultravioleta Vilber Lourmat™.

As amostras que foram visivelmente amplificadas através do aparecimento de bandas nos géis de agarose, tiveram seu restante do produto da PCR purificados com o auxílio do kit Microcon Montage™ PCR (Millipore™) seguindo protocolo orientado pelo fabricante. Este purificado foi então submetido a reações de sequenciamento sendo os iniciadores moleculares os mesmos utilizados nas PCRs, além do kit big Dye v3 (Applied BioSystems®). Em seguida foi realizada purificação das reações de sequenciamento com Sephadex™ G-50 (GE Healthcare BioSystems® AB) e este purificado, através da diluição em 10 μ l de formamida, submetido a um sequenciador ABI3130.

As sequências visualizadas a partir do sequenciador foram editadas no programa Pregap4 1.5, pertencentes ao Staden Package (Staden, 1996) e alinhadas através do programa Bioedit Sequence Alignment Editor, versão 7.0.5.2 (Hall, 1999) e ClustaW versão 1.4 (Thompson *et al.* 1994), permitindo assim as análises.

5.3. Análises Moleculares

As análises de diversidade genética das populações foram realizadas tanto com as populações locais de *P. piraya* separadas quanto agrupadas em um único conjunto de amostragem.

Através do programa Arlequin versão 3.0 (Excoffier *et al.* 2005) foi possível realizar análises de diversidade de nucleotídeos, estatística F, AMOVA e *Mismatch Distribution*. A quantidade de haplótipos foi obtida por contagem direta e a diversidade de nucleotídeos foi computada como sendo a probabilidade de que dois nucleotídeos homólogos escolhidos ao acaso fossem diferentes entre si (Tajima, 1983; Nei, 1987).

As deleções, transições e transversões foram consideradas com pesos iguais e a percentagem permitida de dados faltantes por sítios (“missing data per site”) foi de 5%.

Visando facilitar a observação dos haplótipos encontrados, assim como a contribuição destes haplótipos nas diferentes populações locais, foi construída uma rede de haplótipos, através do programa TCS versão 1.21 (Clement *et al.* 2000).

A existência de estruturação genética entre as populações locais de *P. piraya* foi testada através da análise de variância molecular, AMOVA, com todos os indivíduos agrupados em única amostragem, de acordo com o método de Excoffier *et al.* (1992). A matriz de distância foi calculada entre todos haplótipos através do método de distância pareada (“pairwise difference”) com o número de permutações igual a 10.000. O índice de fixação (F_{ST}) teve sua significância calculada através de permutações não-pareadas como descrito em Excoffier *et al.* (1992).

Através da análise de *Mismatch Distribution* (Distribuição das Diferenças Pareadas) foi inferida a história demográfica das populações analisadas (Slatkin & Hudson, 1991; Rogers & Harpending, 1992). Esta análise baseia-se no número de diferenças observadas entre todos pares de haplótipos em relação à frequência da distribuição destas diferenças. Os distintos padrões gráficos que podem ser gerados por esta análise são característicos para cada tipo de história demográfica. Simulações indicam que populações em equilíbrio demográfico longo e estável devem apresentar um padrão multimodal, enquanto que populações em expansão recente apresentam geralmente uma distribuição unimodal (Rogers & Harpending, 1992; Slatkin & Hudson, 1991). Já contatos secundários entre populações que

estiveram isoladas por longos períodos de tempo são representados por padrões bimodais (Frankham *et al.*, 2004).

Três parâmetros foram estimados utilizando o modelo de Rogers & Harpending (1992) a partir da curva formada pela distribuição das diferenças pareadas (*Mismatch Distribution*), 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. Quanto mais próxima a curva estiver do eixo Y, mais recente será a população e quanto mais afastada do eixo Y estiver, mais gerações t deverão ter se passado. A curva desloca-se lentamente para a direita à medida que o tempo transcorrido pelo número de gerações aumenta (Rogers & Harpending, 1992). A crista desta curva é definida pelo τ , ou seja, se a onda desloca-se a uma taxa de $2u$, então a crista estará a $\tau = 2ut$ depois de t gerações. Por intermédio de τ também 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 nucleotídeos por gerações do fragmento e L é o tamanho do fragmento de DNA analisado (ver Ciofi *et al.*, 2006 e Iyengar *et al.*, 2007). A taxa de mutação por nucleotídeos (μ) adotada neste estudo foi 3,6% por milhão de anos, baseando-se nos estudos de Donaldson & Wilson (1999). 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, $\alpha = 0,05$; foi obtido através de *bootstrap* paramétrico com 10.000 repetições.

Foram utilizados os testes de neutralidade seletiva de Tajima (1989) e Fu (1997) a fim de testar o equilíbrio entre a perda de alelos por deriva e o aporte causado por mutações. Ambos os testes são, segundo Fu (1997), apropriados para sequências de pequenos fragmentos de DNA. Estes geram os resultados estatísticos D e Fs, este último um valor muito sensível à expansão demográfica (Fu, 1997). Segundo Oliveira-Neto *et al.* (2007), valores negativos para D e Fs são característicos de expansões populacionais recentes.

6. RESULTADOS

Fragmentos da região controladora do DNA mitocondrial (D-loop) contendo entre 488 e 754 pares de base foram amplificados de 135 indivíduos de *P. piraya* em nove regiões amostradas (Tabela 1). Foi realizada uma matriz a partir do alinhamento original para servir de base na geração dos resultados, construída cortando-se as extremidades das sequências até o tamanho da mais curta (de ambos os lados), de modo que todos os indivíduos pudessem ser utilizados.

Este alinhamento editado resultou em sequências de 488 pares de base incluindo todos os indivíduos sequenciados ($n = 135$). Foram 26 sítios polimórficos, incluindo 22 substituições (sendo 15 transições e 7 transversões) e 5 “indels”. A frequência estimada da composição de nucleotídeos no fragmento analisado foi: A = 34,82%; T = 26,65%; C = 24,99%; G = 13,65%.

6.1. Variação genética

O alinhamento revelou a existência de 21 haplótipos entre os nove pontos amostrados. O ponto 7 foi o com maior número de haplótipos, dez no total. A média de haplótipos por ponto foi entre cinco e seis, contendo no máximo quatro sítios polimórficos diferentes. A partir do haplótipo maior ($n = 61$) outros doze haplótipos variaram apenas um sítio polimórfico, destes haplótipos apenas três geraram outros haplótipos.

A variabilidade genética entre as sequências de modo geral foi bastante baixa. A diversidade de nucleotídeos de todas as sequências foi 0,31% e todas as populações individualmente apresentaram baixa diversidade: entre 0,11% e 0,64% (Tabela 1).

Através da rede de haplótipos (Figura 2) é possível observar que a inter-relação existente entre os indivíduos de *P. piraya* é de dominância de um dos haplótipos (H1) sobre os demais, além de estar presente em todas as localidades amostradas, H1 representa mais de 45% das sequências. Outros três haplótipos, H2, H3 e H4 com diferença de um sítio polimórfico em relação a H1 representam frequências relativas de 17,0%, 11,1% e 7,4%; respectivamente. Os demais dezessete haplótipos aparecem com frequências relativas menores e de forma esporádica dentro das populações locais como sugerem os valores na Tabela 2.

Variações de um a quatro nucleotídeos separam os demais haplótipos do primeiro. Todos haplótipos partem de um mesmo ramo genealógico representando uma única linhagem, sugerindo que todos haplótipos sejam descendentes de um haplótipo ancestral comum e provavelmente recente, visto o baixo número de mutações entre o haplótipo mais comum (H1) e os demais.

6.2. Estrutura das Populações

Houve uma baixa estruturação genética ($F_{ST} = 0,033$; $p = 0,029 \pm 0,002$), devido à existência de apenas dois haplótipos a jusante de Sobradinho (ponto 5). A análise estatística F indicou ausência de estruturação das populações isoladas quando esta localidade agrupada com a montante de Itaparica (ponto 6), tratando-se de uma mesma localidade não separada por usinas Hidrelétricas ($F_{ST} = 0,028$; $p = 0,050 \pm 0,002$). Os resultados de AMOVA demonstraram que existe mais variação dentro das populações locais do que entre elas: 96,69% e 3,31%, respectivamente (Tabela 3).

6.3. Passado Demográfico

A análise de *Mismatch Distribution* (Distribuição das Diferenças Pareadas) resultou em um padrão de distribuição formando uma curva unimodal (Figura 3) com uma média das diferenças pareadas de 1,13 nucleotídeos (Tabela 4), muito próxima à zero. Padrão este que sugere que a baixa variabilidade genética encontrada em *P. piraya* no Rio São Francisco seja resultado decorrente de um gargalo populacional. Além da ocorrência deste efeito de gargalo as estimativas θ_0 e θ_1 indicam uma expansão populacional de *P. piraya*. Os valores de D e F_s foram negativos, para todas as populações locais agrupadas, com grau de significância positivo para ambos (tabela 4), corroborando a existência de uma recente expansão populacional das piranhas do São Francisco. O evento causador deste efeito de gargalo e da consequente e atual expansão populacional foi estimada através do valor de τ , a cerca de 170.000 anos atrás, correspondente ao período Pleistoceno Médio.

7. DISCUSSÃO

Através dos dados apresentados fica evidente a ausência de estruturação genética entre as populações isoladas de *P. piraya* em todo Rio São Francisco, com exceção da baixa variabilidade genética gerada pela amostragem a jusante de Sobradinho com apenas dois haplótipos encontrados. Tratando-se de localidades não separadas por represas, os pontos 5 e 6, jusante de Sobradinho e montante de Itaparica, foram agrupados para uma nova análise estatística indicando ausência de estruturação genética. Porém todos os resultados aqui apresentados devem ser cuidadosamente avaliados, a fim de evitar interpretações prévias indicando a inexistência de consequências genéticas sobre a ictiofauna fragmentada pela construção das Usinas Hidrelétricas.

Hipóteses podem facilmente ser empregadas para explicar a falta de estruturação genética das populações isoladas de piranhas do São Francisco. A primeira seria a existência de uma conectibilidade, uma ligação entre as populações supostamente fragmentadas, permitindo o fluxo gênico entre elas. No entanto, todas as barragens construídas ao longo do Rio São Francisco constituem verdadeiras barreiras físicas, com nenhuma conexão a montante e a jusante de cada represa, não existindo nenhum mecanismo, como escadas, por exemplo, que permitem a passagem de peixes entre as regiões fragmentadas.

Outra hipótese que explicaria a ausência de estruturação genética seria a utilização de iniciadores moleculares que não expressam sensibilidade adequada e suficiente para detecção de eventos de fragmentação relativamente recentes. Visto que as primeiras barragens no São Francisco tiveram início de construção a cerca de cinquenta anos, como a primeira Hidrelétrica de Paulo Afonso em 1954, seguido do início de funcionamento da Usina de Três Marias em 1962, Sobradinho em 1973, assim como a última usina do Complexo de Paulo Afonso no mesmo ano, de Itaparica em 1990 e por fim a Usina Hidrelétrica de Xingó em 1994. Todavia, fragmentos mitocondriais, como o utilizado nesta pesquisa, são amplamente empregados em estudos visando análises de estruturação genética de peixes, tendo detectado eventos de deriva genética em populações recentemente isoladas, além de ter identificado fluxo gênico entre populações distribuídas por toda a costa brasileira (e.g. Kawamura *et al.*, 2006; Prodocimo *et al.*, 2008).

A baixa variabilidade genética encontrada para *P. piraya* foi inesperada, visto a alta diversidade genética descrita para a região controladora do mtDNA com espécies de peixes (e.g. Bremer *et al.*, 1997; Rocha-Oliveira *et al.*, 2000; Martins *et al.*, 2003) tanto para a diversidade de haplótipos quanto nucleotídica. A própria biologia não migradora da espécie proporciona a falsa idéia de uma possível estruturação ao longo dos mais de 2700 km de extensão do rio, porém mesmo fragmentada, toda a espécie ainda comporta-se como uma única população.

Valores de baixa diversidade de haplótipos e de nucleotídeos são evidências de eventos fundadores ou de efeito de gargalo populacional (Grant & Bowen *et al.*, 1998). A forma estrelada da rede de haplótipos, a partir de um haplótipo predominante gerando vários outros haplótipos com menor número de indivíduos é, segundo alguns estudos, apontado também como característica de eventos de gargalo populacional sofrido pela população (e.g. García *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2008). Portanto estes casos podem ser aplicados à *P. piraya* na Bacia do Rio São Francisco. Esse padrão de diversidade genética, entretanto, também é encontrado em outras espécies de peixes que vivem nesta bacia, como *Leporinus elongatus*, *Prochilodus* sp. e *Pimelodus maculatus* (dados de pesquisa do LEMPE ainda não publicados). Segundo Martins *et al.* (2003), *L. elongatus* apresenta grande variabilidade genética na Bacia do Rio Paraná, corroborando a hipótese de que eventos históricos e/ou ecológicos tenham influenciado o padrão de diversidade encontrado na Bacia do Rio São Francisco.

A análise de *Mismatch Distribution* proporcionou um padrão unimodal (Figura 3), que juntamente com os parâmetros estimados pelos testes de neutralidade de Tajima (1989) e Fu (1997) (Tabela 4), corroboram a hipótese de efeito de gargalo populacional. Este evento tendo ocorrido muito antes da instalação das barragens para geração de energia elétrica, visto que desde o Alto São Francisco até o Baixo São Francisco as populações isoladas compartilham, em proporção semelhante, praticamente os mesmos haplótipos. Caso o gargalo tivesse ocorrido depois do represamento e consequente fragmentação da população original, deveriam existir proporções haplotípicas distintas entre as populações isoladas. A datação deste evento através de τ corrobora novamente o efeito de gargalo, estimando-o há aproximadamente 170.000 anos, assim sendo, durante o Pleistoceno Médio.

A partir desta datação é plausível inferir que este evento, embora tenha ocorrido muito antes da construção da primeira usina hidrelétrica no Rio São Francisco impossibilitando o fluxo gênico entre espécies de peixes, ocorreu muito depois do surgimento da bacia e da colonização desta por *P. piraya*. A Bacia do Rio São Francisco tem sua origem bastante remota. Potter (1997) supõe que ela tenha surgido de fato no final do Cretáceo, em função da separação dos continentes Sul-Americano e Africano, com ocorrência de muitos soerguimentos e aberturas de falhas compondo o início dos padrões de drenagem existentes atualmente. Já a diversificação da ictiofauna de água-doce neotropical ocorreu por volta de 70 milhões de anos, no início da era Cenozóica (Lundberg *et al.*, 1998). Hubert *et al.*, (2007) destaca eventos nos quais o mar chegou a penetrar sobre o continente da América do Sul, inundando diversas bacias, unindo e misturando suas faunas. O autor ainda descreve a possível conexão da Bacia do São Francisco com a Bacia do Rio Paraná e o Alto Amazonas, havendo eventos geológicos separado-as há milhões de anos. Este fato levado em questão também por Sato & Pavanelli (2004) evidenciando o compartilhamento da fauna destas bacias, inclusive de parasitas. Hubert *et al.*, (2007) data o evento de cladogênese que deu origem a *P. piraya* há 2,63 milhões de anos, além de correlacionar esta espécie como irmã de *P. nattereri*, sendo seu ancestral comum oriundo da Bacia do Alto Amazonas, onde hoje vivem outras espécies de piranha.

Nos nove pontos fragmentados, a maioria pelas usinas hidrelétricas, há uma distribuição contínua dos haplótipos, quase que igualmente distribuídos em cada local analisado. Este fato também pode estar atrelado à existência de vários afluentes ao longo do Rio São Francisco, onde os peixes podem estar utilizando-os como hábitat alternativo, pontos de desova e em busca de recursos, desta forma mantendo a uniforme variabilidade encontrada em toda extensão do rio. Certamente mais estudos devem ser desenvolvidos a fim de comprovar o grau de veracidade desta hipótese. Pois caso esta afirmação seja positiva é pertinente alertar que diversos cuidados passam a ser essenciais para a instalação de represas em uma bacia e para a própria transposição do rio. Havendo a necessidade de manter os afluentes dos principais rios livres de barragens, evitando consequências genéticas às populações de peixes que possam levá-las a extinção local ou o desequilíbrio faunístico.

Especula-se que mudanças ambientais em tempo evolutivo possam ter afetado condições bióticas e abióticas, contribuindo para a baixa diversidade nesta bacia. Por exemplo, grandes secas poderiam ter esgotado, de forma integral ou parcial, o volume de água sobre o leito dos rios da Bacia do Rio São Francisco, acarretando na morte da ictiofauna e conseqüente alterações da diversidade genética de espécies de peixes desse local.

8. CONCLUSÃO

A baixa variabilidade genética encontrada em *P. piraya*, correlacionada a outras espécies, provavelmente está associada como resultado de processos naturais na Bacia do Rio São Francisco indicando a vulnerabilidade deste sistema. A presença de variabilidade é essencial para a sobrevivência de populações frente a mudanças ambientais e a instalação de Usinas Hidrelétricas e de seus reservatórios torna esta bacia ainda mais frágil.

Através das análises de *Mismatch Distribution*, da caracterização da rede de haplótipos e da estimativa de τ , foi possível concluir a existência de um efeito de gargalo populacional datado do Pleistoceno Médio, que provavelmente influenciou o padrão de diversidade encontrado na Bacia do Rio São Francisco, tendo ocorrido muito antes da instalação das Usinas nesta bacia e milhões de anos após a especiação que deu origem a *P. piraya*.

A inexistência de mecanismos de transposição capazes de permitir o fluxo gênico entre montante e jusante das represas no Rio São Francisco, torna as populações isoladas de peixes deste rio ainda mais vulneráveis, pois quanto menor o fluxo gênico maior são os riscos de perda de variabilidade. No entanto, a homogeneidade de haplótipos e da diversidade de nucleotídeos aponta para uma importante questão. Supostamente a utilização de afluentes do rio, onde são construídas as barragens, podem estar sendo usados como hábitat alternativo pelos peixes, mantendo as populações fragmentadas com praticamente o mesmo padrão de diversidade genética.

Monitoramentos genéticos são interessantes para garantir a manutenção da diversidade populacional de espécies, havendo em muitas delas uma taxa de mutação bastante lenta, como é o caso da espécie neste estudo. Estratégias de manejo são muito utilizadas com objetivo de recuperar estoques de peixes a partir da introdução de organismos, sejam provenientes de outra fonte, ou um método mais conservacionista, utilizando indivíduos nativos para aumento da variabilidade genética. Porém para que estratégias de manejo sejam eficientes, é necessário o conhecimento não só da fauna local, mas também como ela está estruturada geneticamente, além de seus aspectos comportamentais e ecológicos. Dessa forma

medidas corretas poderão ser implantadas a fim de minimizar os impactos causados pela construção de represas e reservatórios ao meio ambiente.

9. FIGURAS

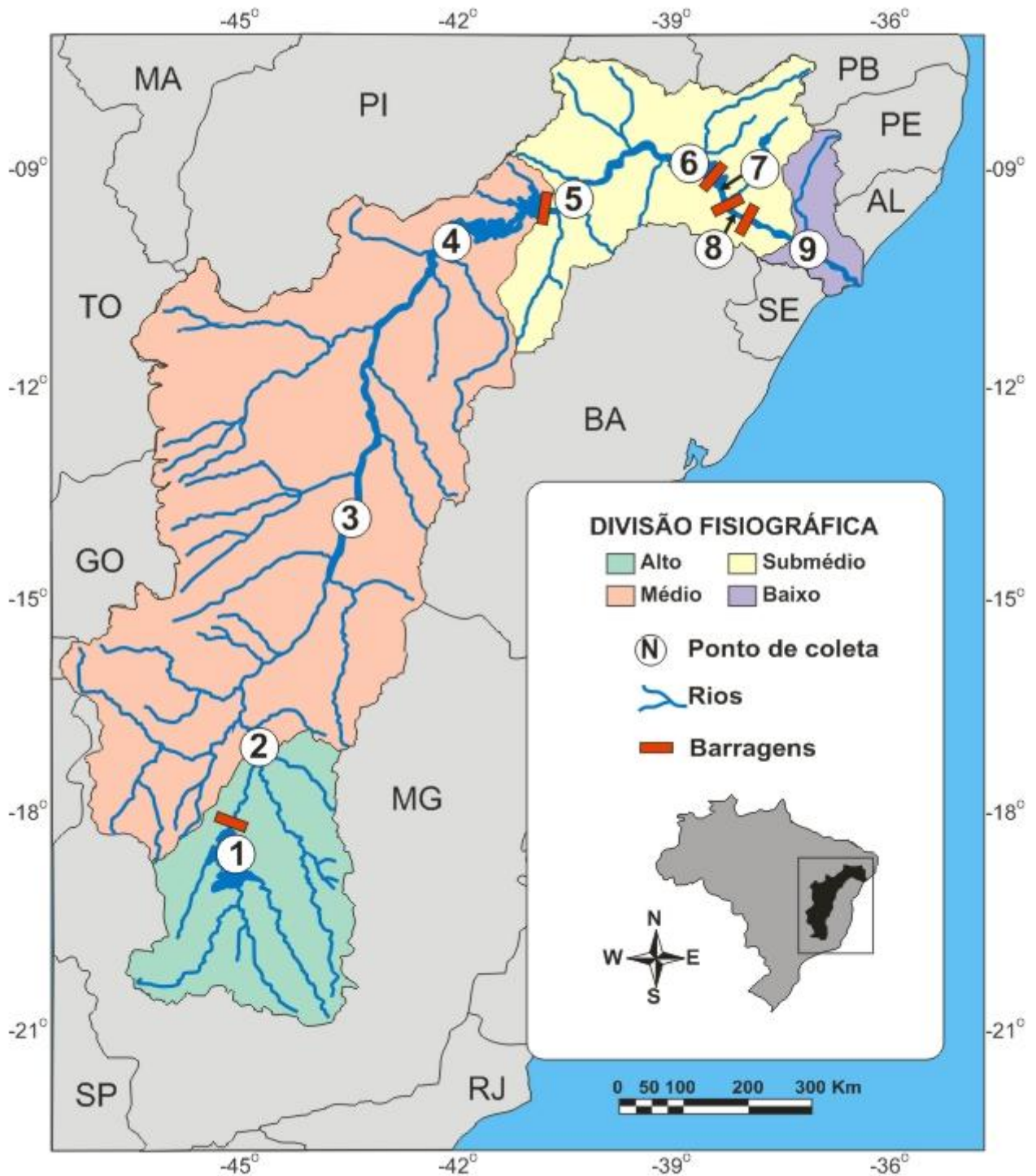


Figura 1. Mapa da Bacia do Rio São Francisco indicando a localização dos pontos de coleta e das barragens. Pontos de coleta de 1 a 9, respectivamente: Lago de Três Marias (MG), Januária (MG), Bom Jesus da Lapa (BA), Lago de Sobradinho (BA), Petrolina (PE), Petrolândia (PE), Paulo Afonso (BA), Delmiro Golvea (AL) e Piaçabuçu (AL).

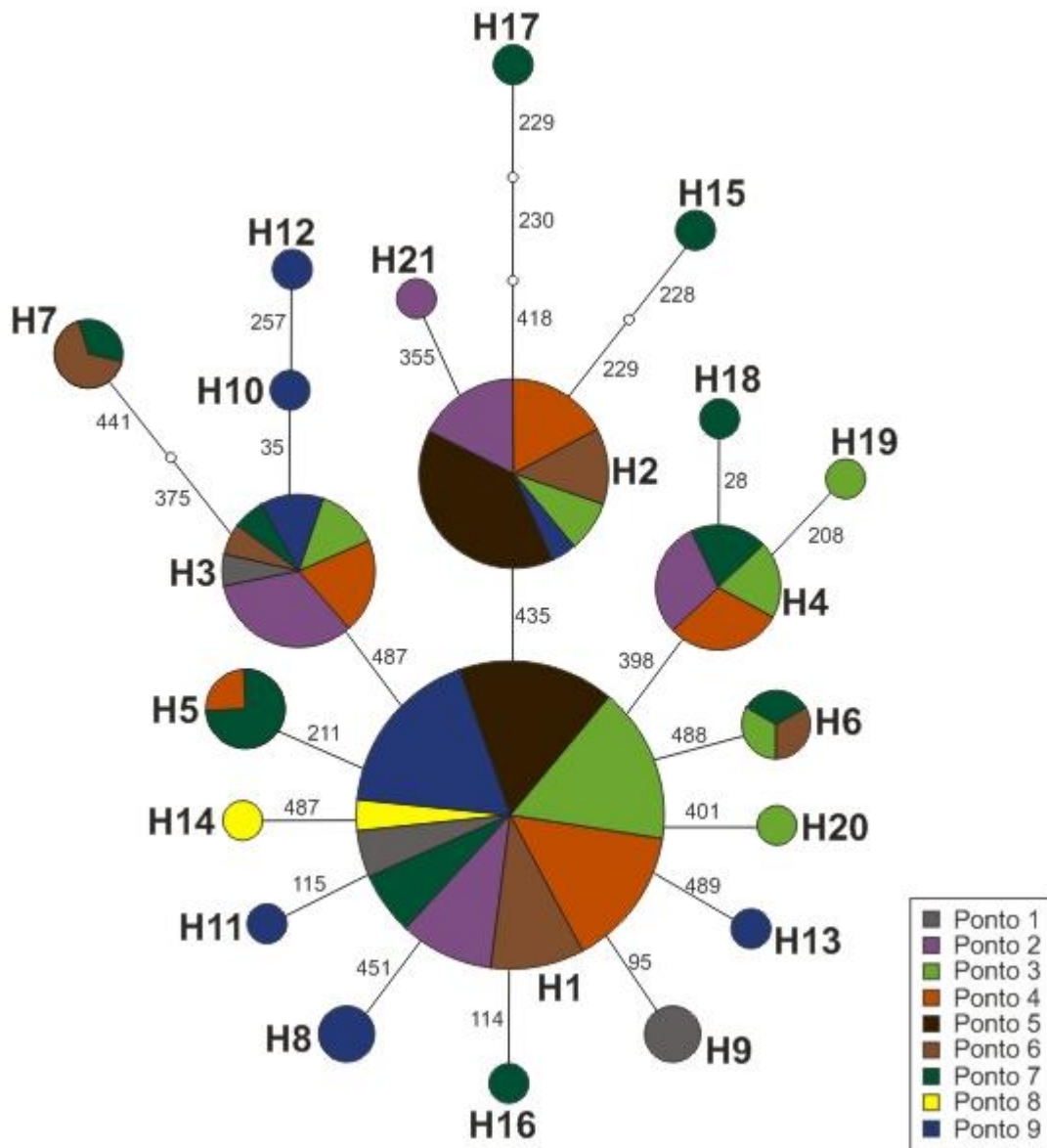


Figura 2. Rede de haplótipos de *Pygocentrus piraya*, mostrando as inter-relações existentes entre os haplótipos no Rio São Francisco. Referente ao alinhamento de 488pb de 135 indivíduos, a partir do fragmento da região controladora mitocondrial (D-loop). Os valores entre os traços representam os sítios onde ocorreram as mutações geradoras do respectivo haplótipo conectado.

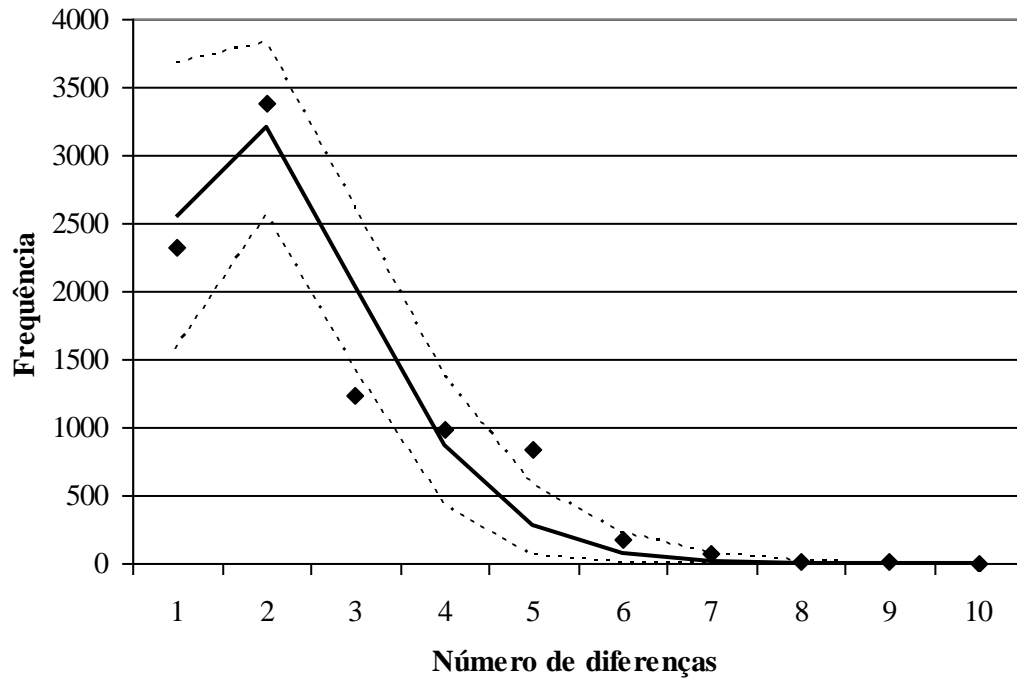


Figura 3. Gráfico de *Mismatch Distribution* com todas as localidades agrupadas. Os retângulos representam os dados observados, a linha inteira o modelo e as linhas pontilhadas o intervalo de confiança ($\alpha=0,05$).

10. TABELAS

Tabela 1. Número de indivíduos sequenciados (n), número de haplótipos (n_h) e diversidade de nucleotídeos (π), dos nove pontos de coleta.

Ponto Amostrado	Número de indivíduos (n)	Número de haplótipos (n_h)	Diversidade de nucleotídeos (π)
1 – Montante Três Marias	6	3	0,002 ± 0,002
2 – Jusante Três Marias	19	5	0,004 ± 0,002
3 – Bom Jesus da Lapa	19	7	0,003 ± 0,002
4 – Montante Sobradinho	20	5	0,003 ± 0,002
5 – Jusante Sobradinho	19	2	0,001 ± 0,001
6 – Montante Itaparica	13	5	0,003 ± 0,002
7 – Entre Itaparica e Paulo Afonso	16	10	0,006 ± 0,004
8 – Entre Paulo Afonso e Xingó	3	2	0,000 ± 0,000
9 – Jusante Xingó	20	8	0,002 ± 0,002
Total	135	21	0,003 ± 0,002

Tabela 3, Análise de variância molecular, AMOVA,

Fonte de variação	gl	Soma dos quadrados	Variância	% variação	p
Entre populações	8	8,854	0,025	3,31	0,030 ± 0,002
Entre indivíduos das populações	126	92,798	0,737	96,69	

Tabela 4, Valores obtidos através dos testes de neutralidade seletiva, N = tamanho da amostra, S = número de sítios variáveis, P_i = média das diferenças pareadas,

Testes	Parâmetros	Valores
Tajima (1989)	N	135
	S	21
	P_i	1,12803
	D	-0,076 ± 0,920
	P_D	0,003
Fu (1997)	Nº de alelos observados	135
	Nº de alelos esperados	7,374
	F_S	-28,289
	P_F	0,000

11, REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, V,C,; Pereira, A,M,; Robalo, J,I,; Fonseca, J,P,; Levy, A,; Maia, c,; Valente, A,; Mitochondrial DNA fails to reveal genetic structure in sea-lampreys along European shores, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **46**, 391-396,
- ANA – Agência Nacional de Águas 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, *Atlas de energia elétrica do Brasil*, 3ª edição, Brasília-DF, ANEEL, 236p, 2008, Disponível em <http://ww,aneel.gov,br/>
- Baumgartner, G,; Nakatani, K,; Gomes, L,C,; Bialetzki, A,; Sanches, P,V,; Makrakis, C,; 2004, Identification of spawning sites and natural nurseries of fishes in the Paraná River, Brazil, *Environmental Biology of Fishes*, **71**, 115-125,
- Bremer, J,R,A,; 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,
- Brown, W,M,; George Jr., M,; Wilson, A,C,; 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,c.gov,br/>
- Ciofi, C,; Wilson, G,A,; Beheregaray, L,B,; Gibbs, J,P,; Marquez, C,; Tapia, W,; Snell, H,L,; Caccone, A,; Powel, J,R,; 2006, Phylogeographic History and Gene Flow Among Giant Galápagos Tortoises on Southern Isabela Island, *Genetics*, **172**, 1727-1744,
- Clarke, A,D,; Telmer, K,H,; Shrimpton, J,M,; 2007, Habitat use and movement patterns for a fluvial species, the Artic 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, K.A.; 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/>
- Donaldson, K.A.; Wilson Jr., R.R.; 1999, Amphi-Panamic Geminates of Snook (Percoidei: Centropomidae) Provide a Calibration of the Divergence Rate in the Mitochondrial DNA Control Region of Fishes, *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **13**, 208-213,
- 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,
- Frankham, R.; Ballou, J.D.; Briscoe, D.A.; 2004, *A Primer of Conservation Genetics*, Cambridge University Press, 220 p,
- Fu, Y.X.; 1997, Statistical Tests of Neutrality of Mutations Against Population Growth, Hitchhiking and Background Selection, *Genetics*, **147**, 915-925,
- García, B.A.; Manfredi, C., Fichera, L., Segura, E.L.; 2003, Short report: Variation in mitochondrial 12S and 16S ribosomal DNA sequences in natural populations of *Triatoma infestans* (Hemiptera: Reduviidae), *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **68**, 692-694,
- 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, W.S.; Bowen, B.W.; 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,
- Hall, T.A.; 1999, BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids, Symposium Series*, **41**, 95-98,

- Hubert, N.; Duponchelle, F.; Nuñez, J.; Garcia-Davila, C.; Paugy, D.; Renno, J.F.; 2007, Phylogeography of the piranha genera *Serrasalmus* and *Pygocentrus*: Implications for the diversification of the Neotropical ichthyofauna, *Molecular Ecology*, **16**, 2115-2136,
- Iyengar, A.; Gilbert, T.; Woodfine, T.; Knowles, J.M.; Diniz, F.M.; Brenneman, R.A.; Louis, E.E.; Maclean, N.; 2007, Remnants of ancient genetic diversity preserved within captive groups of scimitar-horned oryx (*Oryx dammah*), *Molecular Ecology*, **16**, 2436-2449,
- Kawamura, K.; Yonekura, R.; Katano, O.; Taniguchi, Y.; Saitoh, K.; 2006, Origin and dispersal of bluegill sunfish, *Lepomis macrochirus*, in Japan and Korea, *Molecular Ecology*, **15**, 613-621,
- Loureiro-Crippa, V.E.; Hahn, N.S.; 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, J.G.; Marshall, J.; Guerrero, J.; Horton, B.; Malabarba, M.; Wesselingh, F.; 1998, *The Stage for Neotropical Fish Diversification: A History of Tropical South American Rivers*, In Malabarba, L.R.; Reis, R.E.; Vari, R.P.; Lucena, Z.M.S.; Lucena, C.A.S.; (Eds) *Phylogeny and Classification of Neotropical Fishes* (pp 13-48), Porto Alegre, Brasil: EDIPUCRS,
- Martins, C.; Wasko, A.P.; 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, E.E.; 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, G.M.; Almeida, R.G.; 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.; Hoerau, 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, T,D.; Basasibwaki, P.; Wilson, A,C.; 1990, Monophyletic origin of Lake Victoria cichlid fishes suggested by mitochondrial DNA sequences, *Nature*, **347**, 550-553,
- Mol, J,H.; de Mérona, B.; Ouboter, P,E.; Sahdew, S.; 2007, The fish fauna of Brokopondo Reservoir, Suriname, during 40 years of impoundment, *Neotropical Ichthyology*, **5**, 351-368,
- Mullis, K,B.; Faloona, F,A.; 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, Nex York, NY,USA,
- Oliveira-Neto, J,F.; Pie, M,R.; Boeger, W,A.; Ostrensky, A.; Baggio, R,A.; 2007, Population genetics and evolutionary demograohy of *Ucides cordatus* (Decaponda: Ocypodidae), *Marine Ecology*, **28**, 460-469,
- Potter, P,E.; 1997, The Mesozoic and Cenozoic paleodrainage of South América: a Natural History, *Journal of South American Earth Sciences*, **10**, 331-344,
- Prioli, S,M,A,P.; Prioli, A,J.; Júlio Jr., H,F.; Pavanelli, C,S.; De Oliveira, A,V.; Carrer, H.; Carraro, D,M.; Prioli, L,M.; 2002, Identification of *Astyanax altiparanae* (Teleostei, Characidae) in the Iguaçu River, Brazil, based on mitochondrial DNA and RAPD markers, *Genetics and Molecular Biology*, **25**, 421-430,
- Prodocimo, V.; Tschá, M,K.; Pie, M,R.; Oliveira-Neto, J,F.; Ostrensky, A.; Boger, W,A.; 2008, Lack of genetic differentiation in the fat snook *Centropomus parallelus* (Teleostei: centropomidae) along the Brazilian coast, *Journal of Fish Biology*, **73**, 2075-2082,
- Rocha-Oliveira, A.; Garber, N,M.; Stuck, K,C.; 2000, High genetic diversity, large inter-oceanic divergence and historical demography of the striped mullet, *Journal of Fish Biology*, **57**, 1134-1149,
- Rogers, A,R.; Harpending, H.; 1992, Population Growth Makes Waves in the Distribution of Pairwise Genetic Differences, *Molecular Biology and Evolution*, **9**, 552-569,
- Sato, M,C,B.; Pavanelli, G,C.; 2004, Digenea de *Pimelodus maculatus* (Osteichthyes, Pimelodidae) das bacias dos rios São Francisco e Paraná, Brasil, *Parasitologia Latinoamericana*, **59**, 123-131,

- Sato, Y.; Godinho, H,P,; 1999, *Peixes da bacia do rio São Francisco*, p, 401-413, In: Lowe-Mcconnell, R,H, *Estudos Ecológicos de Comunidades de Peixes Tropicais*, São Paulo, ed, USP, 534p,
- Sato, Y,; Godinho, H,P,; 2004, *Migratory fishes of São Francisco river*, IN, Carolsfeld, J,; Havey, B,; Ross, C,; Baer, A,; editors, *Migratory fishes of South America: biology, fishes 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 Mutations Rates Vary Among Sites: Application to human Mitochondrial DNA, *Genetics*, **152**, 1079-1089,
- Seutin, G,; White, B,N,; Boag, P,T,; 1991, Preservation of avian blood and tissue samples for DNA analysis, *Canadian Journal of Zoology*, **69**, 82-90,
- Slatkin, M,; Hudson, R,R,; 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,
- Thompson, J,D,; Higgins, D,G,; Gibson, T,J,; 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, C,E,M,; Hespanhol, I,; Cordeiro-Neto, O,M,; 2001, *Gestão da Água no Brasil*, Brasília: UNESCO, 156p,