



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO DE GEOCIÊNCIAS  
CURSO EM OCEANOGRAFIA**

**BRUNO BALBI**

**ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DE  
POPULAÇÕES DA POLIQUETA *Laeonereis acuta* DE TRÊS  
ESTUÁRIOS DA BAÍA DE TODOS OS SANTOS, BA.**

Salvador  
2013

**BRUNO BALBI**

**ANÁLISE DA ESTRUTURA GENÉTICA DE POPULAÇÕES DA  
POLIQUETA *Laeonereis acuta* DE TRÊS ESTUÁRIOS DA BAÍA DE  
TODOS OS SANTOS, BA.**

Monografia apresentada ao Curso de Oceanografia, Instituto de Geociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para a obtenção do grau de Bacharel em Oceanografia.

Orientador: Prof. Dr. FRANCISCO CARLOS ROCHA DE BARROS JUNIOR

Co-Orientador: Dra. FLORA FERNANDES

Salvador  
2013

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente aos incríveis Pais que tenho, sem eles não seria metade da pessoa que sou hoje. Estão sempre me motivando, aconselhando e me ajudando a atingir meus objetivos. Não consigo nem expressar direito a gratidão e amor que sinto por vocês.

A minha Família que me apoia e sempre me apoiou em todos os aspectos da minha vida.

Aos colegas do curso de Oceanografia e especialmente a galera do surf: Mateus, Seu Myag, Lucão, Rasta, Johnny Boy, Filipão, Lessa e Marcéu.

Aos colegas de Laboratório pela companhia e parceria: Lara, Yuri, Alice, Amorim, Gilson, Samara, Thaisinha, Gabriel, Anchieta, Ricardo, Marcos Krull (Valeu pelas coletas!!), Tosta e Pati.

As bandas Neologia, Vendo 147 e Tabuleiro Musiquim, por tudo de bom que passamos profissionalmente e pessoalmente, vocês fizeram e fazem parte do meu aprendizado de como ser uma melhor pessoa trabalhando em grupo.

Flora Fernandes e Antônio "Tosco" pelo apoio desde o começo do projeto.

A Gonçalo por me receber como família em sua casa e laboratório, disponibilizando toda a estrutura e me dando uma oportunidade única de estar trabalhando ao lado de um grande time de pesquisadores da UNICAMP.

Ao pessoal do LGE na UNICAMP em especial para Joan Barau, Nove, Bruce, Brunão, Leleco, Prause, Aline, Ana Deckman, Osmar, Leandro, Pedro, Marcela, Paulinho, Dani, Dona Ernê, Silvia, Maria e Eliane.

Em especial a Gleidson Teixeira pela dedicação, paciência e disposição para que eu conseguisse realizar o projeto e principalmente pelos ensinamentos que com certeza me fizeram hoje uma pessoa e um profissional muito melhor.

A Francisco Barros, meu orientador e principalmente amigo, presente e crítico sempre, foi decisivo no meu crescimento como profissional. Não tenho nem como agradecer a confiança que me foi dada em um trabalho tão desafiador e importante para o grupo.

Nina Fonseca pela cumplicidade, carinho e apoio em literalmente todos os momentos. Te amo.

Muito obrigado,

Bruno Balbi

- “ O que vamos fazer hoje à noite Cérebro?

- A mesma coisa que fazemos todas as noites Pink, tentar dominar o mundo!”

Pink e Cérebro - Warner Bros. Animation.

## Sumário

1. Introdução.....	- 7 -
2. Objetivos.....	- 10 -
2.1 Objetivo geral.....	- 10 -
2.2 Objetivos específicos.....	- 10 -
3. Materiais e Métodos .....	- 11 -
3.1 Área de estudo.....	- 11 -
3.2 Obtenção e identificação do material biológico.....	- 12 -
3.3 Extração de DNA.....	- 13 -
3.4 Amplificação.....	- 13 -
3.5 Sequenciamento.....	- 13 -
3.6 Análise da variabilidade genética.....	- 14 -
4. Resultados.....	- 15 -
5. Discussão.....	- 20 -
6. Considerações finais .....	- 22 -
7. Referências bibliográficas .....	- 23 -

## Lista de Figuras

- Figura 1** – Mapa da Baía de todos os santos, com a indicação dos pontos de coleta referentes aos rios Jaguaripe (#10), Paraguaçu (#10) e Subaé (#11).....- 12 -
- Figura 2** – Região de interesse do DNA ribossomal (compreendendo os Genes 18S, 5.8S e 28S e os espaçadores intergênicos ITS1 e ITS2) e posição de anelamento dos primers Forward (F) e Reverse (R).....- 13 -
- Figura 3** – Fragmentos de aproximadamente 1200bp em Gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio..... - 15 -
- Figura 4** – Frequência de alelos por População.....- 17 -
- Figura 5** – Valores esperados e observados oriundos da análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg..... - 18 -
- Figura 6** – Porcentagens da variação molecular entre populações e entre indivíduos.....- 19 -

## Lista de Tabelas

- Tabela 1** – Distância genética entre indivíduos; Jaguaripe (J), Subaé (S) e Paraguaçu (P). Valores de distância ‘0’ foram grifados, representando sequências idênticas.....- 16 -
- Tabela 2** – Distância genética entre as populações: Jaguaripe (J), Subaé (S) e Paraguaçu (P). Valores de distância ‘0’ foram grifados, representando sequências idênticas..... - 16 -
- Tabela 3** – Tabela contendo ‘n’ amostral; Número de alelos; Número efetivo de alelos; Índice de informação; Heterozigosidade observada; Heterozigosidade esperada e Coeficiente de endogamia..... - 17 -
- Tabela 4** – Tabela contendo o resumo dos testes qui-quadrado..... - 18 -
- Tabela 5** – Resumo da análise *F<sub>st</sub>*, que avalia a divergência das frequências alélicas entre duas ou mais populações.....- 19 -

## Resumo

A diversidade genética é a variedade de alelos e genótipos presentes no grupo sob estudo (populações, espécies ou grupos de espécies). Dessa forma, uma população habitando um local contaminado, estando assim sujeita a uma pressão seletiva, pode desenvolver uma elevada resistência em comparação com populações habitando locais não ou menos contaminados. Consequentemente, o desenvolvimento de resistência pode estar atrelado a uma diminuição geral do polimorfismo intrapopulacional. O presente trabalho teve como objetivo caracterizar a estrutura genética de populações de *Laeonereis acuta* em três sistemas estuarinos da Baía de Todos os Santos (Subaé, Paraguaçu e Jaguaripe), BA; Avaliar o grau de polimorfismo nas populações estudadas e testar a hipótese de que a população do estuário do rio Subaé é menos polimórfica em relação às outras populações estudadas devido ao seu alto grau de contaminação por metais pesados. Indivíduos da espécie *L. acuta* das populações dos estuários dos rios Subaé, Paraguaçu e Jaguaripe foram coletados nos pontos mais internos destes. A região do DNA ribossomal que compreende o 18S parcial, ITS-1, 5.8S, ITS-2 e 28S parcial, destes indivíduos foi amplificada e sequenciada. As análises foram feitas através dos testes de distância genética, Frequência de alelos, Análise de Variação Molecular (AMOVA), Análise  $F_{st}$  e Equilíbrio de Hardy-Weinberg. Os resultados encontrados indicam que as três populações possuem baixos níveis de polimorfismo, sendo que a população que apresentou a menor variabilidade genética foi a do estuário do Rio Paraguaçu, refutando a hipótese do trabalho de que a população que apresentaria os menores valores de variabilidade genética seria a do estuário do rio Subaé, devido aos altos níveis de contaminação inorgânica no sedimento e relação aos outros estuários. Estudos apontam que a variação da salinidade exerce uma forte influência na estrutura populacional e taxas de sobrevivência das espécies bentônicas, bem como sendo a causa de doenças em ostras e responsável pelo declínio de populações de espécies estuarinas. Uma possível explicação para este resultado seria a presença da barragem de Pedra do Cavalo no estuário do rio Paraguaçu, que afeta o regime hidrográfico e altera o gradiente de salinidade ao longo da região. Estudos futuros relacionados com a vazão de água doce nos principais tributários da BTS e com a dispersão larval da espécie *L. acuta*, bem como a utilização de outros marcadores moleculares como RAPD e microsátélites são essenciais para esclarecer possíveis questões quanto ao impacto causado pelos agentes antrópicos nestes sistemas.

Palavras-chave: *Laeonereis acuta*; ITS; genética de populações; estuário.

# 1. Introdução

Estuário pode ser definido como um corpo d'água costeiro parcialmente fechado que está permanentemente ou periodicamente em conexão com o mar, que recebe descargas pelo menos periódicas de um rio, possuindo assim salinidade tipicamente menor que a água do mar e que varia temporalmente ao longo de sua extensão, podendo se tornar hipersalino em regiões onde a perda de água por evaporação é alta e onde os fluxos de maré e de água doce são negligíveis (Potter *et al.*, 2010). Mclusky & Elliot (2004) sugeriram que ambientes estuarinos abrigam “Comunidades controladas por fatores físicos”, onde tais fatores variam amplamente e não são completamente previsíveis. Consequentemente, os organismos estuarinos estão expostos a estresses fisiológicos severos.

A presença de humanos em áreas estuarinas é marcante ao longo da história, devido principalmente aos benefícios comerciais e de transporte, abundância de alimentos, lazer, construção de marinas, portos e barragens, etc, inerentes a esse ambiente. Atividades antropogênicas podem resultar em alterações do estado natural desses sistemas, assim, atualmente quase não há estuários completamente livres desses impactos (Day *et al.*, 1989). Adicionalmente, a zona costeira de países em desenvolvimento tende a ser mais impactada, devido à presença de leis regulatórias e fiscalizações menos severas quando comparadas com as dos países mais desenvolvidos (Kennish, 2002). Dessa forma, gestores de cidades costeiras são desafiados pela necessidade de gerenciar o crescimento urbano, de forma que leve em consideração a preservação ambiental e ao desenvolvimento sustentável (Barbière, 2005).

Baías adjacentes a áreas metropolitanas tem sido fortemente poluídas por despejo de esgoto, resíduos industriais entre outros impactos antropogênicos (Kjerfve *et al.*, 1997; Yasuhara *et al.*, 2005). Os impactos provenientes dessas atividades podem influenciar os padrões de distribuição, abundância e diversidade de espécies (McGee *et al.*, 1995; Ponti *et al.*, 2010), sendo geralmente aceito que elevados níveis de contaminação podem afetar adversamente a sobrevivência, o desenvolvimento e/ou a biomassa de diversas espécies (Reish & Gerlinger, 1997; Dixon & Wilson, 2000; Yükses *et al.*, 2006; Ferreira-Cravo *et al.*, 2009; Alonso *et al.*, 2011). Os efeitos bioquímicos e fisiológicos induzidos pelo aumento da concentração de contaminantes podem levar à mortalidade das espécies se certos limites são excedidos (e.g. Gray & Elliot, 2009).

Alterações antrópicas nas características do sedimento (i.e. granulometria e composição química) e das propriedades da água podem afetar as comunidades macrobentônicas (Pagliosa & Barbosa, 2006). O trabalho de Mazik e Elliott (2000) sugeriu que o aumento dos níveis de contaminação pode causar uma redução da bioturbação (perturbação do sedimento pelos organismos). Ward e Robinson (2005) submeteram uma população de *Daphnia* em laboratório a altos níveis de cádmio e obtiveram como resultado um aumento da tolerância à presença deste metal, porém indivíduos adaptados apresentaram menor tamanho, maior sensibilidade a outros contaminantes e menor variabilidade genética, o que potencialmente pode representar um aumento no risco de extinção da população (Dixon & Wilson, 2000; Klerks & Levinton, 1989). O trabalho realizado por Klerks e Levinton (1989) mostrou que uma forte seleção, imposta por contaminação de metais pesados, pode resultar em aumento da resistência e modificação da composição taxonômica de espécies de oligoquetas marinhos.

Adicionalmente, impactos relacionados com a alteração do fluxo de água doce também são responsáveis por efeitos deletérios em comunidades biológicas. De acordo com o trabalho de Gillanders e Kingsford (2002), alterações do fluxo em estuários e ambientes costeiros causam efeitos indiretos sobre a estrutura das comunidades bentônicas a partir de mudanças na carga sedimentar, bem como mudanças na salinidade, na temperatura e na concentração de contaminantes. Consequentemente, organismos também são afetados por variações no recrutamento, crescimento, mortalidade e fecundidade. McCairns e Bernatchez (2008) indicaram que a diferenciação genética de uma espécie de peixe estuarino é explicada pela covariação da



salinidade do ambiente, sugerindo que a variação fenotípica pode ser a nível fisiológico. McGee e colaboradores (1995) concluíram que o fluxo limitado de água em marinas contribui para o impacto da contaminação sobre assembléias bentônicas locais, devido à diminuição da exportação dos contaminantes. Christopher e Gippel (2002) indicaram que após a construção da barragem no rio Murray (EUA), devido à diminuição da variabilidade do fluxo de água doce, houve um decréscimo acentuado da diversidade e abundância de macroinvertebrados bentônicos na região do estuário abaixo da barragem.

Com o contínuo aumento da população humana, mudanças ambientais drásticas são impostas pelo desmatamento, poluição, erosão e efeitos potenciais ao clima local. A habilidade dos organismos de sobreviverem em habitats impactados tem sido amplamente estudada, possivelmente com observações de aumento de resistência de alguns patógenos a antibióticos (Ward & Robinson, 2005). Dentro desse contexto, tem se dado mais atenção a aumentos da resistência à poluição ambiental e sua ação como força seletiva, causando uma adaptação dos organismos (Xie & Klerks, 2003). A persistência das espécies depende de sua vulnerabilidade a essas mudanças, a qual é determinada por sua estrutura genética - tipos e frequência de genes ou genótipos presentes na população (Hoffmann & Willi, 2008). Esta, por sua vez, junto às leis que regem sua variação, é objeto dos estudos da Genética de populações (Masatotschi, 1975). Dessa forma, a preservação da diversidade genética é importante devido ao potencial evolutivo de longo prazo que ela proporciona. Formas raras de um gene (alelos), ou combinações de alelos, podem não conferir nenhuma vantagem imediata, mas poderiam tornar-se muito apropriadas no futuro em resposta a mudanças nas condições ambientais (Begon, 2007).

A diversidade genética é a variedade de alelos (cada uma das diferentes formas de um gene em um dado locus) e genótipos presentes no grupo sob estudo (populações, espécies ou grupos de espécies) (Frankham, 2008). A perda desta variabilidade natural, conhecida como polimorfismo, reduz o potencial evolutivo associado com a redução do sucesso reprodutivo (Sertse *et al.*, 2010), sendo atualmente aceito que variações genéticas em locos específicos podem ter uma profunda influência em populações, permitindo que elas suportem mudanças ambientais (Hoffmann & Willi, 2008). Estresses ambientais naturais e antropogênicos que causam um declínio persistente no tamanho da população e aumento nas taxas de endogamia e/ou redução de fluxo gênico, podem resultar em uma diminuição geral da variação genômica dentro das populações e um aumento da divergência genética entre estas (Sertse *et al.*, 2010). Mudanças fenotípicas e fisiológicas envolvendo mudanças genéticas são particularmente grandes em contextos antropogênicos (Carroll *et al.*, 2007). Quando a contaminação afeta a sobrevivência e/ou reprodução, o processo de seleção irá favorecer aqueles indivíduos que são menos sensíveis àquele(s) contaminante(s) específico(s) (Klerks *et al.*, 2011). Dessa forma, uma população habitando um local contaminado, estando assim sujeita a uma pressão seletiva, pode desenvolver uma elevada resistência em comparação com populações habitando locais não ou menos contaminados. Conseqüentemente, o desenvolvimento de resistência pode estar atrelado a uma diminuição geral do polimorfismo intrapopulacional (Sertse *et al.*, 2010). Klerks e colaboradores (2011) indicaram diversos trabalhos que, em laboratório, submetem populações a estresses ambientais para investigar o desenvolvimento da resistência de diversos organismos a diferentes contaminantes, encontrando impactos fisiológicos como principais resultados (LeBlanc, 1982; Ward & Robinson 2005; Shirley & Sibly 1999; Klerks & Levinton, 1989; Rahel 1981; Xie and Klerks, 2003). Alguns trabalhos sugeriram que a resposta para a seleção direcionada por um contaminante em populações naturais pode ser relativamente rápidas (Klerks & Levinton, 1989; Xie & Klerk, 2003).

Seleções divergentes relacionadas a características ambientais particulares de bacias hidrogeográficas distintas podem potencializar a diferenciação genética entre linhagens, conseqüentemente promovendo uma adaptação local e impedindo um fluxo gênico eficiente entre

essas linhagens (Peijnenburg *et al.*, 2004). Dessa forma, padrões consistentes baixos ou nulos de conectividade genética entre táxons ou regiões podem revelar um impedimento para o compartilhamento ou troca gênica (Riginos *et al.*, 2011).

Organismos bentônicos são importantes membros da base de cadeias tróficas marinhas, podendo ser consumidores de detritos, fitoplâncton, zooplâncton e também servindo de recurso alimentar para consumidores em níveis superiores (Barros *et al.*, 2009). Adicionalmente, possuem um papel importante na ciclagem de nutrientes e na manutenção da qualidade da água. Por possuir um contato direto com o sedimento e pouca mobilidade, esses organismos refletem as condições locais de seu ambiente, podendo assim ser utilizados como indicadores da qualidade ambiental (Nunes *et al.*, 2008; Borja *et al.*, 2011), como parâmetros para modelagem e em programas de monitoramento (Castello *et al.*, 1998; Weis *et al.*, 2004; Elias *et al.*, 2005; Ventura-Lima *et al.*, 2007).

Tradicionalmente, o campo da genética tem amplamente direcionado o desenvolvimento de sistemas modelo “clássicos” utilizando organismos que possuem uma considerável quantidade de recursos e estudos (Laborda *et al.*, 2009). Avanços tecnológicos da genética molecular possuem o potencial de mudar como são estabelecidos os organismos modelo (Borda *et al.*, 2009). A partir do poder do sequenciamento genômico, e com a disponibilidade de ferramentas genômicas funcionais, um organismo que recebia pouca atenção pode ser rapidamente desenvolvido em um recurso multidisciplinar útil (e.g. Du *et al.*, 2007; McMullin *et al.*, 2003). A unidade de repetição do DNA ribossomal (rDNA) contém regiões gênicas (segmentos 18S, 5.8S e 28S) e não gênicas (Espaçadores Intergênicos – ITS1 e ITS2). Estes genes são altamente conservados, e dessa forma podem ser utilizados para analisar grandes eventos evolutivos. Por outro lado, a região do ITS, devido às rápidas taxas de divergência, permite variações. Dessa forma, essa região se tornou um marcador bastante popular para estudos de populações e para distinguir relações filogenéticas de espécies proximamente relacionadas. (Chillali *et al.*, 1998; O’Donnell, 1992; Bakker *et al.*, 1992).

A combinação de uma notável diversidade de adaptações, formas e funções ao longo da história de vida, tem promovido um grande número de espécies de anelídeos a ter o potencial de se tornarem organismos modelo (Borda *et al.*, 2009). A classe Polychaeta é geralmente dominante em sedimentos marinhos e estuarinos. Geralmente possuem uma forte tolerância a diversos contaminantes, sendo também os invertebrados mais comumente encontrados em áreas poluídas (Eriksen *et al.*, 1988). Reish e Gerlinger (1997) apontaram 48 espécies de poliquetas que têm sido utilizadas como modelo para a avaliação de efeitos de poluentes em ambientes marinhos, sendo muitos deles pertencentes à família Nereididae, incluindo a espécie *Laeonereis acuta*. Esta espécie infaunal é comum em estuários ao longo da costa Atlântica da América do sul, tendo distribuições desde Recife, Brasil até a península de Valdés na Argentina (Orensanz *et al.*, 1974). Pode atingir altas abundâncias e biomassa em praias abrigadas, manguezais e planícies de maré, ocorrendo principalmente nas regiões menos salinas das zonas intermareais (Lana *et al.*, 1997). É caracterizada por ser depositívora e conseqüentemente viver em contato direto com o sedimento (Castello *et al.*, 1998; Omena & Amaral, 2001), sendo muito útil em programas de biomonitoramento marinho por conseguir refletir a poluição local do ambiente. Esta espécie tem sido utilizada extensivamente em trabalhos toxicológicos, mostrando alterações no sistema de defesa antioxidantes após exposição a poluentes como cádmio, cobre, peróxido de hidrogênio, entre outros (Ferreira-Cravo *et al.*, 2009; Geracitano *et al.*, 2002; Moraes *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2010; Sandrini *et al.*, 2008; Ventura *et al.*, 2007).

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Testar a hipótese de que a população do estuário do rio Subaé é menos polimórfica em relação às outras populações estudadas devido ao seu alto grau de contaminação por metais pesados

### **2.2 Objetivos específicos**

Caracterizar a estrutura genética de populações de *Laeonereis acuta* em três sistemas estuarinos da Baía de Todos os Santos (Subaé, Paraguaçu e Jaguaripe), BA e avaliar o grau de polimorfismo nas populações estudadas.

### 3. Materiais e métodos

#### 3.1 Área de estudo

A bacia de drenagem total da Baía de Todos os Santos (BTS) possui cerca de 60.000 km<sup>2</sup> e quase sua totalidade (59.150 km<sup>2</sup>) é drenada por três tributários: Paraguaçu, Jaguaripe e Subaé. As condições estuarinas na BTS são observadas apenas próximo à saída dos principais tributários, devido à pequena descarga fluvial. A BTS possui uma grande diversidade de táxons e de habitats bentônicos onde diversos trabalhos mostraram que esses habitats, principalmente na região norte e nordeste da Baía, vem historicamente sofrendo diversos impactos antrópicos (Barros *et al.*, 2012).

As principais fontes de impactos ambientais da bacia do rio Paraguaçu estão relacionadas às atividades econômicas e urbanas desenvolvidas na área, sendo que diversas comunidades dessa bacia não dispõem de qualquer serviço de coleta e tratamento de esgoto sanitário (Barros *et al.*, 2008; CRA, 2004). A principal característica que difere o estuário do rio Paraguaçu dos demais é a presença da Barragem Pedra do Cavalo, construída na década de 80, na cabeceira do estuário do Rio Paraguaçu, promovendo mudanças no regime hidrológico e afetando a região estuarina (Genz, 2006).

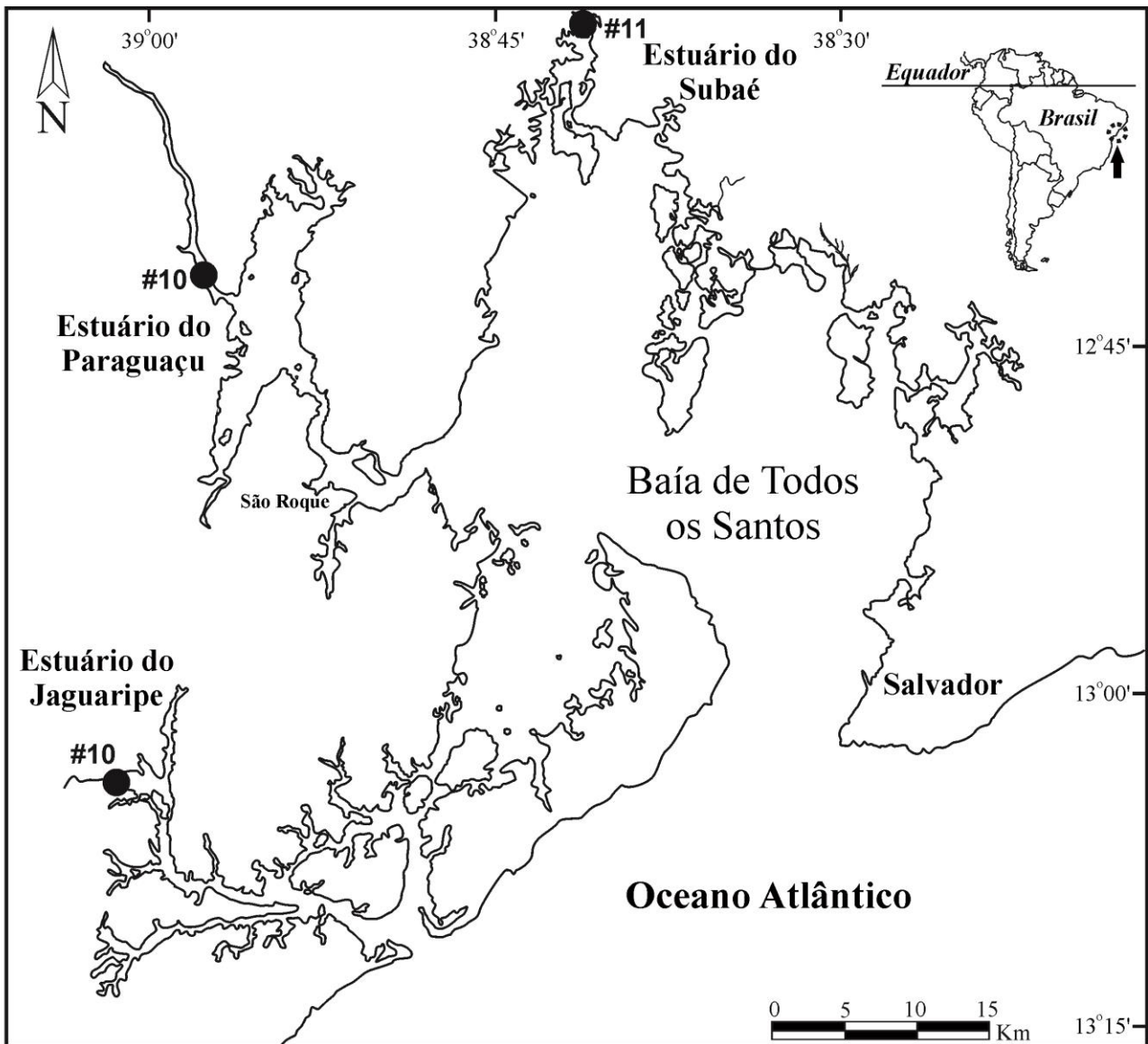
Na bacia do rio Subaé, as principais atividades poluidoras são industriais, lançamento de esgotos domésticos, utilização de agroquímicos em plantações e o lançamento de resíduos sólidos sem tratamento adequado (Hatje *et al.*, 2006). Diferencia-se dos outros estuários devido aos altos níveis de contaminantes inorgânicos, devido a uma antiga metalúrgica que funcionava nessa região, promovendo efeitos deletérios na macrofauna. As condições ambientais mais adversas para a biota são encontradas no estuário superior (Fig.1) (Hatje *et al.*, 2006).

A agricultura é a atividade predominante na bacia do rio Jaguaripe e os principais impactos ambientais são o aterro de manguezais, a disposição inadequada de esgotos sanitários e resíduos sólidos, e o uso indiscriminado de pesticidas e corretivos (CRA, 2004). Adicionalmente, a região é conhecida pela produção de artesanato de barro, por cerca de 60 olarias, onde a pintura é feita com esmaltes, óxido de chumbo, sulfato de cobre, dentre outras substâncias e estes são despejados sem tratamento ou controle no rio.

Apesar do fato de que os diferentes estuários da BTS apresentam uma grande variabilidade no que se refere aos teores de metais, outro padrão observado é o aumento da concentração de alguns elementos, a depender do sistema estuarino, em regiões mais internas (Barros *et al.*, 2009). Isso provavelmente se deve ao maior número de fontes de contaminação a montante.

De acordo com Hatje e Barros (2012), o estuário do rio Jaguaripe configura-se como sendo o que possui menores concentrações de metais traço no sedimento e o estuário do rio Subaé como sendo o mais contaminado. Os resultados para o estuário do rio Paraguaçu indicam que este se encontra em sua maioria com concentrações baixas de contaminantes no sedimento.

Como observado em diversos sistemas estuarinos ao redor do globo (e.g. Nunes *et al.*, 2008; Mclusky, 2004), as assembléias bentônicas dos estuários dos rios Jaguaripe, Paraguaçu e Subaé são dominadas por poliquetas, moluscos e crustáceos. Os principais sistemas estuarinos da BTS apresentam, de maneira geral, um decréscimo do número de táxons a montante, indicando que um menor número de táxons possui adaptações para habitar as porções mais doces destes sistemas (Barros *et al.*, 2012).



**Figura 1** – Mapa da Baía de Todos os Santos (BTS), com a indicação dos pontos de coleta referentes aos rios Jaguaripe (#10), Paraguaçu (#10) e Subaé (#11).

### 3.2 Obtenção e identificação do material biológico

Indivíduos da espécie *Laonereis acuta* das populações dos estuários dos rios Subaé, Paraguaçu e Jaguaripe foram coletados ( $n = 7, 8$  e  $5$  respectivamente) nos pontos mais internos destes (Fig. 1). Os indivíduos foram capturados através de tubos de PVC (amostradores do tipo corer) de 15 cm de diâmetro utilizando uma malha de 0,5 mm e preservados em Álcool 92,8%. Foram identificados em laboratório utilizando bibliografia adequada (i.e. Amaral *et al.*, 2005).

### 3.3 Extração de DNA

O sistema digestivo de cada espécime foi removido, através da utilização de um microscópio estereoscópio trinocular, pinça e bisturi, para evitar contaminação com DNA que não fosse do próprio animal.

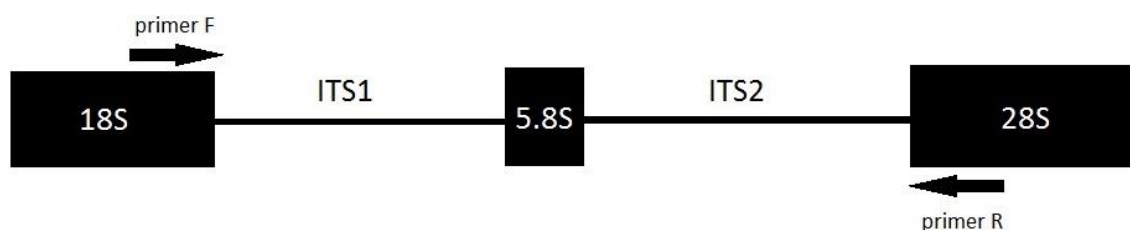
A extração do DNA total foi feita a partir do protocolo salino de extração de tecidos animais descrito por Aljanabi & Martinez, 1997. Após a extração, a solução com DNA foi purificada através do Kit de purificação (QIAGEN – QIAquick PCR purification kit protocol) para remover qualquer tipo de contaminação que pudesse afetar a posterior PCR (Reação em Cadeia da Polimerase). A qualidade e concentração do DNA extraído foram avaliados a partir do espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm) NanoDrop® 2000, dessa forma, somente soluções de DNA livres de contaminantes foram utilizados para as posteriores análises.

### 3.4 Amplificação

A região do DNA ribossomal contendo os genes 18S parcial, ITS1 completo, 5.8S completo, ITS2 completo e 28S parcial (Fig. 2) foi amplificada a partir dos primers ITS-1 (CGTCGCTACTACCGATTG) e ITS-4 (CCGCTTAGTGATATGCTTAAG), desenhados a partir de sequências de *Platynereis dumerilii* (Hui *et al.*, 2007). A reação foi realizada com as seguintes concentrações finais de reação: Buffer 1mM, MgCl<sub>2</sub> 2mM, DNTP 0,2mM, Primers ITS-1 e ITS-4 0,4mM, TAQ 1mM e DNA 40ng/μL.

O programa utilizado no termociclador consiste em desnaturação a 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de Desnaturação a 94°C por 20 segundos; hibridização dos primers a 56°C por 15 segundos; extensão a 72°C por 45 segundos.

Os produtos de PCR foram analisados em Gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio. As bandas foram cortadas e purificadas do gel a partir do kit Promega - Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System. A qualidade e concentração dos produtos de PCR foram avaliados a partir do espectrofotômetro de espectro completo (190 a 840 nm) NanoDrop® 2000.



**Figura 2** - Região de interesse do DNA ribossomal (compreendendo os Genes 18S, 5.8S e 28S e os espaçadores intergênicos ITS1 e ITS2) e posição de hibridização dos primers Forward (F) e Reverse (R).

### 3.5 Sequenciamento

O sequenciamento das 20 amostras foi feito em triplicata utilizando o BigDye® Terminator v. 3.1 CycleSequencing Kit no Sequenciador Applied Biosystems, 3500 GeneticAnalyzer, no Laboratório de Genômica e Expressão (UNICAMP). Os contigs foram montados a partir do Software Chromas Pro. O Alinhamento das sequências foi feito a partir do software MEGA5.

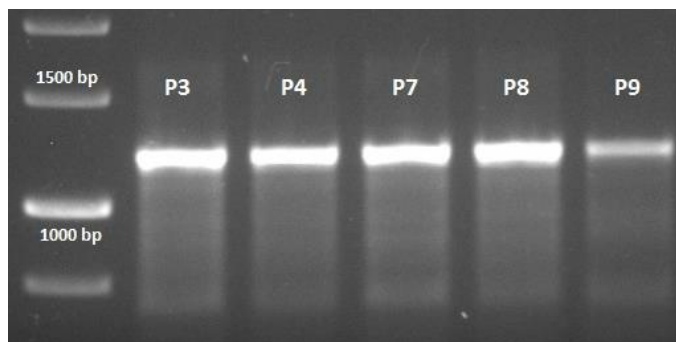
### **3.6 Análise da variabilidade genética**

Foi realizado um teste de distância genética, o qual fornece dados sobre diferença do material genético entre diferentes espécies ou indivíduos da mesma espécie a partir do software MEGA5 (Tamura *et al.*, 2011).

A partir dos dados de distância, com o software Genalex (Peakall & Smouse, 2012), foram feitos os seguintes testes: Análise de frequência de alelos; Análise de variação molecular (AMOVA): método que estima a diferenciação intra e interpopulacional; Análise  $F_{st}$ , que representa a taxa de diferenciação média entre pares de cromossomos; Equilíbrio de Hardy-Weinberg, o qual afirma que em uma população mendeliana, dentro de determinadas condições, as frequências alélicas permanecerão constantes ao passar das gerações (Hartl, 2008).

## 4. Resultados

As amplificações a partir dos primers ITS-1 e ITS-4 resultaram em fragmentos de aproximadamente 1200pb (Fig. 3). A partir do sequenciamento, as bandas foram posteriormente confirmadas como a região do DNA ribossomal que compreende a região do ITS através da ferramenta BLAST dentro do banco de dados do National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).



**Figura 3** – Fragmentos representando a região do ITS, para os indivíduos P3, P4, P7, P8 e P9 pertencentes à população do rio Paraguçu, com aproximadamente 1200bp em Gel de agarose (1,5%) corado com brometo de etídio.

Os valores de distância genética intrapopulacional e interpopulacional estão dispostos nas tabelas 1 e 2 respectivamente. Os maiores valores de distância foram encontrados entre indivíduos da população do rio Subaé (0.012) e valores de distância ‘0’ para todos os indivíduos com exceção do P14 na população do rio Paraguçu.



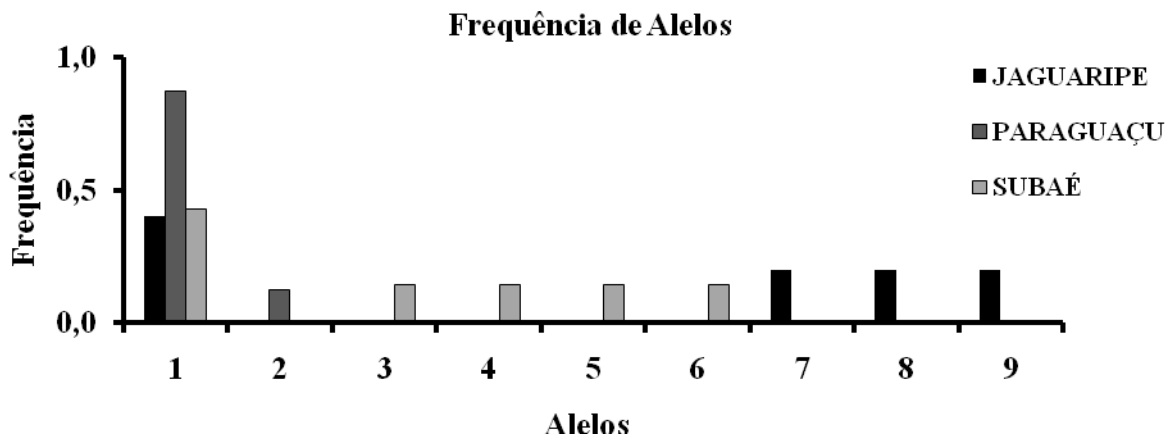
**Tabela 1** – Valores de distância genética entre indivíduos; Jaguaripe (J), Subaé (S) e Paraguaçu (P). Valores iguais a ‘0’ representam sequências idênticas.

	J1	J2	J13	J17				
J1								
J2	0,002							
J13	0,006	0,008						
J17	0,003	0,005	0,009					
J19	0,000	0,002	0,006	0,003				
	S8	S4	S12	S15	S16	S19		
S8								
S4	0,000							
S12	0,001	0,001						
S15	0,010	0,010	0,012					
S16	0,001	0,001	0,002	0,012				
S19	0,001	0,001	0,002	0,012	0,002			
S23	0,000	0,000	0,001	0,010	0,001	0,001		
	P1	P2	P3	P4	P8	P14	P16	
P1								
P2	0,000							
P3	0,000	0,000						
P4	0,000	0,000	0,000					
P8	0,000	0,000	0,000	0,000				
P14	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002			
P16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002		
P17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	

**Tabela 2** – Valores de distância genética entre populações: Jaguaripe (J), Subaé (S) e Paraguaçu (P). Valores iguais a ‘0’ representam sequências idênticas.

	P1	P2	P3	P4	P8	P14	P16	P17	S8	S4	S12	S15	S16	S19	S23	J1	J2	J13	J17
P1																			
P2	0,000																		
P3	0,000	0,000																	
P4	0,000	0,000	0,000																
P8	0,000	0,000	0,000	0,000															
P14	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002														
P16	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002													
P17	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000												
S8	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000											
S4	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000										
S12	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001									
S15	0,009	0,009	0,009	0,009	0,009	0,011	0,009	0,009	0,009	0,009	0,010								
S16	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,010							
S19	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001	0,003	0,001	0,001	0,001	0,001	0,002	0,010	0,002						
S23	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,009	0,001	0,001					
J1	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,009	0,001	0,001	0,000				
J2	0,002	0,002	0,002	0,002	0,002	0,005	0,002	0,002	0,002	0,002	0,003	0,011	0,003	0,003	0,002	0,002			
J13	0,007	0,007	0,007	0,007	0,007	0,009	0,007	0,007	0,007	0,007	0,008	0,016	0,008	0,008	0,007	0,007	0,009		
J17	0,003	0,003	0,003	0,003	0,003	0,006	0,003	0,003	0,003	0,003	0,005	0,010	0,005	0,005	0,003	0,003	0,006	0,010	
J19	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,002	0,000	0,000	0,000	0,000	0,001	0,009	0,001	0,001	0,000	0,000	0,002	0,007	0,003

A partir dos dados de distância foram identificados 9 alelos (Fig. 4) indicando que a população do estuário do rio Paraguaçu apresenta apenas 2 alelos, a população do rio Jaguaripe contém 4 alelos e a população do estuário do rio Subaé contém 5 alelos. O alelo ‘1’ é o único compartilhado e é o alelo dominante em termos de frequência dentro de cada população. O alelo ‘2’ é exclusivo do Paraguaçu, os alelos ‘3’, ‘4’, ‘5’ e ‘6’ são exclusivos do Subaé e os alelos ‘7’, ‘8’, e ‘9’ são exclusivos do Jaguaripe. Foi encontrado um valor alto em todas as populações para o coeficiente de endogamia ( $F_{is} = 1,0$ ) (Tabela 3).



**Figura 4** – Frequência de alelos nas populações dos rios Jaguaripe, Paraguaçu e Subaé.

**Tabela 3** – Tabela contendo ‘N’ amostral; Número de alelos; Número efetivo de alelos; Índice de informação; Heterozigosidade observada; Heterozigosidade esperada e Coeficiente de endogamia.

População	N	Na	Ne	I	Ho	He	$F_{is}$
JAGUARIFE	5	4	3,571	1,332	0,387	0,720	1,0
PARAGUAÇU	8	2	1,280	0,377	0,035	0,219	1,0
SUBAÉ	7	5	3,769	1,475	0,399	0,735	1,0

Os resultados da análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) mostraram que as três populações apresentaram desvios significativos (Tabela 4) dos valores observados em relação aos valores esperados de acordo com o equilíbrio (Fig. 5). O teste qui-quadrado para HWE realizado, indica que o modelo não foi aceito. Valores de  $P=0,02$ ;  $P=0,005$ ;  $P=0,002$  (Jaguaripe, Paraguaçu e Subaé respectivamente).

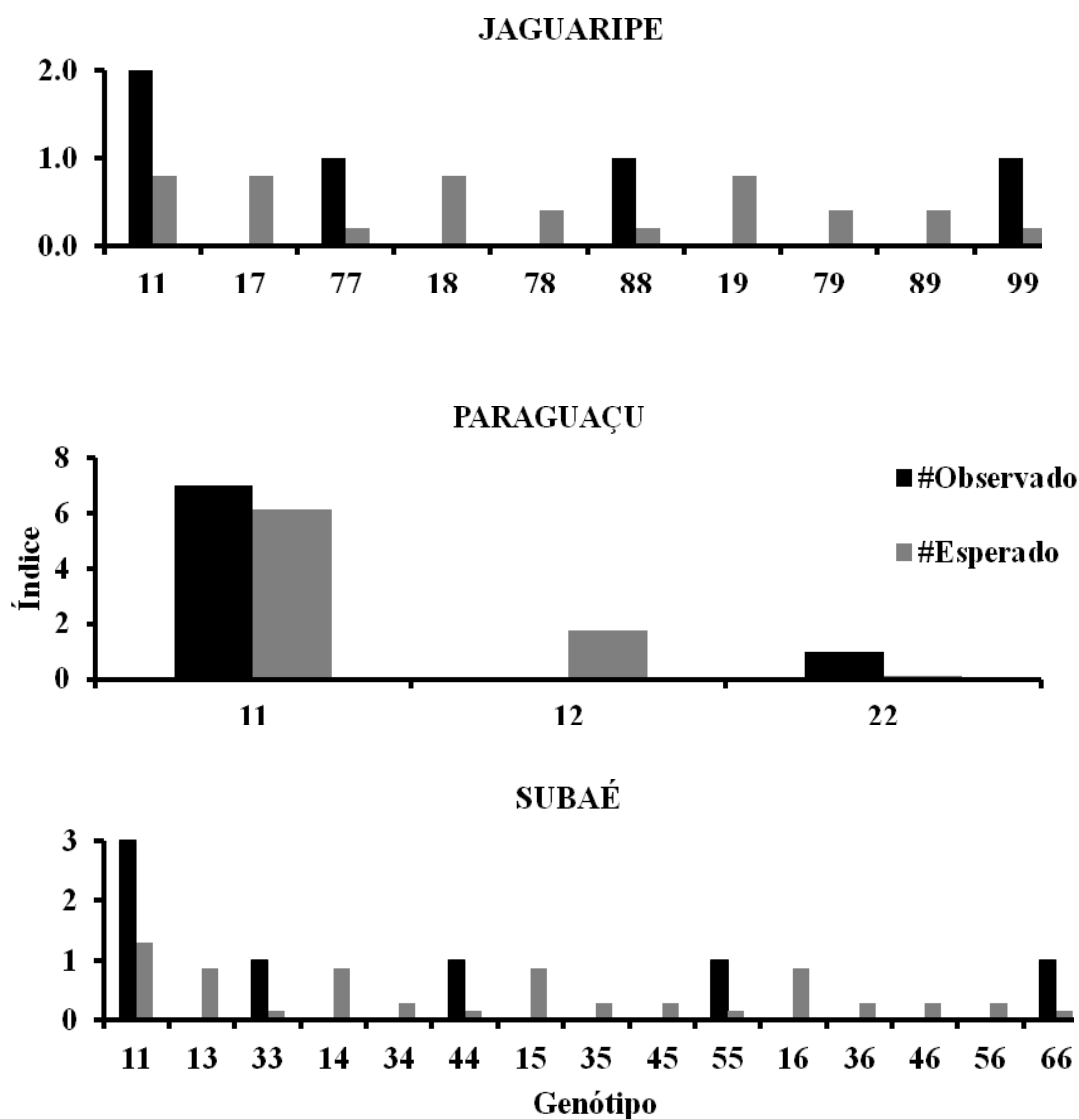
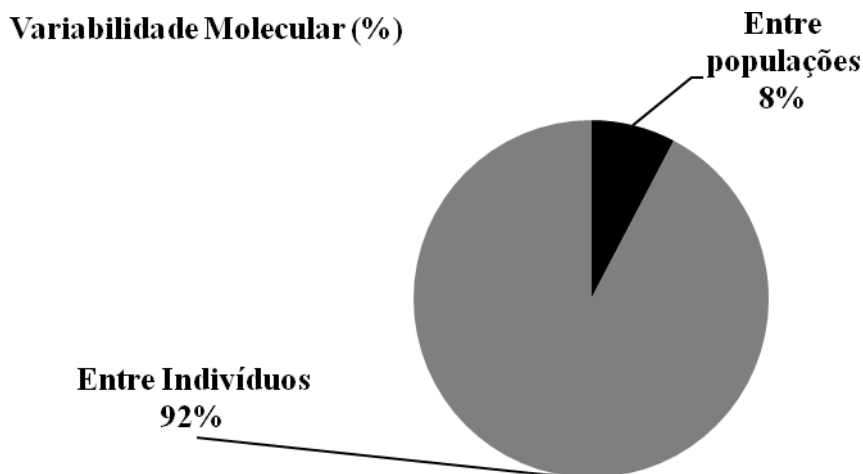


Figura 5 – Valores esperados e observados oriundos da análise do Equilíbrio de Hardy-Weinberg.

Tabela 4 - Tabela contendo o resumo dos testes qui-quadrado.

Pop	Locus	DF	ChiSq	Prob
JAGUARIFE	1	6	15,000	0,020
PARAGUAÇU	1	1	8,000	0,005
SUBAÉ	1	10	28,000	0,002

O teste AMOVA indicou que somente 8% da variação total é atribuída a variações entre populações e que 92% da variação total é atribuída a variação entre indivíduos (Fig. 6).



**Figura 6** – Representação da variação molecular em porcentagem da variabilidade molecular entre populações e entre indivíduos.

Foi observada uma diferenciação genética significativa ( $P < 0.05$ ) entre as populações dos rios Jaguaripe e Subaé em relação à população do rio Paraguaçu na análise *Fst* (Tabela 5). Não houve diferenciação genética significativa entre as populações do Subaé e Jaguaripe. A maior diferenciação genética ( $Fst = 0.173$ ) foi encontrada entre as populações dos rios Jaguaripe e Paraguaçu.

**Tabela 5** – Resumo da análise *Fst*, que avalia a divergência das frequências alélicas entre duas ou mais populações.

Pop1	Pop2	Fst	LinFst	Nm	#Pop1	#Pop2	P(rand>= data)	No. PW Pm
JAGUARIPE	PARAGUAÇU	0,173	0,209	1,197	5	8	0,023	999
JAGUARIPE	SUBAÉ	0,000	0,000	-	5	7	0,448	999
PARAGUAÇU	SUBAÉ	0,127	0,146	1,716	8	7	0,025	999

## 5. Discussão

O Equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) descreve o estado de equilíbrio em um único locus em uma população diplóide com acasalamento aleatório, livre de outras forças evolutivas como mutação, migração e deriva genética (Gillespie, 1998). Qualquer desvio significativo do modelo indica que a população está subdividida, e que existe uma endogamia significativa ou fluxo de genes de outra população (Hartl *et al.*, 2008). De acordo com o teste de HWE realizado no presente trabalho, as populações dos três estuários (Jaguaripe, Paraguaçu e Subaé) apresentaram desequilíbrios significativos em relação ao modelo. Para cada população, a heterozigosidade esperada ( $H_e$ ) foi maior que a Heterozigosidade observada ( $H_o$ ), levando a altos valores do coeficiente de endogamia ( $F_{is} = 1$ ) (Maguire *et al.*, 2000). Dessa forma, é sugerido que a estrutura genética das populações de *L. acuta*, nos três sistemas estuarinos estudados, reflete impactos diversos e específicos de cada ambiente, culminando em um baixo nível de polimorfismo geral.

Os menores valores de heterozigosidade e frequência alélica foram encontrados na população do rio Paraguaçu seguido das populações dos rios Jaguaripe e Subaé respectivamente. De acordo com a revisão de Hoffmann e Willi (2008), se os estresses ambientais causam um declínio persistente no tamanho e/ou no fluxo gênico na população, estes podem causar uma redução geral na variação genética intrapopulacional.

O estuário do rio Subaé possui as maiores concentrações de metais traço no sedimento dentre os três estuários estudados, especialmente Cd, Zn, Pb, e Cu (Hatje *et al.*, 2006; Hatje e Barros, 2012). As populações deste estuário foram as que apresentaram a maior variedade de alelos (5), o que seria oposto ao esperado. Diversos autores apontam que outros fatores como biogeografia e fluxo gênico são importantes para a diluição dos efeitos deletérios promovidos pela contaminação, exercendo influência na frequência de alelos, nas taxas de mutação e mudanças no tamanho populacional efetivo (Boulding & Hay, 2001; Belfiore & Anderson, 2001; Ross *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2003; Whitehead *et al.*, 2003; Colpaert *et al.*, 2004; Muller *et al.*, 2007; Taylor & Theodorakis, 2010). De acordo com Colson (2002) estes fatores são reponsáveis por prevenir divergências genéticas induzidas detectáveis entre grupos, na medida em que populações isoladas podem estar em maior risco de mudanças genéticas induzidas por agentes estressores. Klerks & Levinton (1989) indicam que mudanças na estrutura genética e composição taxonômica de uma área poluída em relação a uma área controle podem não ser definitivamente atribuídas ao fator poluição. Dessa forma, a avaliação das diferenças dos padrões genéticos populacionais devem se basear não somente em hipóteses relacionadas às taxas de contaminação.

O presente trabalho levou em consideração a informação de que o estuário do Rio Jaguaripe, quando comparado aos sistemas estuarinos dos rios Paraguaçu e Subaé, é considerado o menos contaminado (Hatje *et al.*, 2012). No entanto, os resultados indicaram uma divergência genética não significativa entre as populações deste estuário e as do Rio Subaé ( $F_{st} = 0$ ;  $P = 0,448$ ). Dessa forma, é interessante notar que apesar de possuir níveis de contaminação inorgânica menores no sedimento em comparação com os estuários estudados, o sistema estuarino do Rio Jaguaripe possui peculiaridades em seu ambiente que levam a uma baixa diversidade genética, como por exemplo, o despejo de esgoto doméstico sem tratamento, o uso indiscriminado de pesticidas e corretivos (CRA, 2004) e pela presença de olarias de artesanato de barro, onde a pintura é feita com esmaltes, óxido de chumbo, sulfato de cobre (Hatje *et al.*, 2009), dentre outros impactos. De acordo com o trabalho de Hatje e colaboradores (2010), concentrações de Arsênio (As), em mais de 50% das estações no estuário do Rio Jaguaripe e em algumas poucas estações dos estuários dos rios Subaé e Paraguaçu, estão com níveis acima do TEL (NOAA, 2004) (i.e. 7,24 mg/kg), conseqüentemente o sedimento desses estuários podem estar tóxicos para espécies bentônicas. No

entanto, são necessários mais estudos sobre a toxicidade dos sedimentos ao longo dos estuários em questão para poder ter uma visão mais clara da qualidade do sedimento nestes sistemas.

De acordo com o trabalho realizado por Genz (2006), o fluxo de água doce no Paraguaçu foi severamente afetado pela implantação da barragem Pedra do Cavalo, na década de 80. Em decorrência da barragem, houve a redução da descarga fluvial ao estuário, devido à baixa frequência de extravasamento. Principalmente o baixo curso do rio Paraguaçu é fortemente afetado pela descarga fluvial e, dessa forma, a diminuição das vazões médias impostas pela operação da barragem modifica as condições estuarinas, direcionando o aumento da salinidade à montante (Genz, 2006). Alterações antropogênicas dos padrões naturais de descarga de água doce afetam potencialmente aspectos físicos (química da água e sedimento), conseqüentemente a fauna e a flora estuarina e marinha (Gippel *et al.*, 2002). Os efeitos de barragens sobre os estuários estão relacionados às alterações na magnitude e distribuição temporal das vazões, influenciando negativamente no habitat e organismos estuarinos (Gillanders & Kingsford, 2002).

Alguns autores indicam modificações biológicas em estuários associadas à existência de barragens a montante: o declínio dos manguezais (corte e a redução da dispersão das sementes) devido à redução das enchentes (Rubin *et al.*, 1999); a alteração na qualidade da água; as flutuações no nível e vazão; a redução da vegetação intermareal e emergente (Sklar & Browder, 1998); a interrupção do movimento da biota aquática. Dessa forma, é interessante notar que a existência da barragem no estuário do rio Paraguaçu, por limitar e possivelmente interromper a dispersão larval da biota no local, provavelmente pode ter comprometido um possível fluxo gênico que existia entre as populações de *L. acuta* ao longo do gradiente estuarino anterior à construção da barragem, o que também pode ter contribuído para a menor variabilidade genética encontrada dentre os estuários estudados.

Estudos apontam que a variação da salinidade exerce uma forte influência na estrutura populacional e taxas de sobrevivência das espécies bentônicas, bem como sendo a causa de doenças em ostras e responsável pelo declínio de populações de espécies estuarinas (Craig *et al.*, 1989; Mcleod & Wing, 2008). Kowalewski e colaboradores (2000) demonstraram que o decréscimo agudo dos fluxos de água doce no Rio Colorado (EUA) e o conseqüente aumento da salinidade à montante, é a provável causa do grande declínio em abundância do bivalve *Mulinia coloradoensis*. Adicionalmente, os autores afirmam que o aumento dos fluxos seria capaz de criar condições para a persistência dessa espécie e até recuperar seu tamanho populacional original. De acordo com o trabalho de Patel (1996), após a construção da barragem construída no rio Ganges na Índia, em épocas de seca, a água salgada adentra até 100 km no estuário. Com esse aumento da intrusão salina está havendo a morte de diversas espécies de mangue e conseqüentemente tendo um forte impacto nos estoques pesqueiros da região. De acordo com White (1988), a construção da barragem ‘High Aswan Dam no Rio Nilo (Egito) teve um forte impacto negativo na biota, devido ao aumento da intrusão salina e das concentrações de nutrientes nas porções costeiras e estuarinas. Os resultados do trabalho realizado por Genz (2006) indicam que houve um aumento da intrusão salina à montante do estuário do Rio Paraguaçu após a construção e operação da barragem Pedra do Cavalo. Dessa forma, o presente trabalho foi capaz de identificar, através do estudo da estrutura genética de populações de *L. acuta*, que o estuário do Rio Paraguaçu apresenta a menor variabilidade genética em relação aos outros estuários estudados. Resultado este que, de acordo com a literatura apresentada pode estar intimamente relacionado com a construção e operação da barragem, situação singular deste estuário em relação aos estuários dos rios Subaé e Jaguaripe. Conseqüentemente, a hipótese de que a população do nereidídeo *L. acuta* localizada no estuário do rio Subaé seria aquela que apresentaria menores níveis de polimorfismo, por possuir os maiores valores de contaminação por metais dentre os estuários estudados, não foi aceita.

## 6. Considerações finais

O estudo dos impactos na estrutura genética de populações deve ser criterioso e levar em consideração as interações físicas, químicas e biológicas no ambiente. Os três estuários estudados não se adequam ao modelo de HWE e possuem baixos valores de diversidade genética. Os resultados encontrados no presente trabalho indicam a possibilidade de que o stress provocado pelo controle das vazões no estuário do Rio Paraguaçu pela barragem de Pedra do Cavalo, com o consequente aumento da intrusão salina principalmente no baixo curso do rio, tem maior influência na diversidade genética das populações, quando comparadas com os outros estuários estudados, livres desse tipo de controle de fluxo. A alta contaminação por metais presente no sedimento no estuário do Rio Subaé, de acordo com os resultados, não culminou em uma menor variabilidade genética como esperado, tendo como possíveis explicações um maior fluxo gênico entre subpopulações ao longo do gradiente estuarino e evolução da tolerância. Estudos futuros relacionados com a evolução da tolerância, a vazão de água doce nos principais tributários da BTS e com a dispersão larval da espécie *L. acuta*, bem como a utilização de outros marcadores moleculares como RAPD e microsátélites são essenciais para esclarecer possíveis questões quanto ao impacto causado pelos agentes antrópicos nestes sistemas.

## 7. Referências bibliográficas

- Aljanabi, S. M., & Martinez, I. (1997). Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. *Nucleic acids research*, 25(22), 4692–3.
- Amaral, A.C.Z.; Rizzo, A.E.; Arruda, E.P. (orgs.). 2005. Manual de Identificação dos Invertebrados Marinhos da Região Sudeste-Sul do Brasil. 1a. ed. São Paulo, SP: Editora da Universidade de São Paulo, Vol. 1. 287 p.
- Bakker, F.T., Olsen, J.L., Stam, W.T., and van De Hoek, C. (1992). Nuclear ribosomal DNA internal transcribed spacers (ITS1 and ITS2) define discrete biogeographic groups in *Cladophora albida* (Chlorophyta). *J Phycol* 28:839–845.
- Barbière, J. (2005). Challenges of Growing Urbanization of Coastal Areas. *UNESCO*, 5, 51–53.
- Barros, F., Hatje, V., Figueiredo, M. B., Magalhães, W. F., Dórea, H. S., & Emídio, E. S. (2008). The structure of the benthic macrofaunal assemblages and sediments characteristics of the Paraguaçu estuarine system, NE, Brazil. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78(4), 753–762. doi:10.1016/j.ecss.2008.02.016
- Belfiore, N. M., & Anderson, S. L. (2001). Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation research*, 489(2-3), 97–122.
- Beth L. McGee, Christian E. Schlekati, D. M. B. (1995). Sediment contamination and biological effects in a Chesapeake Bay marina, 59, 39–59.
- Borda, K. M. H. and E. (2009). Developing Models for Lophotrochozoan and Annelid Biology.
- Borja, A., Barbone, E., Basset, A., Borgersen, G., Brkljacic, M., Elliott, M., Garmendia, J. M., *et al.* (2011). Response of single benthic metrics and multi-metric methods to anthropogenic pressure gradients, in five distinct European coastal and transitional ecosystems. *Marine pollution bulletin*, 62(3), 499–513. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.12.009
- Boulding, E. G., & Hay, T. (2001). Genetic and demographic parameters determining population persistence after a discrete change in the environment. *Heredity*, 86(Pt 3), 313–24.
- Carroll, S. P., Hendry, a. P., Reznick, D. N., & Fox, C. W. (2007). Evolution on ecological time-scales. *Functional Ecology*, 21(3), 387–393. doi:10.1111/j.1365-2435.2007.01289.x
- Castello, Seeliger C Odebrecht J P, B. (1998). Os Ecosistemas Costeiro e Marinho do Extremo Sul do Brasil. Rio Grande - RS: EDITORA ECOSCIENTIA.
- Chillali, M., Idder-Ighili, H., Guillaumin, J. J., Mohammed, C., Escarmant, B. L., & Botton, B. (1998). Variation in the ITS and IGS regions of ribosomal DNA among the biological species of European *Armillaria*. *Mycological Research*, 102(5), 533–540. doi:10.1017/S0953756297005315



- Christopher Gippel, D. B. (2002). Review of Environmental Impacts of Flow Regulation and Other Water Resource Developments in the River Murray and Lower Darling River System Includes Glossary of Terms Final Report to Murray-Darling Basin Commission by Fluvial Systems Pty Ltd July 2002 Rev.
- Colpaert, J. V., Muller, L. a. H., Lambaerts, M., Adriaensen, K., & Vangronsveld, J. (2004). Evolutionary adaptation to Zn toxicity in populations of Suilloid fungi. *New Phytologist*, 162(2), 549–559. doi:10.1111/j.1469-8137.2004.01037.x
- Colson, I. (2002). Selection and gene flow between microenvironments: the case of *Drosophila* at Lower Nahal Oren, Mount Carmel, Israel. *Molecular ecology*, 11(8), 1311–6.
- CRA (2004). Diagnóstico do grau de contaminação da Baía de Todos os Santos por metais pesados e hidrocarbonetos de petróleo a partir da análise das suas concentrações nos sedimentos de fundo e na biota associada. Volume I, II e IV. Salvador, Bahia
- Craig, A., E. N. Powell, R. R. Fay, J. M. Brooks. 1989. Distribution of *Perkinsus marinus* in Gulf Coast oyster populations. *Estuaries* 12:82–91.
- Dixon, D., & Wilson, J. (2000). Genetics and marine pollution. *Hydrobiologia*, 420(1), 29–43.
- Donald J. Reish and Thomas V. Gerlinger. (1997). A Review of the Toxicological Studies. *Marine Bulletin of Science*, 60(2), 584–607.
- Du, H., Han, J., Lin, K., Qu, X., & Wang, W. (2007). Characterization of 11 microsatellite loci derived from genomic sequences of polychaete *Capitella capitata* complex. *Molecular Ecology Notes*, 7(6), 1144–1146. doi:10.1111/j.1471-8286.2007.01811.x
- Elias, R., Palacios, J., Rivero, M., & Vallarino, E. (2005). Short-term responses to sewage discharge and storms of subtidal sand-bottom macrozoobenthic assemblages off Mar del Plata City, Argentina (SW Atlantic). *Journal of Sea Research*, 53(4), 231–242. doi:10.1016/j.seares.2004.08.001
- Eriksen, K.D.H., Daae, H.L., Andersen, R.A., 1988. Evidence of presence of heavy metal-binding proteins in polychaete species. *Comp. Biochem. Physiol.* 91, 377–384.
- Ferreira-Cravo, M., Ventura-Lima, J., Sandrini, J. Z., Amado, L. L., Geracitano, L. A., Rebelo, M., Bianchini, A., *et al.* (2009). Antioxidant responses in different body regions of the polychaeta *Laeonereis acuta* (Nereididae) exposed to copper. *Ecotoxicology and environmental safety*, 72(2), 388–93. doi:10.1016/j.ecoenv.2008.07.003
- García-Alonso, J., Greenway, G. M., Munshi, a, Gómez, J. C., Mazik, K., Knight, a W., Hardege, J. D., *et al.* (2011). Biological responses to contaminants in the Humber Estuary: disentangling complex relationships. *Marine environmental research*, 71(4), 295–303. doi:10.1016/j.marenvres.2011.02.004
- Genz, F. (2006). Avaliação dos efeitos da barragem Pedra do Cavalo sobre a circulação estuarina do rio Paraguaçu e Baía de Iguape. Curso de pós graduação em Geologia - Universidade Federal da Bahia.

- Geracitano, L., Monserrat, J. M., & Bianchini, A. (2002). Physiological and antioxidant enzyme responses to acute and chronic exposure of *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae) to copper. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 277(2), 145–156. doi:10.1016/S0022-0981(02)00306-4
- Gillanders, B. M., & Kingsford, M. J. (2002). Impact of changes in flow of freshwater on estuarine and open coastal habitats and the associated.
- Gillespie, J. H. (1998). *Population Genetics a concise guide*.
- Hartl, D. (2008). *Princípios de genética de população*. 3. ed. Ribeirão Preto - SP. FUNPEC Editora.
- Hatje, V., Barros, F., Figueiredo, D.G., Santos, V.L.C.S., Peso-Aguiar, M.C., 2006. Trace metal contamination and benthic assemblages in Subae´ estuarine system, Brazil. *Marine Pollution Bulletin* 52, 969–987
- Hatje, V, Macedo, S. M., De Jesus, R. M., Cotrim, G., Garcia, K. S., De Queiroz, a F., & Ferreira, S. L. C. (2010). Inorganic As speciation and bioavailability in estuarine sediments of Todos os Santos Bay, BA, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 60(12), 2225–32. doi:10.1016/j.marpolbul.2010.08.014
- Hatje, Vanessa, & Barros, F. (2012). Overview of the 20th century impact of trace metal contamination in the estuaries of Todos os Santos Bay: Past, present and future scenarios. *Marine pollution bulletin*. doi:10.1016/j.marpolbul.2012.07.009
- Hoffmann, A. a, & Willi, Y. (2008). Detecting genetic responses to environmental change. *Nature reviews. Genetics*, 9(6), 421–32. doi:10.1038/nrg2339
- Hui, J. H. L., Kortchagina, N., Arendt, D., Balavoine, G., & Ferrier, D. E. K. (2007). Duplication of the ribosomal gene cluster in the marine polychaete *Platynereis dumerilii* correlates with ITS polymorphism, 443–449. doi:10.1017/S002531540705566X
- Kennish, M. J. (2002). Environmental threats and environmental future of estuaries. *Environmental Conservation*, 29(1), 78–107.
- Kim, S.-J., Rodriguez-Lanetty, M., Suh, J.-H., & Song, J.-I. (2003). Emergent effects of heavy metal pollution at a population level: *Littorina brevicula* a study case. *Marine pollution bulletin*, 46(1), 74–80.
- KJERFVE, B., RIBEIRO, C. H. A., DIAS, G. T. M., FILIPPO, A. M., & QUARESMA, V. D. S. (1997). Oceanographic characteristics of an impacted coastal bay: Baía de Guanabara, Rio de Janeiro, Brazil. *Continental Shelf Research*, 17(13), 1609–1643.
- Klerks PL, Levinton JS. 1989. Rapid evolution of metal resistance in a benthic oligochaete inhabiting a metal-polluted site. *Biol Bull* 176:135–141.
- Klerks, P. L., Xie, L., & Levinton, J. S. (2011). Quantitative genetics approaches to study evolutionary processes in ecotoxicology; a perspective from research on the evolution of resistance. *Ecotoxicology (London, England)*, 20(3), 513–23. doi:10.1007/s10646-011-0640-2

- Kowalewski, M., & Sciences, G. (2000). Dead delta ' s former productivity : Two trillion shells at the mouth of the Colorado River, (12), 1059–1062.
- Laborda, P. R., Mori, G. M., & Souza, A. P. (2009). *Drosophila mediopunctata* microsatellites I: more than a hundred polymorphic loci available for genetic studies. *Conservation Genetics Resources*, 1(1), 297–307. doi:10.1007/s12686-009-9070-3
- Lana, P.C., E. G. Couto and M. V. O. Almeida. 1997. Polychaete distribution and abundance in intertidal flats of Paranaguá Bay (SE Brazil). *Bull. Mar. Sci.* 60: 433–442.
- LeBlanc, A. G. (1982). Laboratory investigation into the development of resistance of *daphnia magna* ( straus ) to environmental pollutants. *EG & G Bionomics, Enviroment Pollution Ser. A.* 0143-1471/82/0027-0309/\$02.75, 27, 309–322.
- Maguire, T. L., Saenger, P., Baverstock, P., & Henry, R. (2000). Microsatellite analysis of genetic structure in the mangrove species *Avicennia marina* (Forsk.) Vierh. (Avicenniaceae). *Molecular ecology*, 9(11), 1853–62.
- Masatotshi, N. (1975). *Molecular population genetics and Evolution*. North-holland research monographs. *Frontiers of biology*, volume 40(Library of Congress Catalog Card Number: 74-84734).
- McCairns, R. J. S., & Bernatchez, L. (2008). Landscape genetic analyses reveal cryptic population structure and putative selection gradients in a large-scale estuarine environment. *Molecular ecology*, 17(17), 3901–16. doi:10.1111/j.1365-294X.2008.03884.x
- McLeod, R., & Wing, S. (2008). Influence of an altered salinity regime on the population structure of two infaunal bivalve species. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 78(3), 529–540. doi:10.1016/j.ecss.2008.01.019
- Mclusky, D. S. (2004). *The Estuarine Ecosystem*.
- McMullin, E. R., Wood, J., & Hamm, S. (2003). Twelve microsatellites for two deep sea polychaete tubeworm species, *Lamellibrachia luymesii* and *Seepiophila jonesii*, from the Gulf of Mexico. *Molecular Ecology Notes*, 4(1), 1–4. doi:10.1046/j.1471-8286.2003.00540.x
- Miranda, R. J., Barros, F., Costa, P. C., Cruz, I., & Mariano, D. L. S. (2012). Habitats Bentônicos na Baía de Todos os Santos Habitats Bentônicos na Baía de Todos os Santos, 4(5).
- Moraes, T. B., Ferreira, J. L. R., Da Rosa, C. E., Sandrini, J. Z., Votto, A. P., Trindade, G. S., Geracitano, L. a, *et al.* (2006). Antioxidant properties of the mucus secreted by *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): a defense against environmental pro-oxidants? *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP*, 142(3-4), 293–300. doi:10.1016/j.cbpc.2005.10.017
- Muller, L. a H., Vangronsveld, J., & Colpaert, J. V. (2007). Genetic structure of *Suillus luteus* populations in heavy metal polluted and nonpolluted habitats. *Molecular ecology*, 16(22), 4728–37. doi:10.1111/j.1365-294X.2007.03549.x
- NOAA. 2004. Screening quick reference tables. *Hazmat Report*, vol. 99, no. 1, National Academy Press, Washington, pp. 601.

- Nunes, M., Coelho, J. P., Cardoso, P. G., Pereira, M. E., Duarte, a C., & Pardal, M. a. (2008). The macrobenthic community along a mercury contamination in a temperate estuarine system (Ria de Aveiro, Portugal). *The Science of the total environment*, 405(1-3), 186–94. doi:10.1016/j.scitotenv.2008.07.009
- O'Donnell, K. (1992). Ribosomal DNA internal transcribed spacers are highly divergent in the phytopathogenic ascomycete *Fusarium sambucinum* (*Gibberella pulicaris*). *Current genetics*, 22(3), 213–20. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1525873>
- Oliveira, V. M., Santos, C. S. G., Lana, P. C., & Camargo, M. G. (2010). Morphological variations caused by fixation techniques may lead to taxonomic confusion in *Laeonereis* ( Polychaeta : Nereididae ). *America*, 27(1), 146–150.
- Omena, E. P., Cec, A., & Amaral, Z. (2001). Morphometric study of the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida : Polychaeta ). *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 423–426.
- Orensanz JM, Gianuca NM (1974) Contribuição ao conhecimento dos anelídeos poliquetas do Rio Grande do Sul, Brasil. *Com Mus Ciên Pontif Univ Católica Rio Grande Sul (Porto Alegre)* 4:1-37
- Pagliosa, P., & Barbosa, F. (2006). Assessing the environment–benthic fauna coupling in protected and urban areas of southern Brazil. *Biological Conservation*, 129(3), 408–417. doi:10.1016/j.biocon.2005.11.008
- Patel, T. 1996. Bridge over troubled waters. *New Scientist* 152 (2058), 12—13.
- Paul Klerks, J. L. (1989). *Effects of Heavy Metals in a polluted aquatic Ecosystem.*
- Peijnenburg, K. T. C. a, Breeuwer, J. a J., Pierrot-Bults, A. C., & Menken, S. B. J. (2004). Phylogeography of the planktonic chaetognath *Sagitta setosa* reveals isolation in European seas. *Evolution; international journal of organic evolution*, 58(7), 1472–87.
- Ponti, M., Casselli, C., & Abbiati, M. (2010). Anthropogenic disturbance and spatial heterogeneity of macrobenthic invertebrate assemblages in coastal lagoons: the study case of Pialassa Baiona (northern Adriatic Sea). *Helgoland Marine Research*, 65(1), 25–42. doi:10.1007/s10152-010-0197-0
- Potter, I. C., Chuwen, B. M., Hoeksema, S. D., & Elliott, M. (2010). The concept of an estuary: A definition that incorporates systems which can become closed to the ocean and hypersaline. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87(3), 497–500. doi:10.1016/j.ecss.2010.01.021
- Rahel F (1981). Selection for zinc tolerance in fish: results from laboratory and wild populations. *Trans Am Fish Soc* 110:19–28
- Riginos, C., Douglas, K. E., Jin, Y., Shanahan, D. F., & Treml, E. a. (2011). Effects of geography and life history traits on genetic differentiation in benthic marine fishes. *Ecography*, 34(4), 566–575. doi:10.1111/j.1600-0587.2010.06511.x

- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J. R., & Elder, J. (2002). Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Marine pollution bulletin*, 44(7), 671–9.
- Rubin, J. A., Gordonà, C., & Amatekporà, J. K. (1999). Causes and Consequences of Mangrove Deforestation in the Volta Estuary , Ghana: Some Recommendations for Ecosystem Rehabilitation, 37, 441–449.
- Sandrini, J. Z., Lima, J. V., Regoli, F., Fattorini, D., Notti, A., Marins, L. F., & Monserrat, J. M. (2008). Antioxidant responses in the nereidid *Laeonereis acuta* (Annelida, Polychaeta) after cadmium exposure. *Ecotoxicology and environmental safety*, 70(1), 115–20. doi:10.1016/j.ecoenv.2007.03.004
- Sertse, D., Gailing, O., Eliades, N.-G., & Finkeldey, R. (2010). Anthropogenic and natural causes influencing population genetic structure of *Juniperus procera* Hochst. ex Endl. in the Ethiopian highlands. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 58(6), 849–859. doi:10.1007/s10722-010-9623-z
- Shirley MDF, Sibly RM (1999) Genetic basis of a between- environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution* 53:826–836
- Sklar, F., & Browder, J. (1998). Coastal Environmental Impacts Brought About by Alterations to Freshwater Flow in the Gulf of Mexico. *Environmental management*, 22(4), 547–62.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5 : Molecular Evolutionary Genetics Analysis Using Maximum Likelihood , Evolutionary Distance , and Maximum Parsimony Methods Research resource, 28(10), 2731–2739. doi:10.1093/molbev/msr121
- Taylor, P., & Theodorakis, C. W. (2010). Human and Ecological Risk Assessment : An Establishing Causality between Population Genetic Alterations and Environmental Contamination in Aquatic Organisms, (April 2013), 37–41.
- V. Hatje a,\*, F. Barros b, D.G. Figueiredo a, V.L.C.S. Santos a, M. C. P.-A. b. (2006). Trace metal contamination and benthic assemblages in Subae estuarine system, Brazil. *Marine pollution bulletin*, 52(8), 978–82. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.04.013
- Vanessa Hatje, J. B. de A. (2009). Baía de Todos os Santos - Aspectos Oceanográficos.
- Ventura-Lima, J., Sandrini, J. Z., Cravo, M. F., Piedras, F. R., Moraes, T. B., Fattorini, D., Notti, A., *et al.* (2007). Toxicological responses in *Laeonereis acuta* (annelida, polychaeta) after arsenic exposure. *Environment international*, 33(4), 559–64. doi:10.1016/j.envint.2006.09.016
- Ward, T. J., & Robinson, W. E. (2005). Evolution of cadmium resistance in *Daphnia magna*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 24(9), 2341–9. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16193764>
- Weis, J. S., Skurnick, J., & Weis, P. (2004). Studies of a contaminated brackish marsh in the Hackensack Meadowlands of Northeastern New Jersey: benthic communities and metal contamination. *Marine pollution bulletin*, 49(11-12), 1025–35. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.07.006

- White, G. F. 1988. 'The environmental effects of the high dam at Aswan', *Environment*, 30, 4-11, 34-40.
- Whitehead, A., Anderson, S. L., Kuivila, K. M., Roach, J. L. & May, B. (2003). Genetic variation among interconnected populations of *Catostomus occidentalis*: implications for distinguishing impacts of contaminants from biogeographical structuring. *Mol. Ecol.* 12, 2817–2833.
- Xie, L., & Klerks, P. L. (2003). Responses to selection for cadmium resistance in the least killifish, *Heterandria formosa*. *Environmental toxicology and chemistry / SETAC*, 22(2), 313–20.
- Yasuhara, M., & Yamazaki, H. (2005). The impact of 150 years of anthropogenic pollution on the shallow marine ostracode fauna, Osaka Bay, Japan. *Marine Micropaleontology*, 55(1-2), 63–74. doi:10.1016/j.marmicro.2005.02.005
- Yüksek, A., Okuş, E., Yılmaz, I. N., Aslan-Yılmaz, A., & Taş, S. (2006). Changes in biodiversity of the extremely polluted Golden Horn Estuary following the improvements in water quality. *Marine pollution bulletin*, 52(10), 1209–18. doi:10.1016/j.marpolbul.2006.02.006