

**UFRB
CCAAB**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DE BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E BIOLÓGICAS
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Patrícia Reis de Oliveira Silva

**Contribuição citogenética e molecular para a
caracterização da peracuca (*Kalyptodoras bahiensis*:
Siluriforme), coletada no médio e baixo Paraguaçu**

**Cruz das Almas
2012**

Patrícia Reis de Oliveira Silva

**Contribuição citogenética e molecular para a
caracterização da peracuca (*Kalyptodoras bahiensis*:
Siluriforme), coletada no médio e baixo Paraguaçu**

Monografia solicitada pela disciplina TCC
II . Discente Patrícia Reis de Oliveira
Silva, orientado por Soraia Aguiar Barreto
Fonteles.

**Cruz das Almas- Bahia
2012**

Folha de Aprovação

Contribuição citogenética e molecular para a caracterização da peracuca (*Kalyptodoras bahiensis*: Siluriforme), coletada no médio e baixo Paraguaçu

Monografia Apresentada a fim de obter o título de graduada em
Bacharel de Biologia

elaborada por
Patrícia Reis de Oliveira Silva

BANCA EXAMINADORA


Orientadora Profa.Dra. Soraia Aguiar Barreto Fonteles
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Profa. Dra. Maria Vanderly Andréa
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia


Prof.Dr. Ricardo Franco Cunha Moreira
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia

Cruz das Almas
2012

Dedico este Trabalho e meus
sucessos a todos aqueles que me
ensinaram:

Caminhar, Amar, Sorrir e
principalmente Lutar sempre
com justiça e honestidade.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me concedido força e serenidade para trilhar este caminho mesmo diante de muitos obstáculos.

A minha família pais e irmãos em especial a minha irmã e companheira Mara, por ter estado comigo em momentos muito difíceis.

Aos Meus amigos Índira, Daiane, Flavio, Jamile, Kaliane, Juliana e Edinaldo, Felipe por todo carinho, amor, confiança de todos estes anos.

A Alison Eduardo e Luiz Gustavo amigos e companheiros de Laboratório por ter me ajudado no desenvolvimento desta pesquisa e pela amizade a mim concedida.

As minhas colegas de residência Thayane, Erika e Caroline pela amizade e paciência.

A minha orientadora Profa. Dra. Soraia Aguiar Barreto Fonteles por todos os ensinamentos.

Agradeço a Universidade Federal do Recôncavo da Bahia pela oportunidade.

A todos os colegas do Laboratório de Ictiogenética situado no Núcleo de Estudos em Pesca e Aquicultura (NEPA).

Agradeço a todos que participaram desse processo direta ou indiretamente.

*Necessito da força dos ventos, da
calma das águas e da coragem de
uma borboleta ao sofrer sua
primeira metamorfose e
conseguir voar.*

Patrícia Reis

RESUMO

O rio Paraguaçu, é o único exclusivamente baiano, muito importante economicamente por abastecer a metrópole com pescado, e por dar subsídio às muitas famílias ribeirinhas, que dependem da pesca como meio de sobrevivência. Várias espécies possuem grande interesse comercial na região, dentre elas *Kalyptodoras bahiensis*, um bagre da família Doradidae pertencente à ordem Siluriforme conhecido popularmente como “peracuca”. Sua morfologia é peculiar podendo alcançar no máximo 80 cm de comprimento. A espécie é endêmica da bacia do Paraguaçu, descrita principalmente no baixo curso do rio. Encontra-se atualmente, ameaçada de extinção, em decorrência das muitas construções de barramentos na região, além da pesca predatória. Fazendo-se necessários estudos no sentido de evitar o desaparecimento desta espécie e a redução da sua variabilidade genética. Este trabalho tem como propósito criar um banco de DNA preservado “*in vitro*” e caracterizar através de marcadores genético-moleculares e citogenéticos a espécie *Kalyptodoras bahiensis*. Com essas informações será possível proceder o monitoramento genético dos estoques naturais que se encontram sob pressão de exploração comercial. Os resultados desta pesquisa revelaram que a espécie ainda pode ser encontrada nas porções do médio e baixo Paraguaçu, que apresentou um número cariotípico igual a 58 cromossomos sendo 38 metacêntricos, 8 submetacêntrico, 8 subtelocêntricos e 4 acrocêntricos além do par sexual, mostrando também que a mesma apresentou pouca variação em seus padrões genéticos intra-específicos estudados.

Palavra chave: ENDÊMICA, EXTINÇÃO, NEOTROPICAL

ABSTRACT

The Paraguaçu river is the only exclusively from Bahia. It's economically very important for supplying with fish the metropolis and give subsidy for many families that depend on fishing as living. Several species have great commercial interest in the region, one of them is *Kalyptodoras bahiensis*, a catfish from Doradidae family and Siluriforme order, known as "peracuca." It's morphology is peculiar and it may reach up to 80 cm long. This species is endemic of the Paraguaçu watershed, mostly in the lower course of the Paraguaçu river. It's currently listed as an endangered species due of overfishing and constructions of dams in the region. This work aims to create a DNA database maintained "in vitro" and to recognize cytogenetic and molecular patterns of *Kalyptodoras bahiensis* species, enabling genetic monitoring of wild stocks that are under pressure from environmental exploration. This research revealed that it's still possible to find the peracuca in the middle and lower portions of Paraguaçu River, which presents a karyotypic number equal to 58 chromosomes, among which 38 metacentric, 8 submetacentric, 8 subtelocentric and 4 acrocentric. In addition the pair of sex chromosome, showing that this species presented little variation in their intra-specific genetic patterns.

Keyword: ENDÊMICA, EXTINÇÃO, NEOTROPICAL.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Mapa do rio Paraguaçu localizado no estado da Bahia..... | 3 |
| Figura 2. Espécie <i>Kalyptodoras bahiensis</i> | 7 |
| Figura 3. Posição Taxonomica da <i>Kalyptodoras bahiensis</i> | 8 |
| Figura 4. Mapa indicando os principais pontos de coleta..... | 14 |
| Figura 5. Imagens dos pontos de coleta..... | 15 |
| Figura 6. Cromossomos metafásicos da espécie <i>Kalyptodoras bahiensis</i> | 20 |
| Figura 7: Cariótipo de <i>Kalyptodoras bahiensis</i> submetidos a coloração convencional com Giemsa..... | 21 |
| Fig 8. Produtos de amplificação gerados pelo <i>primer</i> (AAGC), na espécie <i>Kalyptodoras bahiensis</i> | 23 |
| Fig 9. Produtos de amplificação gerados pelo <i>primer</i> (TAGG), na espécie <i>Kalyptodoras bahiensis</i> | 23 |

APENDICE

| | |
|---|----|
| APENDICE 1. Número de animais e respectivos pontos de coleta..... | 32 |
|---|----|

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| RESUMO | vi |
| ABSTRACT | vii |
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| 1. INTRODUÇÃO | 1 |
| 2. REVISÃO DA LITERATURA | 3 |
| 2.1. Área De Estudo. | 3 |
| 2.2. Ordem Siluriforme | 5 |
| 2.3 Família Doradidae e Espécie <i>Kalyptodoras bahiensis</i> | 6 |
| 2.4 Estudos Genéticos | 8 |
| 2.5. Análise Citogenética e Genética Molecular | 9 |
| 2.5.1. Análise Citogenética..... | 9 |
| 2.5.2. Análise Genética Molecular..... | 11 |
| 3. JUSTIFICATIVA | 12 |
| 4. OBJETIVOS | 13 |
| 4.1 Objetivo Geral..... | 13 |
| 4.2 Objetivos Específicos..... | 13 |
| 5. MATERIAIS E MÉTODOS | 14 |
| 5.1 Materiais..... | 14 |
| 5.1.1 Espécie Analisada..... | 14 |
| 5.1.2 Locais de Coleta..... | 14 |
| 5.2 Métodos | 15 |
| 5.2.1 Citogenética..... | 15 |
| 5.2.1.1 <i>Obtenção dos cromossomos mitóticos</i> | 15 |
| 5.2.1.2 <i>Análise Cariotípica</i> | 17 |
| 5.2.1.3 <i>Montagem Do Cariótipo</i> | 18 |
| 5.3 Molecular | 18 |
| 6. RESULTADO E DISCUSSÃO | 19 |
| 6.1 Resultados Citogenéticos | 19 |
| 6.2 Genética Molecular | 21 |
| 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS | 24 |
| REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICAS | |
| APENDICE | 32 |

1. INTRODUÇÃO

A região Neotropical possui uma ictiofauna dulcícola considerada uma das mais ricas e diversificadas do planeta, possuindo duas ordens de peixes bastante representativas em número de espécies, os Characiformes e os Siluriformes (MEDRADO, 2009). Os peixes representam um dos grupos mais diversificado e interessante para estudos de variabilidade genética e de evolução entre os vertebrados (NELSON, 1984). A grande diversidade de espécies para este grupo é explicada por ser um grupo de animais primitivos altamente heterogêneos, submetidos a processos evolutivos em diferentes direções (CASTRO, 2009). Essa grande diversidade de peixes, esta atrelada ao fato desta região possuir ricas redes hidrográficas, com biomas altamente diversificados.

A rede hidrográfica brasileira é bastante complexa, diversificada e possuidora de grandes riquezas, constituída por um conjunto de bacias e regiões hidrográficas com características de ecossistemas bastante diferenciados, o que propicia o desenvolvimento de múltiplas espécies vivas da flora e da fauna aquática. Esse conjunto de ecossistemas aquáticos comporta, parte da rica biodiversidade brasileira (ANA, 2009-2010). Nesta rede hidrográfica encontram-se inseridos diversos rios como o rio Paraguaçu que esta totalmente localizado no território do Nordeste baiano, e em uma bacia neotropical, a Bacia do Paraguaçu. Sendo este muito importante para a região, pois abastece com o pescado, boa parte da metrópole e região metropolitana. Este rio é possuidor de uma ictiofauna muito extensa e diversificada que, juntamente com o turismo local proporciona avanços econômicos para os ribeirinhos. Apresenta também grande importância ecológica, por possuir espécies endêmicas, como *Kalyptodoras bahiensis*, popularmente conhecida como peracuca.

O endemismo ictiológico do nordeste brasileiro foi reconhecido por Vari (1988), que definiu uma região denominada “Northeastern”, e por Menezes, (1996), que incluiu os rios do nordeste como parte de “Northeastern Small Drainages”. Entretanto, determinar diversidade, endemismo e padrões de distribuição com base em critérios objetivos, é uma tarefa comprometida pela ausência de informações. A fauna atual encontra-se extremamente reduzida em relação à que existia no passado, devido aos processos históricos, às alterações climáticas, e aos fatores

antrópicos, que possivelmente alteraram sua composição original, com extinções locais ou generalizadas (VARI, 1988).

Segundo Sá et al., (2003) a ictiofauna vem passando por um processo rápido de extinção por causa da devastação de ambientes aquáticos, em especial, córregos e riachos das cabeceiras de rios maiores. A extinção de espécies de peixes endêmicas, que sofrem grande pressão de pesca, está aumentando na mesma proporção da destruição dos ecossistemas aquáticos.

Para Agostinho (2005), as causas para a perda direta da biodiversidade em ecossistemas aquáticos continentais brasileiros têm por fatores: poluição, eutrofização, assoreamento, construção de barragens e controle de cheias, pesca e introdução de espécies.

Diante da problemática do desaparecimento de espécies, muitos estudos estão sendo desenvolvidos com o propósito de conhecer e desenvolver projetos de conservação e manejo nas regiões consideradas de riscos. Estudos genéticos com a utilização de marcadores moleculares e ferramentas citogenéticas são considerados instrumentos importantes para a realização desses trabalhos, pois auxiliam em projetos de conservação do patrimônio genéticos destes indivíduos.

O Estudo em genética de peixes é considerada uma área em ampla expansão no Brasil. A considerável diversidade de espécies que existe, aliada aos avanços recentes nas pesquisas genômicas, tem permitido que modelos de estudo utilizando os peixes venham sendo cada vez mais freqüentes (MARTINS, 2009).

A aplicação da genética em estudos de pesquisa básica, no que se refere a este grupo de vertebrados, ocorre mediante uma soma significativa de trabalhos que começam a aparecer envolvendo análise aplicada na área da biologia da conservação. Os estudos em peixes tem se delineado através da utilização de mapeamento de ligação, mapeamento físico cromossômico, mapas de restrição enzimática e mapas de seqüenciamento completo de genomas (MARTINS, 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Área de Estudo.

A Bacia do Paraguaçu é conhecida por ser uma das mais estratégicas do Estado da Bahia estando localizada na região central do Estado, entre as coordenadas 12°40' e 13°40'S e 41°15' e 41°40'O. Esta bacia é considerada de grande importância para o sistema fluvial, estando seu território inteiramente localizado na Bahia, onde drena cerca de 56.000km². Seu comprimento é de aproximadamente 360km e largura média em torno de 200km possuindo uma forma retangular alongada, com escoamento no sentido geral oeste/leste (SENTGES *et al*, 2009-2011).

Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010), a maioria do território encontra-se situada na região da Chapada Diamantina. A Bacia atualmente abrange partes de cinco municípios, alguns deles considerados de importância histórica, como Mucugê e Andaraí, criados no período áureo da exploração de diamante.

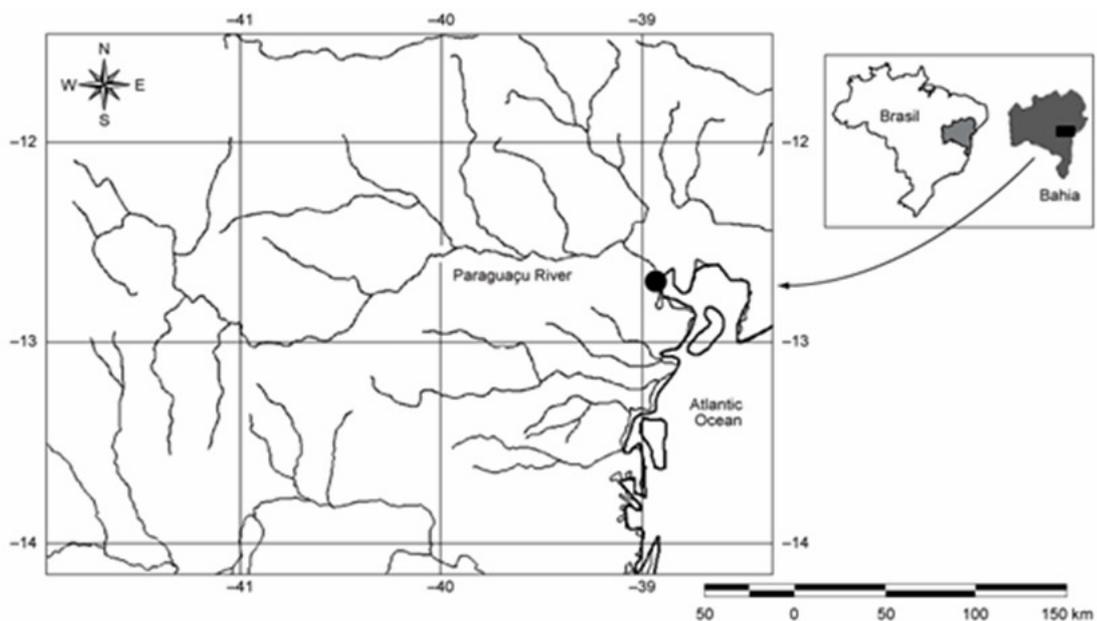


Figura 1. Mapa do Rio Paraguaçu localizado no Estado da Bahia. Fonte: Santos *et al*, (2009).

O rio Paraguaçu é o principal rio da Bacia. Sendo este o maior rio exclusivamente baiano. Possuidor de nascentes diamantíferas, com margens férteis, apropriado para a pesca além de ser navegável no seu baixo curso. Está localizado na região centro-leste do estado da Bahia, fazendo limite a leste com a bacia do Recôncavo Norte e com a Bahia de Todos os Santos. Possui sua nascente nas proximidades da localidade de Farinha molhada no município Barra da Estiva, e toma a direção norte, atravessando os municípios de Ibicoara, Mucugê e Andaraí; nesse trecho, recebe os rios Riachão (Ibicoara), Rio Preto (Mucugê) e Bahiano (Andaraí). No seu alto curso estão compreendidos 22 municípios distribuídos em uma área de 12.860 Km² dos quais 9,8% é ocupado pelo Parque Nacional da Chapada Diamantina (SOUZA, 2011). A vegetação ao longo do Rio Paraguaçu apresenta cenário bastante diversificado que é predominante em grande parte da região central (IBGE, 2010).

Segundo Palma (2003), na Bacia do Paraguaçu foi construído barragens utilizadas para abastecimento de água, a única fonte de água para muitas regiões atingidas pelas grandes estiagens. Dentre as barragens construídas, destaca-se a barragem Pedra do Cavalo, com capacidade de acumulação de 4.100 milhões de metros cúbicos de água, que abastece parte da região metropolitana de Salvador. No entanto estas construções aliadas a diversos fatores vem provocando muitos problemas de ordem ambiental que ocasionam o desaparecimento de muitas espécies de fauna e da flora local.

Segundo o IBGE, (2010) os recursos naturais da região da Bacia do Alto Paraguaçu, nos últimos anos têm passado por uma indiscriminada exploração, em geral sem conhecimento prévio das suas potencialidades, o que tem provocado grandes prejuízos ao meio ambiente. É preciso que se conheçam as potencialidades e limitações dessa área, permitindo que se estabeleçam perspectivas de utilização, planos de manejo, conservação dos recursos e restrições ao uso dos recursos.

2.2. Ordem Siluriforme

Segundo Reis *et al.*,(2003) a região Neotropical possui uma ictiofauna grandiosa e extremamente variada, possuindo aproximadamente 6.025 espécies, distribuídas em 71 famílias. Destas, 1.150 espécies ainda não foram descritas taxonomicamente.

De acordo com Reis, (2003) a ordem Siluriforme é considerada o segundo maior grupo na região Neotropical, com grande diversidade de formas e grande distribuição. Os peixes dessa ordem são caracterizados por não possuírem escamas, cobertos por pele nua ou placas ósseas; apresentam barbilhões ao redor da boca, as nadadeiras são geralmente providas de espinhos com serras nas margens. Muitas espécies apresentam corpo achatado, dorso-ventralmente, adaptado a vida no fundo. Grande parte das espécies possui hábitos noturnos ou crepusculares.

Os Siluriformes frequentemente possuem um acúleo forte e pungente a frente do primeiro raio das nadadeiras dorsais e peitorais, capazes de infringir graves ferimentos e em algumas espécies, injetar um veneno produzido por células glandulares localizadas no tecido epidérmico que cobre estes acúleos (ORTI, 2008). O corpo desprovido de escamas pode ser revestido por uma pele espessa, popularmente conhecida como couro, podendo também possuir o corpo coberto total ou parcialmente com placas ósseas; geralmente possuem três pares de barbilhões, que possivelmente são usados para localizar alimentos no fundo e orientar sua natação (ALEXANDER, 1965; PAXTON E ESCHMEYER, 1998, *apud* ORTIZ, 2008).

Os peixes da ordem Siluriforme, conhecidos como bagres, são muito importantes tanto para a pesca comercial como de subsistência, e vem sendo assim explorados há várias décadas (FERREIRA, 2007). Apesar da importância científica e econômica dos Siluriformes, o grupo apresenta diversos problemas sistemáticos e taxonômicos. O estudo de Pinna (1998) sobre a sistemática de representantes de todos os principais grupos dessa ordem indicou, com base em dados morfológicos, que algumas famílias formam agrupamentos polifiléticos enquanto vários grupos tradicionais tiveram seu monofilétismo confirmado. Segundo Sullivan *et al.*, (2006), em um recente estudo dessa mesma ordem, com base em dados moleculares,

recuperam alguns dos grupos de Pinna (1998), indicando novos grupos e apresentando uma nova proposta de relacionamento entre estes.

2.3 Família Doradidae e Espécie *Kalyptodoras bahiensis*

Os membros da família Doradidae são facilmente reconhecidos pela placa nugal que precede a nadadeira dorsal e pelas ossificações bem desenvolvidas na linha lateral que formam um apêndice espinhoso. Tipicamente, também possuem barbelas (exceto a nasal), um nadadeira adiposa, e 4-6 raios na nadadeira dorsal com um espinho no raio anterior. Estes peixes são algumas vezes chamados de "gatos-peixes-falantes" por causa de sua habilidade em produzir som movendo suas nadadeiras peitorais ou vibrações com sua bexiga natatória. Para a família, somente duas espécies de doradidae foram descritas nas bacias do costa leste brasileira: *Wertheimera maculata* no rio Jequitinhonha e rio Pardo, e *Kalyptodoras bahiensis* do rio Paraguaçu (ALVES *et al*, 2008).

Os peixes da família Doradidae pertencem à ordem siluriforme e correspondem a uma família de bagres de água doce, endêmica da América do Sul, e podem ser separados em dois grupos, segundo a presença de barbilhão maxilar simples ou ramificado. Estes animais são reconhecidos como um grupo monofilético, cujas relações intra-genéricas são pouco definidas (ORTIZ, 2008).

Os peixes Doradidae possuem um complexo produtor de som, característica compartilhada com algumas outras famílias de Siluriformes mesmo guardando com estas diferentes níveis de relações de parentesco. As análises das relações de parentesco entre as diferentes famílias de Siluriformes, com entre os diferentes gêneros e espécies de uma mesma família, em geral tem por base características osteológicas e de partes moles, além de dados moleculares (Ortiz, 2008).

Os peixes da família Doradidae são onívoros, sua boca encontra-se localizada inferiormente e não possuem dentes, seu focinho é alongado e tem a função de capturar os alimentos: larvas de insetos e outros invertebrados, inclusive camarões e moluscos, que vivem em meio aos detritos do fundo de rios e lagos. As espécies desta família podem ser encontradas em vários habitats, incluindo matas inundadas, lagos de várzea e canais quando os cardumes sobem os rios (Ribeiro, M *et al* 2008-2009).

A espécie *Kalyptodoras bahiensis* é um bagre Doradídeo, conhecido popularmente como “peracuca”, sua morfologia é peculiar, possuindo uma fileira de placas ósseas laterais ao longo do corpo com 4-6 raios macios e 3 pares de barbilhões, podendo alcançar no máximo 80 cm de comprimento descrito principalmente, para o baixo curso do rio Paraguaçu, e encontra-se atualmente relacionado como espécie ameaçada de extinção de acordo com a instrução normativa de nº 5 do IBAMA, de 21 de maio de 2004. Não se sabe muito sobre esta espécie, ela foi descrita primeiramente a partir de exemplares coletados durante a pré-construção da barragem de Pedra do Cavalo no baixo curso do rio Paraguaçu e desde então não tem sido mais registrada à jusante da barragem e suas populações vêm apresentando uma diminuição de seus estoques.



Figura 2 : *Kalyptodoras bahiensis*

De acordo com Livro Vermelho, (2008, MMA e Fundação Biodiversitas) *Kalyptodoras bahiensis* é uma espécie relativamente rara, que só pode ser encontrada no rio Paraguaçu, na represa Pedra do Cavalo, esta espécie deve estar extinta, pois é comum nos membros de médio porte da família Doradidae a preferência por ambientes correntosos. Por esse motivo, o represamento de alguns trechos do rio pode causar sua extinção. O trecho médio do rio Paraguaçu apresenta-se relativamente bem preservado. A poluição das águas e a destruição da vegetação ciliar podem ter efeitos negativos na população desta espécie. Outra

preocupação é a introdução do tucunaré (*Cichla sp.*), e da tilápia (*Oreochromis niloticus*), espécies alóctones atualmente disseminadas na bacia do rio Paraguaçu que competem por espaço e alimento com as espécies locais.

A posição taxonômica dessa espécie é a seguinte:

Classe Actinopterygii

Ordem Siluriforme

Subordem Siluroidei

Família Doradidae

Gênero *Kalyptodoras*

Espécie *Kalyptodoras bahiensis*



Figura 3: *Kalyptodoras bahiensis*

Fonte: Baena, 2010

2.4 Estudos Genéticos

Segundo Martins *et al.*, (2002) até a década de 1970 o DNA era uma molécula de difícil análise bioquímica. No entanto sabe-se atualmente graças à evolução das tecnologias de manipulação do DNA, que ela é uma das moléculas mais fáceis de ser estudadas. Regiões específicas do genoma podem ser, com facilidades isoladas, propagadas em número inimaginável de vezes, além disso, sua sequência nucleotídica pode ser conhecida em questão de horas. Isso graças ao desenvolvimento de duas tecnologias em particular, a restrição enzimática e a reação em cadeia da polimerase (PCR, do Inglês Polymerase Chain Reaction) que possibilitou avanços significativos na manipulação do material genético. Estas técnicas estão sendo amplamente usadas em organismos aquáticos.

A extensa diversidade dos recursos genéticos aquáticos que pode ser entendida pelo conjunto da diversidade de espécies e pela própria diversidade genética inter e intra-específicas são componentes importantes da biodiversidade como um todo (HILSDORF *et al.*, 2006). No entanto apesar desta grande diversidade e de sua importância, de acordo com Brasil (2004), a hidrografia brasileira que é detentora da mais rica ictiofauna da região Neotropical, relaciona 135 espécies de peixes de água doce em estado de vulnerabilidade ou em risco de extinção relacionado na “Lista das Espécies Ameaçadas” produzida pelo Ministério do Meio Ambiente.

Com o choque de maiores densidades humanas, industrialização, mudanças e interferência nos habitats de água doce e outras atividades provocadas pelo homem, vem colocando em risco a estabilidade dos ambientes naturais em todo o mundo (GARCIA *et al.*, 2005).

Diante dessa grande problemática que veem ocorrendo com a ictiofauna neotropical, diversos estudos genéticos estão sendo desenvolvidos no sentido de conhecer o potencial, genético destas espécies. Segundo Benites, (2008) o alargamento de pesquisas sob a óptica biológica, ecológica e da variabilidade genética das populações são de grande importância por poder proporcionar a sustentabilidade destas espécies e dos ecossistemas estudados.

De acordo com Torres *et al.*, (2004), métodos realizados em pesquisas genéticas de populações e de sistemática molecular, tem concebido valiosas contribuições ao entendimento da fauna de peixes que auxiliam de forma muito eficaz na resolução de problemas de ordem ecológica ligadas a preservação de ambientes naturais.

2.5. Análise Citogenética e Genética Molecular

2.5.1. Análise Citogenética

Segundo Tedesco (2006), o reconhecimento do cariótipo é o processo pelo qual os cromossomos, em uma célula preparada adequadamente, são identificados e alocados para uma determinada classe, a qual presumivelmente pertence. Para a análise dos cariótipos é necessário que as células estejam em metáfase onde os

cromossomos encontram-se condensados, para isso utiliza-se tecidos que se encontram em constante divisão celular.

A citogenética de peixes apresenta duas fases distintas, sendo a primeira quando as preparações cromossômicas são realizadas por secções de tecidos e a segunda quando as preparações passam a ser feitas a partir de células isoladas, através de suspensões celulares (GALETTI-JUNIOR *et al* , 1981). Os peixes constituem um dos grupos de animais de maior variação cariotípica, com referência de $2n = 16$ até $2n = 250$ cromossomos. Na ictiofauna Neotropical, a maior concentração de informações cromossômicas encontra-se nos Characiformes e Siluriformes, (LACERDA, 2005). Já de acordo com Garcia:

Os peixes neotropicais de água doce apresentam grande diversidade cariotípica. Até o presente momento, o menor número diplóide relatado corresponde à $2n=20$ cromossomos para *Peterolebias longipinnis*, e o maior à $2n=134$ cromossomos para *Corydoras aeneus* (Garcia *et al* 2005.; p 1)

Segundo Lacerda, (2005) atualmente pode-se observar um aumento nas análises cromossômicas em populações de peixes, tendo se tornado cada vez mais frequentes relatos de trabalhos em áreas geográficas relativamente amplas. Estes estudos ultrapassam um estágio de simples identificação do número e da morfologia dos cromossomos abrangendo uma abordagem populacional, onde são analisados diferentes tipos de polimorfismos e modos de diversificação cromossômica. A variabilidade cariotípica verificada nesses estudos evidência a necessidade de uma análise sistemática dos grupos naturais, levando em conta sua distribuição geográfica e utilizando-se ao máximo as facilidades das técnicas já desenvolvidas.

O avanço das técnicas é proporcional a qualidade das preparações cromossômicas que permitiram um aumento sensível do número de espécies estudadas e a descrição das suas características cromossômicas(FELDBERG, PORTO & BERTOLLO, 1992).

Segundo Vieira *et al.*, (2010) a citogenética de peixes, possui grande importância para estudos, com a taxonomia. A citotaxonomia tem constituído um dos objetivos da citogenética para elucidação a real história evolutiva dos organismos. Nas últimas décadas a citogenética teve um impulso significativo no seu espectro de atuação mostrando-se uma ciência dinâmica que se adapta às necessidades e às novas tecnologias, mantendo-se sempre como uma área em destaque na genética. Em especial para o grupo dos peixes a citogenética, tem solucionado diversos

problemas já levantados, e se propõe a solucionar outros que surgem a todo o momento, há muito ainda a ser investigado no campo dos cromossomos.

Devido ao grande número de espécies e por apresentarem características biológicas peculiares, além de ocuparem uma posição central na evolução dos vertebrados, os peixes constituem um dos melhores grupos para estudos genéticos, citogenéticos e evolutivos (TOLEDO-FILHO, 1978). Até o final dos anos 70, pouco se conhecia sobre as características citogenéticas da ictiofauna neotropical. Os estudos citogenéticos nesse grupo de peixes incluem dados como: informações sobre o padrão de distribuição da heterocromatina constitutiva, número e localização das regiões organizadoras de nucléolo (RONs), bem como, identificação de cromossomos sexuais diferenciados e presença de cromossomos supernumerários, do tipo cromossomos B.

No decorrer de seu curso o rio Paraguaçu apresenta uma ictiofauna diversificada e pouco descrita na literatura, além das muitas espécies ameaçadas de extinção. Os estudos da genética de populações de peixes têm contribuído de forma relevante para o esclarecimento dos questionamentos relacionadas as estruturas das populações selvagens ou cultivadas, de diversas espécies, desde sua origem a características peculiares, tais como sucesso reprodutivo, taxas de divergência genéticas entre populações, migração, tamanho da população, seleção natural. (BORBA *et al.*, 2009).

Desde o início da década de 1990, programas de conservação de recursos pesqueiros, tem utilizado como ferramenta marcadores citogenéticos na detecção de bancos selvagem, considerando-se a importancia ecologica do grupo, suas características biológicas, a grande diversidade da ictiofauna neotropical e a importância da pesca em diversas regiões do mundo, (TOLEDO-FILHO *et al.*, 1992).

2.5.2. Análise Genético Molecular

Análises moleculares estão sendo usadas com sucesso no intuito de caracterizar a ictiofauna neotropical. Trata-se de um importante instrumento que oferece informações úteis para o direcionamento de programas de melhoramento e manejo de bancos genéticos e conseqüente formação de bancos de DNA preservado das espécies.

Desde a década de 60 marcadores morfológicos e protéicos estão sendo utilizados em pesquisas para analisar a variabilidade populacional em peixes (HILSDORF, 2002). Com o desenvolvimento das técnicas da biologia molecular, diversos marcadores vêm sendo localizados em regiões do genoma nuclear e mitocondrial (HILSDORF, 2002).

Segundo Hilsdorf (2002) os marcadores moleculares tornaram-se muito importantes no estudo e avaliação genética de populações de peixes selvagens, podendo ser usados para: estabelecimento da filogenia da espécie e da população; determinação da estrutura populacional de uma espécie; identificação de linhagens; Variação genética em populações selvagens e cultivadas; determinação do impacto genético da introdução de peixes cultivados em populações naturais, entre outras.

Diversas técnicas são hoje utilizadas na identificação de marcadores de DNA, entre elas pode-se citar: ISSR ou SPAR-PCR (Single Primer Amplification Reaction-Polymerase Chain Reaction), RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism), RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) e VNTRs (Variable Number Tandem Repeat Loci) (HILSDORF 2002).

Técnicas moleculares proporcionam a criação e caracterização de bancos genéticos selvagens (*in situ*), bancos genéticos preservados (*in vitro*), e bancos genéticos cultivados (*ex situ*). Sendo que para o presente trabalho será dado enfoque aos bancos selvagens e preservado. Os dados genéticos vêm dando considerável enfoque a ictiofauna neotropical, diante de sua grande diversidade, onde tem sido objeto de várias publicações nos últimos tempos (ver por ex. Calgagnotto *et al.*; 2001; Fernandes - Matioli e Almeida Toledo, 2001; Moysés *et al.*, 2005); Fonteles-Santos *et al.*, 2005 Farias e Hrbek, 2008; Alves-Costa *et al.*,2008; Sofia, *et al.*,2008; Ortí, *et al.*,2008; Barbosa, *et al.*,2008) principalmente diante do acentuado declínio de população de peixes neotropicais em diferentes sistemas hidrográficos brasileiros (GODOY, 1975; AZEVEDO 1972; BRAGA, 1982; MENDONÇA & MELO, 1994), desta forma a conservação se faz urgente.

3. JUSTIFICATIVA

O desenvolvimento deste trabalho justifica-se por envolver uma região de grande importância econômica e ecológica. Será usado como objeto de pesquisa uma espécie endêmica do rio Paraguaçu que encontra-se ameaçada de extinção.

Com os resultados esperados, diversas, outras ações poderão ser desenvolvidas para que os estoques naturais desta espécie possam ser conservados nos poucos locais onde se encontram.

Além do que já foi exposto, este projeto possui um caráter pioneiro para a espécie *Kalyptodoras bahiensis*. Com os dados obtidos será possível conhecer a distribuição geográfica da espécie na região do Paraguaçu, como também inferir acerca da variabilidade genética intra e interpopulacional, podendo posteriormente estabelecer estudos de conservação e administração dos estoques pesqueiros locais.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Caracterização de *Kalyptodoras bahiensis* popularmente conhecida como peracuca, através de técnicas citogenéticas e genético-moleculares.

4.2 Objetivos Específicos

- ✓ Formação um banco genético, em forma de DNA preservado, de *Kalyptodoras bahiensis*;
- ✓ Caracterização *Kalyptodoras bahiensis* através de marcadores moleculares;
- ✓ Caracterização *Kalyptodoras bahiensis*, utilizando as técnicas citogenéticas convencionais;
- ✓ Conhecer a distribuição geográfica de *Kalyptodoras bahiensis*;
- ✓ Fornecer dados para estudos de conservação e administração dos estoques pesqueiros locais;

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Materiais

5.1.1 Espécie Analisada

Foram coletados e analisados exemplares fêmeas e machos de *Kalyptodoras bahiensis* pertencente a família Doradidae.

5.1.2 Locais de Coleta

Os exemplares de *Kalyptodoras bahiensis* foram coletados na porção do médio e baixo Paraguaçu pertencente a Bacia do Paraguaçu(Figura 4).

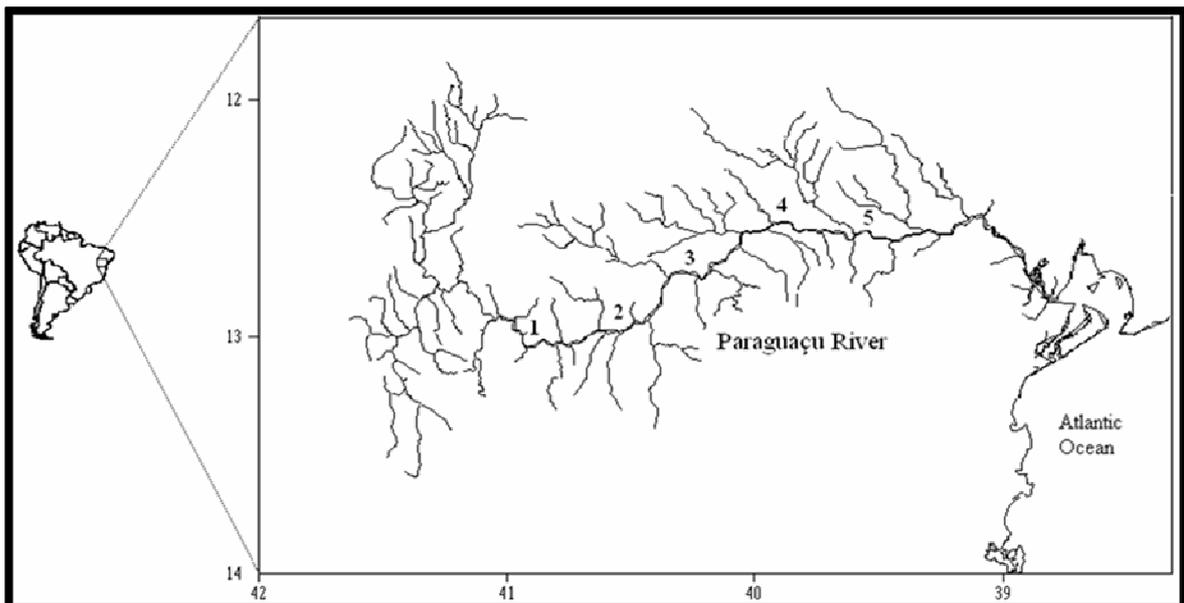


Figura 4: Mapa indicando os principais pontos de coleta. 1:Fazenda Deus Andou, 2: Rafael Jambeiro, 3:Bandeira de Melo, 4:Fazenda Palmas,5: Fazenda Touros.



(a) Ponto 2 - Rafael Jambeiro



(b) Ponto 3 de coleta Bandeira de Melo

Figura 5. Imagens dos pontos de Coleta. (a) Ponto de coleta Bandeira de Melo e (b) Rafael Jambeiro.

Foram coletados 121 exemplares de *Kalyptodoras bahiensis* em 5 estações de amostragem. As amostragens foram realizadas durante o período de março de 2008 a novembro de 2011. Após as coletas, o material para as análises citogenéticas e moleculares foi trazido para o Laboratório de Ictiogenética da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (UFRB). Em cada ponto de coleta foi feito o georreferenciamento através de GPS modelo GARMIM e Trex Legend.

5.2 Métodos

5.2.1 Citogenética

5.2.1.1 Obtenção dos cromossomos mitóticos

Para as análises citogenéticas foram coletados exemplares em 10 expedições, sendo todas nas porções do médio e baixo Paraguaçu.

O protocolo para obtenção de placas metafásicas foi realizado através da técnica descrita por Almeida-Toledo *et al.*, (1993). Para a obtenção das células mitóticas foi retirado uma porção de rim, órgão com função hematopoiética apresentando células em constante divisão.

Para obtenção de um maior número de figuras mitóticas nas preparações, foi utilizada uma técnica que consiste em injetar previamente nos animais, uma solução de fermento biológico. Essa técnica foi descrita inicialmente por Cole & Leavens (1971) para anfíbios e répteis, foi utilizada por Lee & Elder (1980) para pequenos mamíferos e por Oliveira *et al.*, (1988) para peixes. O procedimento utilizado foi o seguinte:

1. Preparar uma solução de fermento biológico (Fleischmann) na seguinte proporção: 0,5 g de fermento, 0,5 g de açúcar e 7 ml de água destilada.
2. Incubar a solução em banho-maria a 37°C por cerca de 20 minutos.
3. Injetar a solução dorso-lateralmente no peixe na proporção de 1 ml para cada 100 g de peso do animal.

Deixar o animal em aquário bem aerado por 48 horas.

As preparações citológicas para estudo de cromossomos metafásicos somáticos foram realizadas a partir de células de rim posterior e anterior, obtidos *in vitro*. A técnica utilizada para obtenção de figuras mitóticas foi descrita por Foresti *et al.*, (1993) consiste em:

1. Injetar intraperitonealmente, fermento biológico. Deixá-lo nadando livremente em aquário com aeração;
2. Sacrificar o animal, retirando rins (porção cefálica e posterior);
3. Colocar os tecidos retirados em placa de petri contendo cerca de 6 ml de solução Hank's;
4. Dissociar o material procurando obter uma suspensão de células; para tal, primeiro dissociar o material com pinças de ponta fina e depois homogeneizar com auxílio de uma pipeta Pasteur ou seringa de vidro;
5. Pingar 2 gotas de colchicina 0,02% com pipeta de Pauster;
6. Ressuspender 10 vezes bem devagar;
7. Retirar a suspensão da placa de petri e colocá-la em tubo de centrifuga. Deixar o tubo no interior de uma estufa a 37°C por cerca de 15 minutos;
8. Retirar e por 10 minutos na centrifuga a 1.200 rpm;
9. Retirar o sobrenadante;
10. Pôr 6ml de kcl, ou complementar até chegar a 6ml;
11. Ressuspender 30 vezes;
12. Por na estufa 27 minutos a 37°C;

- 13 .Quando faltar 5 minutos, preparar o fixador e coloca-lo no gelo;
- 14 .Retirar da estufa e colocar 10 gotas de fixador gelado recém preparado;
(metanol e ácido acético na proporção de 3:1, respectivamente);
- 15 .Ressuspender 30 vez bem faquinho;
- 16 .Deixar repousar por 5 minutos à temperatura ambiente;
- 17 .Adicionar 6 ml de fixador gelado e ressuspender a solução 50 vezes. Levar à centrífuga (1200 ± 100 rpm) por 10 minutos;
- 18 .Retirar o sobrenadante e ressuspender o precipitado em 6 ml de fixador gelado. Centrifugar por 10 minutos a 1200 rpm;
- 19 .Retirar o sobrenadante e por 6 ml de fixador, ressuspender por 100 vezes bem forte e por 6 minutos na centrífuga a mesma velocidade;
- 20 .Repetir o item 8 por 2 vezes;

Preparar lâminas e pingar 2 gotas de material sobre cada uma. As lâminas devem estar sobre suporte no interior de um banho-maria a 60°C;

Para uma melhor caracterização e visualização dos cromossomos será utilizada a técnica básica de coloração por Giemsa.

5.2.1.2 *Análise Cariotípica*

As preparações cromossômicas foram analisadas com o auxílio de um microscópio de Luz. As melhores metáfases foram separadas para registro fotográfico utilizando o microscópio óptico (aumento de 1000x) , foram fotografadas fotomicroscópio com câmara Samsung SDC-415.

A princípio as fotos foram ampliadas com papel fotográfico. Em seguida, foram escaneadas com Scanner/Impressora HP Deskjet e resolução de 600 pixels. Os cromossomos foram recortados sendo feito o pareamento dos possíveis homólogos. A classificação cromossômica foi feita com o auxílio de um paquímetro determinando o comprimento dos braços dos cromossomos (braços maiores e braços menores) e o comprimento total do cromossomo. Estes foram identificados de acordo com a relação de braços (RB=comprimento do braço maior/comprimento do braço menor). O número fundamental (NF) foi determinado de acordo com o número de braços cromossômicos, considerando-se os metacêntricos,

submetacêntrico e subtelocêntrico como tendo dois braços. Aqueles cromossomos com somente um braço foram classificados como (Levan et al, 1964)

5.2.1.3 Montagem do Cariótipo

Para a montagem do cariótipo os cromossomos foram organizados em ordem crescente de tamanho, de acordo com as medidas efetuadas e os ajustes visuais (Levan et al, 1964)

5.3 Molecular

Para as análises moleculares o material coletado foi levado para laboratório de Ictiogenética da UFRB) onde se procedeu a organização das amostras e o início das extrações do DNA total, sendo que de cada ponto de coleta, foi preservado um espécime inteiro para posterior identificação.

De todos os indivíduos amostrados foram retirados uma porção de aproximadamente 1cm² da nadadeira caudal. Esse material foi identificado, rotulado, e estocado em álcool etílico comum (92,8°), na proporção de 1:3, em temperatura ambiente (banco de tecido), e acondicionado em tubos tipo Eppendorf. O DNA total de todos os exemplares amostrados foi extraído de acordo com o protocolo fenol: clorofórmio descrito por Sambrook e colaboradores (1989).

Após a extração foi colocado 100 µl de tampão TE (tris-EDTA) e deixado no banho-maria a 37°C, durante 48 horas, para diluir o DNA. No dia seguinte todas as amostras foram rotuladas e estocadas no freezer a -20°C, para a sua conservação e composição do banco genético "*in vitro*". Antes da estocagem em freezer as amostras foram levadas ao espectrofotômetro modelo Bioespecto SP22 para medir a concentração e o grau de pureza obtidos na extração.

A concentração e a qualidade do DNA isolado foram também avaliadas em gel de agarose 1,0%. Os padrões de amplificação de fragmentos de DNA flanqueados por seqüências repetitivas foram obtidos através do emprego da técnica de SPAR-PCR (*Single Primer Amplification Reaction-Polymerase Chain Reaction*), proposta por Gupta *et al.* (1994). Nessa técnica o DNA foi submetido à PCR, empregando-se *primers* tetranucleotídicos de seqüência repetitiva simples, o qual foi

selecionado a partir de testes preliminares com um total de oito *primers* diferentes: (TAGG)₄, (GGAC)₄, (GACA)₄, (GGAT)₄, (AAGC)₄, (CACT)₄, (GGGT)₄, e (AACC)₄. O DNA molde (5-10 ng) foi amplificado em um volume final de 30 µL contendo 10mM Tris-HCl, pH 8,4, 0,5 % nonidet P-40, 50 mM KCl, 5,0 mM MgCl₂, 100 µM de cada dNTP, 5 pmol de *primers* e 1,25 unidade de *Taq* DNA polimerase (Life Technologies).

O processo de amplificação ocorreu em 33 ciclos. Em cada ciclo, inicialmente o DNA foi desnaturado em elevada temperatura, em seguida a temperatura foi baixada para permitir o anelamento do *primer* em regiões homólogas encontradas no genoma. Logo em seguida deu-se uma elevação da temperatura para permitir a atuação da *Taq* polimerase e a síntese de polinucleotídeo complementar a uma das fitas da região intermediária entre dois sítios de anelamento do *primer* localizados em fitas opostas. Após a etapa de polimerização, o ciclo seguinte foi iniciado e novamente os componentes foram misturados.

A amplificação foi realizada em termociclador Eppendorf® Mastercycler Gradient. Os produtos de amplificação foram separados em gel de agarose 1,4% e corados com brometo de etídio (5 mg/L). A visualização dos padrões foi feita sob luz ultravioleta e os géis fotografados em sistema de fotodocumentação de gel.

6. RESULTADO E DISCUSSÃO

6.1 Resultados Citogenéticos

Os resultados obtidos por meio das preparações citogenéticas revelaram que a *Kalyptodoras bahiensis* possui $2n=58$ cromossomos e fórmula cromossômica $38M+8SM+8ST+4A$, tanto para exemplares machos como para os exemplares fêmeas.

Estes resultados corroboram com aqueles já descritos na literatura, onde o menor número diplóide encontrado é $2n=42$, e o maior número diplóide é $2n=62$ para o gênero *Siluriforme* (GARCIA *et al*, 2005). E é reafirmado com os dados visto na literatura para a família *Doradidae* onde observa-se a manutenção do número diplóide de $2n=58$ nas espécies estudadas sendo que o seu cariótipo é

principalmente constituído por elementos de dois braços. De todas as espécies da família Doradidae já estudada apenas uma, a *Trachydoras sp.* apresenta $2n=56$ uma situação única dentro do grupo (FENOCCHIO et al 1993 *apud* GARCIA, 2005).

Na análise das lâminas foi observado que as preparações citogenéticas ocorreram com sucesso devido a grande quantidade de metáfases encontradas. Analisando a morfologia dos cromossomos mitóticos, foi visualizado que estes encontravam-se bastante condensados, e que os cromossomos poderiam ser classificados em metacêntrico, submetacêntrico, subtlocêntrico e acrocêntrico, resultado, que concorda com outros já publicados para espécies do grupo (CAMILO, 2004) & (RIBEIRO, 2007).

Os dados obtidos com estas análises mostraram que do ponto de vista evolutivo dentro da família Doradidae, não é perceptível grandes variações. No entanto, quando se compara estes resultados com aqueles já descritos para todo o grupo Siluriforme nota-se uma maior distinção com relação ao número de cromossomos e a fórmula cromossômica relacionado a sua evolução (ENDO, 2006).

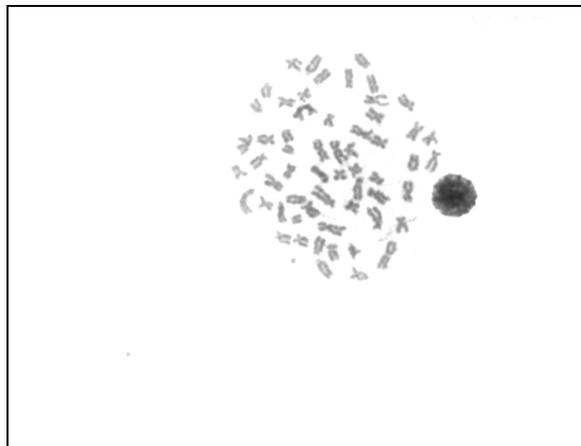


Figura 6. Cromossomos metafásicos de *Kalyptodoras bahiensis* submetidos a coloração convencional com Giemsa.

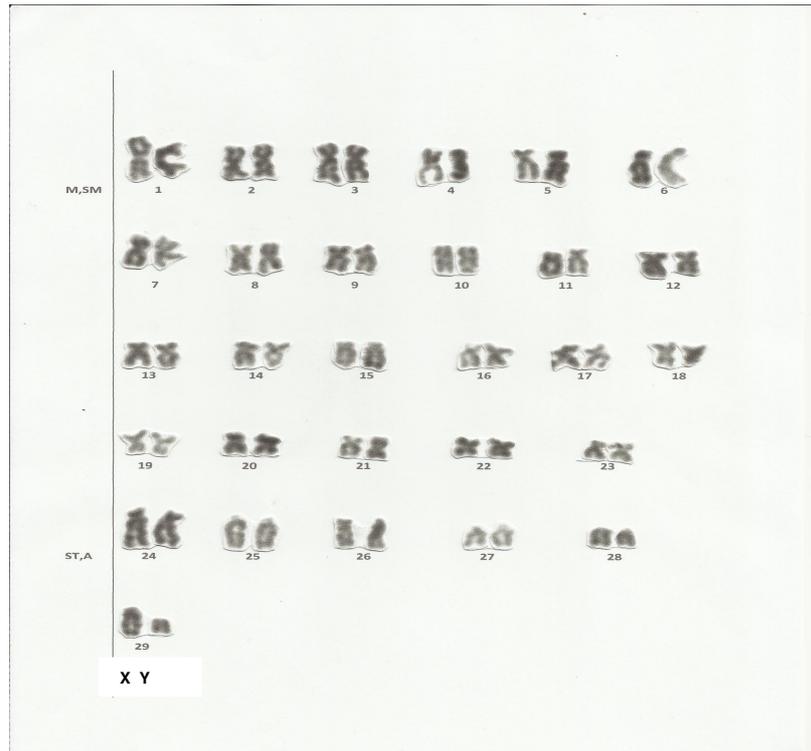


Figura 07: Cariótipo de *Kalyptodoras bahiensis* submetidos a coloração convencional com Giemsa evidenciando os 28 pares de cromossomos autossômicos (metacêntricos, submetacêntricos, subtlocêntrico e acrocêntrico) e o par 29 de cromossomos sexuais.

6.2 Genética Molecular

De todo o material analisado foi obtido boas concentrações de DNA em quase todas as amostras extraídas, variando entre $C = 30 \text{ ng}/\mu\text{l}$ e $C = 75 \text{ ng}/\mu\text{l}$. Pôde-se observar também que na maioria das extrações se conseguiu um grau de pureza excelente variando entre $P = 1,7$ e $P = 1,8$, sendo que o DNA considerado puro e de qualidade deve variar entre 1,7 a 2,0. Isto possibilitou um melhor aproveitamento das amostras.

Foi observado que a espécie *Kalyptodoras bahiensis*, foi encontrada, em nossas amostragens, na porção do médio e baixo Paraguaçu (Rafael Jambeiro, Fazenda Palmas, Bandeira de Melo, Fazenda Touros e Fazenda Deus Andou), indicando que essas áreas devem ser alvo de medidas de conservação e manejo para a preservação da espécie. Foi constatado que nas proximidades do município de Cabaceiras do Paraguaçu (baixo Paraguaçu), local influenciado pelo lago

formado pelo represamento das águas do rio Paraguaçu, a espécie em estudo não foi encontrada. Esses dados concordam com os achados por Santos (2005), que relata que a espécie em questão foi muito capturada no passado, a jusante da barragem Pedra do Cavalo e hoje não tem sido mais registrada nesse local. O mesmo autor refere que suas populações vem apresentando sinais de declínio em seus estoques nos outros locais de captura.

A partir do banco genético constituído, foi realizado um trabalho de caracterização genética por meio de marcadores moleculares do tipo microssatélites utilizando a técnica de SPAR-PCR. Dos oito *primers* testados dois (TAGG e AAGC) amplificaram e se mostraram informativos para a espécie estudada (Figura 8 e 9).

As ampliações refletiram diretamente a distribuição de sequências repetitivas simples no genoma dos espécimes analisados. Foram obtidos perfis eletroforéticos da espécie nos 5 locais amostrados, os quais apresentaram baixa variação nos exemplares analisados. Dessa forma, tornaram-se disponíveis dois marcadores diagnósticos padrão, ou seja, espécie-específicos, que caracterizaram *Kalyptodoras bahiensis*.

Os *primers* testados produziram diferentes padrões de SPAR onde um total de dois locus foi observado para ambos os marcadores. A variação de tamanho dos produtos amplificados ficou entre 492 a 738 e pb para o *primer* AAGC e 492 e 984 pb para o *primer* TAGG.

Neste trabalho os marcadores utilizados não apresentaram diferenças marcantes entre as populações analisadas e praticamente não discriminaram variações entre o genoma de indivíduos de uma mesma população. Os fragmentos obtidos nos indivíduos avaliados mostraram alto grau de monomorfismo entre os espécimes. As figuras 8 e 9 apresentam os produtos de amplificação gerados pelos *primers* AAGC e TAGG, respectivamente. Observa-se que o *primer* AAGC (Figura 8) apresentou um padrão de bandas com um primeiro locus com algum grau de polimorfismo no exemplar amostrado na Fazenda Deus Andou e um segundo com alto grau de monomorfismo em todas as amostras. Para o *primer* TAGG (Figura 9) o primeiro locus apresentou-se bastante monomórfico e o segundo mostrou algum grau de polimorfismo nas amostras coletadas na Fazenda Touros.

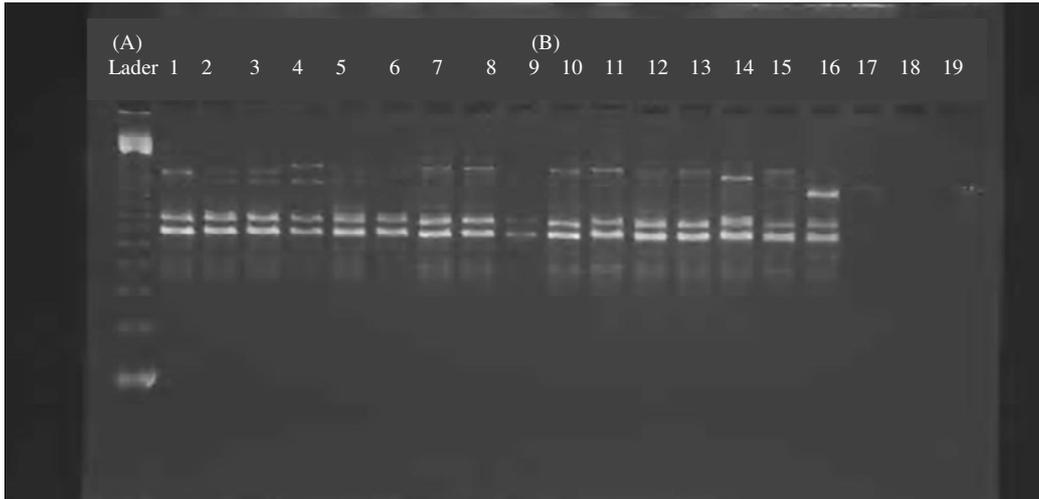


Fig 8. Produtos de amplificação gerados pelo *primer* (AAGC), na espécie *Kalyptodoras bahiensis*. (A) Marcador de peso molecular, 123 DNA ladder (GibcoBRL) e (B) *K. bahiensis* (pistas 1 a 19). Sendo pista 1 a 4 amostras da Fazenda Touros, de 5 a 8 amostras da Fazenda Palmas, 9 a 12 amostras de Bandeira de Melo, 13 a 15 amostras de Rafael Jambeiro e 16 a 19 amostras da Fazenda Deus Andou.

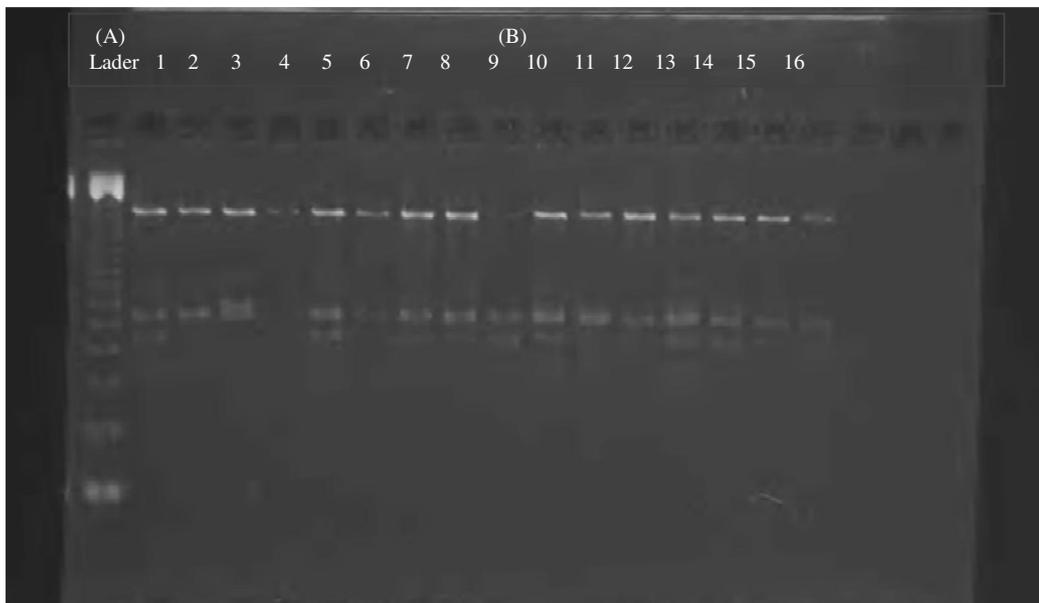


Fig 9. Produtos de amplificação gerados pelo *primer* (TAGG), na espécie *Kalyptodoras bahiensis*. (A) Marcador de peso molecular, 123 DNA ladder (GibcoBRL) e (B) *K. bahiensis* (pistas 1 a 19). Sendo pista 1 a 4 amostras da Fazenda Touros, de 5 a 8 amostras da Fazenda Palmas, 9 a 12 amostras de Bandeira de Melo, 13 a 15 amostras de Rafael Jambeiro e 16 a 19 amostras da Fazenda Deus Andou.

Os dois *primers* analisados produziram pouca diferença nos padrões de fragmentos de SPAR, com número de bandas nítidas e reproduzíveis geradas. Entre as populações foi possível verificar a pequena variação dos produtos amplificados. Ao analisar os perfis eletroforéticos dos diferentes indivíduos através da separação dos fragmentos de DNA, pôde-se observar a existência de poucas bandas espécie-específicas, ou seja, poucos fragmentos estão presentes em indivíduos de uma população e ausentes em outra, resultado que corrobora como os achados de (BIGNOTTO et al., 2002)

Marcadores moleculares, baseados na seqüências de microssatélites, têm possibilitado grande detecção de polimorfismo interpopulacional em comparação com marcadores morfológicos ou baseados na análise de proteínas. Neste trabalho, os fragmentos amplificados com os *primers* analisados constituíram marcadores estáveis apresentado pouca variação intraespecífica e interpopulacional entre os indivíduos avaliados.

Para os espécimes coletados na Fazenda Deus Andou e Fazenda Touros foi observado certo grau de polimorfismo apontando que os referidos locais necessitam de um olhar mais criterioso. Com isso pode-se inferir que esses locais devem ser alvo de programas que propõem o manejo visando contribuir para a proteção, conservação e uso do potencial genético (variabilidade genética) das populações selvagens de espécies nativas.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No processo de extração de DNA para que se obtenha um banco de material genético preservado de qualidade é necessário a obtenção de boas concentrações e ótimos graus de pureza do DNA, para que se possa posteriormente realizar outras investigações genéticas e de conservação.

O banco de biomateriais obtido em forma de DNA preservado "*in vitro*" poderá ser usado com eficiência em estudos genéticos utilizando marcadores moleculares a qualquer tempo;

Ao longo da evolução dos Siluriformes em particular aqueles representantes da família Doradidae, não foi possível perceber nenhuma mudança significativa no padrão cariotípico evidenciado através da manutenção do número e da fórmula

cromossômica que se mantiveram sem grandes alterações quando comparados com outros representantes da família Doradidae.

As informações citogenéticas e os dados moleculares obtidas irão permitir a delimitação de regiões que necessitam de preservação do potencial genético das espécies, além de fornecer subsídio para guiar futuros programas de cultivo, repovoamento e conservação desta espécie.

O material produzido nesse projeto servirá de base, para um instrumento importante na definição de uma política de monitoramento e conservação, do patrimônio genético de *Kalyptodoras bahiensis* como também dos ecossistemas aquáticos continentais, visando à preservação da biodiversidade e o uso responsável dos recursos genéticos de peixes neotropicais.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGOSTINHO, A. A. ; THOMAZ, S.M. ; GOMES, L.C(2005). **Conservação da biodiversidade em águas continentais do Brasil**. Megadiversidade, v. 1, n.1, p.70-78.

ALEXANDER, R.M. (1965). **Structure and function in catfish**. J. Zool., 148: 88-152.

ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; OLIVEIRA, C(1993). A citogenética de peixes no Brasil. In: X Encontro Brasileiro de Ictiologia, 1993. Anais. p, 347-376.

ALVES, C. B. M.;L, C. G. ;BRITO, M. F. G.;SANTOS,A.C. A(2008). **Biodiversidade e conservação de peixes do Complexo do Espinhaço**.Universidade Federal de Lavras, Lavras, Brasil. Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil.

Ana (2009-2010)Disponível:< (<http://www.ana.gov.br/pnrh/DOCUMENTOS/5Textos/69EcossistemasAquaticos.pdf>).>Acesso : 04 de setembro de 2010.

ARQUIVO PUBLICO MUNICIPAL. **Rio Paraguaçu e sua História**. Disponível em< <http://arquivomunicipaldesaofelix.blogspot.com/2010/05/rio-paraguacu-e-sua-historia.html>.Acesso em: 08 de outubro>Acesso em: 23 de fev 2010.

AZEVEDO, P(1972). **Piscicultura: Histórico, considerações gerais e perspectivas futuras**. In: Comissão Interestadual da Bacia Paraná-Uruguai. Poluição e piscicultura. São Paulo: Faculdade de Saúde de USP, Instituto de Pesca, p. 177-180

BAENA.E. **Imagens de bagre colocados em *Kalyptodoras bahiensis***. Disponível em:<http://acsi.acnatsci.org/base/image_list.html?mode=genus&genus=Kalyptodoras> Acesso em :01 de Jan de 2012.

BENITES, C.(2008) **Caracterização genética do pintado *Pseudoplatystoma corruscans*,(Spix & Agassiz,1829) (Siluriformes: Pimelodidae) da Bacia**

Paraná-Paraguai, por marcadores moleculares do tipo microssatélite.
Universidade Estadual Paulista.

BIGNOTTO, T.S; MANIGLIA, T.C.; GALDINO, J.C; PRIOLI,S.M.A.P; PRIOLI,L.M; JÚLIO JR,H.F; PRIOLI,A.J(2002). **Divergência Genética entre *Pseudoplatystoma Corruscans* (Pisces, Siluriformes) e *Pseudoplatystoma Fasciatum*, evidenciada pelo uso de marcadores moleculares SPAR.** Universidade Estadual De Maringá, Maringá – PR.

BORBA, R.S; PARISE-MALTEMPI, P.P; ALVES, A.L(2009). **Tendência da evolução cariotípica na família Heptapteridae (Telostei: Siluriformes).**
Universidade Estadual Paulista.Rio Claro SP.

BRAGA, R.A (1982). **Crescimento do tucunaré pinima, em cativeiro.** In: Departamento Nacional de Obras Contra as Secas. Coletânea de trabalhos técnicos do DNOCS. Fortaleza, p.101 – 109.

BRASIL. Instrução normativa no. 05, de 21 de maio de 2004. Brasília: **Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Ministério do Meio Ambiente, 2004.** p.136-142.

CALCAGNOTTO, D.; RUSSELLO, M.; DESALLE, R (2001). **Isolation and characterization of microsatellite loci in *Piaractus mesopotamicus* and their applicability in other Serrasalminae fish.** Molecular Ecology. 245-247.

CAMILO, F. M (2004).**Estudo ciogenéticos em algumas espécies de peixes da família loricariidae pertencente a Bacia do Rio Piracicaba.** Dicação de (Mestrado). Universidade Federal de São Carlos.

CASTRO, K.N; AVANIZ, M.V; GUEDES, S.A.A; OLIVEIRA, V.A ANÁLISE (2009). **Genética de Espécies do Gênero *Hypostomus* sp. Do rio Ivaí, através de Marcadores Moleculares ISSR CESUMAR – Centro Universitário Maringá – Paraná.** 27 a 30 de outubro de 2009

COLE, C.J. & LEAVENS, C.R (1971). **Chromosome preparations of amphibians and reptiles: improved technique.** Herp.. Rev., 3: 102.

MARTINS,C; FORESTI. P.F; WASKO, P.A; Leitão R. G; OLIVEIRA,C;FORESTI. **F.Marcadores genéticos e sua aplicação na piscicultura.** Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento - nº 28- setembro/outubro 2002.

ENDO, K. S (2006). **Análise citogenética de espécies da subfamília Hypostominae (SILURIFORMES, LORICARIIDAE) da bacia do alto rio Paraná.** Dissertação (mestrado). Universidade Estadual de Maringá. Paraná.

FARIAS, I.P.; HRBEK, T (2008). **Patterns of diversification in the discus fishes (*Symphysodon* spp. Cichlidae)**. *Mol. Phylogenet. Evol.*, doi:10.1016/j.ympev.2008.05.033

FELDBERG, E., PORTO, JIR. and BERTOLLO, L.A.C (1992). **Karyotype evolution in Curimatidae (Teleostei, Characiformes) of the Amazon region. 1. Studies on the genera Curimata, Psectrogaster, Steindachnerina and Curimatella**. *Rev. Brasil. Genet.*, vol. 15, no. 2, p. 369-383.

FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C.; LOPÉZ, P.A.; SANCHÉZ, S.; ALBERDI, A.J.; BORDENAVE, S.; Dib, M.C(1994). **Levantamento citogenético em peixes de água doce da Argentina: resumo das espécies estudadas**. *In: Anais do V Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada em Peixes Neotropicais*. Botucatu, SP. p. 8.

FENOCCHIO, A.S.; PASTORI, M.C.; LOPÉZ, P.A.; SANCHÉZ, S.; ALBERDI, A.J.; BORDENAVE, S.; Dib, M.C(1994). **Levantamento citogenético em peixes de água doce da Argentina: resumo das espécies estudadas**. *In: Anais do V Simpósio de Citogenética Evolutiva Aplicada em Peixes*.

FERREIRA, B.R.S(2007). **Variabilidade Génética da dpurada (*Brachyplatystoma rousseauxii*-Siluriforme:Pimelodidae), Na Bacia do rio Branco, Roraima, Amazônia brasileira**. Universidade Federal de Roraima. Boa Vista.

FONTELES-SANTOS, SBA.M FERNANDES, F.M.C., LOPES, CE., KULIKOSKI, R., KULIKOSKI, J.M. & ALMEIDA-TOLEDO, L.F. 2008 **Molecular markers in Chinese carps and their interspecific hybrids**. *Genetics and Molecular Biology* 28 (1) : 172-174.

GALETTI, P. M. **Tendências da evolução cromossômica dos nossos peixes. (uma síntese) In: SIMPÓSIO DE CITOGENÉTICA EVOLUTIVA E APLICADA DE PEIXES NEOTROPICAIS, 1994, Botucatu. Anais...** São Paulo: UNESP, 1994. p.31-32.

GALLETI JR. , P.M, ALMEIDA-PAIVA, J.C.; PORTELLA A.L.B.S.; SATO. Y E CARDOSO, E.L.(1981). **Estudos Citogenético de peixes do Rio São Francisco**. *Ciência e Cultura*. p. 668.

GARCIA, C.(2003). **Contribuições de estudos Citogenéticos de representantes de três Famílias de Siluriformes**. Monografia. Universidade de São Carlos. São Carlos,SP.

GARCIA, C.; MOREIRA FILHO, O(2005). **“Cytogenetical analyses in three fish species of the genus Pimelodus (Siluriformes, Pimelodidae) from rio São Francisco: considerations about the karyotypical evolution in the genus”**. *Neotropical Ichthyology*, v. 3, p. 285-290.

GODOY, M.P(1975). **Peixes do Brasil – subordem Characoidei: da Bacia do Rio Mogi Guassú**. Piracicaba: Ed. Franciscana, v. 4.

GUPTA, M., SINHA S., CHANDRA P. **Uptake and toxicity of metals in *Scirpuslacustris* L. and *Bacopa monniferi* L.** *J. Environ.Sci. Health.*, A29 (10): 2185-2202, 1994

GUPTA, M.; CHYI, Y. S.; ROMERO-SEVERSON, J.; OWEN, J. L. **Amplification of DNA markers from evolutionary diverse genomes using single primers for simple-sequence repeats.** *Theor. Appl. Genet.* 89: 998-1006. 1994

HILSDORF, A.W.S.; RESENDE, E.K.; MARQUES, D.K.S. **Genética conservação de estoques pesqueiros de águas Continentais no Brasil: situação atual e perspectivas.** Corumbá: Embrapa Pantanal, 2006. 43p.

HILSDORF, A.W.S.; ESPIN, A.M.A.; KRIEGER M.H.; KRIEGER, J.E. **Mitochondrial DNA diversity in wild and captivity population of *Brycon opalinus* (Cuvier, 1819) (Characiforme, Characidae, Bryconiae) in the Paraíba do Sul Basin, Brazil.** *Aquaculture*, v. 214, p. 81-91, 2002.

HILSDORF, A.W.S.; PETRERE JR., M. **Peixes da bacia do rio Paraíba do Sul: Aspectos de sua diversidade e conservação.** *Ciência Hoje*, v. 30, p. 62-65, 2002.

IBAMA. **Estatística da pesca 2004:** Brasil: grandes regiões e unidades da federação. Brasília: Coordenação Geral de Gestão de Recursos Pesqueiros, 2005. 136p. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/rec_pesqueiros/index.php?id_menu=93>. Acesso em: 21 mar. 2010

IBGE. **INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA.** Disponível em; <ftp://geoftp.ibge.gov.br/documentos/recursosnaturais/diagnosticos/paraguacu.pdf>. Zonamento geoambiental da Bacia do alto Paraguai. Acesso em: 10 de setembro 2010.

LACERDA, V.C. **Análises citogenéticas em espécies de peixes gymnotus (pisces, gymnotidae), coletadas no córrego fundo, Alfenas, Minas Gerais.** Universidade José do Rosário Vellano – UNIFENAS, mestrado em ciência animal Alfenas – MG 2005.

LEE, M.R.; ELDER, F.F.B. **Yeast stimulation of bone marrow mitosis for cytogenetic investigations.** *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 26, p. 36-40, 1980.

LEVAN, A. ; FREDGA K. ; SANDBERG, A. A. 1964. **Nomenclature for centromeric position on chromosomes.** *Hereditas*, 52: 201-220.

KASAHARA, S. (2001). **Práticas de Citogenética.** Universidade Estadual Paulista, Rio Claro 69p.

MARTINS, C. **Resumos Simpósio RIIA 2 – Manaus 28-30 Outubro 2009.** Departamento de Morfologia, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista Botucatu, SP.

MEDRADO, S.A (2009) **Citogenética de Peixes Neotropicais de Água doce.** Universidade Estadual de Santa Cruz pró-reitoria de pesquisa e pós-graduação

departamento de ciências biológicas programa de pós-graduação em genética e biologia molecular.

MENDONÇA, J.O.J.; MELO, J.S.C. (1994). INTRODUÇÃO. IN: **Seminário sobre criação de espécies do gênero Brycon**, 1, Pirassununga, SP. Anais Pirassununga: CEPTA, p. 1

MENEZES, N. A. 1996. **Padrões de distribuição da biodiversidade da Mata Atlântica do sul e sudeste brasileiro**: Peixes de Água Doce.. In: Workshop Padrões de Distribuição da Diversidade da Mata Atlântica do Sul e Sudeste Brasileiro

Ministerio do Meio Ambiente (2008). **Livro Vermelho da Fauna Brasileira Ameaçada de Extinção**.

MOYSÉS, C.B. 2005. **Diversidade genética, estrutura populacional e análises filogenéticas no gênero Eigenmannia (Pisces: Gymnotiformes)** São Paulo. Tese (Doutorado) Departamento de Genética e Biologia Evolutiva-Universidade de São Paulo.

NELSON, J.S. "**Fishes of the World**". 2. ed. New York: Wiley-Interscience, 1984. 523 p.

OLIVEIRA, C., ALMEIDA TOLEDO, L.F., FORESTI, F., BRITSKI, H.A. & TOLEDO FILHO, S.A. (1988). **Chromosome formulae of Neotropical freshwater fishes**. *Rev. Brasil. Genet.*, 11:577-624.

ORTI, G, ET AL. **PHYLOGENY OF THE Serrasalimidae(Characiformes)based on mitochondrial DNA sequences**: Depicting gene diversity and molecular markers. *in* Genetics and Molecular Biology. Sociedade Brasileira de Genetica : Abril 2008, volume 31,1. p. 342-351

PALMA, E. G. A. **Gestão do Território em Unidades de Conservação**: O caso da APA Lago de Pedra do Cavalo. Monografia de Especialização em Geografia do Semi-árido Brasileiro. Universidade Estadual de Feira de Santana. Feira de Santana: 2003.

PAXTON, J.R., ESCHMEYER, W.N. (1998). **Encyclopedia of fishes**. 2a. ed., Academic Press, San Diego.

PINNA, M.C.C. (1998). **Phylogenetic relationships of Neotropical Siluriforme: historical overview and synthesis of hypothesis**. In: **Phylogeny and classification of Neotropical Fishes** (eds. Malabarba, L.R. ; Reis R.E.; Vari, R.P.; Lucena, C.A.S.) Edpurcs, Porto Alegre-Brasil, pp.70-330.

REIS, R.E; KULLANDER, S.O; FERRARIS, C.J. **Check list of the freshwater fishes of The South and Central America**. Porto Alegre: Ed. PUCRS, 742 p., 2003.

RIBEIRO, H. B. (2007). **Estrutura e evolução cariotípica de peixes cichlídeos sul americanos** . Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

RIBEIRO, M et al . ; (2008 a 2009) Peixes de couro. **A principal característica dos Doradidae é a presença de uma fileira de placas ósseas na região mediana dos flancos.** Disponível em <http://ambientes.ambientebrasil.com.br/agua/pesca_esportiva_em_agua_doce/abotado_-_oxydoras_spp..html> Acesso em 21 de outubro 2009.

ROSA.S.R; COSTA,M.E.J.W; MENEZES.A.N; BRITSKI.A.H. COSTA, G.(2008) **.Didiversidade, padrões de distribuição e conservação dos peixes da caatinga.**http://www.culturaapicola.com.ar/apuntes/libros/Caatinga/08_caatinga_cap03_peixes.pdf.

SÁ F. P; FENERICH-VERANI, N; FRAGOSO.N.E.**Revista Ciência Hoje dezembro de 2003 • CIÊNCIA. ictiologia Espécies dos córregos e cabeceiras de rios do Brasil central devem ser conservadas Peixes do cerrado em perigo.**

SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F. & MANIATS, T.(1989). **Molecular cloning, a laboratory Manual.** 2a ed., Cold Spring Harbor, N.Y.

SAMBROOK ,J. FRITSCH EF AND MANIATIS T. (1989). **Molecular cloning.** A Laboratory Manual.2ºed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

SANTOS, A. C. A. S. (2005). **Distribuição e ecologia da peracuca, *Kalyptodoras bahiensis* Higuchi, Britski & Garavello, (Siluriformes, Doradidae) na bacia de rio Paraguaçu, no estado da Bahia.** Boletim Sociedade Brasileira de Ictiologia. N. 80. p. 5.

SANTEGES, D(2008-2009). **Rio Paraguaçu e sua história.** Disponível em< <http://arquivomunicipaldesaofelix.blogspot.com/2010/05/rio-paraguacu-e-sua-historia.html>> Acesso em 02 de fevereiro

SOUZA, J.I (2009-2010). **Fim de tarde Rio.** Disponível em< <http://www.flickr.com/photos/iurisouza/5590851246/>/. Acesso em 24 de junho de 2010.

SULLIVAN,J.P; LUNDEBERG,J.G & HARDDAMAN,M, (2006). **A Phylogenetic analysis of the major groups of castefishes (Teleostei: Siluriforme)using RAG-1 and RAG-2 nuclear gene sequences molecular Phylogenetic and Evolution,41:636-66**

TEDESCO.L.J.(2006). **Reconhecimento de padrões usando rede neuronal Artificial com uma função de base radial: uma aplicação na classificação de cromossomos humanos.** tese de doutoramento, engenharia de produção da Universidade Federal de Santa Catarina,capitulo 2. Disponível em: www.ufscar.br/~labcito/citog.htm. Citogenetica de peixes. Acesso em 22 de junho 2010.

TOLEDO-FILHO, S.; ALMEIDA-TOLEDO, L.F.; FORESTI, F.; GALHARDO, E.; DONOLA, E. **Conservação genética de peixes em projetos de repovoamento.** São Paulo, USP. 39 p. USP. Cadernos de Ictiogenética, 1992.

TORRES, R.A. ; MATOSSO, A.D; ARTONI, F.R. **Genética de peixes neotropicais. ii. biologia de peixes neotropicais, Neotropical fish genetics. ii. molecular biology of neotropical FISH.** Universidade Estadual de Ponta GROSSA (UEPG) Ci. Biol. Saúde, Ponta Grossa, 10 (2): 27-37, jun, 2004

VARI, R.P (1988). **O Curimatidae, uma planície família de peixes neotropicais (Pisces: Characiformes); Distribuição, Endemismo, e Biogeografia Filogenética.** Pp. 313-348 nos padrões de distribuição neotropical: Anais do Workshop 1987 (WR Heyer e PE Vanzolini, ed.) Academia Brasileira de Ciência Rio de Janeiro .

APÊNDICE

APÊNDICE 1- Número de animais e respectivos pontos de coleta georreferenciados.

| N° | Ponto | Localidade | Animal | Latitude | Longitudes |
|----|-------|------------------|--------|-----------------|----------------|
| 1 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 2 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 3 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 4 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 5 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 6 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 7 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 8 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 9 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 10 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 11 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 12 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 13 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 14 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 15 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 16 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 17 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 18 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 19 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 20 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 21 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 22 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 23 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 24 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 25 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 26 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 27 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 28 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 29 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 30 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |

| | | | | | |
|----|---|------------------|-------|-----------------|----------------|
| 31 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 32 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 33 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 34 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 35 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 36 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 37 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 38 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 39 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 40 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 41 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 42 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 43 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 44 | 3 | Igrejinha | vivo | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 45 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 46 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 47 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 48 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 49 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 50 | 4 | Rafael Jambeiro | morto | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 51 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 52 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 53 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 54 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 55 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 56 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 57 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 58 | 3 | Igrejinha | morto | -13° 01' 28,10" | 40° 40' 52,98" |
| 59 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 60 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 61 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 62 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 63 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 64 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 65 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 66 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 67 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 68 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 69 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |

| | | | | | |
|-----|---|------------------|-------|-----------------|-----------------|
| 70 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 71 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 72 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 73 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 74 | 4 | Rafael Jambeiro | vivo | -12° 32' 13,33" | 39° 48' 13,72" |
| 75 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 76 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 77 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 78 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 79 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 80 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 81 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 82 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 83 | 2 | Bandeira de Melo | vivo | -13° 02' 08,63" | 40° 48' 39,02" |
| 84 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 85 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 86 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 87 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 88 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 89 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 90 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 91 | 1 | Fazenda Palmas | vivo | 12° 56' 42,03" | 40° 28' 59,14" |
| 92 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 93 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 94 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 95 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 96 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 97 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 98 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 99 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 100 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 101 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 102 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 103 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 104 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 105 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 106 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 107 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 108 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |

| | | | | | |
|------------|---|----------------|-------|-----------------|-----------------|
| 109 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 110 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 111 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 112 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 113 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 114 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 115 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 116 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 117 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 118 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 119 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 120 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |
| 121 | 5 | Fazenda Touros | morto | -12° 41' 24,30" | -40° 07' 01,10" |